

DIRECTION DU DEVELOPPEMEN  
DE L'ECONOMIE RURALE  
DE LA  
NOUVELLE-CALEDONIE  
ET DEPENDANCES

**LA FUSARIOSE DU MAÏS  
ET LES MYCOTOXINES FUSARIENNES  
EN NOUVELLE-CALEDONIE**

Synthèse des travaux effectués  
en 1982, 1983, 1984 et 1985

SERVICE DE PHYTOPATHOLOGIE  
DU CENTRE ORSTOM DE NOUMEA



INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION

CENTRE DE NOUMEA BP A 5 CEDEX NOUVELLE CALEDONIE

LA FUSARIOSE DU MAIS ET LES MYCOTOXINES FUSARIENNES  
EN NOUVELLE CALEDONIE.

Synthèse des travaux effectués en 1982, 1983, 1984 et 1985

par :

-B. BOCCAS, F. PELLEGRIN, F. KOHLER, J. HAMEURT et J. KONGOULEUX.  
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.

-J. DOMENECH et F. STACHURSKI.  
Laboratoire de l'I.E.M.V.T. à Port-Laguerre.

-C. LAMBERT et J. MAGNOL.  
Ecole Vétérinaire de Toulouse.



## S O M M A I R E

<b><u>INTRODUCTION</u></b>	1
---	
<b><u>ETIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE DE LA FUSARIOSE DU MAIS</u></b>	
1 - IDENTIFICATION DES ESPECES PARASITANT LE MAIS EN NOUVELLE-CALEDONIE	5
2 - TAUX DE CONTAMINATION DU GRAIN PRODUIT EN NOUVELLE-CALEDONIE	6
3 - LES VOIES D'INFECTION EMPRUNTEES PAR <u>F. MONILIFORME</u>	8
4 - ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA FUSARIOSE INTERNE AU COURS DU CYCLE CULTUREL DU MAIS AU CHAMP	10
. <u>Méthode d'étude</u>	
. <u>Caractéristique des champs étudiés</u>	
. <u>Résultats</u>	
. <u>Conclusion</u>	
5 - ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA FUSARIOSE INTERNE AU COURS D'UN CYCLE CULTURAL EN SERRE	12
. <u>Le dispositif expérimental</u>	
. <u>Les essais</u>	
. <u>Résultats des essais</u>	
6 - DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS AU CHAMP ET EN SERRE	14
7 - INFLUENCE DE LA NATURE DU SOL, DES AMENDEMENTS, ET DES CHOIX VARIETAUX SUR LE TAUX D'INFECTION DU GRAIN PRODUIT EN NOUVELLE-CALEDONIE	17
<b><u>ETUDE DE LA TOXICOGENIE DU FUSARIUM MONILIFORME</u></b>	
1 - LES METHODES DE PREPARATION DES CULTURES DE FUSARIUM	20
<b>Les substrats</b>	
<b>Les conditions de culture</b>	

2 - LES METHODES D'ADMINISTRATION AUX ANIMAUX	23
Administration par injection	
Administration par dépôt cutané	
Administration <u>per os</u>	
Administration par sondage oesophagien	
---	
3 - LES RESULTATS CLINIQUES DES ESSAIS D'INTOXICATION	26
Administration par injection intrapéritonéale	
Injection dans l'oeuf de poule embryonné	
Dépôts cutanés	
Administration <u>per os</u>	
Administration par sondage oesophagien	
4 - LES RESULTATS NECROPSIQUES ET HISTOLOGIQUES	
A - <u>CANETONS</u>	33
I - Symptomatologie	
II - Nécropsie	
III - Histologie	
IV - Conclusion	
B - <u>RATS</u>	35
I - Symptomatologie	
II - Nécropsie	
III - Histologie	
IV - Conclusion	
5 - PROCEDURES MISES EN OEUVRE DEPUIS LE 15 SEPTEMBRE 1985	
PROCEDURE DE TOXICOLOGIE CLINIQUE	40
PROCEDURE DE SACRIFICE DES ANIMAUX	46
PROCEDURE D'AUTOPSIE	48
PROCEDURE DE TRAITEMENT ET DE LECTURE DES PRELE- VEMENTS HISTOLOGIQUES	52
PROCEDURE D'IDENTIFICATION ET DE GESTION DE L'ELEVAGE DES RATS REPRODUCTEURS	57
<u>CONCLUSION</u>	63
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

## INTRODUCTION

Dans la mycoflore associée à Zea mays, le genre Fusarium est représenté par de nombreuses espèces, en majorité faiblement pathogènes ou saprophytes. Mais trois d'entre elles, dotées d'un pouvoir pathogène plus élevé, sont cependant des parasites majeurs du maïs. Il s'agit de Fusarium graminearum, de Fusarium moniliforme et de Fusarium subglutinans.

Ces espèces ont été identifiées sur tous les continents, dans toutes les grandes zones de culture du maïs, avec des fréquences relatives qui varient en fonction des conditions géographiques ou climatiques (26). Ainsi, F. graminearum prédomine en Italie et dans le Sud de la France, alors qu'en Europe de l'Est F. moniliforme est plus fréquemment isolé pendant la période la plus chaude de l'été, avant d'être supplanté par F. graminearum qui se développe plutôt à l'automne, lorsque le maïs atteint sa maturité. Sur le continent nord américain où la culture du maïs s'étend sur plus de trente millions d'hectares, les trois espèces sont présentes. F. moniliforme est le plus répandu, avant F. graminearum et F. subglutinans, mais cet ordre peut varier au cours des années et d'une région à l'autre (26, 29). Il n'est pas rare cependant que des lots de grains soient contaminés à 100 % par la première espèce.

En Afrique, et plus généralement dans les régions tropicales, F. moniliforme (19) et, dans une moindre mesure, F. subglutinans sont les espèces les plus fréquemment présentes sur le maïs, F. graminearum apparaissant surtout dans les zones d'altitude élevée au climat plus frais. Ce schéma est respecté en Australie où F. graminearum précède F. subglutinans en Nouvelle Galles du Sud au climat tempéré doux, alors que F. moniliforme prévaut au Queensland qui s'étend de part et d'autre du tropique du Capricorne.

