

CONVENTIONS

SCIENCES DE LA TERRE

PHYTOPATHOLOGIE

1987

La fusariose du maïs
et les mycotoxines fusariennes
en Nouvelle-Calédonie

RAPPORT SEMESTRIEL
JANVIER - JUIN 1987
CONTRAT DE RECHERCHE
C.E.E./ORSTOM
N° TSD - A - 244 - F - (3)

LA FUSARIOSE DU MAIS EN NOUVELLE-CALEDONIE

--o00o--

Rapport semestriel sur les recherches effectuées de janvier
à juin 1987.

- F./PELLEGRIN, F./KOHLER, L.FOUQUET, J./KONGHOULEUX.
Laboratoire de phytopathologie du Centre O.R.S.T.O.M. de Nouméa.
- D.LAURENT.
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles du Centre O.R.S.T.O.M. de Nouméa.
- C.LAMBERT.
Laboratoire de Diagnostics Vétérinaires de Port-Laguerre.
- L.COLLET.
Centre de Recherche et d'Expérimentation Agronomiques.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
PHYTOPATHOLOGIE	2
A - Recherche de variétés résistantes	2
B - Physiologie de l'infection	2
1-Isolements sur milieux sélectifs	
2-Mesure par scintillation	
3-Historadiographie	
CHIMIE - TOXICOLOGIE	9
A - Oeufs embryonnés	9
B - Chromatographie sur couche mince	10
1-Nature de l'extrait	
2-Mise en place de la série éluotrope	
3-Révélation des plaques	
4-Choix des systèmes de solvants	
5-Conclusion	
6-Chromatographie sur couche mince	
C - Solubilisation de l'extrait-Solvants organiques	14
D - Extractions par solvants organiques	15
E - Colonnes de silice	18
F - Cascades de dialyses	19
G - Colonnes XAD2 Amberlite	22
H - Sephadex	24
I - Ultrafiltration Amicon	29
J - Recherche de moniliformine	31
K - Dosage des sucres totaux	32
L - Conclusion	34

LEUCOENCEPHALOMALACIE EQUINE	37
A - Note préliminaire	37
B - Compte rendu clinique	37
1-Examen physique	
2-Contrôle de la consommation alimentaire	
3-Biochimie urinaire	
4-Biochimie sanguine	
5-Hématologie	
6-Synthèse clinique	
C - Compte rendu nécropsique	43
D - Compte rendu histologique	50
1-Système nerveux	
2-Organes urinaires et génitaux	
3-Appareil digestif	
4-Appareil respiratoire	
5-Organes hémoiétiques et appareil circulatoire	
6-Bilan histologique	
7-Discussion	
E - Conclusion générale	65
HISTOLOGIE CHEZ LE RAT	66
A - Note préliminaire	66
B - Lames lues à l'ENVT	66
C - Modalités de lecture	66
D - Lésions observées	67
1-Lésions rénales	
2-Lésions hépatiques	
3-Lésions gastriques	
4-Lésion thymique	
5-Lésion splénique	
E - Discussion	69

INTRODUCTION

Ce rapport du quatrième semestre est le dernier rapport de campagne avant le compte rendu de synthèse qui paraîtra en Novembre 1987. En effet, la Commission de la CEE gérant du contrat nous a accordé une prolongation de 6 mois permettant d'achever certaines opérations de recherche.

Nous évoquerons dans ce rapport successivement les recherches poursuivies sur les thèmes suivants :

Sur le plan phytopathologique

- Poursuite de la recherche de variétés résistantes à Fusarium moniliforme
- Physiologie de l'infection : nous détaillerons les résultats obtenus par autoradiographie.

Sur le plan chimique et toxicologique

- Procédés chimiques mis en oeuvre pour fractionner et purifier les extraits fusariens.
- Toxicologie associée aux fractionnements chimiques.
- Histologie de la toxicité sur rats et cheval.
- Mise en place de nouveaux tests toxicologiques.

PHYTOPATHOLOGIE

A - RECHERCHE DE VARIETES RESISTANTES

Les trois variétés précédemment retenues comme semblant présenter une bonne résistance à Fusarium moniliforme pendant le cycle de saison chaude (cycle court) ayant exprimé leur sensibilité pendant le cycle de saison fraîche (cycle long), nous avons sélectionné deux nouvelles variétés (G 491 et ILONGA 8032) dans un essai intervariétal de saison fraîche.

Ces deux nouvelles variétés devaient être intégrées à l'essai intervariétal de saison chaude ainsi qu'à un essai en serre avec apport massif d'inoculum.

Le Centre de Recherches et d'Expérimentation Agronomiques (C.R.E.A.) n'a pas eu la possibilité de mettre en place l'essai intervariétal annuel de saison chaude car les semences sont arrivées non accompagnées d'un certificat phytosanitaire. Elles ont donc été refoulées par les services du contrôle phytosanitaire.

L'essai en serre a été mis en place le 12 février 1987 à raison de 20 plants par variétés, inoculés massivement par un mélange de souches 68B et 68R cultivées sur un extrait de Pomme de Terre.

Ces plants ont reçu les doses habituelles d'engrais et seront récoltés incessamment. Des isolements seront pratiqués au niveau des noeuds et des épis.

B - PHYSIOLOGIE DE L'INFECTION

Le rapport précédent décrivait la technique d'historadiographie mise en oeuvre pour visualiser la présence de Fusarium moniliforme dans son hôte. Nous allons en exposer les résultats.

Les prélèvements ont été effectués après des temps de croissance de : 24 jours, 38 jours, 53 jours, 73 jours, 140 jours.

Chaque prélèvement a été analysé de la façon suivante :

- 2 plants ont été fragmentés puis repiqués sur un milieu sélectif composé de P.D.A. (Potato, Dextrose, Agar) additionné d'antibiotiques.

- 2 plants ont été échantillonnés en tranches fines broyées mécaniquement puis immergées dans de l'Aquasol II. Un double comptage en scintillation a été effectué à l'aide

d'un scintillateur Packard Tri - Carb 300. Le premier comptage dans la zone basse énergie (CPMA de 0 à 156 KeV) le second dans la zone haute énergie (CPMB de 4 à 156 KeV)

- 2 plants ont été traités pour être analysés par historadiographie selon la technique suivante : prélèvement de la tige, fixation dans du F.A.A, rinçage, coupes, fixation des coupes sur lames de verre, stripping avec du film Kodak AR 10, séchage avec chlorure de Calcium, exposition en chambre noire, révélation, fixation, rinçage, examen microscopique.

1 - Isolements sur milieu sélectif.

Prélèvement 24 jours :

plant 1 découpé arbitrairement en 18 "rondelles" de 2 mm d'épaisseur. Isolements positifs du noeud 1 à 9.

plant 2 découpé en 20 "rondelles". Isolements positifs du noeud 1 à 11.

Prélèvement 38 jours :

plant 1, 15 noeuds prélevés. Isolements positifs jusqu'au noeud 4.

plant 2, 12 noeuds prélevés. Isolements positifs jusqu'au noeud 5.

Prélèvement 53 jours :

plant 1, 16 noeuds prélevés. Isolements positifs jusqu'au noeud 8.

plant 2, 18 noeuds prélevés. Isolements positifs jusqu'au noeud 7.

Prélèvement 73 jours :

plant 1, 18 noeuds prélevés. Isolements positifs jusqu'au noeud 11.

Prélèvement 140 jours :

plants à maturité, récolte des épis uniquement, prélèvements sur chacun des 6 épis d'un fragment pour isolements : 3 épis positifs.

2 - Mesure par scintillation de la radioactivité absorbée.

Prélèvement 24 jours : voir tableau I

- Les plants 1 et 2 contiennent de la radioactivité jusqu'à la "rondelle" 8 ce qui correspond au 1/3 inférieur des plants.

Prélèvement 38 jours : voir Tableau II

- Un seul plant était disponible. A ce stade végétatif, les noeuds commencent à s'individualiser, les prélèvements sont donc effectués noeud à noeud. Ce plant contient de la radioactivité jusqu'au noeud 7.

Prélèvement 53 jours : voir tableau III

- Le plant 1 contient de la radioactivité jusqu'au noeud 7.
- Le plant 2 contient de la radioactivité jusqu'au noeud 9.

Prélèvement 73 jours : voir tableau IV

- Les plants sont au stade de la floraison mâle et formation de l'épis. Les noeuds de grosse taille sont fractionnés en 2 morceaux ((1) et (2)) pour limiter le quenching. Les plants 1 et 2 contiennent de la radioactivité jusqu'au noeud 14.

Prélèvement 140 jours :

- Les mesures par scintillation n'ont pas été effectuées sur épis car ceux-ci sont trop lignifiés pour être efficacement broyés finement. Les gros fragments entraînent un quenching trop important pour rendre les résultats significatifs.

3 - Historadiographie .

Prélèvement 24 jours :

Les coupes réalisées sur 2 plants ont été fixées sur lames de microscope. Le stripping s'effectuant avec un film de 121 x 165 mm, pratiquement impossible à découper quand il est décollé de son support en verre, seules 6 lames ont pu être effectivement réalisées. Révélées après 3 semaines d'exposition en chambre noire, elles étaient ininterprétables.

Prélèvement 38 jours :

2 plants ont été utilisés avec un prélèvement à l'apex, un prélèvement à la couronne et un prélèvement au noeud 4. Les coupes ont été fixées à l'albumine sur des plaques de verre de 121 x 165 mm correspondant aux plaques support du film historadiographique ce qui facilite considérablement le stripping. Un dernier inconvénient reste à améliorer, les coupes fixées à l'albumine se décollent rapidement de leur support quand elles sont immergées dans l'eau pour réaliser le stripping. La photo A est un exemple des images obtenues au niveau de la couronne après 2 mois 1/2 d'exposition en chambre noire.

Prélèvement 53 jours :

2 plants ont été utilisés avec un prélèvement à la couronne, au noeud 3 et au noeud 6. Les coupes ont été fixées sur les plaques de verre à l'aide d'un ruban adhésif transparent double face ce qui donne une plus grande liberté pour les manipulations liées au stripping. La photo B est un exemple des images obtenues au niveau du noeud 4 après 2 mois 1/2 d'exposition.

Prélèvement 73 jours :

4 prélèvements ont été effectués sur 2 plants au niveau de l'apex, de la couronne, des noeuds 4 et 7. La photo C est un exemple des images obtenues au niveau de la couronne. Sur cette photo, les granules radioactifs sont intégrés aux parois des vaisseaux. Il est probable que, à ce niveau, le mycélium sénescant s'est lysé, les parois des vaisseaux ont alors absorbé tout ou partie des contenus cellulaires y compris la ^{14}C Thymine intégrée au DNA.

Prélèvement 140 jours :

6 épis ont été récoltés, des coupes ont été pratiquées au niveau du noeud et du pédoncule supportant l'épis ainsi que dans le rachis de l'épis. Ces coupes sont actuellement en cours d'exposition en chambre noire

Les résultats obtenus sur les prélèvements des 38ème, 53ème et 73ème jours ont été soumis à l'appréciation du Professeur Nougarede du laboratoire de physiologie végétale de Jussieu ainsi qu'au Dr Michaux-Ferrière du CNRS de Montpellier actuellement détachée au laboratoire de physiologie végétale du CIRAD. L'une et l'autre ont été surprises par le contraste des images obtenues. Après discussion, il ressort que cette intensité de l'imagerie radioactive peut être attribuée au temps de contact en chambre noire des coupes histologiques avec le film autoradiographique. Afin d'éliminer toute probabilité d'artéfact, une expérimentation complémentaire va être entreprise pour faire la preuve que Fusarium moniliforme cultivé sur un milieu complété avec de la ^{14}C Thymine intègre bien cette molécule à sa chromatine puis, lors de sa croissance hors du milieu complété, distribue la radioactivité dans les noyaux issus des mitoses.

Nous procéderons de la façon suivante :

- mise en culture de F. moniliforme en milieu minéral pauvre complété en ^{14}C Thymine.

- Prélèvement d'un fragment mycélien qui sera abondamment rincé à l'eau stérile afin d'éliminer toute trace de ^{14}C Thymine non absorbée.

- Mise en culture du fragment mycélien "marqué" sur une lame recouverte d'une couche de gélose nutritive (P.D.A.).

- Après croissance du champignon, dessiccation de la culture, stripping de la lame avec une émulsion radiosensible du type K2 ou L4 Ilford et mise en chambre noire de 3 jours à 2 mois. Traitement habituel de la plaque autoradiographique et observation au microscope. Cette technique devrait permettre, en calibrant le temps d'exposition, d'individualiser au sein des hyphes mycéliennes les noyaux marqués.

Enfin, si nos moyens nous le permettent, nous envisageons également de procéder à une expérimentation sur plantules de maïs cultivées in vitro afin d'identifier les sites de pénétration du parasite. Pour cela, nous utiliserons: soit les techniques classiques de mise en contact hôte parasite et le suivi dynamique par observation directe au microscope ; soit le marquage radioactif du parasite et l'analyse autoradiographique sur plante entière qui nous ont été suggérés par le Dr Michaux-Ferrière. La présence de F. moniliforme dans les plantules de 24 jours semble démontrer que cette dernière technique est utilisable dans le couple Fusarium maïs, la méthodologie reste à mettre au point, en particulier, pour définir les temps de contact hôte parasite et pour trouver une méthode de lavage du collet et des racines afin d'éliminer toute trace externe de Fusarium marqué, par exemple au niveau des poils absorbants.

TABLEAU I

Echantillons /noeud	Poids en g.	CPMA	CPMB	Echantillons /noeud	Poids en g.	CPMA	CPMB
Plant 1-1	0,01	44,33	27,33	Plant 2-1	0,02	39,67	25,67
1-2	0,03	39	24,67	2-2	0,04	38,33	26,67
1-3	0,07	37	28	2-3	0,04	39,33	22,67
1-4	0,006	38,33	22	2-4	0,11	48,67	20,33
1-5	0,08	40	19	2-5	0,10	40,33	22
1-6	0,08	42,33	24,33	2-6	0,2	44,67	29,67
1-7	0,08	40,67	25,33	2-7	0,18	114,33	92,67
1-8	0,08	48,67	23	2-8	0,31	42,67	30
1-9	0,07	9,33	8	2-9	0,38	6	3,67
1-10	0,05	8,67	6	2-10	0,36	8,33	4,33
1-11	0,07	13	9	2-11	0,27	9,67	6,33
1-12	0,05	5,61	3	2-12	0,34	11	8,33
1-13	0,07	6	4,33	2-13	0,44	7,33	5
1-14	0,07	12,67	8,67	2-14	0,69	7,67	4,33
1-15	0,06	8,33	5,67	2-15	0,22	9,33	6,67
1-16	0,08	11,67	8	2-16	0,33	5	3
1-17	0,08	7,33	6,33	2-17	0,47	11,67	8,33
1-18	0,06	9,67	7,67	2-18	0,26	13	9
				2-19	0,30	11,33	8,67
				2-20	0,29	8,67	6,33
				2-21	0,37	6,33	4
				2-22	0,39	10,33	7,33

Taux de radioactivite du prélèvement 24 jours

TABLEAU II

Echantillons/noeud	Poids	CPMA	CPMB
Plant 1-1	0,11	48	22,67
1-2	0,25	57	29,67
1-3	0,58	57	25,33
1-4	0,46	53,33	22,67
1-5	0,52	60,67	23,33
1-6	0,71	59,33	27,67
1-7	0,77	52,67	28
1-8	0,55	2,33	6
1-9	0,70	11	8
1-10	0,62	8,67	5,67
1-11	0,42	5,67	3
1-12	0,35	7,67	6
1-13	0,62	13	9
1-14	0,54	12,33	7,67
1-15	0,62	6	4,33
1-16	0,32	12,67	8,67

