

Microbiologie
Aliments
Nutrition

Microbiology - Foods and Feeds - Nutrition
Microbiologia - Alimenti - Nutrizione
Mikrobiologie - Nahrungsmitteln - Ernährung
Microbiología - Alimentos - Nutrición

Fonds Documentaire ORSTOM



010005664

Publication périodique éditée par la société I.E.E.N.A
avec le concours scientifique de l'Association A. TESSIER

ABONNEMENTS 1988

- France métropolitaine, départements et territoires français d'Outre-Mer (prix T.T.C.)
- Abonnement annuel (4 fascicules) 450 F.F.
- Le numéro (franco) 140 F.F.

Etablir la commande et le titre de paiement au nom de :

Société I.E.E.N.A. - 2, Av. Salengro - 92290 Châtenay-Malabry (France)
(B.N.P., Agence de Sceaux, 27 rue Houdan - 92330 Sceaux
Code Banque : 3004 - Code guichet : 01496 - N° de compte : 240286 23).

Les abonnements partent du premier numéro de l'année.

SUBSCRIPTION 1988

- Annual subscription (4 issues)
 - Belgium, Czechoslovakia, Denmark, East Germany, West Germany, Great-Britain, Greece, Hungria, Ireland, Italy, Luxemburg, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Switzerland, Spain, Sweden, Yugoslavia 450 F.F.
 - Other countries of Europa, America, Asia, Africa, Oceania, (air mail charges paid) 450 F.F.
 - One copy (postage paid-all countries) 140 F.F.

Subscription order and payment should be send to :

Société I.E.E.N.A. - 2, Av. Salengro - 92290 Châtenay-Malabry (France)
(Banque Nationale de Paris - Agence de Sceaux, 27 rue Houdan - F. 92330 Sceaux
30004 - 01496 - Account number 240286 23).

The subscription will run from January to December

**LA TOXICOGENESE CHEZ *FUSARIUM MONILIFORME* :
INFLUENCE DE L'INOCULUM ET DE LA METHODE DE CULTURE
SUR LE POTENTIEL TOXICOGENE ⁽¹⁾**

F. KOHLER* (*), F. PELLEGRIN (*), D. LAURENT (*)

FUSARIUM MONILIFORME: TOXICOGENESIS

Summary

It is well known that *Fusarium moniliforme* strains lose their toxicity in the course of *in vitro* conservation. Further study shows that the choice of inoculum and the method of cultivation enable to restore toxicogenesis in "anatoxic" strains (strains which have loss their toxicogenicity) and induce it in atoxic isolates. It appears from these first observations that the sole pionnotal form which favours the formation of macroconidia is toxicogenic whereas the aerial mycelium that produces microconidia is not.

KEY-WORDS: *Fusarium moniliforme* - Macroconidia - Microconidia - Toxicogenesis.

INTRODUCTION

A la suite de plusieurs observations de cas de leucoencéphalomalacie équine et dans le cadre d'une enquête épidémiologique concernant la fusariose du maïs en Nouvelle-Calédonie, nous avons procédé durant les années 1983-1985 à l'isolement systématique de souches de *Fusarium moniliforme* récoltées sur épis, feuilles, tiges ou grains en silos (7).

Une centaine de ces isolats a été ainsi réunie et conservée en tubes, sur milieu PDA ou sur vermiculite additionnée de milieu nutritif liquide. Les extraits aqueux ont été testés sur de jeunes rats albinos et, suivant le rapport GMQ/CMQ (Gain Moyen Quotidien/Consommation Moyenne Quotidienne), classés d'après leur toxicité (7).

Il devint évident en 1986 et 1987 que plusieurs souches avaient perdu leur pouvoir toxigène (souches "anatoxiques"), et principalement l'une d'entre elles, nommée "68", qui servait de référence et dont les extraits constituaient la base des études chimiques entreprises en vue de déterminer la (ou les) toxine (s) responsable (s) de la leucoencéphalomalacie équine.

Cette perte de toxicité, après un certain temps de conservation, des souches de champignons toxigènes est un phénomène bien connu et souvent constaté dans les mycothèques des laboratoires travaillant sur les mycotoxines (6). Sous peine d'être bloqué dans l'avancement de nos travaux, il devint alors impératif d'appréhender l'origine de cette perte de toxicité et d'essayer de la combattre.