Parmi les autres espèces du genre Fusarium communément associées au maïs, certaines sont des parasites faibles dont la présence sur cette plante ne pose jamais de problème pathologique important. F. culmorum, F. tricinctum et F. oxysporum, espèces signalées par de nombreux auteurs dans toutes les grandes régions céréalières, entrent dans cette catégorie. D'autres Fusarium comme F. sporotrichioides, F. poae, F. avenaceum, F. equiseti, F. acuminatum, F. sambucinum et F. solani, peuvent également être isolés du maïs. Elles se comportent généralement en saprophytes, ou parfois en parasites très faibles, sans incidence notable sur la vie de la plante.

Les espèces pathogènes peuvent se développer sur tous les organes reproductifs ou végétatifs du maïs tout au long du cycle cultural. Chacune de ces espèces intervient

seule, ou plus rarement associée à d'autres au sein d'un complexe plurispécifique plus ou moins pathogène selon les circonstances et les conditions d'environnement.

Les attaques de Fusarium sur le maïs se traduisent par divers symptômes: fontes de semis, pourriture des tiges, des épis, ou infection latente ou active du grain (26).

Les fontes de semis provoquées par les Fusarium sont toujours liées à des conditions climatiques anormales (1). Ainsi, un excès d'humidité du sol accompagné de températures basses, inférieures à 22°C, favorise l'attaque des plantules, par F. moniliforme. Il est cependant rare que ce faciès revête un caractère épiphytique grave, notamment en Nouvelle-Calédonie où la fonte de semis imputable à F. moniliforme est un phénomène exceptionnel.

De la même manière, la pourriture du pied (Stalk rot) n'est pas à l'heure actuelle une maladie fréquente sur le territoire, alors qu'en Australie et aux Etats Unis (9), ce type d'attaque par F. moniliforme et F. graminearum cause des dommages importants dans les régions les plus humides. La pourriture du pied se manifeste souvent au moment de la floraison mâle. La base de la tige montre alors une décoloration brunâtre particulièrement marquée au niveau des premiers noeuds, les tissus internes sont également colorés de brun et desséchés. Le plant qui manifeste ces symptômes est généralement condamné par la désorganisation définitive du système vasculaire qu'entraîne le développement du parasite. Les plants atteints sont fragiles, cassants, et la maladie aboutit souvent à une "verse parasitaire" précédant la mort de la plante.

La pourriture des épis constitue un autre faciès classique de la fusariose, et certainement celui qui occasionne les dégâts les plus importants. Les Fusarium pathogènes peuvent en effet se développer dans le rachis et le pédoncule de l'épi ainsi que dans une partie ou l'ensemble des grains. Ce type d'attaque s'observe fréquemment lorsque la phase terminale de la maturation de l'épi coïncide avec une période excessivement humide et fraîche. Dans ces conditions la maladie revêt en général un aspect épiphytique généralisé. Outre la pourriture des épis, le parasite détermine également des nécroses sur tous les organes aériens de la plante. Des taches nécrotiques brunâtres ou lie de vin, de contour irrégulier, souvent confluentes, couvrent de larges plages sur les tiges, les gaines foliaires et les spathes, permettant une intense sporulation du champignon et une efficace propagation de la maladie. Dans les cas les plus graves, les dégâts peuvent alors aller jusqu'à la destruction de la récolte sur pied.

Lorsque l'intensité moindre de l'attaque permet de récolter, le grain fortement contaminé est de mauvaise qualité. Entièrement colonisé par le parasite présent sous une forme latente entre péricarpe et endosperme, ce grain risque d'être pollué par les mycotoxines fusariennes.

Le genre Fusarium est en effet un des principaux producteurs de mycotoxines. Vingt quatre de ses espèces sont toxigènes (22, 7). Elles le sont à des degrés divers, chacune d'entre elles se caractérisant par sa propre gamme de toxines. Au total, plus de trente mycotoxines différentes ont jusqu'à ce jour été identifiées chez les Fusarium (12, 22, 25). La plupart appartient à la famille chimique des trichothécènes qui compte des molécules puissamment zootoxiques, en particulier chez les mammifères.

Toutes les espèces associées au maïs sont capables de produire des toxines. A cet égard, F. sporotrichioides, F. poae, F. equiseti, F. tricinctum, F. graminearum et F. moniliforme sont considérés comme les plus redoutables. Ces espèces ont été impliquées dans plusieurs maladies humaines, comme l'aleucie toxique alimentaire ou le cancer de l'oesophage (20, 21, 24). Leur responsabilité est également reconnue dans une longue liste de maladies animales. Elles sont à l'origine de syndromes hépatiques, neurologiques, oestrogéniques, hémorragiques ou émétiques, ou induisent chez les animaux intoxiqués des refus de nourriture (3). Certaines toxines, comme la toxine T2, ont très probablement des propriétés carcinogéniques, en particulier sur la peau et le tractus digestif. La diversité des substances toxiques produites par les Fusarium, et notamment par les espèces associées au maïs, la variété et la gravité des symptômes induits chez de nombreuses espèces animales et probablement chez l'homme, font de l'étude de la toxinogénie de ces champignons un sujet de recherche d'intérêt général qui se développe activement au plan international.

En Nouvelle-Calédonie la première relation de la fusariose du maïs date de 1958. Elle est due à Bugnicourt (6). Dès cette époque la présence de F. graminearum et de F. moniliforme avait été identifiée dans plusieurs secteurs du territoire, et surtout dans la région de Bourail où elle occasionnait régulièrement des dommages sensibles en s'attaquant aux épis.