Taux de radioactivité du prélèvement 38 jours

TABLEAU III

Echantillons /noeud	Poids en g.	CPMA	CPMB	Echantillons /noeud	Poids en g.	CPMA	CPMB
Plant 1-1	0,22	49	21,67	Plant 2-1	0,67	48	22
1-2	0,56	49	23	2-2	0,81	57	29,67
1-3	0,63	53,33	24	2-3	0,63	57	25,33
1-4	0,61	62,67	28	2-4	0,51	59,33	28
1-5	0,48	80,33	32,33	2-5	0,75	94	24,33
1-6	0,53	72,67	23,33	2-6	0,73	56	27
1-7	0,77	86,33	24,67	2-7	0,63	48,67	29
1-8	0,39	10,33	8	2-8	0,61	112	24
1-9	0,63	8,67	5,67	2-9	2,77	98,33	19,33
1-10	0,57	8	4,67	2-10	0,56	14,67	3,33
1-11	0,43	12,67	7,33	2-11	0,69	12,67	6
1-12	0,78	9	6	2-12	0,58	8	5,33
1-13	0,68	10,33	5,33	2-13	0,74	10,33	5,67
1-14	0,56	7	5,67	2-14	0,81	6	3,33
1-15	0,44	7,33	4	2-15	0,68	9,33	4,67
1-16	0,51	9,67	6,33	2-16	0,54	8,67	5

Taux de radioactivité du prélèvement 53 jours

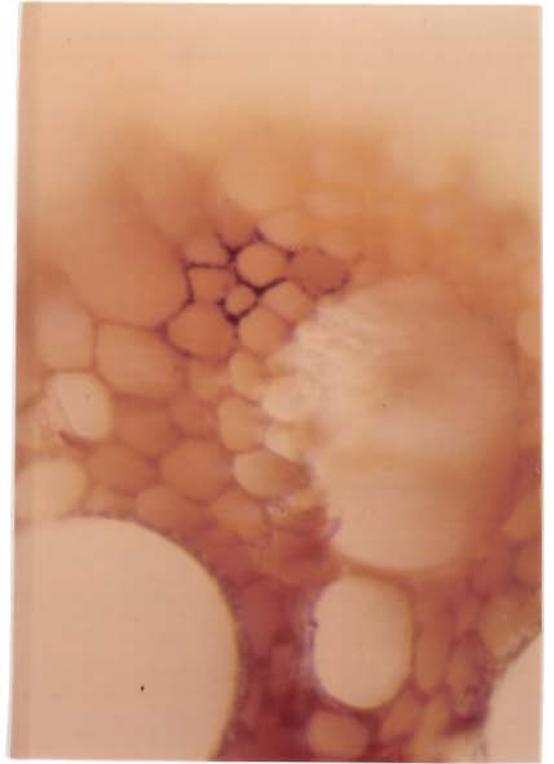
TABLEAU IV

Echantillons / noeud	Poids en g.	CPMA	CPMB	Echantillons /noeud	Poids en g.	CPMA	CPMB
Plant 1-1	0,13	49	21,67	Plant 2-1	0,18	38	23
1-2	0,46	63,67	19	2-2	0,37	38	19,33
1-3(1)	0,49	71,33	22,33	2-3-1	0,46	40,67	19,67
1-3(2)	0,61	73,67	18,67	2-3-2	0,39	38,33	22,33
1-4(1)	0,76	110,67	22	2-4-1	0,51	55,67	29,67
1-4(2)	0,63	94,33	24,33	2-4-2	0,54	42,67	21
1-5(1)	0,68	112,33	23	2-5-1	0,81	52,67	25
1-5(2)	1,03	110,67	21	2-5-2	0,73	47	25
1-6	0,77	141	23,67	2-6-1	1,02	74	27
1-7(1)	0,71	92,67	23	2-6-2	1,05	50,67	15,33
1-7(2)	0,88	120	26,67	2-7-1	1,11	65	26,33
1-8(1)	0,90	129,33	25	2-7-2	1,23	81	20,67
1-8(2)	0,57	110,67	24,33	2-8-1	0,93	75,33	26,67
1-9(1)	0,78	92,33	24,33	2-8-2	0,79	63,67	26
1-9(2)	0,64	86,33	20,67	2-9-1	0,94	86	27,67
1-10(1)	0,60	109,33	22,67	2-9-2	1,03	80,67	24
1-10(2)	0,56	112,33	20,67	2-10-1	0,79	81,67	26,67
1-11(1)	0,59	89	24	2-10-2	0,85	74,67	23
1-11(2)	0,57	114	20,33	2-11-1	0,63	56,33	25,33
1-12(1)	0,67	90,67	24,67	2-11-2	0,70	59,33	24,33
1-12(2)	0,55	97,33	20	2-12	1,01	60,67	25,33
1-13	0,48	100,33	19,33	2-13	0,75	58,67	27
1-14	0,58	118	16,67	2-14	0,67	50,67	24,33
1-15	0,43	14,67	3,33	2-15	0,43	11	8,33
1-16	0,31	14	5	2-16	0,15	7,67	5,67
1-17	0,41	12,67	5,33	2-17	0,23	11,33	8
1-18	0,49	16	5,67	2-18	0,42	7	5,67

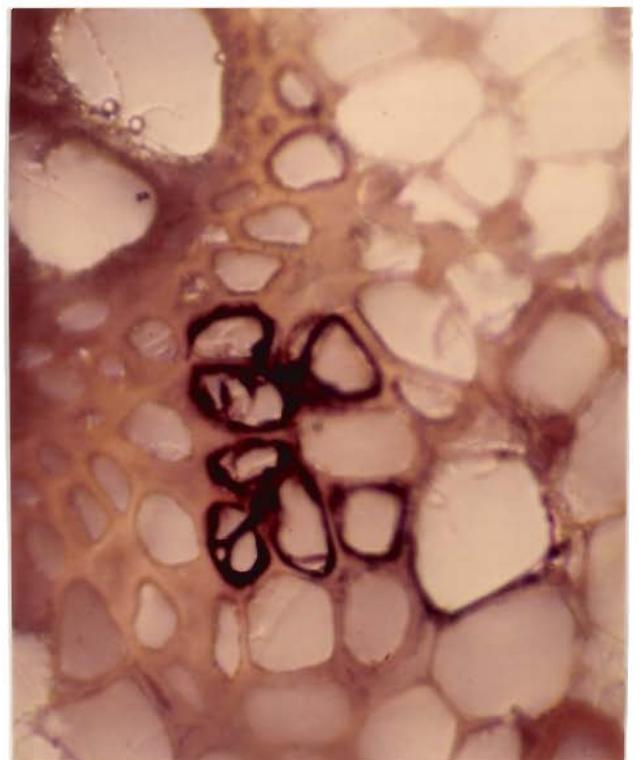
Taux de radioactivité du prélèvement 73 jours



A



C



B

CHIMIE - TOXICOLOGIE

L'arrivée d'un chimiste, Volontaire de l'Aide Technique, a permis de développer les études chimiques destinées à purifier puis identifier le ou les principes toxiques de Fusarium moniliforme. Différentes techniques ont été expérimentées successivement ou parallèlement ; la chronologie du compte rendu suivant n'exprime donc pas fidèlement le déroulement des opérations menées au laboratoire.

Les principaux résultats toxicologiques concernent les oeufs embryonnés et les rats ; ils ont été intégrés au texte au fur et à mesure de leur réalisation en ce qui concerne les oeufs embryonnés et par un tableau récapitulatif en ce qui concerne les rats (Tableau XII qui fait suite au tableau VIII du précédent rapport). Les essais par injections intrapéritonéales ont été momentanément abandonnés car impossibles à corréler avec les tests par sondages oesophagiens (voir rapport précédent).

A - OEUFS EMBRYONNES.

Afin de disposer d'un test biologique pratique et surtout qui nous permette de tester un nombre important de fractions, nous avons utilisé le test de l'inoculation dans la poche à air d'oeufs embryonnés de 5 jours (J. LAFONT et P. LAFONT -1979-. F.H. KEMPER et N.P. LUEPKE -1986-).

Après inoculation, les oeufs sont mis en couveuse pendant une semaine avant d'être cassés pour examen.

Un test préliminaire a été effectué avec l'extrait total de la culture sur maïs de la souche 68 R du 9/09/86 à la dose de 48 mg/0,1 ml par oeuf. Après 8 jours d'incubation, tous les oeufs étaient "coagulés".

Nous avons alors recherché un effet dose avec différentes concentrations de l'extrait ce qui a donné les résultats suivants :

- Témoin eau distillée	= 5 vivants	
- 48 mg oeuf	= 5 coagulés	
- 24 mg oeuf	= 5 coagulés	
- 12 mg oeuf	= 5 coagulés	
- 6 mg oeuf	= 5 coagulés	
- 3 mg oeuf	= 3 coagulés	1 mort
- 1,5 mg oeuf	= 3 coagulés	2 vivants
- 0,75 mg oeuf	= 1 mort	4 vivants

Une autre expérience a été faite en filtrant l'extrait total à l'aide d'une membrane Millipore à 0,22 µm pour obtenir un extrait axénique.

- 48 mg oeuf = 5 coagulés
- 12 mg oeuf = 5 coagulés
- 3 mg oeuf = 5 coagulés
- 1,5 mg oeuf = 5 coagulés.

Cet effet coagulant est inexplicable, il ne faut pas exclure qu'il soit lié à la toxicité de l'extrait.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

1 - Nature de l'extrait à séparer

Toutes les expériences ont été menées avec de l'extrait total 68 R du 9/09/86.

2 - Mise en place de la série éluotrope - choix du support chromatographique.

Le choix du support chromatographique a été fait par microtechnie circulaire en déposant la substance à séparer sur la couche en plusieurs points sur 3 supports différents : silice, alumine, cellulose F; les solvants, déposés au centre de chaque point à l'aide d'un capillaire fin, ont été successivement :

- Hexane
- Tétrachlorure de carbone
- Toluène
- Chlorure de méthylène
- Chloroforme
- Méthanol

Aucune séparation n'est apparue sur la plaque d'alumine. On observe une séparation sur cellulose avec le méthanol et sur silice avec le méthanol et le chloroforme. Cette expérience indique qu'il va falloir s'orienter vers des systèmes de solvants assez polaires afin d'obtenir une séparation optimale.

3 - Révélations des plaques

Une large gamme de révélateurs a été testée sur des plaques de silice 60 F 254 et de cellulose F éluées au méthanol pur.

Révélateurs	Molécules caractérisées	Test positif	Test négatif
NINHYDRINE	Amines, Acides aminés		X
VERT DE BROMOCRESOL	Acides organiques	SPOT JAUNE	
PHTALATE D'ANILINE	Sucres		X
DIMETHYL AMINO 4 BENZALDEHYDE	Amines		X
2,7 DICHLORO FLUORESCINE	Lipides		X
Acide PHOSPHOMOLYBDIQUE	Lipides, Stéroïdes		X
Vanilline Sulfurique à froid	2% Alcools supérieurs Phénols, Stéroïdes		X
Iode	Composés organiques	X	
Ultra violet	Tout composé ayant une bande à 254 mm	X	

Remarques : Tous ces révélateurs ont été testés sur silice et sur cellulose sauf la vanilline sulfurique qui détruit cette dernière. Il est à noter que la révélation des sucres par le phtalate d'aniline n'a rien donné alors que l'extrait total contient un pourcentage de sucres important (voir chapitre K).

4 - Choix des systèmes de solvants

Notre recherche s'est orientée vers des systèmes à polarité importante. Nous avons utilisé des plaques de cellulose F Merck et de silice 60F 254 à indicateur de fluorescence de chez Merck.

Les solvants utilisés sont des solvants Normapur pour analyses de chez Prolabo.

Activation des plaques : 110°C pendant une heure

Migration sur 10 cm, de 20' à 1 heure selon les systèmes

Révélation : Iode, UV, Vert de bromocrésol.

4-a Cellulose F

Systemes de solvants	Remarques
Méthanol - Eau 1-1	Pas de séparation
Butanol - Acide acétique - Eau 4-1-5	"
Chloroforme pur	"
Chloroforme - Me 9-1	"
" " 8-2	Migration en plaques
" " 1-1	"
" " 4-6	"
" " 3-7	"
" " 2-8	"
" " 1-9	"
Méthanol pur	"

4-b Silice 60F 254

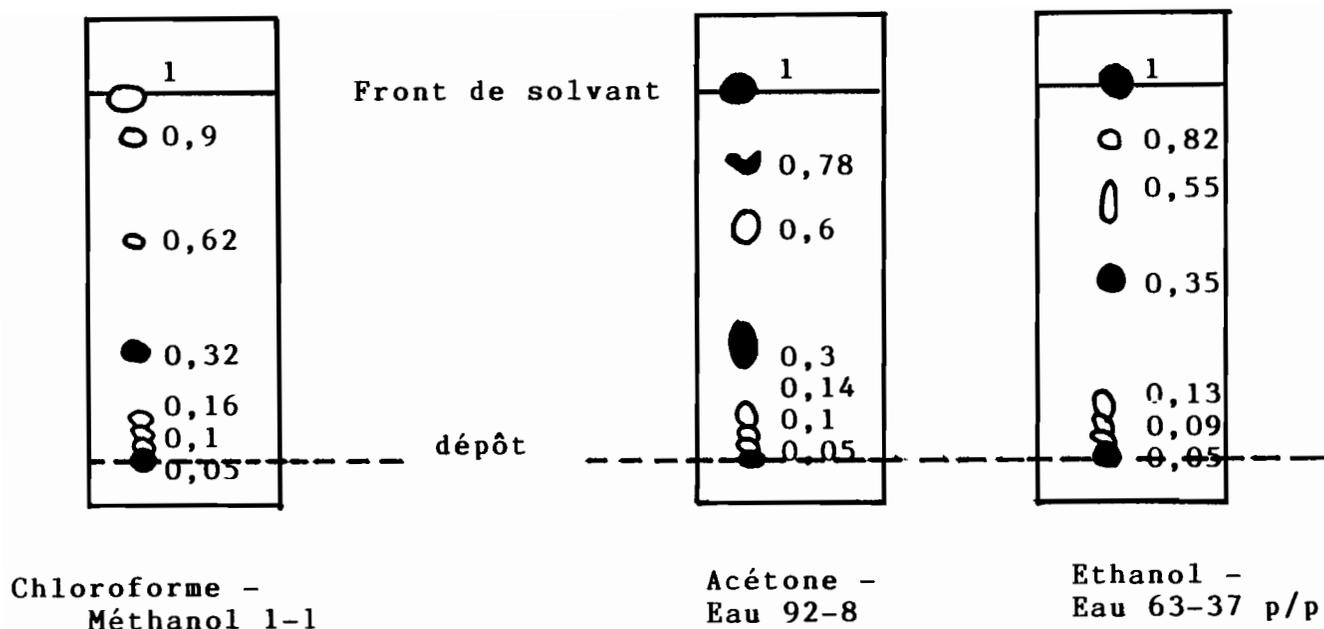
Systèmes de solvants	Remarques
Butanol - Acide acétique - Eau 4-1-5	Pas de séparation
Chloroforme pur	"
Chloroforme - Méthanol 9-1	"
" " 8-2	"
" " 1-1	Séparation + plaques
" " 4-6	"
" " 3-7	Migration en plaques
" " 2-8	"
" " 1-9	"
Méthanol pur	Pas de séparation
Toluène-Acétone-Méthanol 5-3-2	"
Chloroforme-Acide acétique - Méthanol 6-7-1	Migration en plaques
Acétone - Eau 92-8	Séparation + plaques
Chlorure de méthylène-Méthanol ammoniaque 17% 2-2-2	Migration en plaques
Chlorure de méthylène-Méthanol 9-1	Pas de séparation
" -Acétonitrile 1-1	"
Ethanol-Ammoniaque 28% 77-23 p p	"
Ethanol-Eau 63-37 p p	Séparation + plaques

5 - Conclusion

D'après les résultats précédents nous avons opté pour la silice avec un système de solvants chloroforme - méthanol 1-1 ou acétone-eau 92-8 ou éthanol-eau 63-37 p p. Pour chaque système, les produits sont caractérisés par leur Rf.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}}$$

Plus un produit a un Rf élevé, moins il est polaire.



Les essais de CCM sur une fraction purifiée telle que la phase méthanolique XAD2 n'a pas permis de situer la toxine car le chromatogramme est identique à celui de l'extrait total. De plus, celui d'une souche non toxique est également identique à celui d'une souche toxique. Cela semblerait indiquer que le principe toxique est une molécule très polaire ne migrant pas dans les systèmes de solvants étudiés. Pour essayer de mieux visualiser les produits à faible Rf nous avons utilisé des plaques phases inverses.