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

(*) Laboratoire de Phytopathologie, O.R.S.T.O.M., B.P. A5, Nouméa, Nouvelle-Calédonie

L'isolat de référence [68] avait été cloné en 1984 et ainsi séparé en deux souches, l'une blanche à revers crème (68B), atoxique, l'autre blanche à revers rosé (68R), qui seule se révéla toxigène.

C'est en étudiant cette différence qu'il apparut qu'il ne s'agissait ni d'une coloration du mycélium, ni d'un pigment diffusant dans le milieu de culture, mais que la couleur rose-saumon de la 68R était due à la présence, sous le mycélium aérien, de sporodochies productrices de macroconidies. La souche blanche, elle, ne produit pas ces éléments sporifères, mais uniquement des microconidies en chaînettes (1-5).

Les deux types de spores (micro - et macroconidies) de la souche de référence de *F. moniliforme* ont été repiqués séparément sur milieu P.D.A. et il fut alors possible d'obtenir d'une façon régulière deux types morphologiques de thalles nettement différenciés :

- Un thalle de type "1", aérien, floconneux, blanc à revers crème, produisant exclusivement des microconidies en chaînettes.
- Un thalle de type "2", ras, humide, en plage grumeleuse de couleur rose-saumon et produisant un très fort pourcentage de macroconidies (thalle pionnotal) (5).

Les spores, issues de chacun de ces deux morphotypes, servent d'inoculum afin d'ensemencer un substrat constitué de grains de maïs selon le protocole suivant :

1 - Microconidies :

Le thalle de type 1 est cultivé en boîte de Petri sur milieu P.D.A.. Après 7-8 jours de croissance, la gélose est découpée et les morceaux sont placés dans une fiole contenant de l'eau stérile.

Après agitation, la suspension de microconidies, vérifiée au microscope, sert à ensemencer le maïs humidifié à 70 % et stérilisé une heure à 120°C (200 ml d'eau ajoutée à 300 g de grains placés en Erlenmeyer de 2 litres).

L'extraction est effectuée après 20 jours de croissance à 25°C.

Il faut noter que cette méthode de culture fut utilisée jusqu'à la constatation de la perte de toxicité des souches de référence (4).

2 - Macroconidies :

Le thalle de type 2 est cultivé selon la méthode suivante :

a - Technique de production de macroconidies en vue de la préparation de l'inoculum

- Repérer les sporodochies sous le mycélium aérien à microconidies.
- Retirer ce mycélium en le détachant de la surface de la gélose à l'aide d'un scalpel.
- Gratter la surface des sporodochies ainsi dégagées.
- Faire une suspension de macroconidies dans un tube d'eau stérile.
- Vérifier au microscope.
- Etaler une goutte de la suspension sur P.D.A. ou P.D.A. + antibiotiques.

Après quelques (3-4 jours), la forme pionnotale se développe en plage pustuleuse, rase, humide, de couleur saumon-orangée.

Cette gelée de macroconidies, mise en suspension, sert d'inoculum pour ensemencer les grains de maïs.

b - Technique de production du mycélium toxigène

- Dans un Erlenmeyer de 2 litres, stériliser pendant 1 h 30 à 120°C, 300 g de grains de maïs humidifiés avec 80 ml d'eau.
- Ensemencer avec 20 ml d'une suspension de macroconidies.
- Disperser l'inoculum en secouant les grains.
- Incliner l'Erlenmeyer.
- Laisser se développer le mycélium durant 4 à 5 jours, à la température du laboratoire.
- Transvaser les grains envahis dans des boîtes de Petri de 30 cm de diamètre en les étalant.

- Quotidiennement sécher les couvercles des boîtes en les essuyant avec des tampons de papier absorbant stérilisés au four Pasteur, afin d'abaisser progressivement l'humidité ambiante tout en évitant le dessèchement.
- Laisser se développer le thalle jusqu'à l'apparition des sporodochies (pustules ou plages de couleur orange-saumon), soit environ 15 jours après le changement de récipient.
- Après une vingtaine de jours de croissance, procéder à l'extraction aqueuse de la culture (4, 7).