En 1981, notre attention se porta à nouveau sur ce problème après qu'une épizootie se fut déclarée à NOUMEA chez une quarantaine de chevaux, entraînant la mort de cinq d'entre eux (10). Les premières investigations montrèrent alors que ces animaux avaient été intoxiqués par du maïs récolté en Nouvelle-Calédonie dans la région de Gomen,

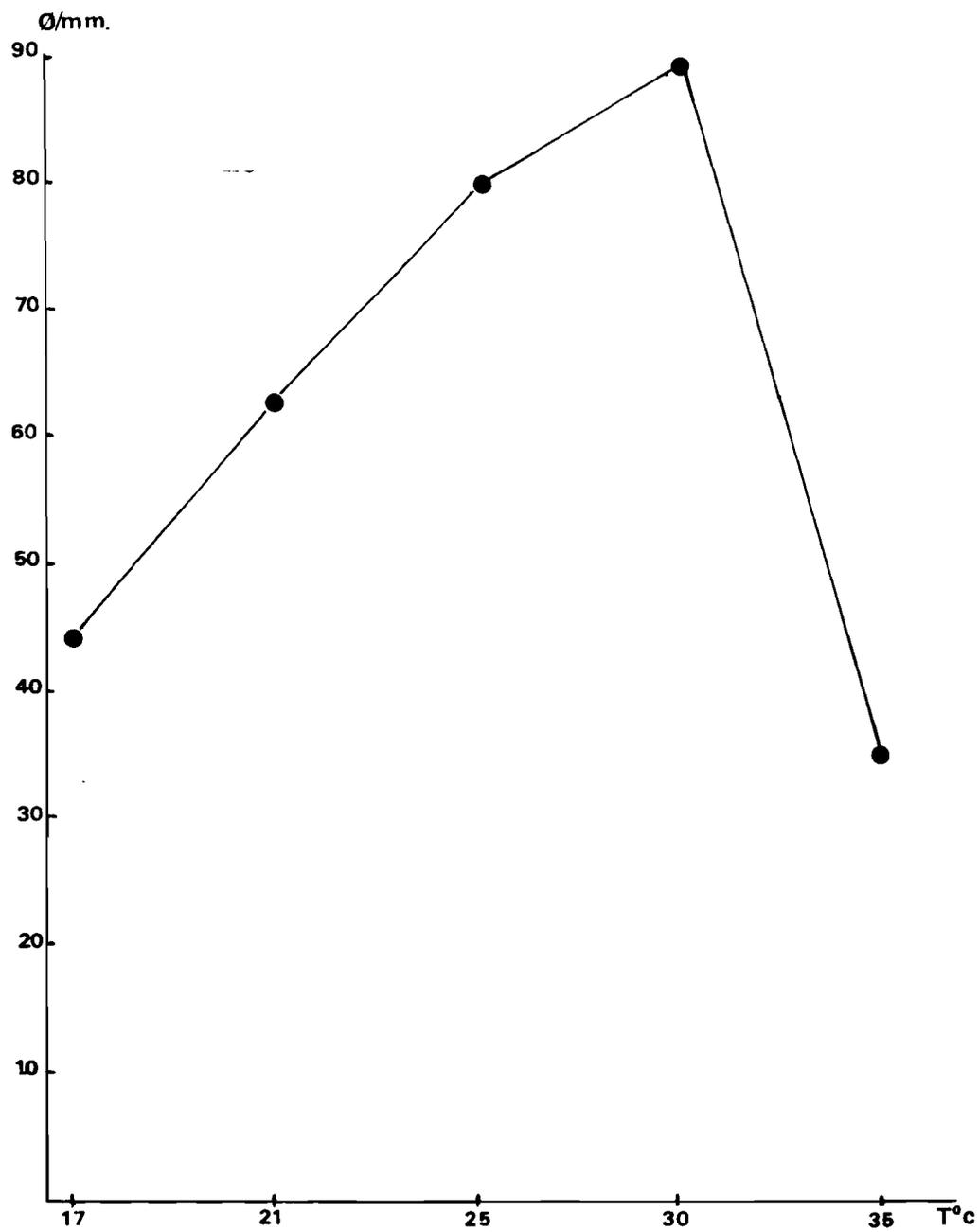
récolté en Nouvelle-Calédonie dans la région de Gomen, après une forte attaque de Fusarium. Deux ans plus tard, un nouveau cas d'empoisonnement permit de poser un diagnostic vétérinaire plus précis montrant qu'un cheval était mort de leucoencéphalomalacie toxique après avoir ingéré du maïs fortement infesté par ce même Fusarium (cf. annexe n° 1 et 2).

La leucoencéphalomalacie toxique équine (LEM) est la seule maladie dont l'origine soit liée d'un façon certaine à l'ingestion d'aliments contaminé par F. moniliforme (2, 13, 14, 18, 32, 38). Cette maladie neurotoxique des équidés se caractérise par des lésions nécrotiques et liquéfactives de la substance blanche des hémisphères cérébraux (photo 3). La LEM est connue depuis 1850 dans les états producteurs de maïs des U.S.A., où elle provoqua la mort de milliers de chevaux au début du siècle, puis dans les années 30 (4). Très récemment encore, en 1978-1979, la LEM a tué plusieurs centaines de chevaux dans les états du "middle west" et du sud ouest du continent nord américain (3). La maladie a également été observée en Argentine, en Chine, en Egypte et en Afrique du Sud. En Europe des cas de LEM, relativement peu nombreux, ont été signalés en France, en Allemagne et en Grèce.

La responsabilité du F. moniliforme dans le déclenchement de cette maladie des équidés a été expérimentalement prouvée; mais l'étiopathogénie de la LEM demeure mal connue et l'on ignore totalement quelle toxine est impliquée dans son apparition.

Les premières observations de cette maladie en Nouvelle-Calédonie ont brutalement révélé la réalité du danger que représentent les mycotoxines dans l'alimentation des animaux, et peut être dans celle des hommes. Cette constatation a conduit les responsables de l'agriculture du territoire à souhaiter que des recherches soient entreprises sur les Fusarium toxigènes parasitant le maïs. Ces recherches sont conduites par l'O.R.S.T.O.M. en association avec l'I.E.M.V.T.. Elles poursuivent un double objectif : parvenir à une connaissance approfondie de l'étiologie et de l'épidémiologie de la fusariose du maïs, d'une part, identifier les mycotoxines produites par les espèces de Fusarium associées à cette plante en Nouvelle-Calédonie et déterminer leur toxicité sur les animaux d'élevage, d'autre part. Le présent rapport présente les résultats actuels de ces recherches.

=====



CROISSANCE DE FUSARIUM MONILIFORME EN FONCTION DE LA TEMPERATURE  
MOYENNES SUR 20 ISOLATS

FIGURE. 1

## ETIOLOGIE, EPIDEMIOLOGIE DE LA FUSARIOSE DU MAIS.

### 1 - IDENTIFICATION DES ESPECES PARASITANT LE MAIS EN NOUVELLE-CALEDONIE.

Plusieurs centaines de souches de Fusarium ont été récoltées sur les différents organes de la plante, épis, tiges, racines, au cours des différents cycles culturaux et dans toutes les zones de culture du maïs. Deux espèces de Fusarium ont été identifiées : F. moniliforme et F. graminearum. La première espèce est très largement dominante, elle représente en fait la presque totalité des isolats. La seconde n'a été que rarement trouvée sur les feuilles et les tiges.

