

**FUSARIUM MONILIFORME DU MAÏS EN NOUVELLE-CALÉDONIE :
TOXICOLOGIE ANIMALE (1)**

D. LAURENT* (*), F. PELLEGRIN (*), F. KOHLER (*), C. LAMBERT (**),
L. FOUQUET (*), J. DOMENECH (***), B. BOCCAS (****)

**FUSARIUM MONILIFORME ON CORN IN NEW-CALÉDONIA :
ANIMAL TOXICOLOGY.**

Summary

The hydrosoluble character of the toxin responsible for equine leucoencephalomalacia is confirmed by the artificial induction of the disease on a horse with an aqueous *Fusarium* extract.

An oesophageal probing test on a 20 days old rat enables the toxicity study during the chemical fractionation.

The presence of two toxins or toxical complexes, the one of light molecular weight (500-1000) and the other of a more important one (about 4-5000) is assumed. It seems that the synergy of both is necessary for an acute toxicity of the extract to appear.

KEY-WORDS: *Fusarium moniliforme* - Toxicity - Rats - Ducklings - Horse - Corn.

INTRODUCTION

En 1981, une épizootie s'est déclarée en Nouvelle-Calédonie chez une quarantaine de chevaux, entraînant la mort de cinq d'entre eux. Les premières investigations montrèrent que ces animaux avaient été intoxiqués par du maïs fortement contaminé par *Fusarium moniliforme*.

Deux ans plus tard, un nouveau cas d'empoisonnement permis de poser un diagnostic vétérinaire plus précis, montrant que le cheval était mort de leucoencéphalomalacie (LEM), après avoir ingéré du maïs infesté par ce même *Fusarium* (1).

La responsabilité de *Fusarium moniliforme* dans le déclenchement de cette maladie des équidés a par ailleurs été expérimentalement prouvée (4, 8), ce qui confirme la réalité du danger que représentent les mycotoxines dans l'alimentation des animaux et peut-être dans celle des hommes (6).

Un programme de recherche a donc été lancé pour essayer d'identifier, dans la population de *F. moniliforme* inféodée au maïs, les souches toxicogènes et leurs toxines.

TOXICOLOGIE

Comme il n'était guère possible, dans un premier temps, de tester la toxicité de *Fusarium moniliforme* sur le cheval, l'étude toxicologique sur des animaux de laboratoire mieux adaptés (le rat, la souris, le caneton et le poussin) a été envisagée.

(1) Communication présentée aux Vèmes Journées d'Etudes de l'Association A. Tessier, Paris, 25-27 Novembre 1987.

(*) Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, BP A5, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

(**) Service Vétérinaire et Protection Animale, BP 256, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

(***) BP 206, Bingerville, Côte-d'Ivoire.

(****) ORSTOM, 213, Rue Lafayette, 75480 Paris Cedex 10, France.

1) Essais *per os* sur rats

Après plusieurs essais, l'expérimentation par alimentation *per os* du rat de 20 jours a été retenue pour effectuer une évaluation du pourcentage de souches toxiques en Nouvelle-Calédonie (7).

Les isolats sont cultivés sur riz pendant trois semaines avec un taux d'humidité de 60 %. L'alimentation est distribuée quotidiennement sous forme de croquettes comprenant 50 % de riz infesté et 50 % d'un aliment complet du type aliment pour chien. L'expérimentation dure 14 jours. Les survivants sont sacrifiés et autopsiés.

Après avoir testé une cinquantaine de souches, il apparaît qu'une forte proportion d'entre elles induit une toxicité variable en intensité.

Tous les isolats administrés provoquent de l'anorexie et des troubles de l'assimilation qui s'amplifient avec les souches les plus toxicogènes en provoquant ictère, protéinurie et lésions hémorragiques du système digestif. La mort survient en moins de 14 jours avec 28 % de la population d'isolats.

2) Essais *per os* sur canétons

Suivant l'exemple de l'équipe du Professeur Marasas (5), nous avons lancé une expérimentation sur des canétons Pékin de un jour (3). Les premiers essais ont été effectués avec un aliment de base très équilibré qui masque la toxicité des souches. La même expérience avec un mélange à parts égales de maïs fusarien et d'aliment poulet du commerce a permis de confirmer la toxicité des souches sélectionnées par le test *per os* sur rats.

Les inconvénients de ces tests *per os* sont le temps de réponse important et le manque de précision dans l'évaluation de la quantité d'aliment toxique ingérée par l'animal.

Dans l'optique d'un test accompagnant des recherches chimiques, les expérimentations *per os* se sont donc révélées peu pratiques.