RESULTATS ET DISCUSSION

La toxicité des extraits aqueux issus de ces deux types de cultures est testée sur rats albinos de 20 jours, par sondage oesophagien. Les résultats sont les suivants :

- L'extrait issu d'une culture privilégiant la formation de microconidies n'est pas toxicogène ; la courbe de croissance des rats ayant ingéré ce produit suit la même pente ascendante que celle d'animaux ayant reçu des extraits de souches non toxiques ou anatoxiques. Ces courbes sont également comparables à celle des rats témoins ne subissant pas de sondage oesophagien (Fig. 1).
- En revanche, l'extrait de la culture sur maïs d'un thalle à macroconidies est fortement toxicogène. Les rats meurent 24 à 48 heures après l'ingestion de l'extrait total ; un effet dose est observé après dilution de celui-ci au 2/3, 1/2 et 1/3 (Fig. 1).

Après une première mise en évidence de la différence de toxicogénèse entre ces deux modes de croissance du mycélium, le phénomène a pu être reproduit régulièrement à partir d'extraits de culture du type pionnotal :

- D'une part en restaurant la toxicogénèse chez deux souches anatoxiques, la première, "110", isolée par nous-mêmes, la seconde, "MRC 826", provenant du laboratoire du Professeur W.F.O. Marasas en Afrique du Sud (Fig. 2).
- D'autre part en l'induisant chez la souche atoxique "68B" (Fig. 3).

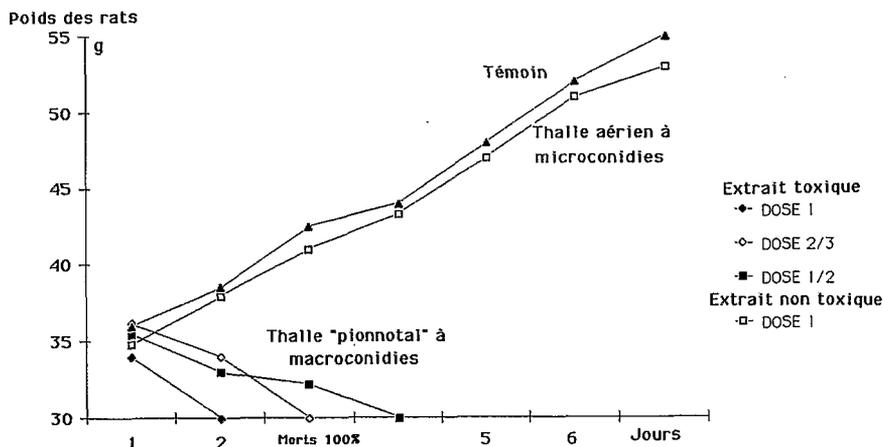


Figure 1 - Restauration de la toxicogénèse chez une souche anatoxique (68R)

Pour ce faire et principalement dans le deuxième cas, l'inoculum de macroconidies a été réalisé à partir de sporodochies, souvent rares et très petites sous le mycélium aérien. Ces résultats sont encore trop récents pour que l'on puisse donner une explication définitive à cette méthode d'induction ou de restauration de la toxicogénèse chez *Fusarium moniliforme* ; cependant au vu de ces observations quelques hypothèses peuvent être émises :