Nos identifications sont fondées sur le système récemment mis au point par NELSON, TOUSSOUN, et MARASAS (26), qui établit une synthèse de tous les systèmes taxonomiques antérieurs. Les caractéristiques des deux espèces sont les suivantes :

#### Fusarium moniliforme Sheldon

Cette espèce appartient à la section Liseola.

Sur le milieu de référence P.D.A. (Potato Dextrose Agar), elle développe un thalle blanchâtre dont la croissance rapide atteint son optimum autour de 30° C (figure 1). Après quelques jours de croissance sous une alternance lumière-obscurité, le mycélium prend généralement une teinte rose saumon à rouge lie de vin .

L'espèce ne forme pas de chlamydospores, mais souvent des microsclérotés de coloration bleu-noir.

Les macroconidies sont présentes, mais rares.

Les microconidies se forment toujours en très grande abondance. Elles sont produites en longues chaînettes, ou parfois en fausses têtes quand elles s'agglomèrent les unes aux autres sous l'effet d'un environnement très humide. Dans les deux cas, ces microconidies sont produites par des monophialides.

Les chaînettes de microconidies et les monophialides d'une part, l'absence de chlamydospores, d'autre part, sont les caractéristiques essentielles dans la détermination de l'espèce.

La forme sexuée du F. moniliforme est Gibberella fujikuroi.

#### Fusarium graminearum Schwabe

Cette espèce appartient à la section Discolor.

Sur milieu P.D.A., le thalle est dense avec un mycélium aérien abondant. La pigmentation, souvent plus marquée que chez l'espèce précédente, va du jaune ocre au rouge carmin.

Les chlamydospores se forment assez tardivement

dans les cultures, soit à partir de macroconidies, soit à partir de segments d'hyphes mycéliennes.

L'espèce ne produit pas de microconidies : Les macroconidies sont par contre formées en abondance par des monophialides simples ou ramifiées. Les macroconidies sont arquées, septées et pourvues de parois épaisses.

La principale caractéristique qui permet l'identification de cette espèce dans la section *Discolor*, est la taille et la forme des macroconidies produites sur le milieu de référence C.L.A. (pétales d'oeillet, agar) de NELSON et al. (21).

## 2 - TAUX DE CONTAMINATION DU GRAIN PRODUIT EN NOUVELLE CALEDONIE.

Quelques exemples :

Des échantillons de grains produits localement dans les différentes régions de l'île ont été régulièrement analysés pour déterminer le taux de contamination par les Fusarium et pour identifier les espèces en cause.

La méthode employée consiste simplement en un comptage des grains ou des fragments de grain donnant naissance à un thalle de Fusarium, après incubation en chambre humide. Les grains examinés sont d'abord superficiellement désinfectés dans un bain d'alcool éthylique à 95%, pendant 30 secondes, lavés à l'eau stérile, puis incubés à 26° C en boîte de Pétri, sur papier filtre stérile imbibé d'eau.

Les comptages sont effectués après 48 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de grains, ou de fragments s'il s'agit de grains concassés, ayant donné naissance à un thalle de Fusarium.

Le tableau 1 donne quelques-uns des résultats obtenus par cette méthode.

Dans tous les cas, une seule espèce parasite a été identifiée : Fusarium moniliforme.

Cette première méthode nous apprend si un grain est ou n'est pas infecté par le Fusarium, mais elle n'apporte pas d'indication sur l'étendue de cette infection, ou en d'autres termes, sur le niveau de contamination. Un grain de maïs peut en effet n'être que faiblement contaminé et n'abriter que quelques éléments mycéliens ou quelques propagules (conidies, microsclérotés) en état de latence ; dans ce cas, le risque de pollution par les mycotoxines est faible. Le grain peut au contraire être entièrement colonisé par le champignon, si l'attaque a été précoce et forte; dans ce second cas, le grain porte

TABLEAU 1: Taux d'infection du grain récolté en Nouvelle-Calédonie

DATE	Lieu de récolte	variété de maïs	% grain infecté
7:81	GOMEN		
	: (ex. Mediflor)	: XL 81	: 100
	: GOMEN (Frouin)	: XL 81	: 100
	: GOMEN (Silo)	: XL 81	: 100
8:82	TAMOA	"Dent de cheval"	90
	: TAMOA		: 100
	: KARIKATE	: XL 81	: 20
	: KARIKATE	: HY C 9	: 50
	: KARIKATE	: GH 128	: 30
	: TAMOA	: GH 390	: 80
	: TAMOA	: PX 422	: 10
	: TAMOA	: PX 49	: 10
	: TAMOA	: Sergeant	: 10
	: POUEMBOUT	: "locale"	: 100
8:83	QUITCHAMBO	?	100
	: GOMEN	?	: 100
	: TAMOA	?	: 100
1:84	GOMEN	GH 5004	12
	: KOUMAC	GH 5004	: 20
8:84	TAMOA	?	100

souvent des traces de nécroses et le risque qu'il soit pollué par les mycotoxines est élevé.

La formation des mycotoxines peut être antérieure à la récolte et accompagner la colonisation du grain en cours de maturation au champ, si le développement du parasite est facilité par des conditions d'environnement favorable (humidité, température). Elle peut aussi survenir après la récolte, si le grain n'est pas correctement séché ou (et) s'il est conservé dans des conditions induisant une reprise de la croissance mycélienne du Fusarium. Il convient d'ailleurs de souligner que cette reprise de croissance sur un grain fortement contaminé et placé dans un environnement humide et chaud est extrêmement rapide et brutale : la quantité de spores infectieuses produites dans ces conditions après 48 heures d'incubation en chambre humide à 26 C° atteint des chiffres considérables - jusqu'à 200 millions de microconidies par gramme de grains - témoignant de la vigueur de la croissance du champignon.