6 - Chromatographie sur couche mince sur support Silice HPTLC RP8F 254.

L'extrait total a été testé avec les systèmes de solvants suivants :

- Méthanol-Chloroforme 1-1
- Méthanol pur
- Acétone-Eau 92-8

Les résultats n'ont rien apporté de nouveau. La fraction XAD2 méthanolique a été testée dans un mélange méthanol-chloroforme 8-2 en révélant à la vanilline sulfurique à 2% puis chauffage. Il est apparu 3 taches de Rf 0,15-0,65-0,75. Les études des fractions issues d'une Sephadex G25 et d'ultrafiltration sont en cours.

C - SOLUBILISATION DE L'EXTRAIT TOTAL DANS LES SOLVANTS ORGANIQUES

Pour cette étude, nous avons utilisé un extrait total 68R (9/09/86). 5g d'extrait avec 50 ml du solvant à tester sont mis à agiter pendant 2 heures à température ambiante. la phase soluble est récupérée par filtration et le résidu est repris par de l'eau distillée. Les deux fractions sont

ensuite chromatographiées sur plaque de silice 60 dans un mélange méthanol-chloroforme 1-1 avec révélation à l'iode.

Certaines fractions ont été testées sur oeufs embryonnés à 48 mg/oeufs en évaporant et en reprenant à l'eau distillée les phases organiques. (Tableau V).

Conclusion

Pour tous les solvants dans lesquels l'extrait total est partiellement soluble à froid, la CCM montre que l'on a une extraction spécifique des deux produits les moins polaires (Rf 0,9 et 1 dans le système cité ci-dessus) ce qui est logique étant donné la polarité des solvants employés. Par contre, les plaques CCM des fractions solubles au propanol 1 et 2 montrent que l'on extrait les produits de façon moins spécifique (traces des produits à Rf 0,32 et 0,1).

Il est à noter que dans tous les essais, nous n'avons pas obtenu de solubilisation supérieure à 5 % - 10 %. Les oeufs embryonnés montrent que la toxicité est nulle dans les fractions solubles. Pour cette raison, cette voie a été abandonnée et nous nous sommes orientés vers des séparations sur colonnes en milieu aqueux ou alcoolique.

D - EXTRACTION PAR SOLVANTS ORGANIQUES

Malgré le peu de résultats positifs obtenus lors des essais de mise en solution de l'extrait total, il était intéressant de faire quelques essais d'extraction, méthode qui d'un point de vue chimique semblait plus satisfaisante. Là encore nous avons travaillé sur la souche 68R (9 9 86). Dans cette étude, nous avons été limité dans le choix des solvants car l'extraction dans une ampoule à décanter implique la non miscibilité du solvant avec l'eau.

Protocole

Chaque essai a été effectué en mettant 10-20 g d'extrait sec dans 100 ml d'eau distillée. La solution est ensuite extraite par 100 ml de solvant (cette opération est répétée 3 fois). Les phases organiques sont séchées sur chlorure de calcium puis évaporées à sec avant d'être reprise à l'eau distillée. Chaque fraction a été ensuite testée en CCM (Silice 60: Méthanol. Chloroforme 1-1 Révélateur =iode bisublimée).

Solvants testés

- Chlorure de méthylène - Butanol - Toluène 1-1
- Acétate d'éthyle
- Hexane

SOLVANTS	SOLUBLE A FROID	PARTIELLEMENT SOLUBLE A FROID	INSOLUBLE A FROID	REMARQUES
Eau	X			
Chloroforme		X		
Butanol		X		
Hexane		X		
Cyclohexane			X	
Ether			X	
Chlorure de méthylène			X	
Toluène			X	
Toluène-Butanol 1-1			X	
Propanol 1		X		Testés sur oeufs embryonnés à 48 mg/oeufs
Propanol 2		X		"
Acétate d'éthyle		X		"
Tétra Hydrofurane		X		"
Acétonitrile		X		"
Méthyl Ethyl cétone		X		"
Méthyl 4 isobutyl cétone		X		"

SOLVANTS	PHASE	VIVANTS	MORTS	COAGULES	REMARQUES
PROPANOL 1	Sol	6	-	-	Solubilisation
	Insol	1	5	-	
Propanol 2	Sol	6	-	-	"
	Insol	-	6	-	
Acétate d'éthyle	Sol	5	-	-	"
	Insol	-	-	5	
Tetrahydrofurane	Sol	4	-	1	"
	Insol	-	-	5	
Acétonitrile	Sol	3	-	2	"
	Insol	-	-	5	
Méthyl Ethyl Cétone	Sol	4	1	-	"
	Insol	-	5	-	
Méthyl 4 isobutyl cétone	Sol	5	-	-	"
	Insol	-	-	5	
BuOH-Toluène 1-1	Org.	3	1	1	Extraction
	Aq.	-	2	3	

TABEAU V - Tests sur oeufs embryonnés (à la dose de 48 mg/oeufs) des différentes solubilisations de l'extrait total.

Résultats et conclusion

Les résultats sont comparables en tous points à ceux obtenus par solubilisation de l'extrait. Les phases organiques ne contiennent que les deux produits de Rf 0,9 et 1 (Méthanol-Chloroforme 1-1) et la partition en poids est inférieure à 5 %. D'autre part, le test sur oeufs embryonnés (voir Tableau V) avec le mélange Butanol-Toluène 1-1 n'a pas donné de toxicité marquée dans la phase organique. Les fractionnements chimiques par solvants n'ayant pas abouti, nous nous sommes orientés vers la chromatographie sur colonne et vers le fractionnement mécanique (filtration et dialyse).

E - COLONNES DE SILICE 60 MERCK 0,063 - 0,2 mm

Dans l'attente de supports spécifiques à des systèmes d'élution très polaires, nous avons mis en oeuvre des colonnes de silice 60. Le support est compacté dans un mélange Méthanol - Chlorure de méthylène 1-1.

Nous avons déposé de 3 à 5 g d'extrait total 68 R (9/9/86). Le suivi de l'élution a été fait par CCM sur silice 60 dans le système méthanol-chloroforme 1-1 (Révélation UV-Iode) et le contrôle de la toxicité par test sur oeufs embryonnés à la dose de 48 mg par oeuf.

Eluants testés

- Acétone puis acétone-eau en augmentant le pourcentage d'eau.
- Méthanol-Chloroforme 1-1 puis méthanol-eau en augmentant progressivement le pourcentage d'eau.
- Méthanol pur puis eau pour rincer la silice.
- Ethanol puis éthanol-eau en augmentant le pourcentage d'eau.

Résultats et conclusion

Dans toutes ces expériences, le suivi par CCM est identique. Les deux produits les moins polaires (Rf 0,9 et 1) sont élués avec le solvant de départ et se séparent correctement dans les premières fractions.

A partir de 10 à 20 % d'eau, tous les produits sont élués en même temps. Ces résultats sont logiques car avec un support de ce type, il est préférable d'éluer avec des solvants peu polaires.

A partir du moment où l'on introduit un système de solvants en partie aqueux, l'adsorption des produits sur la silice ne se fait plus et la colonne perd toute

sélectivité. Malgré cela, les dernières fractions de rinçage du support à l'eau ne présentent que des produits à des Rf inférieurs à 0,2 (les produits ne migrant pas dans le système méthanol-chloroforme 1-1). De plus, les tests sur oeufs embryonnés ont montré la présence d'une toxicité dans la fraction de rinçage du support.

Au vu de ces résultats nous nous sommes orientés vers des supports spécifiques aux solutions aqueuses (XAD2, Séphadex G) et un suivi uniquement toxicologique (oeufs embryonnés et gavages de rats).

F - CASCADE DE DIALYSES

Etant donné la complexité de notre mélange et surtout la différence de taille importante des substances contenues dans l'extrait, il nous a semblé judicieux d'essayer de faire un fractionnement suivant le poids moléculaire par dialyses successives. En effet, si beaucoup de molécules complexes ne sont pas piégées lors de la filtration sur diatomées effectuée après extraction aqueuse de la culture ; elles devraient être éliminées dans les premiers dialysés. Par contre les sels et les sucres simples devraient rester dans le dialysat 1000;

Chaque fraction (dialysés et le dialysat 1000)(schéma 1) a été passé en CCM sur silice 60 dans Ethanol. Eau 63-37 p p et sur oeufs embryonnés (Tableau VI). le dialysat 1000, et les dialysés 25000, 6800, et 3500 ont été testés sur rats en gavage (série 22, Tableau XII). Chaque dialyse a été faite sur 48 heures environ en utilisant 10 litres d'eau distillée en 4 fois.

Résultats

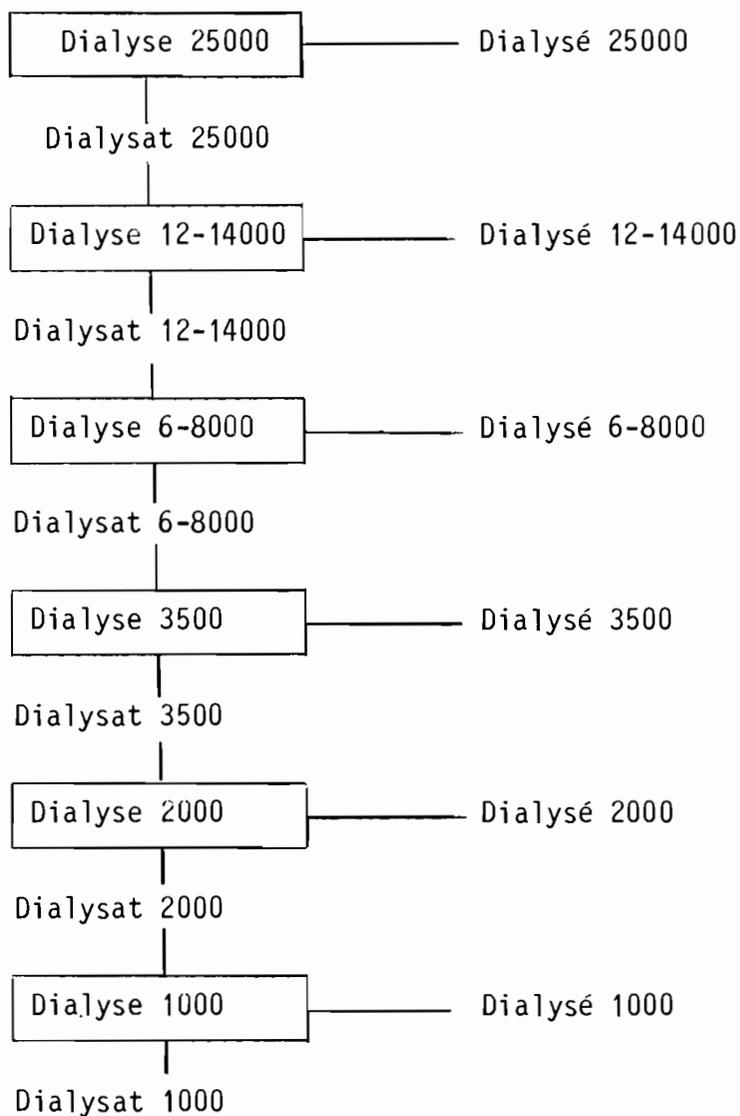
- CCM

Les dialysés 25000, 12-14000, 6-8000 et 3500 contiennent les 2 produits de Rf 0,82 et 1, ainsi que d'autres ne migrant pas. Les dialysés 2000 et 1000 ne contiennent que des produits de Rf nul.

SCHEMA 1

CASCADE DE DIALYSES

25 g Extrait total 68 (9/09/86)



Le dialysat 1000 fait apparaître tous les produits de Rf inférieur à 0,8 contenus dans l'extrait total.

. Gavage sur rats (série 22 - Tableau XII)

Les dialysés ont été testés en gavage à 0,48 g/cc. Le dialysat 1000, lot 6, a été réduit deux fois car à chaque dialyse, nous avons estimé ne pas avoir épuisé le dialysé et les pertes se sont sans doute accumulées. Le dialysat 1000 et les dialysés 25000 lot 7 et 3500 lot 9 ne sont pas toxiques.

Par contre le dialysé 6-8000 lot 8 présente une légère toxicité.

. Oeufs embryonnés

Inoculat	Dose	Vivants	Morts	Coagulés
Dialysé 25000	48 mg w	-	-	5
Dialysé 12-14000	"	-	4	1
Dialysé 6-8000	"	-	5	-
Dialysé 3500	"	-	5	-
Dialysé 2000	"	4	1	-
Dialysé 1000	"	4	1	-
Dialysat 1000	"	-	3	2

TABLEAU VI - Tests sur oeufs embryonnés des différentes fractions de dialyse.

Il semble ne pas y avoir de corrélation entre les rats et les oeufs aux doses employées. Ces doses sont sans doute excessives pour les oeufs embryonnés.

Conclusion

Nous ne devons pas négliger l'apparente présence de deux toxicités exprimées dans l'expérience effectuée par unique dialyse à 3500 (Tableau XII série 20). Il semblerait que le fractionnement par dialyse ou par précipitation à l'acétone sépare l'extrait total en deux phases qui,

chacune à part, perdent leur toxicité sur le rat. La réunion des deux phases, restaure la toxicité. Nous verrons plus loin que cette partition de la toxicité se retrouve, en particulier après passage sur Séphadex pour le test sur oeufs embryonnés.

G - COLONNE XAD2 AMBERLITE

Cette résine adsorbante est un copolymérisat de polystyrène-divinylbenzène synthétique, caractérisée par une structure macroréticulaire et à caractère non ionique. L'avantage de ce support réside dans le fait que l'on peut passer l'extrait total aqueux directement. Les substances qui restent adsorbées sur la colonne sont ensuite éluées au méthanol. La phase aqueuse et la phase méthanolique ont été étudiées en CCM, sur oeufs embryonnés et sur rats en gavage.

Résultats - Voir tableau VII

. CCM - Eluant Ethanol-Eau 63-37 p p

La phase aqueuse présente les mêmes spots que l'extrait total. La fraction méthanolique ne fait apparaître que les produits ne migrant pas et les deux produits peu polaires de Rf 0,82 et 1. Ces derniers n'apparaissent que sous forme de traces dans le chromatogramme de la fraction méthanolique de l'extrait 68R (9/09/86) dégraissé à l'hexane.

Nous avons en effet craint que les produits apolaires ou peu polaires restent adsorbés de façon irréversible sur le support. Après calculs, on note que la colonne fixe environ 20 % de produits à chaque expérience. Pour éviter un engorgement, on rince avec de l'éthanol et de l'eau successivement afin de décrocher le plus de produits possible.

. Gavage des rats - Séries 24,25,26. Tableau XII

La phase aqueuse ne présente aucune toxicité. La phase méthanolique présente une toxicité comparable à celle de l'extrait total (9/9/86). Par contre, si l'on fait une colonne sur un extrait fusarien moins toxique (9/01/87), la toxicité disparaît. L'hypothèse d'un taux important "d'anabolisants" dans certains extraits pouvant masquer la toxicité est donc écartée. Pour les tests sur les rats, les 25% de pertes ont été pris en compte.

. Oeufs embryonnés - Voir Tableau VIII

Comme pour l'extrait total, il semblerait que l'on soit en présence d'un principe coagulant qui "masque" complètement les résultats.

INOCULAT 68R	% aq.	% Meoh	% Rinçage	Volume d'eau	Volume de méthanol
85 g 9/09/86 n°1 dégraissé à l'hexane	73%	3,5%	-	51	31
Série 24 Lot 4-5 Pertés comptées					
65 g 9/09/86 n° 2	73%	4,5%	-	71	31
Série 25 Lot 3-4 Pertés non comptées					
81 g 9/09/86 n° 3	76,3%	2,6%	1,6%	71	41
Série 26 lot 4 Pertés comptées					
40 g 9/01/87 n°4	73%	10%		81	51
Série 27 lot 2-3 Pertés comptées					

TABLEAU VII - Fractionnement sur résine adsorbante
Amberlite XAD2

TABLEAU VIII - Tests sur oeufs embryonnés des différentes fractions XAD2

INOCULAT	DOSES	COAGULES	MORTS	VIVANTS
Phase aqueuse n°1	48 mg w	5	-	-
Phase méth. n°1	"	5	-	-
Phase aqueuse n°2	"	5	-	-
"	12 mg w	5	-	-
"	3 mg w	5	-	-
Phase méthanolique n°2	48 mg w	5	-	-
"	12 mg w	4	-	-
"	3 mg w	2	3	-
"	n°3 12 mg w	5	-	-

Conclusion

Nous avons donc fractionné l'extrait total 68R (9/9/86) et éliminé 95 % en poids de produits sans altérer la toxicité sur rats.