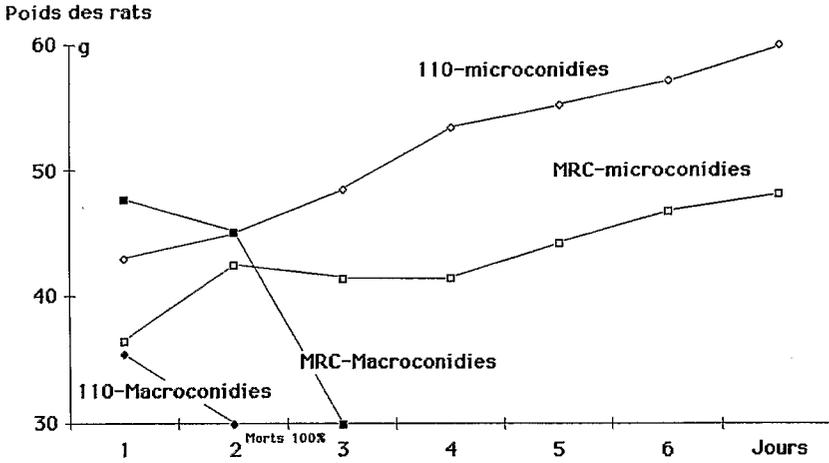


Figure 2 - Restauration de la toxicogénèse

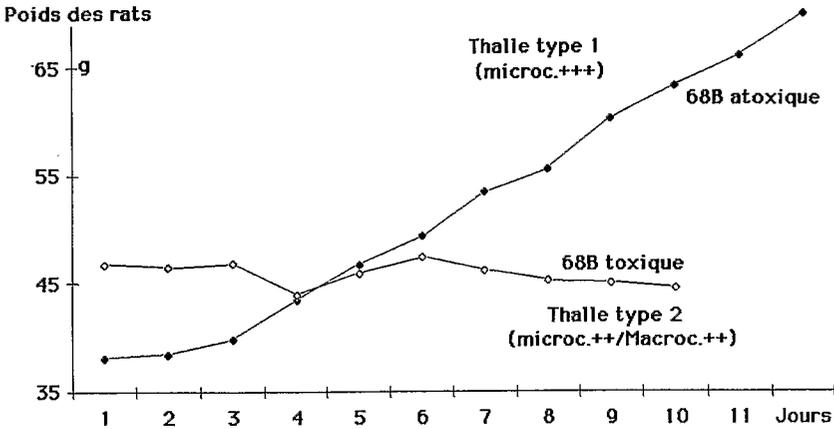


Figure 3 - Induction de la toxicogénèse chez une souche atoxique

- L'atoxicité ou l'anatoxicité pourrait avoir comme origine l'absence, ou la perte de capacité d'une souche, à induire la formation des organes de production des macroconidies (2). Le morphotype 2 à macroconidies serait toxigène grâce à un métabolisme différent de celui du type 1 à microconidies.

- La perte de la toxicité s'expliquerait par le fait que, sur un milieu artificiel et au cours du temps, le mycélium à microconidies majoritaires prédomine et semble être l'évolution naturelle d'une souche subissant des repiquages successifs.

- Lors de la conservation en silos de grains contaminés, le thalle, selon les conditions de sa croissance, évoluerait vers l'un ou l'autre type, ce qui expliquerait l'apparition de cas fortuits de toxicité induisant la leucoencéphalomalacie équine dont l'étiopathologie est encore mal connue. On constate en effet que, contrairement au thalle de type 1 qui se développe dans une ambiance de forte humidité, le morphotype 2 demande une atmosphère plus sèche, assez proche de celle de la conservation des grains chez certains éleveurs, producteurs de leur provende (3, 8). La présence de sporodochies sur les grains durant la conservation pourrait alors donner une indication sur les risques de toxicité d'un aliment.

- De même, après l'induction de la toxicité chez une souche atoxique, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que, pratiquement, tous les isolats de *Fusarium moniliforme*, qui produisent en conditions favorables des sporodochies en nombre suffisant, ont un potentiel toxicogène.

Des études sont en cours qui ont pour but d'expliquer ces observations récentes sur la toxicogénèse de *Fusarium moniliforme* et d'appliquer cette méthode à d'autres espèces du genre.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BOOTH C. - The Genus *Fusarium*. C.A.B. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1971
- (2) FOLLIN J.C., LAVILLE E. - Variations chez le *Fusarium oxysporum f. cubense*. Comportement des lignées issues des différents organes de multiplication - Fruits, 1966, 21 (6), 261-268.
- (3) GOTH R.W., JOHNSTON S.A. - Induction of macroconidium formation in *Fusarium moniliforme*. Mycologia, 1981, 73, 282-287.
- (4) LAURENT D., PELLEGRIN F., KOHLER F., LAMBERT C., FOUQUET L., DOMENECH J., BOCCAS B. - *Fusarium moniliforme* du maïs en Nouvelle-Calédonie. Toxicologie animale. M.A.N., 1988, 6, 159-164.
- (5) NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., MARASAS W.F.O - *Fusarium* species. An illustrated Manual for identification. Pennsylvania State University Press 1983.
- (6) NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., COOK R.J. - *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy. Pennsylvania State University Press, 1981.
- (7) PELLEGRIN F., LAURENT D., KOHLER F., HAMEURT J., DOMENECH J., BOCCAS B. - Potentiel toxicogène des souches de *Fusarium moniliforme* parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie. M.A.N., 1986, 4, 157-161.
- (8) SUNG J.M., LEE E.J., PARK J.S. - Effect of water potential on mycelial growth, reproduction and spore germination by *Fusarium moniliforme*. Korean Journal of Mycology, 1984, 12 (3), 99-103.