3) Administration par sonde oesophagienne chez le rat

Ceci nous a conduit à expérimenter et à retenir la méthode d'administration par sondage oesophagien, chez des lots de 4 rats de 20 jours, de différents extraits de cultures sur maïs ensemencé avec une souche toxique.

Plusieurs extractions ont été effectuées et la toxicité a été mise en évidence dans les extraits les plus polaires, en particulier dans l'extrait aqueux. Celui-ci est préparé par broyage dans de l'eau, macération sous agitation, centrifugation, puis lyophilisation du surnageant.

La toxicité est représentée par la courbe des gains moyens quotidiens en poids pour les rats ayant reçu l'extrait de la souche toxique de référence 68R, comparée à celle des rats traités avec une autre non toxique, la 68B (Fig. 1).

L'étude histologique a montré que les organes lésés sont les reins, le foie, l'estomac, le thymus et la rate.

4) Administration par sondage naso-oesophagien chez le cheval

Afin de corréliser cette toxicité enregistrée chez le rat à la leucoencéphalomalacie équine, un extrait aqueux toxique a été administré par sondage naso-oesophagien à une jument de 14 ans, pesant 320 kg.

La mort de l'animal survint au 15^{ème} jour après qu'il ait ingéré un équivalent poids de 15 kg de maïs fusarien, répartis en doses quotidiennes variant de 65 à 130 g d'extrait (équivalent: 0,75 à 1,5 kg de maïs).

Le suivi clinique pendant l'expérimentation a montré un épisode fugace de diarrhée à J+5, puis une reprise à J+13, l'apparition d'un ictère à J+11 qui s'accroît à J+14, une tachycardie importante et notable jusqu'à la mort, des signes nerveux modérés, décelables jusqu'à l'issue fatale (J+13 et J+14), ainsi qu'une perte d'appétit totale vers J+12. La surveillance des critères biochimiques sanguins et l'hématologie montrent que la

perturbation des fonctions hépatiques commence à J+7 et que l'atteinte musculaire ou myocardique, ainsi que rénale, ne se fait qu'en phase terminale. 161

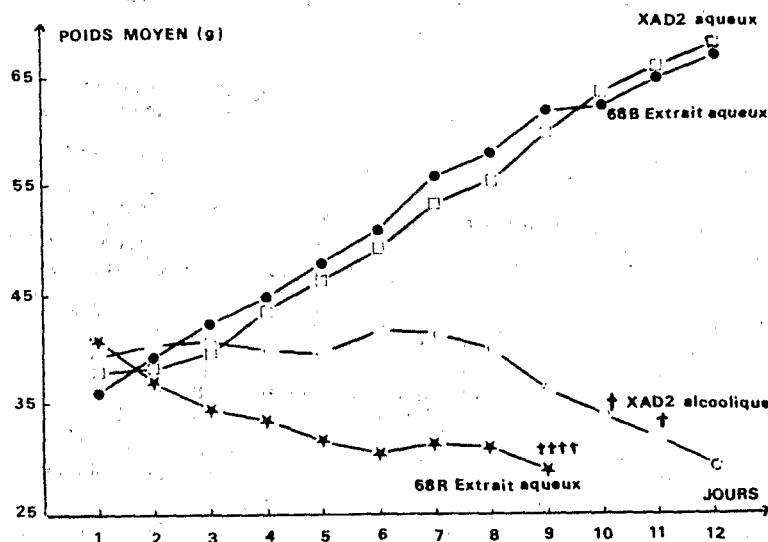


Figure 1 - Toxicité comparée entre deux extraits aqueux et entre les phases aqueuses et méthanoliques d'élution d'une résine XAD2 († = un mort)

Après autopsie, la mort de l'animal a été attribuée à des atteintes dégénératives cardiaques, hépatiques, rénales, digestives et encéphaliques.

Les lésions macroscopiques de l'encéphale, des reins et du foie sont en faveur de l'hypothèse de la L.E.M., hypothèse qui a été confirmée par la lecture des coupes histologiques.

FRACTIONNEMENTS CHIMIQUES

La présence de la (ou des) toxine (s) provoquant la L.E.M. ayant été confirmée dans les extraits aqueux, différents systèmes de fractionnements chimiques ont été essayés: extraction ou précipitation avec des solvants variés, centrifugation, filtration, adsorption sur différents supports.

Finalement, la résine Amberlite XAD2, qui permet d'éliminer 96 % en poids de l'extrait aqueux initial, a été retenue. Des fractionnements en fonction du poids moléculaire ont ensuite été effectués en utilisant des systèmes d'ultrafiltration ou de dialyse ainsi que des colonnes de Sephadex G25 (Fig. 2).