Les quelques résultats présentés dans le tableau 1 résument assez bien l'ensemble des très nombreuses analyses de mycoflore effectuées sur de multiples échantillons de grains de toutes provenances. Le maïs produit en Nouvelle Calédonie est presque toujours contaminé par F. moniliforme, et les taux d'infection sont souvent très élevés. Il le sont particulièrement chez les échantillons de grains récoltés en juin ou juillet, période souvent très humide, marquée par des températures nocturnes assez basses et des températures diurnes qui restent élevées, conditions qui favorisent le développement des maladies fongiques.

Les observations réalisées au cours de ces dernières années indiquent d'ailleurs que le début de l'hiver austral est, en Nouvelle Calédonie, une période à haut risque de fusariose. C'est généralement à cette saison que l'on constate les cas de pourriture des épis les plus nombreux. Ainsi, en 1981, la maladie a revêtu un caractère épiphytique généralisé sur la côte Ouest ou la majeure partie du maïs qui était en phase finale de maturation a pourri sur pied, ou produit un grain de très mauvaise qualité, portant des traces de moisissure, qui intoxiqua gravement les chevaux du club hippique " l'Etrier".

L'épiphytie de juin 1981, et plusieurs attaques du même type, bien que moins étendues, les années suivantes à la même saison, mettent clairement en évidence le risque aggravé de pourriture des épis auquel le maïs du premier cycle cultural se trouve exposé, lorsque les semaisons sont faites avec retard, en janvier ou février, pour aboutir à une récolte en juin.

Les causes de ce surcroît de sensibilité à la forme la plus dommageable de la fusariose ne sont pas totalement élucidées, mais il est très probable qu'elles soient directement liées aux conditions climatiques du

début de l'hiver. A cette saison, les températures moyennes sont en baisse, l'amplitude des variations thermiques jour - nuit augmente, et l'humidité demeure très élevée. Ces conditions ralentissent la maturation du grain qui conserve plus longtemps une teneur en eau élevée, offrant ainsi un substrat favorable au développement du Fusarium et, par voie de conséquence, à la production de mycotoxines.

L'ensemble des observations dont nous disposons actuellement tendent par contre à indiquer que l'incidence de la fusariose sur la récolte, et sur la qualité du grain, est moindre lorsque le maïs du premier cycle cultural est semé en novembre ou décembre, pour être récolté en mars ou avril.

Lorsque ce calendrier est respecté, les risques de pourriture des épis sont réduits et, sauf accident climatique, le maïs parvient en général à son terme en bon état. Il en va de même du second cycle cultural qui s'étend d'avril à octobre (ou novembre) et produit la plupart du temps un grain d'aspect sain.

La bonne apparence du grain n'est cependant pas une garantie de l'absence de Fusarium. Les analyses de mycoflore que nous avons effectuées, depuis près de quatre ans, sur de très nombreux échantillons de grain d'origine locale, ont révélé que les lots de grains totalement indemnes de tout Fusarium sont exceptionnels. Le maïs produit en Nouvelle-Calédonie est généralement contaminé. La plupart du temps cette contamination est discrète. Aucun indice extérieur ne permet de distinguer les grains porteurs du parasite de ceux qui ne le sont pas. Seule la réhydratation du grain et son incubation en chambre humide permet de révéler la présence de Fusarium parmi les espèces de sa mycoflore naturelle.

Cette constatation conduit à s'interroger sur l'origine de l'infection du grain de maïs, et sur les voies empruntées par le parasite pour parvenir jusqu'à cet organe qui se trouve apparemment assez bien abrité de l'extérieur par les spathes recouvrant l'épi.

### 3 - LES VOIES D'INFECTION EMPRUNTEES PAR F.MONILIFORME.

La première voie d'infection est externe : les spores du champignon transportées par divers vecteurs naturels (vent, pluie, insectes) s'installent sur les enveloppes externes des différents organes de la plante, germent et pénètrent dans les tissus, par effraction ou en utilisant les blessures naturelles. Ces attaques provoquent des lésions superficielles facilement identifiables qui n'ont en général que peu de conséquences sur la vie de la plante, car cette dernière réagit en limitant l'extension des nécroses aux tissus externes.

Dans la majorité des cas, un équilibre s'établit ainsi entre le plant de maïs et le Fusarium qui se comporte

en parasite faible à la surface de la plante. Parfois cependant, cet équilibre est rompu au profit du parasite qui peut alors causer de graves dommages. Si cette rupture intervient pendant la croissance végétative de la plante, le champignon provoque la pourriture de la tige et la mort du plant, mais ce faciès est rare sur le Territoire. Il peut néanmoins se présenter à la suite d'un "stress" hydrique important: par exemple lorsqu'un champ a subi, juste après la floraison, une période de grande sécheresse suivie d'une période d'humidité excessive. Les plages nécrotiques qui se forment à la surface de la plante constituent cependant autant de foyers de sporulation; les microconidies qu'elles produisent en abondance peuvent être transportées à travers les spathes, jusqu'au grain, par des insectes foreurs. C'est ainsi que toute pullulation de chenilles s'accompagne toujours en Nouvelle-Calédonie d'une prolifération de Fusarium sur les grains. Le contrôle des insectes parasites du maïs est donc une mesure essentielle à la protection de la plante contre la pourriture fusarienne des épis.

Pour certains auteurs, la voie externe d'infection la plus fréquemment utilisée par F. moniliforme passerait par les soies au moment de l'épiaison (15). Les conidies germant sur les soies peuvent en effet donner naissance à des filaments mycéliens capables de progresser jusqu'au grain et de l'infecter dès sa formation.

La seconde voie d'infection empruntée par le Fusarium est interne (11). Cette forme d'infestation, très fréquente, est discrète. La plante ne manifeste aucun symptôme révélant la présence du parasite qui ne peut être mis en évidence que par des isolements réalisés à partir des tissus internes de la plante colonisée.

La conséquence la plus importante de l'infection interne est la contamination des grains. Progressant vers le sommet du plant, le Fusarium parvient jusqu'au rachis de l'épi et s'installe dans les grains où il demeure en état de latence, jusqu'à ce que les conditions d'environnement lui permette éventuellement d'entrer en croissance active.

L'infection interne, ou systémique, d'un plant de maïs peut être d'origine endogène ou exogène. Elle est endogène si les semences étaient contaminées avant leur plantation (1, 8). Elle est exogène si les souches de Fusarium vivant dans le sol pénètrent dans les racines de la plantule après germination de la graine (5).