Cela va nous permettre de poursuivre l'étude en repartant de cette phase purifiée pour la fractionner sur des supports plus fins (Sephadex G25) ou sur membranes d'ultrafiltration.

H - SEPHADEX

Le Sephadex est un gel de filtration préparé par réticulation du dextran avec l'épichlorhydrine. Ce gel permet une détermination des poids moléculaires. Nous avons utilisé une Sephadex G 25 Medium qui sépare les molécules de poids compris entre 100 et 5000. Les substances de poids supérieur à 5000 ne sont pas retenues par les billes de dextran et sont éluées dans le volume mort. Ensuite l'éluotion se fait par ordre de tailles décroissantes.

La mise en oeuvre s'effectue de la façon suivante : le

compactage se fait après gonflement des billes dans l'eau pendant 2 heures. Après dépôt de la substance à analyser, on élue à l'eau. Le rinçage se fait avec de la soude 0,2N. Le volume mort V_m a été calculé en laissant sécher la colonne (l'eau qui en sort représente le liquide contenu entre les billes du gel). Un spectrophotomètre UV (260 nm) couplé au collecteur de fractions permet le suivi de l'élution.

Résultats

Voir Tableau IX

. Gavage

Afin de déterminer si l'on a conservation de la toxicité après fractionnement sur Sephadex G25 Medium, et d'essayer de calibrer le poids de la toxine, nous avons passé une phase méthanolique XAD2 sur G25 Medium.

Quatre fractions ont été testées sur rats par sondage oesophagien : (Tableau XII)

Volume mort : de V=0 à V=24cc	Série 26	lot 5
volume d'élution : VE1 de V=24 à V=60cc		lot 6
" : VE2 de V=60 à V=110cc		lot 7
Rinçage à la soude 0,2N :		lot 8

La toxicité est nulle dans le rinçage et les 2 fractions d'élution.

Par contre, le volume mort est toxique ce qui semblerait indiquer que la toxine est une molécule de taille importante (égale ou supérieure à 5000).

. Oeufs embryonnés (voir tableau X)

On peut noter la présence d'une toxicité à la fin du volume mort et dans les premiers ml du volume d'élution. Ce résultat est en accord avec celui du gavage. Cela prouverait que la toxine est proche d'un poids moléculaire de 5000, peut être un peu inférieur car on a une forte toxicité sur oeufs entre 30 et 40 cc.

La mesure du volume mort a peut-être été faite de façon inexacte car il semble que la toxicité à $v=30$ cc sur oeufs se soit retrouvée dans le volume mort pour le gavage sur rats. Il semble également que la toxicité soit beaucoup plus dispersée lorsque l'on travaille sur l'extrait total. De plus, il n'apparaît aucune différence sur oeufs entre un extrait très toxique (9/9/86) et celui du 1/4/87 qui l'est beaucoup moins sur rats. Par contre le principe coagulant semble avoir disparu dans certaines expériences.

SCHEMA N° 2 S.2

Extrait total 9/9/86 68R

Dialyse 6-8000

Dialysé 6-8000

Dialysat 6-8000

Sephadex G25 Med.

Oeufs embryonnés

SCHEMA N°3 S.3

Extrait total 68R 9/9/86

XAD2 N°2

Phase aqueuse

Phase méthanolique

Gavage rats

Sephadex G25 Med

Oeufs embryonnés

SCHEMA N°4 S.4

Extrait total 68R 9/9/86

Phase méthanolique

XAD2 N° 3

Phase aqueuse

Sephadex G25 Medium

Gavage rats et oeufs embryonnés

Origine des extraits	Poids	Nombre de Fractions	Destination
Extrait total (9/9/86)	2 g	12	Oeufs embryonnés
Dialysat 6-8000 d'extrait total (9/9/86) S.2	2 g (équivalent)	13	"
XAD2 méthanolique n° 2 d'extrait total (9/09/86) S.3	2 g (équivalent)	11	"
XAD2 méthanolique n° 3 d'extrait total (9/9/86) S.4	50 g (équivalent)	4 (Volume Mort VM (Volume élution VE1 (" VE2 (Rinçage	Gavage rats
Extrait total 1/4/87	0,5 g	11	Oeufs embryonnés

TABLEAU IX - Fractionnement sur Sephadex G25

Volume d'élution	ET 9/9	Dialysat 6-8000 ET 9/9	XAD2 MeOH N° 2 ET 9/9	ET 1/4/87
0 - 10 cc	2V 3C	Pas de volume mort	5 V	5 V
10 - 20 cc Volume mort	4V		4V 1M	2V 2M 1C
20 - 30 cc	4M 1V		5 M	1V 1M 3C
30 - 40 cc	5M	9M	5M	3M 2C
40 - 50 cc	4V 1C	8M 2V	5V	
50 - 60 cc	5V	6V 4M	4V	2V 1M 2C
60 - 70 cc	5V	9V 1M	5V	4V 1M
70 - 80 cc	2M 3V	7V 1M	5V	2M 3V
Rinçage NaOH 0,2N	9V 1M	7V 3M	18V 1M 1C	6M 3C 12VN

TABLEAU X - Tests sur oeufs embryonnés des fractions de sephadex G25
(dose 12 mg/oeufs)

V = Vivants ; M = Morts ; C = Coagulés

Conclusion

Les résultats sont en faveur de principes toxiques au poids moléculaire voisin de 5000. Pour le vérifier, nos recherches se sont orientées vers l'utilisation de membranes d'ultrafiltration.

I - ULTRAFILTRATION AMICON

Cette technique présente de nombreux avantages sur la dialyse et sur les gels type Sephadex car il n'y a pas de problèmes d'épuisement du fractionnement et elle permet de calibrer les molécules avec précision.

Malheureusement, il n'est pas possible de filtrer directement des solutions trop complexes (extrait total par exemple) car on s'expose à un colmatage du filtre. Par contre la fraction XAD2 méthanolique permet d'envisager l'utilisation de cette technique. Pour être sûr de ne pas colmater la membrane, nous avons passé la phase XAD2 méthanol n°1 et 2 en dialyse à 25000 avant de faire une ultrafiltration à 5000, puis à 500 (voir schéma 5).

Résultats

. Gavage sur rats (Tableau XII)

Nous avons testé les fractions suivantes :

- Dialysé 25000	Série 28	Lot 1
- Ultrafiltration < 500		Lot 2
- " > 5000		Lot 3
- " <5000 et >500		Lot 5

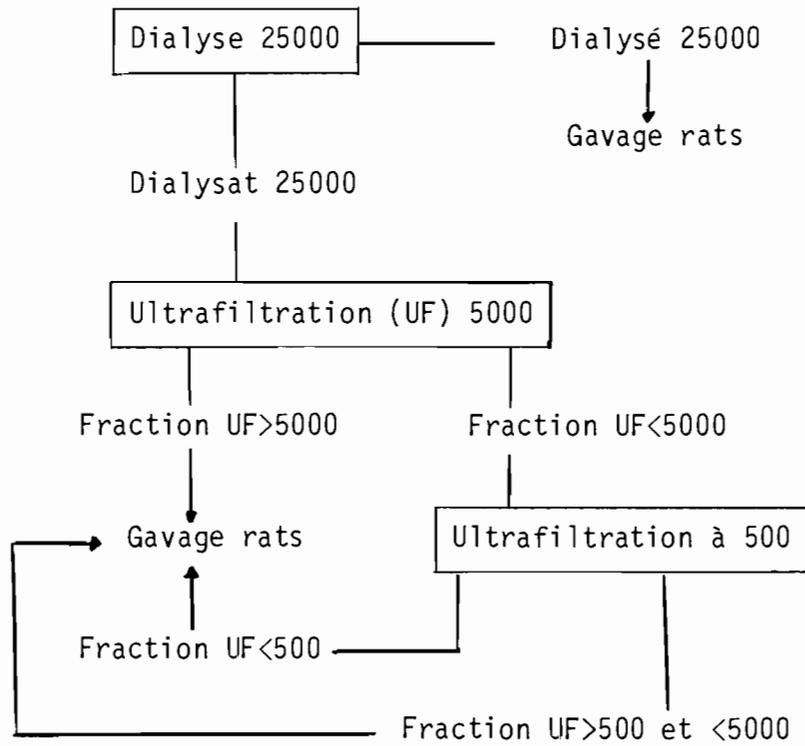
Les pertes ont été compensées de la façon suivante :

- 25 % pour la XAD2 (fraction fixée irréversiblement sur la colonne)
- 10 % pour la dialyse et l'ultrafiltration.

La toxicité se trouve dans la fraction 500 - 5000. Cette expérience affine les résultats des gels Sephadex. Il est donc bien probable que l'on se trouve en présence d'une toxicité de poids moléculaire voisin de 4000 - 5000.

SCHEMA 5

XAD2 Phase méthanolique n° 1 et 2



. Oeufs embryonnés (Tableau XI)

Les fractions de gavage ont été inoculées sur oeufs à 12 mg/oeuf.

Inoculat	Morts	Vivants	Coagulés
Dialysé 25000	2	1	2
UF > 5000	4	1	-
UF < 500	4	1	-
UF > 500 et < 5000	5	-	-

TABLEAU XI - Tests sur oeufs embryonnés des fractions d'ultrafiltration

Conclusion.

Il semblerait que le principe coagulant, présent dans la phase XAD2 alcoolique, soit éliminé par la dialyse à 25000 (phénomène déjà observé lors de la cascade de dialyses). Malgré cela, il n'apparaît pas de phases non toxiques dans les fractions d'ultrafiltration pour les oeufs embryonnés. Par contre, en ce qui concerne les rats, la toxicité se maintient dans la zone des poids moléculaires voisins de 5000.

J - RECHERCHE DE MONILIFORMINE

La moniliformine est présente dans certaines souches de Fusarium moniliforme (W.F.O. MARASAS - 1985 - ; W.F.O. MARASAS et al. -1986 -). Etant donné le caractère toxique de cette molécule, il fallait vérifier son absence dans la souche 68R. Nous avons utilisé la méthode CCM de Burmeister (Applied and Environmental Microbiology Jan. 1979 Vol. 37 n°1 p. 11-13).

On chromatographie le témoin moniliformine et l'extrait total 68R (9/9/86) sur silice 60F 254 et on élue par le mélange toluène-acétone-méthanol (5-3-2). Le Rf du témoin se situe entre 0,25 et 0,3, l'extrait total ne présente aucune tache à ce Rf. Nous avons également passé une solution de moniliformine sur une colonne XAD2. Elle n'est pas fixée sur le support et passe dans la phase aqueuse, l'absence de toxicité de cette phase est une autre preuve de l'absence de moniliformine dans la souche 68R.

K - DOSAGE DES SUCRES TOTAUX

Nous avons effectué un dosage total des sucres dans notre extrait 68R(9/9/86) et dans les fractionnements ultérieurs selon la méthode colorimétrique de SNELL (Colorimetric Methods of analysis. 3^e édition Vol. 3 p 204 et 225) :

Réactif cuivrique -A- : 7,5 g de carbonate de sodium anhydre
dans 250 ml d'eau

1 g de tartrate sodium-potassium
1,5 g d'alanine
1,5 g de sulfate de cuivre

Réactif phosphomolybdique -B- :

dans 85 ml d'eau à chaud 25 g d'acide molybdique
12,5 g de carbonate de sodium
Ajouter 50 ml d'acide phosphorique 85 %.

Réaction

2 ml -A- + 2 ml de l'échantillon. Porter à ébullition au bain-marie pendant 6' puis refroidir.

Ajouter 2 ml de -B-, agiter et lire en UV à 520 mm. La présence de sucres est marquée par une coloration bleu lors de l'addition de -B-

Le dosage total des sucres a été effectué sur les extraits suivants :

SOLUTIONS TESTEES	RESULTATS DU TEST
- Extrait total 9/9/86	Très positif
- " 9/1/87	"
- " 1/4/87	"
- Phase organique THF	Négatif
- " acétonitrile	"
- " cyclohexane	"
- Dialysé 6-8000	Positif
- Dialysat 6-8000	"

SOLUTIONS TESTÉES	RESULTATS DU TEST
- Dialysé 25000	Très positif
- Dialysat 25000	"
- Dialysé 12-14000	"
- Dialysé 3500	Positif
- Dialysé 2000	Légèrement positif
- Dialysat 1000	Positif
- Fraction XAD2 aqueuse	Très positif
- " " méthanolique	Traces

Conclusion

Les extraits totaux contiennent un pourcentage de sucres très important. Les fractions organiques de solubilisation et d'extraction n'en contiennent pas. Les dialyses en cascade ne nous en débarrassent pas. Seule la phase méthanolique XAD2 est pauvre en sucres totaux. La quasi totalité de ceux-ci se retrouvent dans la phase aqueuse.

Quelques tentatives annexes ont été faites pour éliminer ces sucres dans l'extrait total :

- charbon actif : tous les essais pour tenter de dissocier la phase contenant les sucres (fraction aqueuse) de celle où ils sont absents (fraction alcoolique) ont abouti à la perte totale de la toxicité (Tableau VIII série 16 du précédent rapport, Tableau XII séries 18 et 22 du présent rapport).

- Levures : une macération de l'extrait total en présence de levures a effectivement entraîné une forte diminution de la teneur en sucres mais au détriment de la toxicité (Tableau XII séries 22 et 24).

Ces essais ont donc été abandonnés le fractionnement XAD2 donnant toute satisfaction dans ce domaine.

L- CONCLUSION

A ce jour, d'un point de vue chimique, un grand pas a été fait dans l'isolement de la toxine de Fusarium moniliforme responsable de la leucoencéphalomalacie équine.

En effet, la fraction toxique résultant du passage sur Sephadex G 25 Medium ou celle obtenue par ultrafiltration ne représente que 1 % environ de l'extrait total lyophilisé. De nouveaux fractionnements sont envisageables :

- Sephadex G 25 Fine
- " G 15
- Dialyse 2000
- Phase inverse RP8 ou RP18 (CCM en cours)
- Résines échangeuses d'ions
- Amberlite XAD7 - XAD8 spécifiques pour enrichir les stéroïdes hydrosolubles, les alcaloïdes, les polypeptides et les protéines.

Au plan toxicologique, un certain nombre de données vont dans le sens d'une toxicité complexe résultant d'un effet couplé de deux ou plusieurs toxines. Les fractionnements successifs devront prendre en compte cette donnée et certaines phases non toxiques prises individuellement pourraient se révéler toxiques couplées à d'autres phases également non toxiques.

Différents impondérables sont venus retarder l'avancement des études chimiques, les dernières cultures s'étant révélées non toxiques. Ces phénomènes de variabilité des souches sont très fréquents chez Fusarium et nous avons légèrement fait varier les conditions de cultures en les soumettant à une anaérobiose partielle par obstruction des prises d'air des récipients de culture avec une feuille d'aluminium.

D'autre part, nous avons pu constater que les filtrations primaires de l'extrait aqueux initial effectuées sur silice de diatomées diminuaient la toxicité des extraits. Il se révèle que la silice native est très riche en sites OH qui bloquent certaines molécules, voire les dénaturent, ce que nous avons confirmé expérimentalement (Tableau XII série 24).

De nouveaux supports de filtration vont être prochainement mis en oeuvre pour tenter de contourner ce problème.