La toxicité de chaque fraction est étudiée par sondage oesophagien chez le rat et représentée, comme précédemment, par la courbe des gains moyens quotidiens en poids des rats traités.

A équivalent de poids de matière fraîche, la toxicité de la phase méthanolique éluante de la résine Amberlite XAD2 est très marquée (la phase aqueuse ne donnant aucun signe d'activité) (Fig. 1). Le premier volume d'élution de la colonne de Sephadex G25 semble contenir la toxine (Fig. 3). La présence de la toxine dans la fraction de poids intermédiaire 500 à 5000 est bien visible (Fig. 4). La restauration de la toxicité en combinant les deux fractions de moyenne toxicité de poids moléculaire 0-1000 et 1000-5000 est exemplaire (Fig. 5) et l'hypothèse d'une synergie qui en découle est vérifiée par une autre expérience de combinaison entre les fractions précipitées et solubles dans l'acétone (Fig. 6).

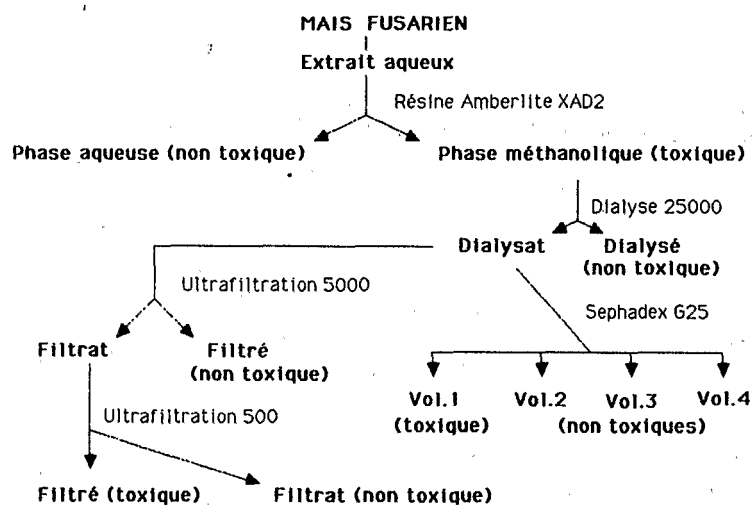


Figure 2 - Schéma de fractionnement

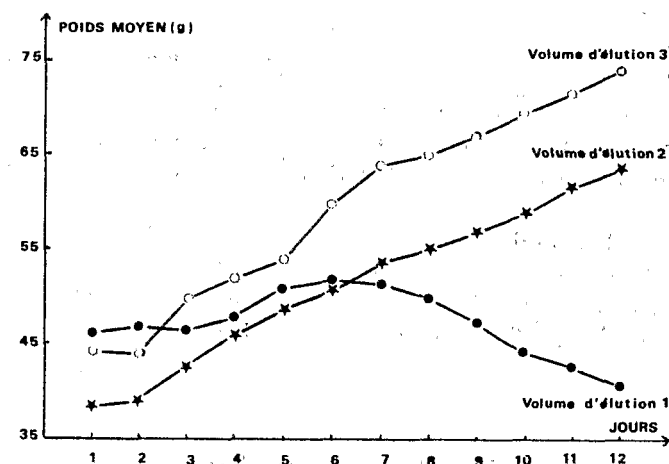


Figure 3 - Toxicité comparée entre les fractions d'éluion d'une colonne de Sephadex G25

CONCLUSION

Ces différentes expériences sont en faveur de la présence de deux toxines ou complexes toxiques, l'un de faible poids moléculaire (500-1000), et l'autre de poids moléculaire plus conséquent, de l'ordre de 4000 à 5000. La synergie des deux est, semble-t-il, nécessaire pour l'expression de la toxicité aiguë de l'extrait.

Cette observation, également faite dans d'autres essais toxicologiques (injections intrapéritonéales chez le rat et la souris, inoculations sur oeufs embryonnés de poule), va dans le sens de la double action des toxines de *F. moniliforme* chez le cheval : actions hépatique et rénale et syndrome de L.E.M. (2, 4).