L'une des premières questions à laquelle il convient d'apporter une réponse concerne la fréquence relative de ces deux sources d'infection: contamination préexistante des semences, ou néo-infection de la plantule à partir de l'inoculum présent dans le sol. Les méthodes de contrôle que l'on peut envisager de mettre en oeuvre dans ces deux éventualités ne sont en effet pas les mêmes (28).

#### 4 - ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA FUSARIOSE INTERNE AU COURS DU CYCLE CULTURAL DU MAÏS AU CHAMP.

Pour tenter d'évaluer l'importance de l'infection systémique du maïs en Nouvelle-Calédonie et pour en comprendre le mécanisme, nous avons suivi l'évolution de la fusariose sur plusieurs champs, du semis à la récolte.

##### Méthode d'étude.

Chaque champ étudié reçoit deux visites mensuelles. A chaque passage, cinq plants de maïs sont prélevés au hasard dans chacune des parcelles.

Le Fusarium est systématiquement recherché sur tous ces plants, au niveau de la couronne et de chaque noeud.

On procède de la façon suivante (figure 2)

Le plant est débarrassé de ses feuilles, seule la tige et les épis sont conservés.

- La tige est superficiellement désinfectée à l'alcool.

- Au niveau de chaque noeud deux tranches d'environ 1 mm d'épaisseur sont découpées à la scie, puis déposées dans une boîte de Pétri, sur un milieu P.D.A à pouvoir sélectif antibactérien renforcé par l'adjonction de pénicilline et de colimycine (100 ppm).

- Lorsque le Fusarium est présent dans les tissus internes, il donne naissance à un thalle qui se développe dans le milieu de culture au contact des tissus contaminés.

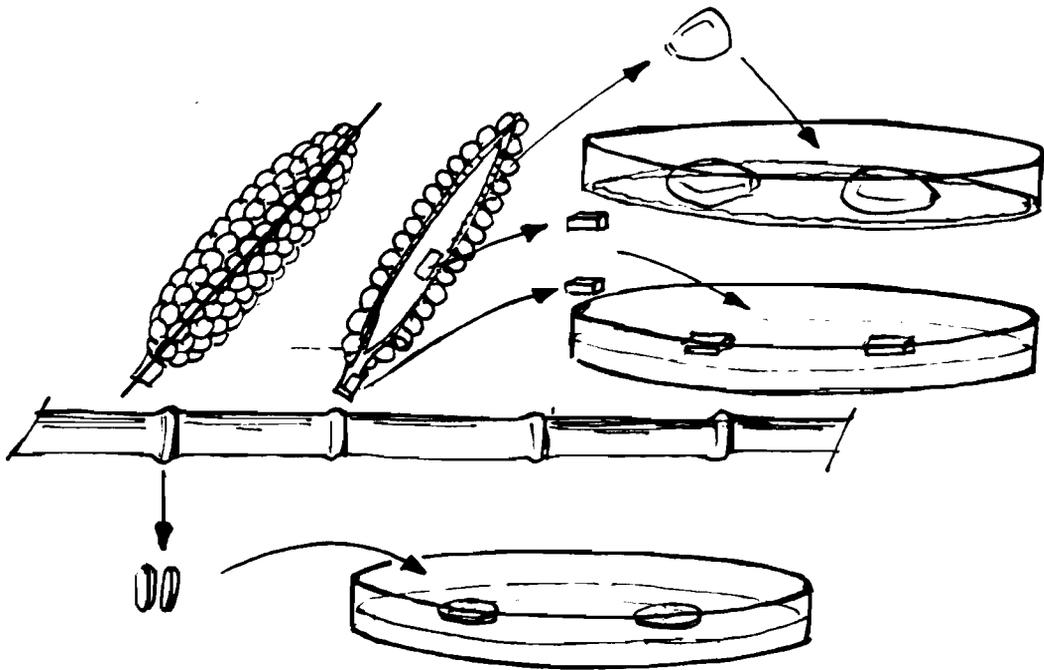
Dans les épis, la recherche du parasite porte sur les tissus internes du rachis et sur les grains. Des fragments de tissu du rachis sont prélevés stérilement et déposés sur le milieu de culture. Les grains sont placés en chambre humide (boîte de Pétri + papier filtre imbibé d'eau stérile) et incubé à 26°C pendant 48 à 72 heures.

##### Caractéristiques des champs étudiés.

Les quatre plantations étudiées se situaient dans la région de Nouméa, à la TAMOA.

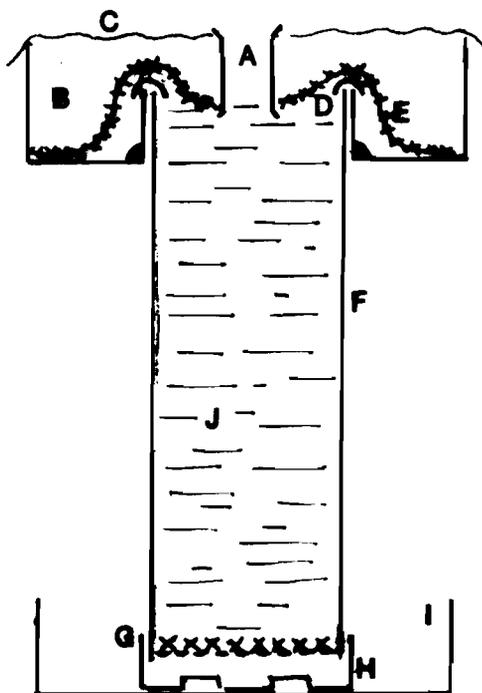
- La première (champ N°1) portait une variété synthétique locale appelée "dent de cheval". Semée le 8 juin 1982, récoltée fin novembre, après 26 semaines de culture. Sur ce champ, nos prélèvements n'ont débuté que le 20 août, soit à la dixième semaine. Les premières semaines de croissance ont échappé à nos observations.