TABLEAU XII

EXPERIMENTATIONS SUR RATS PER OS OU PAR SONDAGE OESOPHAGIEN

SERIE	LOT	PRODUITS DISTRIBUES	MGMQ	MORTS	TEMPS DE SURVIE	POIDS DE DEPART
			MCMQ			
18	1	68R du 14/8/86 Charbon actif (Per os)	0,156	0/4	>8j	29,4
	2	68R du 14/8/86 Charbon actif+Extrait aqueux (Per os)	0,139	0/4	>8j	34,3
	3	68R du 14/8/86 Extrait total	0,362	0/4	>8j	45,5
	4	68R du 14/8/86 Phase aqueuse du charbon actif	0,505	0/4	>8j	44,3
	5	68R du 14/8/86 Soluble Acétone	0,380	0/4	>8j	38,3
	6	68R du 14/8/86 Insoluble Acétone	0,192	0/4	>8j	42,9
	7	68R du 14/8/86 Soluble+Insoluble Acétone	0,233	0/4	>8j	38,1
	8	68R du 14/8/86 Dialysé à 3500	0,340	0/4	>8j	42,9
	9	68R du 14/8/86 Dialysat 3500	0,390	0/4	>8j	41,9
19	1	68R du 29/8/86 Extrait total	0,316	0/4	>10j	38,9
	2	68R du 9/9/86 Extrait total	-0,684	2/4	8,75j	43,0
20	1	68R du 9/9/86 Extrait total	-0,914	0/4	>9j	39,8
	2	68R du 9/9/86 Dialysat à 3500	0,110	0/4	>11j	35,2
	3	68R du 9/9/86 Dialysé à 3500	0,335	0/4	>11j	37,9
	4	68R du 9/9/86 Dialysat+Dialysé à 3500	-0,686	2/4	8,75j	40,2
	5	68R du 9/9/86 Insoluble Acétone	0,268	0/4	>11j	41,4
	6	68R du 9/9/86 Soluble Acétone	0,317	0/4	>11j	42,7
	7	68R du 9/9/86 Soluble+Insoluble Acétone	-0,309	3/4	5,25j	41,7
21	1	68R du 9/1/87 Extrait total (Voir Série 22)				
22	1	68R du 9/9/86 Extrait total	-0,568	3/4	8,75j	41,4
	2	68R du 9/9/86 Extrait total Levures	-0,057	3/4	5j	33,2
	3	68R du 9/1/87 Extrait total	0,155	1/4	9,5j	31,3
	4	68R du 9/9/86 Phase aqueuse du Charbon actif	0,379	0/4	>11j	30,1
	5	68R du 9/9/86 Phase alcoolique du Charbon actif	0,350	0/4	>11j	31,8
	6	68R du 9/9/86 Dialysat 1000	0,443	0/2	>11j	36,8
	7	68R du 9/9/86 Dialysé à 25000	0,383	0/4	>11j	35,0
	8	68R du 9/9/86 Dialysé 6-8000	0,266	0/4	>11j	38,9
	9	68R du 9/9/86 Dialysé à 3500	0,346	0/3	>11j	39,7
23	-----	Annulée: Poids moyen du lot superieur à la norme	-----	-----	-----	-----

SERIE	LOT	PRODUITS DISTRIBUES	MGMQ	MORTS	TEMPS DE SURVIE	POIDS DE DEPART
			MCMQ			
24	1	68R du 9/1/87 Extrait total /Mâles	0,373	0/4	>12j	38,7
	2	68R du 9/1/87 Extrait total/Femelles	0,278	0/4	>12j	38,6
	3	68R du 9/9/86 Extrait total dégraissé à l'hexane	0,149	0/4	>12j	42,8
	4	68R du 9/9/86 Phase aqueuse de XAD2 N° 1	0,419	0/4	>12j	35,7
	5	68R du 9/9/86 Phase MeOH de XAD2 N° 1	-0,326	2/4	11,25j	39,3
	6	68R du 9/9/86 Extrait total Levures	0,203	0/4	>12j	39,8
	7	68R du 9/9/86 Dialysat 3500	0,238	0/4	>12j	37,5
	8	68R du 9/9/86 Dialysé 3500	0,023	1/4	11,25j	37,1
	9	68R du 9/9/86 Extrait total filtré 5 fois sur diatomées	0,302	0/4	>12j	41,6
25	1	68R du 9/9/86 Extrait total dégraissé	-0,286	1/4	11,75j	43,9
	2	68R du 9/9/86 Phase aqueuse XAD2 N°2	0,291	0/4	>12j	46,6
	3	68R du 9/9/86 Phase MeOH XAD2 N°2	0,003	0/4	>12j	43,3
26	4	68R du 9/9/86 Phase MeOH XAD2 N°3	-0,129	1/4	11j	43,0
	5	68R du 9/9/86 Volume mort Sephadex G25/XAD2 N°3	-0,106	0/4	>12j	46,4
	6	68R du 9/9/86 Volume d'élution1 Sephadex G25/XAD2 N°3	0,344	0/4	>8j	38,3
	7	68R du 9/9/86 Volume d'élution2 Sephadex G25/XAD2 N°3	0,328	0/4	>8j	44,8
	8	68R du 9/9/86 Rinçage Sephadex G25/XAD2 N°3	0,390	0/4	>8j	45,4
27	2	68R du 9/1/87 Phase aqueuse XAD2 N°4	0,459	1/4	>10j	34,1
	3	68R du 9/1/87 Phase MeOH XAD2 N°4	0,324	0/4	>10j	31,9
28	1	68R du 9/9/86 Dialysé 25000/XAD2 MeOH N° 1-2	0,470	0/4	>6j	26,4
	2	68R du 9/9/86 UF<500/Dialysat25000/XAD2 MeOH N° 1-2	0,484	0/4	>6j	24,5
	3	68R du 9/9/86 UF>5000/Dialysat25000/XAD2 MeOH N° 1-2	0,382	0/4	>6j	29,3
	4	68R du 1/4/87 Extrait total	0,411	0/4	>12j	27,3
	5	68R du 9/9/86 UF500-5000/Dat25000/XAD2 MeOH N° 1-2	-0,074	2/4	11j	27,3

LEUCOENCEPHALOMALACIE EQUINE = REPRODUCTION EXPERIMENTALE DE L'INTOXICATION

A) NOTE PRELIMINAIRE

Cette expérimentation, qui s'est déroulée au L.T.D.V. en Août 1986 a donné lieu à une première analyse des résultats cliniques, nécroscopiques, et histologiques. Ces résultats ont été consignés dans le rapport de conventions ORSTOM/TERRITOIRE de la Nouvelle-Calédonie, avenant n° 2, de Décembre 1986.

La mission à l'Ecole nationale Vétérinaire de Toulouse avait pour but de pousser plus avant cette analyse des résultats d'étude ; les comptes-rendus cliniques, nécroscopiques et histologiques qui suivent en sont le résultat. Ils confirment globalement les hypothèses précédemment émises et envisagent un schéma pathogénique très probable de l'affection, issu d'une analyse détaillée des constatations d'ordre histologique.

Ces comptes-rendus constituent la conclusion définitive de l'étude .

B) COMPTE-RENDU CLINIQUE

L'état de santé de la jument est suivi en continu par =

- examen physique quotidien
- contrôle quotidien de la consommation alimentaire
- biochimie urinaire)
- biochimie sanguine) 3 fois par semaine
- hématologie)

Ces différents points sont rapportés séparément puis une synthèse globale permet de suivre l'évolution clinique de l'animal.

1) Examen physique

(Voir tableau N° XIII)

Aucun signe clinique n'est noté entre J 0 et J 3.

A J 4, on note = . une hyperthermie modérée qui se maintient jusqu'au dernier jour,
. une élévation modérée du rythme cardiaque qui s'accroît à J 5, puis régresse,
. une accentuation modérée de la couleur jaune habituelle des muqueuses oculaires, gingivales et vulvaires ; on peut parler de subictère.

A J 5 une petite diarrhée est notée ; l'auscultation révèle de forts borborigmes d'origine caecale et colique ; ce trouble digestif régresse dès le lendemain.

A J 7 et J 8, l'animal a retrouvé son état de santé originel.

A J 9, l'hyperthermie et le sondage urinaire permettent de diagnostiquer une cystite imputable aux prélèvements répétés d'urine. Aucun traitement n'est envisagé. La tachycardie modérée constatée à J 10 est attribuée à la fièvre associée à cette cystite.

A J 11 un ictère léger est constaté à l'examen des muqueuses ; il se maintient jusqu'au dernier jour ; l'analyse d'urine confirme cet ictère.

A J 13 est noté le premier signe pouvant exprimer une atteinte nerveuse : il s'agit d'un léger déficit au niveau des postérieurs (premier degré de parésie), tandis que la sensibilité et les réflexes sont conservés dans toutes les régions du corps.

A J 14 ce déficit locomoteur est accentué : spasticité du premier degré au niveau des quatre membres ; l'animal répugne à se déplacer et replace systématiquement son corps dans l'axe tête-encolure lorsqu'on lui devie la tête. Il est faible et apathique ; ses muqueuses sont nettement jaunes et congestionnées. La tachycardie est importante.

La jument est retrouvée morte à J 15 ; la mort date de quelques heures.

Bilan

L'examen physique permet de mettre en évidence chronologiquement :

- un épisode fugace de diarrhée à J 5, puis reprise à J 13 ;
- un ictère notable cliniquement des J 11 et qui s'accroît à J 14 ;
- une tachycardie importante et terminale sans trouble associé du rythme ;
- des signes nerveux modérés et terminaux (J 13 - J 14).

On en retient que ces signes ne laissent pas supposer une mort aussi brutale. Par ailleurs, l'évidence d'une cystite pouvait expliquer certains de ces signes (hyperthermie, tachycardie, déficit des postérieurs).

2) Contrôle de la consommation alimentaire

Durant toute l'expérimentation la jument reçoit quotidiennement 15 kg de maïs vert avant floraison et de l'aliment complet :

- 1 kg/jour de J -7 à J -1 ;
- 2 kg/jour ensuite.

De J 0 à J 12, l'aliment complet est consommé en totalité mais le fourrage vert est progressivement délaissé (aucun refus à J 0 ; 20 % de refus à J 12).

A J 13 et J 14, la prise d'aliment est subitement réduite à zéro, coïncidant avec l'émergence des signes cliniques.

3) Biochimie urinaire ; Cytologie urinaire

Les premières variations enregistrées dans l'analyse urinaire (J 7 à J 9) permettent le diagnostic de cystite. Un coliforme sensible à la spiramycine est isolé de l'urine de J 9 ; le traitement antibiotique local est mis en oeuvre à J 14.

A J 11 et J 14 la protéinurie devient très importante ; elle laisse supposer une atteinte rénale surajoutée à la cystite mais qui n'est pas confirmée par la biochimie sanguine, à J 11. A J 14 l'atteinte rénale est évidente.

La recherche de sang-hémoglobine est positive dès J 9 et très positive à J 14 ; l'absence d'hématies dans l'urine permet d'envisager qu'il s'agisse d'hémoglobinurie ou de myoglobinurie.

4) Biochimie sanguine

(Voir tableau n° XIV)

Le temps de Quick et l'albumine sérique conservent des valeurs normales durant toute l'expérience soulignant l'absence d'atteinte hépatique préexistante.

La bilirubinémie est marquée par un taux modérément augmenté de bilirubine totale à partir de J 7 qui croît ensuite progressivement pour atteindre une valeur très forte à J 14 ; ceci incombe surtout à la bilirubine libre et témoigne d'une atteinte hépatique croissante.

Parmi les enzymes sériques d'origine hépatique, les phosphatases alcalines (ALP) et la gamma-glutamyl transférase (GGT) ont aussi des taux croissant modérément et progressivement à partir de j 7. Les ALP sortent des valeurs normales dès J 7 ; leur taux est multiplié par 3 à J 14. La GGT subit une progression plus modérée.

SDH et OCT, autres enzymes d'origine hépatique, ont des taux sériques faiblement augmentés dès J 4 - J 7, mais conservent des valeurs modérées durant toute l'expérience.

Le taux sérique de SGOT subit une élévation progressive tout au long de l'expérience ; il atteint une valeur préoccupante à J 14 qui atteste d'une atteinte hépatique à composante cytolytique, à laquelle peut s'adjoindre une atteinte musculaire ou myocardique.

Le taux sérique de Créatine Phospho Kinase (CPK) subit une élévation notable et progressive tout au long de l'expérience, sans atteindre cependant une valeur terminale très forte.

Le taux d'ammoniaque sérique augmente à J 11 pour atteindre une valeur limite à J 14, et suit les mêmes variations que les enzymes hépatiques.

Le phosphore, l'urée et la créatinine atteignent des taux sériques très préoccupants témoignant d'une forte atteinte rénale terminale.

Bilan :

Les différents paramètres étudiés de biochimie sanguine atteignent des taux sériques très préoccupants à J 14 qui imposent un pronostic sombre.

Dans les jours précédents, les valeurs sont toutes dans les limites admises, à l'exception des ALP ; leur intérêt diagnostique et pronostic est donc très faible dans notre étude. La SGPT s'avère notamment être un mauvais moyen d'investigation.

Par contre, leur étude rétrospective apporte des renseignements très intéressants :

- atteinte hépatique notable dès J 7, et croissante ensuite; cette atteinte est de type dégénératif,
- insuffisance rénale terminale.

5) Hématologie

(Voir tableau N° XV)

L'hématologie témoigne à partir de J 9 - J 11 d'une déshydratation croissante :

- élévation de l'hématocrite,
- élévation du nombre d'hématies,
- augmentation du taux sanguin d'hémoglobine,
- au plan biochimique = augmentation du taux sérique de protéines totales avec conservation des rapports entre les différentes fractions protéiques.

Abstraction faite de cette hémococoncentration, la numération érythrocytaire est considérée comme stable.

A J 9 - J 11, la formule leucocytaire est marquée par une neutrophilie relative qui permet le diagnostic de cystite.

En tenant compte de cette neutrophilie, les leucocytes circulants totaux sont en diminution croissante à partir de J 7 ; l'étude des formules leucocytaires absolues met en évidence un déclin très net du nombre des lymphocytes et des granulocytes tout particulièrement neutrophiles.

La lymphopénie est précoce et atteint un niveau terminal sévère ; elle peut s'expliquer par une destruction accrue des lymphocytes circulants, par une lymphopoïèse diminuée, ou par la conjonction des deux. Une atteinte directe des lymphoblastes précurseurs est très envisageable (voir histologie).

La neutropénie est moins nette, probablement moins précoce et par ailleurs altérée par la tendance à la neutrophilie qu'induit la cystite à J 9 - J 11. Elle peut s'expliquer par une destruction accrue dans la circulation, une sortie accrue des granulocytes du secteur sanguin sans compensation ; ou par une réduction de l'activité médullaire myéloïde. Cette dernière éventualité est étayée par l'apparition de nombreux neutrophiles jeunes à J 11 (30 %) et à J 14 (42 %) qui évoque une neutropénie dégénérative. Ceci est une constatation souvent faite en pathologie digestive équine et expliquée par la toxémie associée à ces cas ; cela peut aussi témoigner d'une atteinte centrale de la lignée myéloïde (voir histologie), par l'extrait toxique lui-même.

Enfin, l'atteinte conjointe lymphoïde et myéloïde sans modification immédiate de la lignée rouge doit conduire à envisager une activité radiomimétique de l'extrait sur la moelle osseuse hématopoïétique. Il est regrettable à cet effet que la thrombocytémie n'ait pas été suivie durant l'expérience, mais une numération rétrospective par la méthode indirecte fournit des résultats qui vont à l'appui de cette thèse.

6) Synthèse clinique

L'ensemble des paramètres étudiés permet donc de mettre en évidence des atteintes multiples :

- hépatique ,
- sanguine,
- digestive,

- nerveuse,
- musculaire ou myocardique,
- rénale.

La perturbation des fonctions hépatiques est la première perçue, par biochimie sanguine dès J 7, par biochimie urinaire et cliniquement à J 11.

Les perturbations hématologiques sont de deux ordres :

- leucopénie avec lymphopénie et neutropénie dès J 7 - J 9 et thrombocytopénie ;
- déshydratation dès j 9, qui n'est pas perçue à l'examen physique.