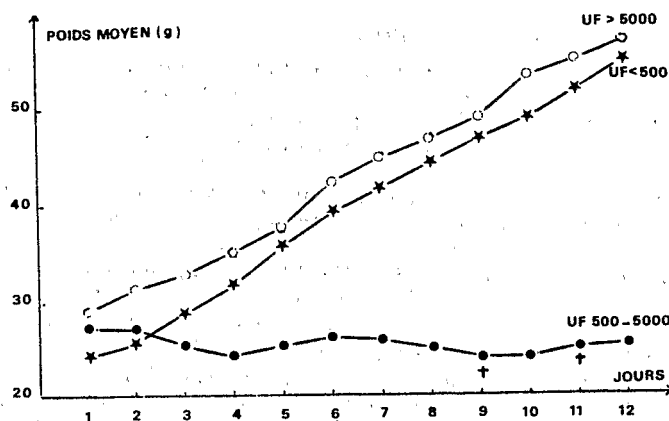


Figure 4 - Toxicité comparée de fractions d'ultrafiltration († = un mort)

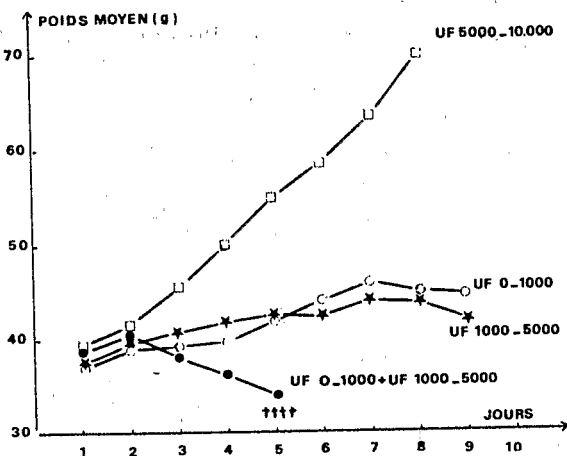


Figure 5 - Toxicité comparée de fractions d'ultrafiltration († = un mort)

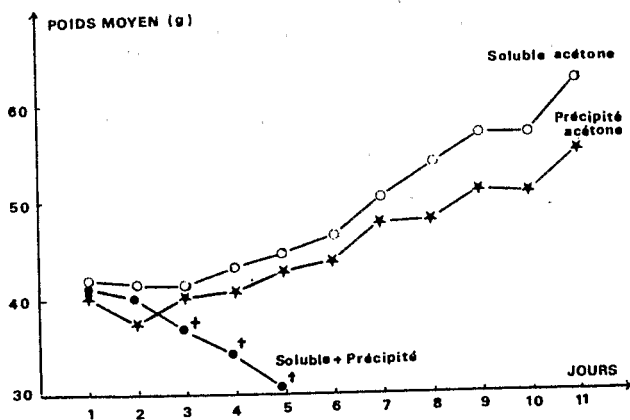


Figure 6 - Toxicité comparée des fractions précipitée et solubilisée par l'acétone et de l'extrait de départ reconstitué († = un mort)

BIBLIOGRAPHIE

- (1) DOMENECH J., BOCCAS B., PELLEGRIN F., LAURENT D., KOHLER F., MAGNOL J., LAMBERT C. - Equine leucoencephalomalacia in New Caledonia. *Aust. J. Vet.*, 1985, **62** (12), 422.
- (2) KELLERMAN T.S., MARASAS W.F.O., PIENAAR J.G., NAUDE T.W. - A mycotoxicosis of Equidae caused by *F. moniliforme* Sheldon. A preliminary communication. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1972, **39**, 205-208.
- (3) LAURENT D., PELLEGRIN F., KOHLER F., LAMBERT C., HAMEURT J., BOCCAS B., DOMENECH J. - Toxicité aiguë sur canetons Pekin de souches de *Fusarium moniliforme* isolées du maïs en Nouvelle-Calédonie. *M.A.N.*, 1987, **5**, 11-15.
- (4) MARASAS W.F.O., KELLERMAN T.S., PIENAAR J.G., NAUDE T.W. - Leucoencephalomalacia: a mycotoxicosis of Equidae caused by *F. moniliforme* Sheldon. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1976, **43**, 113-122.
- (5) MARASAS W.F.O., KRIEK N.B.J., STEYN M., VAN RENSBURG S.J., VAN SCHALKWYK D.J. - Mycotoxicological investigation on Zambian maize. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 1978, **16**, 39-45.
- (6) MARASAS W.F.O. - *Fusarium moniliforme*: a mycotoxicological miasma, in P.S. STEYN and VLEGGAAR R. (eds), *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elseviers Science Publishers B.V. (Amsterdam), 1986, 19-28.
- (7) PELLEGRIN F., LAURENT D., KOHLER F., HAMEURT J., DOMENECH J., BOCCAS B. - Potentiel toxigène des souches de *Fusarium moniliforme* parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie. *M.A.N.*, **4**, 157-161.
- (8) WILSON B.J., MARENPOOT R.R. - Causative fungus agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *Vet. Rec.*, 1971, **88**, 484-486.