- La seconde (champ N°2) comportait les trois hybrides doubles, "Sergeant", "422" et "Northrup" d'origine Néo-zélandaise : semis le 27 août 1982, récolte fin décembre. La mycoflore des semences a été analysée, les



METHODE DE PRELEVEMENT DANS UN PLANT DE MAIS

FIGURE. 2



- A- CYLINDRE DE PLANTATION
- B- CUVETTE SUPERIEURE
- C- CACHE EN PLASTIQUE NOIR
- D- GOUTTIERE
- E- MECHE EN LAINE DE VERRE
- F- POT EN P.V.C.
- G- GRILLE INOX-TOILE EN LAINE DE VERRE
- H- SUPPORT DU POT
- I- CUVETTE INFERIEURE DE RECUPERATION
- J- TERRE TAMISEE

DISPOSITIF DE CULTURE EN SERRE

FIGURE. 3

prélèvements au champ ont débuté le 17 septembre, soit à la quatrième semaine de culture.

- La troisième (champ N°3) comportait l'hybride double néo-zélandais "Sergeant", semé fin décembre, récolté fin avril. Les semences ont été analysées, les prélèvements ont commencé à la cinquième semaine.

- La quatrième (champ N°4) portait l'hybride double, "Major", semis fin décembre, récolte fin avril, semences analysées et premiers prélèvements à la cinquième semaine.

### Résultats.

Champ N°1 : Les semences étaient infectées à 100% par F. moniliforme. Les premiers prélèvements opérés au champ sur les plants âgés de 10 semaines ont permis d'isoler le Fusarium jusqu'au niveau du quatrième noeud. A la dix septième semaine, les isollements étaient positifs jusqu'au neuvième noeud. En fin de cycle, le rachis de tous les épis, ainsi que tous les grains étaient infectés. Ce champ n'ayant reçu aucun traitement insecticide a en outre subi une forte attaque d'Heliothis qui a amplifié la dispersion du Fusarium par la voie externe.

Champ N°2 : Les semences étaient saines; aucune graine n'a donné naissance à un thalle de Fusarium. A partir de la septième semaine, une très forte attaque foliaire par Helminthosporium a été notée sur les variétés "Northrup" et "422". La recherche du Fusarium dans les tissus de la tige a produit des résultats négatifs jusqu'à la douzième semaine. A partir de la quatorzième semaine, le F.moniliforme a été détecté jusqu'au huitième noeud dans environ 50% des plants des variétés "Sergeant" et "Northrup". En fin de cycle, les épis issus des plants infectés étaient eux-mêmes contaminés à 50%, ainsi que les grains qu'ils portaient.

Champ N°3 et 4 : Les semences étaient infectées à 40%. Jusqu'à la sixième semaine, le parasite n'a pas été trouvé au-dessus de la couronne : région du collet où s'insèrent les racines coronaires. A partir de la septième semaine, des isollements positifs ont été réalisés sur 30% des plants des deux variétés étudiées jusqu'au niveau du troisième noeud. Après la septième semaine, le Fusarium se retrouve de plus en plus haut dans la tige, au niveau des noeuds. En fin de cycle, tous les plants hébergeaient le parasite, ainsi que la presque totalité des épis et une partie importante des grains (environ 50%).

## Conclusions.

Cette première enquête sur le terrain a mis en évidence les faits suivants :

-Aucune des plantations étudiées n'était indemne de Fusarium. A partir d'un certain stade de croissance, tous les plants dans le champ N°1, ou une proportion importante d'entre eux dans les champs 2, 3 et 4, hébergeaient F. moniliforme dans les tissus de la tige, au niveau des noeuds, et dans le rachis des épis, sans manifester de symptômes identifiables.

-Il semble exister une corrélation positive entre le taux de contamination des semences et le pourcentage des plants hébergeant le parasite en fin de cycle. La taille insuffisante des échantillons étudiés ne nous permet cependant pas de chiffrer cette liaison.

-Le Fusarium des semences ne constitue pas la seule source possible d'infection systémique. Les plants issus de semences saines peuvent être contaminés par l'inoculum du sol, mais dans ce cas il semble que l'invasion des parties supérieures de la tige soit plus tardive que chez les plants issus de semences contaminées.

## 5 - ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA FUSARIOSE INTERNE AU COURS D'UN CYCLE CULTURAL EN SERRE.

Après les études au champ, la progression de l'infection interne à travers les différentes étapes physiologiques du développement du plant de maïs a été étudiée en serre.

### Le dispositif expérimental.

Les plants de maïs sont cultivés en pot, selon le système mis au point par la section d'agronomie de l'O.R.S.T.O.M. La figure 3 représente, en coupe, le dispositif utilisé.

Chaque pot contient 5 kg d'une terre tamisée, légère, pauvre en éléments organiques, et riche en sable. L'alimentation hydrique est assurée tout au long du cycle par apport d'eau dans la cuvette supérieure. Les éléments nutritifs, N.P.K et oligo-éléments, sont apportés en solution dans la cuvette supérieure. Chaque pot reçoit ainsi 100 ml d'une solution nutritive distribuée par doses successives de 20 ml au cours du cycle cultural.

La solution nutritive contient les éléments suivants :

Pour 100 ml de solution :

- 17,5 g de NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> soit environ 6 g de N
- 8,6 g de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> soit environ 2 g de P et 2,5 g de K

TABLEAU 2 : étude de l'évolution de la fusariose systémique en serre. Variété Fitzroy.

Age des plants (en semaines)	Niveaux colonisés par le <u>Fusarium</u>		
	Condition 1	Condition 2	Condition 3
5 semaines	0	0	Racines Couronne N1
7 semaines	Racines Couronne	Racines Couronne N1	Racines Couronne N1 à N3
8 semaines	Racines Couronne N1 à N6	Racines Couronne N1 à N8	Racines Couronne N1 à N8
10 semaines	Racines Couronne N1 à N12	Racines Couronne N1 à N12	Racines Couronne N1 à N12
15 semaines	Racines Couronne N1 à N13 épis	Racines Couronne N1 à N13 épis	Racines Couronne N1 à N13 épis

TABLEAU 3 : ESSAI DE BOURAIL.

Variété Sergeant. Amendement NPK sur sol peu évolué d'apport argilo-limoneux sur alluvions récentes. 25 épis prélevés par parcelle, 2 parcelles par condition.

Amendements	N° parcelle	% épis infectés	% grains infectés
<u>Condition 1</u>			
Urée = 0	15	56	environ 25%
P2 05 = 0			
K2 0 = 0	30	72	
<u>Condition 2</u>			
Urée = 90kg ha	42	72	environ 25%
P2 05 = 90kg ha			
K2 0 = 45kg ha	4	100	
<u>Condition 3</u>			
Urée = 180kg ha	1	56	environ 25%
P2 05 = 180kg ha			
K2 0 = 90kg ha	39	72	

- 2,8 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour compléter en K
- Oligo-éléments : 1,75 mg de Bore ; 3,98 mg de Cuivre ; 0,45 mg de molybdène ; 2.75 mg de Zinc.