L'atteinte digestive est reconnue cliniquement à J 13 (petite diarrhée) ; elle explique l'aggravation de la déshydratation et peut être en relation avec l'atteinte hépatique. L'arrêt de consommation alimentaire coïncide avec ces signes digestifs.

Les premiers signes de déficit nerveux sont également notés à J 13 ; ils s'accroissent à J 14 sans atteindre un niveau préoccupant.

C'est en phase terminale que l'on envisage une atteinte musculaire ou myocardique, par biochimie sanguine ; l'auscultation cardiaque révèle alors une tachycardie importante, sans autre anomalie descellable.

L'atteinte rénale est également terminale ; elle peut être un facteur aggravant de la déshydratation et entrer dans les causes des troubles circulatoires (tachycardie, congestion périphérique).

On constate donc une atteinte successive de toutes les fonctions essentielles ; sans que des liens de cause à effet puissent être dressés entre tous les troubles observés.

L'étude clinique est surtout dominée par l'apparition tardive de signes préoccupants ; la leucoencéphalomalacie (LEM) serait donc un accident extrêmement brutal consécutif à une lente accumulation du (des) principe (s) toxique (s).

C) COMPTE-RENDU NECROPSIQUE

Jument n° 1

Date de la mort

- * animal . vu debout le 11 Août 1986 à 16 h 00
- . trouvé mort le 12 Août 1986 à 8 h 30
- * mort estimée à 4 - 5 heures du matin.
- * autopsie débutant à 9 h 30.

Examen externe

- * l'animal est en décubitus latéral droit, mais le côté gauche est également souillé de boue ; rigidité cadavérique ; aucune trace de débattement ;
- * les muqueuses oculaires sont jaunes et pâles ;
- * le recul des yeux signe une forte déshydratation ,
- * écoulement de sang par les naseaux lors de la suspension de la carcasse.

Examen sous-cutané

Normal sur peau thoracique, abdominale et céphalique.
Muscles de couleur normale.

Autopsie du système nerveux

Congestion des méninges cérébrales et cérébelleuses.

Cerveau = une petite zone de ramollissement très probable en région crâniale inférieure de l'hémisphère droit ; altération lors du prélèvement à gauche ;

Cervelet = abîmé lors de l'ouverture crânienne ; aspect normal ;

Moelle épinière = examen de C1 - Th2 - Th12 = normal

Autopsie particulière de l'encéphale

Après 6 heures de préfixation dans le formol le bloc cérébro-cérébelleux est divisé par 3 sections transversales :

- en avant du chiasma optique,
- à moitié du cerveau,
- en avant des tubercules quadri-jumeaux.

Après 48 heures de fixation, tout l'encéphale est découpé en tranches transversales de 1 cm d'épaisseur environ numérotées à partir de l'avant et disposées en ordre dans le formol.

Ceci permet de mettre en évidence une zone de destruction de la substance blanche en région crâniale de l'hémisphère cérébral droit :

- la perte de substance s'étend en profondeur sur 2 à 3 centimètres ;
- elle est surmontée par un cortex cérébral macroscopiquement intègre qui marque nettement les limites de la lésion.

Une lésion équivalente est notée dans l'hémisphère cérébral gauche, en région temporale basse.

Par ailleurs, il est constaté en surface des méninges plusieurs zones de 1 à 2 cm de diamètre, de consistance gélatineuse et de couleur jaune accentuée par la fixation.

Un ramolissement de la corne d'Ammon gauche est suspecté.

Organes génitaux et urinaires

Rein gauche : décapsulation facile,
décoloration du cortex, semblant friable,
médullaire externe congestionnée ;
quelques gouttes de liquide opalescent au niveau des crêtes pyéliquies.

Rein droit : décapsulation moins facile,
cortex friable,
même aspect modifié par l'hypostase.

Surrénale gauche : hémorragie de la corticale. S. droite : idem.

Uretères : normales.

Vessie : vide ; présence de pus ;
muqueuse congestivo-hémorragique ;

Urèthre : idem dans son premier segment ;

Utérus : muqueuse d'aspect congestif ;

Ovaires : kyste sur ovaire droit ;

Appareil digestif

Langue et cavité buccale)

Oesophage) RAS

Pharynx)

Estomac : tympanisé ; plein ;
 muqueuse antrale congestionnée ;
 absence de gastrophiles ;

Duodénum : normal ;

Jéjunum : congestion de la muqueuse ;
 ramolissement du contenu ;

Iléon : idem ;

Caecum : congestion et hémorragies en plaques sur toute la muqueuse ;
 quelques trichonèmes (larves) dans la paroi de la pointe caecale ;

Colon : I. : diarrhée ; congestion de la muqueuse ;
 II. : diarrhée ;
 III. et IV. : diarrhée ; congestion de la muqueuse ;
 flottant : diarrhée ; congestion ;

Rectum : diarrhée ;

Ganglion mésentérique : couleur sombre ;

Pancréas : hémorragique ;

Foie : congestion de tout l'organe exagérée à droite par l'hypostase ;
 décoloration diffuse du parenchyme avec ponctuation rouge
 sombre centrolobulaire ;
 périhépatite villeuse modérée.

Appareil circulatoire

Rate : exsangue ; forme, taille et couleur normales ;

Jugulaire gauche : hématome périveineux (prises de sang) ;

Coeur : forte dilatation du coeur droit, avec paroi mince et cavité
 élargie ; décoloration de tout le myocarde ;
 péricarde, endocarde, valvule : RAS ;
 absence de caillots : sang incoagulable ;

Sang : incoagulable et hémolysé dans toutes les régions du cadavre.;

Appareil respiratoire

Cavités nasales)
Larynx, trachée) RAS

TABLEAU XIII

	J -32	J -7	J 0	J 1	J 2	J 3	J 4	J 5	J 6	J 7	J 8	J 9	J 10	J 11	J 12	J 13	J 14	J 15	
Poids vif	320 kg	348 kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	160 kg estimés	
Examen à distance	debout et calme attentive										debout et calme attentive						faiblesse apathie	note modérée calvrière.	
Température rectale	36°4	36°6	36°4	36°4	36°5	36°4	37°2	37°6	36°8	36°3	37°1	38°	37°4	37°1	37°5		37°5	-	
Muqueuses	jaune léger						jaune accentué	jaune léger						jaune accentué	jaune ± marqué	jaunes et congestionnées	jaunes et pâles		
Appareil respiratoire	stabilité de la fonction respiratoire durant toute l'expérience																		-
Poul (fréquence)	-	-	32	32	36	38	38	44	40	36	40	36	40	36	36		52		
Coeur : fréquence	34	36	34	32	37	36	42	45	38	36	42	37	42	36	36		54		
rythme	régulier	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.	rég.		régulier	-	
auscultation								renforcement du 2 ^e bruit											
Appareil digestif	normal						diarrhée modérée bruits caecaux	normal						diarrhée modérée	traces de diarrhée				
Appareils génital et urinaire					sondage urinaire R.A.S.		sondage urinaire R.A.S.			sondage urinaire R.A.S.		sondage urine foncée		sondage urine foncée			sondage urine jaune-brun et trouble	-	
Locomotion	normal						tendance à traîner les postérieurs	curetage du sabot post. D	normal						tendance à traîner les postérieurs	répugne au déplacement, petite spasticité des quatre membres	-		
Fonctions nerveuses																			
Dose d'intoxication (poids équivalent)	0	0	maïs 1.500 g	maïs 1.500 g	maïs 1.500 g	maïs 1.500 g	maïs 1.000 g	maïs 1.000 g	riz 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	maïs 750 g	-	

T A B L E A U X V

Normes		Unité/l	j -7	j 1	j 4	j 7	j 9	j 11	j 14	j 15
2-6	Urée	mmol	7,3	5,6	7,0	6,4	6,8	5,2	19,8	morte
140-200	Créatinine	μ mol	110,4	81,7	86,3	146,1	155,6	125	394	
50-100	Protéines totales	g	80,3	80,6	79,3	86,5	85,7	89,6	93,5	
100-300	AST (SGOT)	UI	237	181	(non fait)	250	387,7	482	1847	
1-100	ALT (SGPT)	UI	10,8	3,7	13	5,6	7,2	9,7	21	
30-200	ALP (Phos. al.)	UI	155	191	164,9	227,9	207,4	250	432	
5-60	GT (GGT)	UI	7	9,2	7,4	12,2	18,1	33,3	60,8	
40-200	CPK	UI	91,9	86,2	89	129,2	202	180	109	
10-80	Bilirubine totale	μ mol	16,5	39,6	18,75	50,2	54,6	66	177	
9-73	Bilirubine libre	μ mol	10,34	34,8	8,15	42,7	37,6	50,6	154,2	
1-7	Bilirubine conj.	mol	6,6	4,76	10,6	7,5	17	15,4	22,8	
18-40	Albumine	g/l	31,6	32,9	34,7	33,5	33,7	34		
0,6-1,6	Phosphore	mmol	1,4	0,95	0,65	0,80	0,98	1	3,5	
2,8-3,4	Calcium	mmol	2,7	2,9	2,8	2,7	2,8	2,7	2,7	
13-108	Ammoniaque	μg/dl	échec	22	non fait	non fait	9	31	98	
3,3 [±] 4,2	OCT	UI/l	1,2	0,9	3,25	24,6	13,6	19,5		
< 1	SDH	UI/l		0,3	non fait	1,8	3,2	3,8	0,3	
8-11	Temps de Quick	Secondes	13	non fait	12	14	16,5	11	13	
Electrophorèse des protéines sériques										
37-44	Albumines	%	44,9	43	40,7	43,4	43,2	39,4	45,3	
56-63	Globulines totales	%	54,8	56,9	59,2	56,5	56,7	60,5	54,5	
4-5	α 1	%	2,4	1,5	3	4,5	3,5	5,5	2,7	
9-12	α 2	%	11	14,2	12,3	13	14,7	14,5	16	
18-22	β	%	18,5	17	21,4	17,5	16,1	19,9	13,9	
21-29	γ	%	22,9	24,2	22,5	21,5	22,4	20,6	21,9	

T A B L E A U X V

Normes		j - 7	j 1	j 4	j 7	j 9	j 11	j 14	j 15
7-10	x 10 ³ /mm ³ GLOBULES BLANCS	8,4	6,2	7,2	5,7	5,4	6,7	4,4	-
6-9	x 10 ⁶ /mm ³ GLOBULES ROUGES	8,76	7,59	8,01	9,02	7,60	9,16	11,56	-
11-18	g/100 ml HEMOGLOBINE	16,0	13,5	15,0	16,2	17,5	16,4	20,2	-
32-52	% HEMATOCRITE	43,6	35,4	37,1	41,1	41,0	47,1	57,0	-
34-58	μ ³ VOLUME MOYEN CEL.	48	47	47	46	-	52	49	-
12-18	μμg TAUX GLOBULAIRE MOYEN Hb	17,7	17,8	18,8	18,1	-	17,6	17,1	-
31-37	g/100m CONCENTRATION GLOB Hb	37,2	38,1	40,1	39,3	-	34,0	34,5	-
90-250	x 10 ³ /mm ³ PLAQUETTES	72,07	—	32,4	—	19,44	11,25	3,96	-
Formule leucocytaire relative									
35-70	NEUTRO.	67	67	66	70	74	83	80	-
0-3	EOSINO.	5	7	5	3	2	2	0	-
0-1	BASO.	1	1	3	1	1	3	0	-
25-70	LYMPHO.	24	19	22	24	20	11	15	-
0-4	MONO.	3	6	4	2	3	1	5	-
Formule leucocytaire absolue									
	NEUTRO.	5.628	4.154	4.752	3.990	3.996	5.561	3.520	-
	EOSINO.	420	434	360	171	108	134	0	-
	BASO.	84	62	216	57	54	201	0	-
	LYMPHO.	2.016	1.178	1.584	1.368	1.080	737	660	-
	MONO.	252	372	288	114	162	67	220	-

Conclusion

La mort de l'animal est expliquée par les atteintes rénale , hépatique et cardiaque ; l'atteinte digestive explique la déshydratation et laisse supposer des perturbations hydro-électrolytiques graves ; un syndrome hémorragique terminal est très probable, tandis que la cystite n'est pas tenue pour fatale.

Les lésions macroscopiques de l'encéphale, des reins, du foie et, à un degré moindre de congestion du tractus digestif, rendent l'hypothèse de L.E.M.. quasi certaine. La lésion cérébrale mérite plus que toute autre une confirmation histologique ; cependant l'atteinte dégénérative cardiaque, hépatique et rénale permet d'affirmer dès l'autopsie une activité toxique certaine chez le cheval de l'extrait aqueux utilisé.

Toutes ces lésions macroscopiques sont en accord avec les conclusions de l'examen clinique à J 14.

Commentaire

Parmi ces lésions dégénératives :

- * l'atteinte cardiaque (myocarde) n'est rapportée par aucun auteur traitant de L.E.M. équine ;
- * l'atteinte hépatique diffuse, sans fibrose (et donc récente), semble toxique plutôt que liée à la seule insuffisance cardiaque droite ; on peut cependant envisager une aggravation de l'atteinte hépatique par les troubles de la fonction cardiaque, lesquels sont apparus tardivement.

D) COMPTE-RENDU HISTOLOGIQUE

1) Système nerveux :

1.1. Cerveau

Le cerveau est marqué par deux zones étendues de nécrose colliquative (région crâniale de l'hémisphère droit et occipitale de l'hémisphère gauche), affectant la substance blanche sous-corticale.

Ces zones sont mal délimitées en profondeur par une substance blanche vacuolisée.

A distance, cette "spongieuse" disparaît, mais la substance blanche est affectée d'un oedème se manifestant par un élargissement notable des espaces périvasculaires. Ceux-ci sont souvent optiquement vides, pouvant donc correspondre à des altérations de nature autolytique, ou emplis d'un liquide hyalin, faiblement éosinophile et attestant d'un oedème cérébral ; ces collections d'oedème tendent à refouler le tissu nerveux environnant.

La substance grise cérébrale, macroscopiquement intègre, montre également à l'examen microscopique des figures d'oedème périvasculaire et périneuronal. Nombreux corps cellulaires de neurones sont condensés, hyperbasophiles avec des noyaux picnotiques ou en caryolyse ; ces figures sont tenues pour nécrotiques plutôt qu'autolytiques car leur répartition n'est ni homogène, ni diffuse.

La corne d'Amon gauche, qui montrait en macroscopie un aspect de ramolissement, est également marquée histologiquement par un oedème notable et la présence de nombreux corps neuronaux hyperbasophiles. Dans ces diverses zones, les hémorragies périvasculaires sont nombreuses étendues, et parfois accompagnées d'infiltrats lymphoplasmocytaires discrets.

En dehors des zones macroscopiquement altérées, l'aspect vacuolaire de la substance blanche est retrouvée en différents foyers ; cette vacuolisation quoiqu'effective reste toujours discrète.

L'étude des vaisseaux, dans toutes les régions du cerveau permet d'envisager une atteinte vasculaire diffuse et qui prend divers aspects :

- effraction de parois vasculaires ;
- hémorragies périvasculaires envahissant les espaces de Virchow-Robin et s'étendant parfois dans la substance nerveuse environnante ;
- nombreux infiltrats lymphocytaires ou lympho-plasmocytaires, toujours petits, en localisation périvasculaire ;
- quelques petits amas périvasculaires de macrophages pigmentés, et réagissant positivement à la coloration de Perls ; ces macrophages surchargés en hémosidérine peuvent témoigner de petites hémorragies datant de plusieurs jours au moins avant la mort ;

Sporadiquement, quelques artérioles présentent une hyalinisation de leur média, et un endothélium turgescent attestant par-là d'une réaction de ces cellules.

Enfin une artériole a été observée, qui montre une média épaissie, irrégulière, très basophile ; des réactions positives aux colorations de Von Kossa et de Perls attestent une imprégnation calcique et ferrique. Cette lésion est tenue pour ancienne.

1.2. Cervelet

Les altérations de type autolytique sont plus tangibles sur le cervelet, de sorte que les modifications lésionnelles du cortex sont difficiles à juger. Au niveau de la substance blanche, l'existence d'un oedème modéré peut être affirmée.

1.3. Bulbe rachidien

L'oedème de la substance blanche y est notable ; c'est dans ce segment du système nerveux central qu'il est le plus patent. Aucune autre altération morphologique n'est reconnue.

1.4. Moelle épinière

On retrouve dans le tissu nerveux médullaire des lésions déjà constatées dans l'encéphale ; elles sont associées ou non selon les segments :

- au niveau de C₁ seuls sont notés quelques petits infiltrats lymphocytaires périvasculaires ;
- au niveau de Th₂ ils sont également présents, ainsi qu'une hémorragie dans la substance grise ; la substance blanche est modérément oedématiée, et montre des gaines axonales de calibres hétérogène ;
- au niveau de Th₁₂, plusieurs hémorragies périvasculaires sont reconnues.

1.5. Méninges

Les méninges de tous les centres nerveux sont congestionnées, et parfois infiltrées d'hémorragies focales. Les taches jaunes reconnues macroscopiquement sur les méninges cérébrales sont mises en relation avec des collections d'oedème visibles à l'examen microscopique.

2) Organes urinaires et génitaux et surrénales :

2.1. Reins

Une autolyse importante affecte les deux reins tant dans le cortex que dans la médullaire. Dans ces deux zones, elle se manifeste sous la forme de tubes et tubules bordés de cellules épithéliales surcolorées, à noyau rond, central, condensé. Nombreux épithélium tubulaires sont en cours de desquamation.

Dans ce contexte autolytique, les altérations tubulaires sont difficiles à interpréter ; l'existence de lésions vraies des tubes contournées peut cependant être affirmée dans le cortex. Ceux-ci sont bordés de cellules irrégulières, très éosinophiles, ayant le plus souvent perdu leur noyau et qui sont fragmentées ou desquamées. La présence de telles cellules desquamées dans la lumière de tubes morphologiquement intègres souligne l'atteinte antemortem des segments situés en amont. Il s'agit de nécrose tubulaire, dont la valeur lésionnelle est étayée par la systématisation entre les pyramides de Ferrein de ces tubules nécrosés.

La présence de cellules tubulaires en mitose est interprétée comme une tentative de remplacement des cellules nécrosées. De plus, une autolyse aussi intense et rapide du parenchyme rénal peut être expliquée par l'existence antemortem de lésions dégénératives.

Dans le cortex on note par ailleurs la présence systématique d'un fin manchon de tissu fibreux autour des glomérules. Ceux-ci semblent intègres, et la fibrose est attribuée à l'âge de l'animal.

La médullaire, outre les altérations lésionnelles ou autolytiques des tubes est marquée par une forte congestion affectant principalement sa zone externe et qui s'exagère parfois en petites hémorragies. Certaines images évoquent enfin la présence dans la médullaire d'un oedème interstitiel.

Aucune réaction inflammatoire n'est observée ; par contre de nombreuses lésions vasculaires sont notées, qui seront discutées plus loin.

2.2. Vessie

L'épithélium transitionnel est marqué par une forte desquamation, imputable à l'autolyse ; il surmonte un chorion congestionné et, ponctué de petites hémorragies. Quelques amas lympho-histocytaires viennent confirmer le diagnostic clinique de cystite.

2.3. Utérus

Morphologie d'anoestrus ; le chorion est congestionné et infiltré de quelques lymphocytes.

2.4. Surrénales

Les glandes surrénales sont systématiquement et fortement congestionnées, et marquées d'hémorragies s'étendant en nappes dans le cortex ; ce sont des lésions classiquement attribuées au stress.

Les structures endocrines conservent une morphologie normale, quoiqu'altérée par l'autolyse, mais les spongiocytes de la zone fasciculée sont de petite taille.

3) Appareil digestif :

3.1. Estomac

- * portion malpighienne = congestion modérée du derme en région papillaire ;
- * portion glandulaire = la muqueuse est altérée en surface par l'autolyse ; son chorion est très congestionné et certains vaisseaux ont un endothélium à cellules turgescentes et à noyau volumineux ; cet aspect est considéré comme un début de réaction de l'endothélium.

La sous-muqueuse et la séreuse sont marquées par diverses altérations de leurs vaisseaux qui seront évoquées plus loin.

3.2. Duodénum

Autolyse très avancée de la muqueuse ; absence de lésion.

3.3. Jejunum

La muqueuse montre les mêmes altérations autolytiques. Le chorion et la sous-muqueuse sont congestionnés (congestion passive) et contiennent d'abondantes cellules, pseudo-éosinophiles.

Dans la sous-muqueuse, deux petits amas de macrophages pigmentés, à gros cytoplasme sont visibles ; des colorations négatives de Hale et de Perls nous font tenir ces pigments pour des lipofuschines.

3.4. Iléon

Mêmes altérations autolytiques et lésionnelles.

3.5. Caecum

La muqueuse est fortement autolysée ; des lymphocytes et plasmocytes nombreux sont présents dans son chorion, de même que des cellules hétérophiles abondantes. La sous-muqueuse congestionnée, recelle également ces types cellulaires ; elle est envahie dans sa zone interne par de nombreux bacilles. Au niveau de la pointe caecale, la musculature externe montre une fibrose diffuse et deux granulomes typiques sont présents, à centre nécrotique et comportant des cellules à corps étranger ; ces lésions sont attribuées à des larves de Trichonèmes.

L'examen des vaisseaux de la sous-muqueuse permet de reconnaître différentes atteintes vasculaires.

3.6. Colon

Dans ces différentes portions, le colon est marqué, par une forte autolyse, par une stase veineuse notable et par la présence de cellules pseudo éosinophiles nombreuses dans le chorion, de même que des lymphocytes et plasmocytes.

Les plaques de Peyer ont une morphologie conservée mais apparaissent peu cellulaires.

Aucune lésion vasculaire manifeste n'est reconnue sur cet organe.

3.7. Pancréas

Il est fortement autolysé et marqué par de vastes et nombreuses hémorragies interlobulaires dans lesquelles ont proliféré de nombreux et grands bacilles groupés en chaînettes.

Des trajets fibreux importants témoignent d'une péripancréatite chronique.

3.8. Foie

L'organe est affecté en totalité par les mêmes altérations ; la lobulation est conservée, régulière, de même que le rapport porto-centrolobulaire. Ceci souligne l'absence de pathologie hépatique ancienne en dehors d'une petite fibrose organisée, constante, autour des veines centrolobulaires et qui est imputable à l'âge de l'animal.

L'atteinte dominante consiste en une nécrose de liquéfaction majeure, répartie dans tout l'organe et limitée à la zone centrale de chaque lobule. Ces territoires entourent des veines centrolobulaires peu ou pas congestionnées et sont envahis d'un magma nécrotique, mêlé de sang dans les parties déclives où une prolifération bacillaire est notable. Dans ce magma, des précipités bruns sont présents ; leur répartition indique qu'il puisse s'agir de cellules de Küpffer surchargées ; une réaction de Perls négative suggère qu'il s'agisse de pigments biliaires.

Ces centres nécrosés de lobules sont souvent circonscrits par des hépatocytes stéatosés ; en région périlobulaire, les hépatocytes ont une morphologie normale, mais les travées de Remack sont séparées par des sinusoides dilatés ; quelques lymphocytes y sont reconnus.

Enfin, de petites hémorragies affectent les espaces portes, tout particulièrement dans les zones déclives du foie.

4) Appareil respiratoire :

Les deux poumons sont massivement hémorragiques, le flux sanguin envahissant les structures alvéolaires et bronchiques. La présence de bulles d'air dans les alvéoles atteste de mouvements respiratoires après l'installation de cette atteinte majeure et totale du parenchyme pulmonaire.

Une prolifération bactérienne importante est notée dans les collections sanguines.

5) Organes hématopoiétiques et appareil circulatoire :

5.1. Rate

La pulpe blanche montre une atteinte régressive majeure : les structures folliculaires sont absentes et les gaines périartériolaires quasi-inexistantes. Il ne subsiste de la pulpe blanche que les cellules réticulaires, à cytoplasme développé et noyaux peu réguliers.

La pulpe rouge quant à elle montre de très nombreux macrophages surchargés d'hémosidérine, mis en évidence par une réaction positive de Perls ; il s'agit d'une réelle hémosidérose splénique.

5.2. Moelle osseuse

L'examen histologique est pratiqué sur un prélèvement issu de la 2ème vertèbre thoracique. Il révèle une moelle osseuse très adipocytaire pour un os spongieux où la fonction hématopoiétique est normalement importante.

Les cellules souches des diverses lignées sont cependant représentées, celles de la lignée rouge étant dominantes ; on reconnaît de nombreux érythroblastes, des myéloblastes et myélocytes, des mégacaryocytes ; les métamyélocytes éosinophiles sont nombreux.

L'hypoplasie médullaire n'est pas manifeste mais ne peut être exclue. D'autre part, on note de nombreux macrophages chargés d'hémosidérine ainsi que des foyers hémorragiques récents.

5.3. Coeur

Le tissu myocardique des deux ventricules et du septum inter-ventriculaire a été étudié en microscopie.

Malgré l'évidence, en macroscopie, d'une atteinte dégénérative (coeur flasque et décoloré), aucune altération microscopique n'est significative : les fibres myocardiques ont une morphologie normale, avec des noyaux centraux et une double striation nettement visible. Les anomalies observées sont de nature artéfactuelle.

Une prolifération bacillaire est visible dans le conjonctif sous-endocardique du coeur droit, ainsi que quelques microhémorragies sous l'endocarde ventriculaire gauche.

5.4. Etude particulière des vaisseaux

L'examen histologique des centres nerveux a révélé diverses lésions de leur réseau vasculaire ; il s'agit d'effractions des parois vasculaires, d'hémorragies plus ou moins étendues, d'infiltrats périvasculaires de cellules mononucléées ou de macrophages hémosidériniques.

Ces lésions s'ajoutent à l'atteinte des centres nerveux proprement dits qui consiste en un oedème diffus et en deux foyers de nécrose colligative.

L'examen histologique de chaque organe a donc comporté une étude attentive des vaisseaux ; diverses atteintes vasculaires ont été observées.

a) *les effractions vasculaires et les hémorragies* sont nombreuses, réparties sur les centres nerveux, les reins, les glandes surrénales, le pancréas, différents segments digestifs, le foie, les poumons et le coeur.

Elles sont vastes, diffuses, étendues dans le pancréas et les poumons ; elles restent périvasculaires dans les centres nerveux, le conjonctif sous-endocardique et les reins, et se limitent au tissu conjonctif des espaces portes dans le foie. Elles sont souvent encore plus focales, prenant l'aspect d'hémorragies sous-endothéliales discrètes. Dans le rein gauche, une hémorragie intrapariétale importante clive la média d'une artériole.

b) *une réaction endothéliale* est visible par ailleurs sur les capillaires sanguins et petits vaisseaux de différents organes ; les cellules endothéliales présentent alors un noyau volumineux comme dans le chorion de l'estomac fundique, ou prennent une morphologie haute, avec un cytoplasme turgescent dans le pancréas et la sous-muqueuse caecale.

c) *une hyalinisation de la média* notamment des artérioles, s'ajoute fréquemment aux atteintes endothéliales. Cette dégénérescence hyaline des média artériolaires est patente dans le chorion et la sous-muqueuse fundiques. Les fibrocytes de la média subissent alors une ballonnisation de leur cytoplasme ; des images de vacuolisation de leurs noyaux sont également observées.

- d) *une dégénérescence hydropique* affecte aussi les médias des veines et artérioles ; ces altérations sont observées plus particulièrement dans la moelle osseuse et dans la sous-muqueuse caecale. Des vacuoles étendues, optiquement vides, d'aspect hydrique, se forment dans les média profondes, repoussant un endothélium réactionnel vers l'intérieur de la lumière vasculaire. Ces aspects des endothélium et des médias vasculaires seraient attribués à l'autolyse si des réactions inflammatoires typiques ne leur étaient parfois associées.
- e) *une lésion d'artérite*, avec afflux de granulocytes neutrophiles est ainsi observée dans la sous-muqueuse de l'estomac fundique. Dans la séreuse du fundus, le tissu conjonctif de plusieurs vaisseaux est infiltré de cellules mononuclées et de granulocytes. Dans le caecum, des leucocytes à majorité polynucléaire adhèrent à l'endothélium de plusieurs artérioles, évoquant le début d'un processus de diapédèse. Ces figures sont tenues pour être le premier stade d'une lésion d'artérite.
- f) *les infiltrats lymphocytaires ou lympo-plasmocytaires*, observés dans les centres nerveux ; sont retrouvés de façon bilatérale au niveau rénal , ils sont périvasculaires, et toujours peu importants.
- g) *des amas de macrophages surchargés d'hémosidérine*, enfin, sont présents autour de quelques vaisseaux du cerveau. Il est donc permis de reconnaître une atteinte diffuse du système vasculaire. Elle prend divers aspects selon les organes où elle siège ou, plus probablement, le temps dont à pu bénéficier chaque lésion pour s'installer avant la mort de l'animal.

6) Bilan histologique :

L'étude histologique a permis de reconnaître des lésions microscopiques multiples et qui siègent sur la plupart des organes examinés ; elles s'accordent pour la plupart avec les observations macroscopiques de l'autopsie et les conclusions des examens cliniques.

L'étude analytique des constatations histologiques permet de dégager des lésions graves et pouvant expliquer la mort :

- sur l'ensemble des centres nerveux, puisqu'il s'agit de lésions irréversibles (nécrose) ou diffuses (oedème et hémorragies),
- sur les reins et le foie qui ont subi une atteinte diffuse ,
- sur les poumons qui sont massivement hémorragiques. Cette atteinte pulmonaire, vue son étendue, est assurément responsable ou synchrone de la mort de l'animal, sans préjuger de sa pathogénie.

La recherche par l'histologie d'une atteinte digestive, en dehors de la congestion et des nombreuses lésions vasculaires constatées sur les intestins, est empêchée par la forte autolyse qui siège sur ces organes. Cependant, la diarrhée constatée cliniquement et à l'autopsie doit être considérée et a pu contribuer à la mort par les perturbations hydro-électrolytiques qu'elle a pu entraîner.

L'atteinte cardiaque constatée à l'autopsie n'est pas confirmée par l'examen histologique de cet organe. Ceci s'explique par l'inadaptation des techniques histologiques conventionnelles pour l'étude des pathologies musculaires et myocardiques, et ne contredit pas les conclusions de l'autopsie.

De façon plus synthétique, les lésions observées permettent de reconnaître six grands groupes lésionnels :

- 1) une atteinte diffuse des parois vasculaires.;
- 2) un syndrome hémorragique affectant le système nerveux, les reins, les glandes surrénales, le foie et le pancréas, certains segments digestifs et les poumons ;
- 3) une insuffisance cardiaque accompagnée de conséquences morphologiques sur les poumons et le foie ;
- 4) une atteinte du foie et des reins, organes impliqués dans tout processus toxique, grâce par son caractère diffus ;
- 5) une régression lymphoïde notable dans la rate et les plaques de Peyer accompagnée d'une probable hypoplasie médullaire ;
- 6) une atteinte nerveuse centrale sous la forme d'oedème, d'hémorragies et de nécrose.

En marge de ces ensembles pathologiques, une prolifération bactérienne importante a été constatée sur plusieurs organes. Elle n'est accompagnée d'aucune réponse inflammatoire et surtout siège préférentiellement dans les territoires congestivo-hémorragiques de chaque organe. Il s'agit donc d'une multiplication bactérienne post-mortem consécutive à la bactérihémie qui a accompagné la mort de l'animal.

7) Discussion :

7.1. Atteinte de parois vasculaires

Des altérations vasculaires non imputables à l'autolyse ont été reconnues dans les centres nerveux et sur différents organes (reins, estomac, intestins et caecum, pancréas). Elles sont probablement présentes sur d'autres organes sans avoir pu y être mises en évidence, et laissent supposer une atteinte générale et diffuse des parois vasculaires.

Les différentes images observées permettent d'envisager une évolution pathogénique dont elles représenteraient les différents stades :

- a) réaction endothéliale à un facteur d'agression, les cellules endothéliales présentant alors un noyau volumineux, puis un cytoplasme turgescant leur donnant une forme haute ;
- b) atteinte des médias, débutant par une hyalinisation, avec ballonnisation des cytoplasmes et vacuolisation des noyaux de leurs cellules, et évoluant vers la dégénérescence hydropique avec formation de vacuoles ;
- c) diapédèse de leucocytes à un stade plus ou moins avancé de cette atteinte primitive de l'endothélium et de la média, et aboutissant à la lésion typique d'artérite ou à la formation de manchons cellulaires périvasculaires.

7.2. Syndrome hémorragique

Les hémorragies présentes sur de nombreux organes peuvent être une conséquence de ces lésions vasculaires primitives. Elles doivent également être reliées à la thrombocytopénie progressive constatée du vivant de l'animal :

- celle-ci pourrait être consécutive aux hémorragies, par consommation de thrombocytes ;

- ou à l'inverse être une des causes des hémorragies ; ce serait alors une thrombocytopénie d'origine centrale, par atteinte des mégacaryocytes médullaires.

La seconde hypothèse est la plus probable puisque la thrombocytopénie a été progressive tout au long de l'expérience, puisque les hémorragies sont récentes et de survenue brutale, puisqu'enfin l'examen histologique de la moelle osseuse révèle un petit degré d'hypoplasie médullaire.

Les vastes hémorragies pulmonaires évoquent quant à elles un infarctus ; elles doivent donc trouver une cause en aval des poumons, qu'il s'agisse d'une obstruction des veines pulmonaires (non constatée à l'autopsie) ou d'une défaillance cardiaque.

7.3. Insuffisance cardiaque

L'examen histologique n'a pas permis de mettre en évidence de lésion microscopique cardiaque ; par contre l'infarctus pulmonaire et la nécrose centrolobulaire au niveau hépatique, par hypoxie consécutive à une mauvaise irrigation sanguine, concourent à envisager une atteinte cardiaque globale. La décoloration du myocarde constatée à l'autopsie vient confirmer cette hypothèse.

Le suivi de la fonction cardiaque, du vivant de l'animal, permet par ailleurs de considérer cette atteinte cardiaque comme une défaillance terminale. La mort de la jument lui serait due, ainsi qu'à l'insuffisance respiratoire concomittente.

Dans ce contexte, l'atteinte hépatique, diffuse et grève, ne trouverait dans l'insuffisance cardiaque qu'une cause d'aggravation.

7.4. Atteinte dégénérative du foie et des reins

Ces deux organes, impliqués de façon non spécifique dans de nombreux processus toxiques, montrent des lésions de nécrose :

- nécrose tubulaire au niveau des reins, siégeant probablement sur les tubes contournés proximaux ;
- nécrose centrolobulaire au niveau hépatique .

Ces deux atteintes sont extrêmement graves, de par leur caractère diffus et étendu ; elles auraient entraîné la mort si la défaillance cardiaque n'était pas intervenue.

L'atteinte rénale est non spécifique ; et correspond à la réponse de cet organe à l'action de la plupart des produits qui lui sont toxiques. Le suivi biochimique permet de la tenir pour très récente.

L'atteinte hépatique, quant à elle est plus caractéristique, quoi que fréquente en toxicologie. En l'absence d'un suivi clinique quotidien montrant une fonction cardiaque cliniquement normale jusqu'à j 13, et une élévation du taux sérique des enzymes hépatiques dès j 7 (la mort survenant à j 15), une telle lésion hépatique trouverait une cause suffisante dans l'insuffisance cardiaque.

Dans le cas présent elle reconnaît une cause toxique, aggravée par l'insuffisance cardiaque terminale. Cette atteinte toxique pourrait s'apparenter à la "maladie veino-occlusive" décrite dans les cas d'intoxication aiguë par les alcaloïdes de type pyrazolidine. La dilatation des capillaires sinusoides en périphérie des foyers de nécrose vient à l'appui de cette hypothèse, de même que les graves hémorragies pulmonaires décrites dans cette affection.

De tels foyers de nécrose centrolobulaire sont également rapportés dans les intoxications aiguës par les aflatoxines, et dans nombreux cas de leuco-encéphalomalacie équine d'évolution rapide (Jubb and Kennedy, the liver in Pathology of Domestic Animals, second edition, Academic Press).

7.5. Régression lymphoïde

Cette atteinte n'est pas rapportée dans les cas de leuco-encéphalomalacie équine.

Dans le cas présent, elle est manifeste ; sa constatation du vivant de l'animal par suivi hématologique est confirmée par l'histologie de la rate et, à un degré moindre, des plaques de Peyer.

Une granulocytopénie et une thrombocytopénie avaient également été reconnues cliniquement. L'histologie ne peut les objectiver que par une image très adipocytaire de la moelle osseuse examinée.

Ces constatations conduisent à envisager une activité radiomimétique de l'extrait fusarien utilisé. Une telle activité est rapportée pour la moniliformine, produite par certaines souches de F. moniliforme. Recherchée par chromatographie CCM dans l'extrait utilisé, elle n'a pas été mise en évidence.

7.6. Atteinte nerveuse centrale

L'examen nécropsique a mis en évidence deux foyers de ramollissement cérébral dans la substance blanche sous-corticale. Histologiquement, ces foyers sont des territoires nécrosés, entourés par un tissu nerveux oedématié et entaché d'hémorragies. Oedèmes et hémorragies sont également retrouvés dans les territoires nerveux macroscopiquement intègres, associés à des lésions vasculaires déjà évoquées dont ils semblent être la conséquence.

De tels foyers de nécrose cérébrale, chez d'autres espèces (homme, carnivores domestiques) reconnaissent préférentiellement une cause ischémique, par thrombose des trajets artériels qui les irriguent. Une pathogénie de ce type peut être envisagée dans le cas présent, mais aucune image d'obstruction vasculaire ne permet d'étayer cette hypothèse.

Il reste que les lésions nerveuses observées sont tenues pour une conséquence particulière, sur ce tissu, de lésions vasculaires primitives.

Toutes les modifications morphologiques tant macroscopiques que microscopiques, sont réunies dans les centres nerveux pour confirmer dans le cas présent le diagnostic de leucoencéphalomalacie équine. La nécrose hépatique centrolobulaire, et des lésions moins univoques comme la congestion du tractus digestif et les hémorragies du cortex surrénalien, sont des éléments supplémentaires de confirmation.

Ces lésions, qu'il s'agisse de l'oedème cérébral et médullaire ou des infiltrats lympho-plasmocytaires périvasculaires sont toujours discrètes, probablement parce que la mort rapide de l'animal n'a pas permis leur installation totale.

E) CONCLUSION GENERALE

Les constatations cliniques, nécropsiques, et histologiques convergent et permettent d'établir le diagnostic formel de leucoencéphalo-malacie équine.

Mais surtout, l'étude de chaque fonction, puis l'examen morphologique de chaque organe après la mort de l'animal permettent d'envisager une pathogénie de l'affection passant par une toxicité vasculaire de l'extrait fusarien.

Cette hypothèse déjà émise est confortablement étayée par ce cas expérimental.

Deux faits restent en marge de ce schéma pathogénique :

- 1°) d'une part l'animal est mort d'une défaillance cardiaque, non rapportée dans les cas spontanés de L.E.M. ;
- 2°) d'autre part la régression lymphoïde constatée aux plans cliniques et lésionnels n'est pas non plus rapportée dans les cas de L.E.M..

La défaillance cardiaque est attribuée à l'utilisation d'une dose d'intoxication très forte qu'a permis une administration par sondage oesophagien de l'extrait fusarien. De plus cet extrait provient de la culture au laboratoire d'une souche de F. moniliforme reconnue comme très toxique chez le rat de 20 jours et le caneton Pékin de 1 jour (Marasas, communication personnelle à F. PELLEGRIN).

Sous cet angle, il y a une chance certaine à ce que les lésions nerveuses spécifiques de l'affection, et ayant permis le diagnostic, aient eu le temps de s'installer.

La régression lymphoïde pourrait également trouver sa cause dans la dose utilisée ; plus simplement l'extrait utilisé peut contenir des substances non impliquées directement dans la L.E.M. ; enfin, la fonction lymphoïde n'a peut être pas fait l'objet d'investigation particulière lors des études précédentes sur la L.E.M.

Rappelons enfin que cette expérimentation est la première reproduction expérimentale rapportée de L.E.M. au moyen d'un extrait aqueux de culture fusarienne, ce qui permet d'affirmer que les principes en cause sont hydrosolubles.

ETUDE HISTOLOGIQUE DES LESIONS INDUITES CHEZ LE RAT PAR DIVERS EXTRAITS FUSARIENS

A) Note préliminaire

Il s'agissait d'effectuer au service d'Anatomie-Pathologique de l'ENVT une double lecture des lames histologiques préparées en 1985 et 1986 au Centre ORSTOM de Nouméa à la suite des expérimentations cliniques sur rats de 20 jours.

A l'époque, la plupart de ces lames ont été lues, amenant des comptes-rendus histologiques non tenus pour définitifs vues les difficultés d'interprétation rencontrées.

L'étude conduite à l'ENVT, avec le Professeur P. CABANIE a permis de préciser cette interprétation ; les premières conclusions sont exposées ci-après. Le compte-rendu définitif sera apporté ultérieurement car il nécessite une nouvelle lecture de l'ensemble des lames, ayant pour but un grading des lésions observées qui permettra de les discuter en fonction des doses administrées. Une telle lecture était impraticable, en 15 jours.

B) Lames histologiques lues à l'ENVT

Ont été lues les séries suivantes)	2	
(expérimentation par voie orale),)	6	
)	7	
ainsi que les lames témoin corres-)	9	Souche 68 R
pondantes:)	10	
)	11	
)	15	
)	5	Souche 68 B

C) Modalités de lecture et d'interprétation

Une image histologique est toujours la somme de quatre composantes qui sont :

- la structure histologique normale du tissu étudié ;
- ses altérations dues à la technique d'étude utilisée ;
- ses altérations autolytiques consécutives à la mort de l'animal ;
- ses lésions proprement dites, c'est-à-dire ses réponses à l'action d'un facteur d'agression.

La lecture rapide de nos lames montre que les images histologiques des organes de rats ayant reçu des extraits fusariens sont conformes à ce principe.

- * *L'histologie normale* du rat de 20 jours est bien connue ; elle est confirmée par la lecture des lames-témoins.
- * *Les altérations artéfactuelles* sont observées sur les lames-témoins, lues en comparaison aux connaissances histologiques acquises. Elles sont retrouvées sur les lames correspondant aux animaux intoxiqués, toutes les lames ayant été traitées par la même technique.
- * *Les lésions vraies* sont dégagées par la lecture comparative des lames histologiques issues d'animaux intoxiqués et sacrifiés avec les lames-témoins issues d'animaux sains sacrifiés dans les mêmes conditions.
- * *Les altérations autolytiques* sont observées sur les lames issues d'animaux traités et morts en cours d'étude. Par comparaison avec les animaux traités et sacrifiés sont reconnus :
 - les aspects d'autolyse,
 - les modifications morphologiques liées à la saignée,
 - les aggravations de lésions.

D) Lésions observées (souche 68R)

Les lésions observées sur les animaux traités et sacrifiés portent sur =

- les reins,
- le foie,
- l'estomac,
- le thymus,
- la rate.

1°) Lésions rénales

Elles consistent en l'apparition de vacuoles plus ou moins nombreuses et plus ou moins grosses au pôle basal des cellules épithéliales des tubes contournés proximaux. Ces lésions portent donc sur la bordure mitochondriale des cellules.

2°) Lésions hépatiques

Elles sont de quatre ordres.

- a - *perte de glycogénose* = la surcharge glycogénique normale des hépatocytes chez le jeune rat, constatée sur les animaux témoins disparaît totalement chez les animaux traités.

Cette surcharge glycogénique est reconnue par la forme anguleuse des hépatocytes, leur aspect végétal, et leur cytoplasme optiquement vide (solution du glycogène lors du traitement des organes).

- b - *stéatose focale*, dispersée et non systématisée. Ces aspects assez fréquents chez le rat, ne sont pas retrouvés sur les animaux-témoins, attestant de leur nature lésionnelle.

La stéatose est reconnue par la forme ronde des hépatocytes, à noyau excentré ou non visible, et à cytoplasme optiquement vide (entraînement des lipides par le toluène lors du traitement des organes).

- c - *nécrose hépatocytaire isolée*, non systématisée, se manifestant par la présence d'hépatocytes à noyau condensé et cytoplasme hypercolorable.

- d - *surcharge des cellules de Kupffer* : de nombreux précipités bruns, bordant les capillaires sinusoides, sont tenus pour des cellules de Kupffer surchargées de par leur localisation homogène. Cette surcharge correspondrait à une accumulation de pigments biliaires (bilirubine).

Les quatre lésions évoquées ici sont observées isolément ou associées sur chaque animal. Une étude fine avec grading pourra permettre d'envisager leur évolution dans le temps, et leur installation en fonction des doses.

3°) Lésions gastriques

Elles consistent en dilatation constante des glandes fundiques dans leur partie moyenne, sans modification visible des épithélium. L'estomac malpighien n'est pas altéré.

4°) Lésion thymique

Les thymus de tous les animaux traités présentent une structure inversée : les centres des lobules ont une densité cellulaire

supérieure à celle des couronnes lymphocytaires. Cet aspect correspond à une perte de cellularité des couronnes où des débris nécrotiques de lymphocytes sont souvent visibles. Il doit être rapproché des pertes de poids relatif du thymus constatées à l'autopsie.

5°) Lésion splénique

Une régression lymphoïde est notable sur la rate de certains animaux traités ; cette lésion est inconstante, d'intensité variable et mérite plus que toute autre d'être précisée par grading.

E) Discussion

Le panorama lésionnel ainsi dégagé permet d'envisager un schéma pathogénique qui ne peut pas être rapproché de celui supposé chez le cheval.

Une pathologie hémolytique est très probable, exprimée morphologiquement par la surcharge en bilirubine des cellules de Küppfer ; une relation peut-être faite avec les signes cliniques d'ictère. L'étude des résultats hématologiques reste à faire sous cet angle.

Cette pathologie pourrait alors expliquer les lésions rénales qui correspondent vraisemblablement à une anoxie. Cependant, une atteinte directe des extraits sur la fonction respiratoire des cellules des tubes contournés proximaux ne doit pas être exclue.

A ces deux atteintes s'ajoutent des lésions beaucoup moins spécifiques, habituellement attribuées au stress, sans préjuger de sa cause :

- inversion thymique,
- lésions hépatiques.

Parmi celles-ci, la perte du glycogène est à rapprocher de l'anorexie constatée cliniquement.

L'atteinte thymique pourrait reconnaître une cause plus spécifique si la régression lymphoïde est confirmée au niveau splénique.

L'aggravation de ces lésions sur les animaux morts en cours d'étude explique précisément qu'ils soient morts.

La morphologie lésionnelle peut également avoir été amplifiée par l'autolyse.

CONCLUSION

Cette mission d'un mois à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse s'avère rétrospectivement avoir été trop courte ; 15 jours prévus pour l'étude histologique de 2 000 lames histologiques de rats étaient tout particulièrement insuffisants et ont imposé un choix parmi celles-ci.

La mission ne s'est déroulée dans de bonnes conditions, et ses buts n'ont été atteints, que grâce à l'excellent accueil qui m'a été réservé par les Professeurs VAN HAVERBEKE, CABANIE, LAUTIE, CHANTAL, TOURNUT et JOUGLARD.

Ceux-ci ont volontier accepté de travailler jusqu'à des heures tardives et d'adapter leur emploi du temps au mien chaque fois qu'il était possible.

Ainsi, le diagnostic de leucoenéphalomalacie équine a pu être confirmé, ce qui est un élément essentiel pour la poursuite du programme Fusarium ; un schéma pathogénique de l'affection a été proposé, qui est étayé par un faisceau d'éléments cliniques et lésionnels convergents.

Enfin, le panorama des lésions induites chez le rat de 20 jour par les extraits fusariens a été précisé, ce qui peut conférer à cette intoxication expérimentale une valeur de test.

L'étude complète et définitive chez le rat peut être conduite localement sur la base des constatations faites à l'ENVT, et donnera lieu à un rapport particulier.