Chaque pot contient un plant de maïs. L'eau et les sels minéraux qui percolent à travers la terre, sans avoir été assimilés par la plante, sont périodiquement récupérés dans la cuvette inférieure et transférés dans la cuvette supérieure pour être recyclés.

### Les essais.

Deux séries d'essais ont été réalisés à l'aide de la variété synthétique Fitzroy fournie par le C.R.E.A. Les semences de cette variété sont naturellement infectées par F.moniliforme à plus de 90%. Pour les besoins de l'expérience, ces graines peuvent être désinfectées et totalement débarrassées du Fusarium qu'elles hébergent par un traitement au formol.

Dans chacun des deux premiers essais, trois conditions expérimentales sont comparées :

- Condition 1 : Semences désinfectées sur terre stérilisée par autoclavage (60 min, à 120°C).

- Condition 2 : Semences désinfectées sur une terre stérilisée qui est ensuite artificiellement réensemencée par 10 ml par pot d'un broyat d'une souche connue de F.moniliforme (10 ml de broyat représente un apport d'environ 350 à 400 millions de microconidies, et une quantité indéterminée d'éléments mycéliens encore actifs).

- Condition 3 : Semences non désinfectées (naturellement contaminées à plus de 90%), sur une terre stérilisée.

L'objectif de ces essais est de comparer la fusariose d'origine endogène (semences infectées), à la fusariose d'origine exogène (terre contaminée). Dans chaque essai, chacune des conditions expérimentales est représentée par 18 pots. A intervalle régulier, 2 plants de chaque condition sont sacrifiés et le parasite est recherché dans les tissus internes, au niveau des racines, de la couronne, et de chaque noeud. La recherche du parasite est effectuée suivant la méthode décrite précédemment.

### Résultat des essais.

Dans le tableau 2 nous avons noté, dans chaque condition, la localisation moyenne du parasite à chaque prélèvement. Les noeuds sont numérotés de bas en haut ; le noeud N1 est le premier au-dessus de la couronne, N2 est le second, etc...

Deux enseignements peuvent être tirés des premières expérimentations en serre.

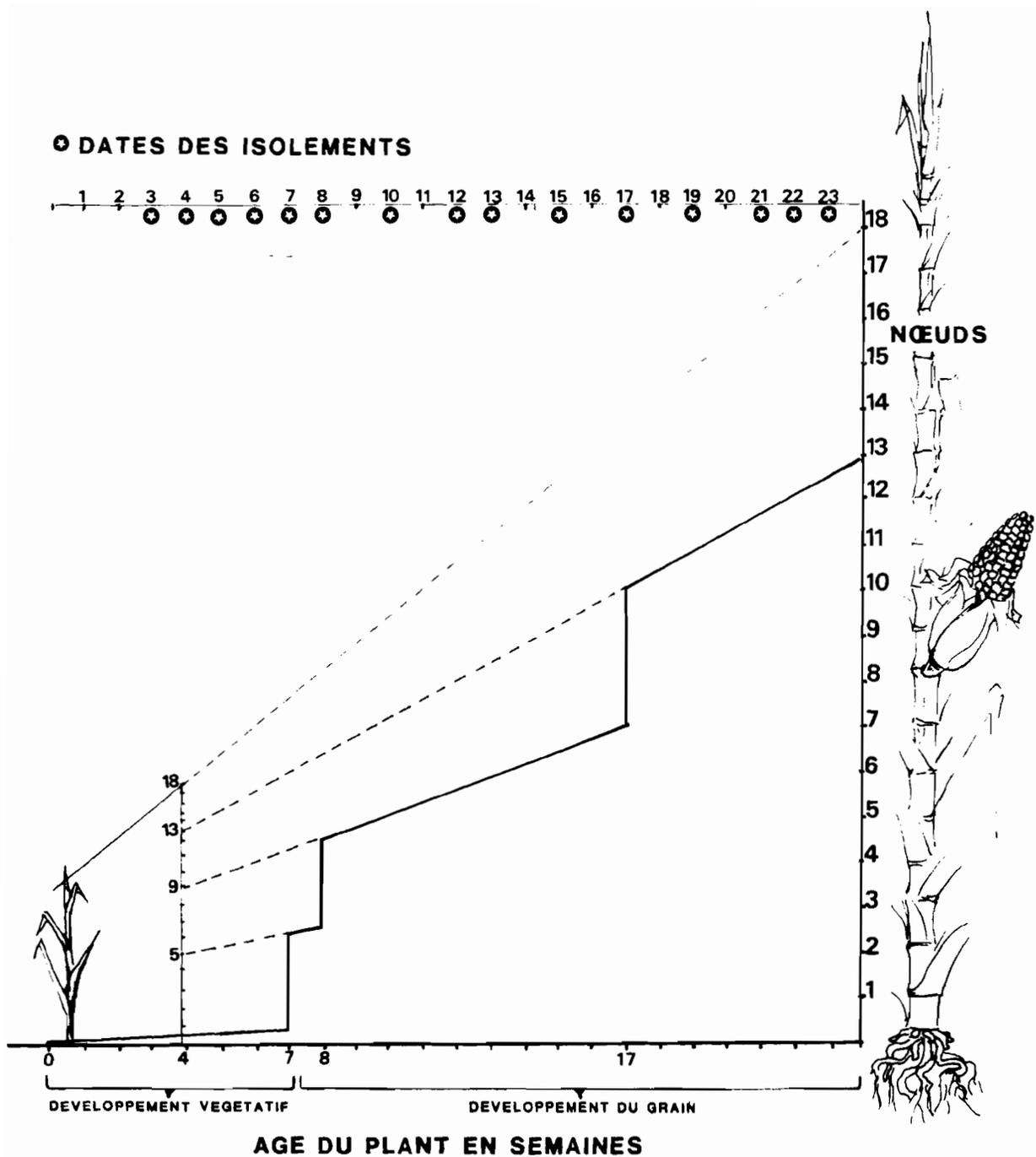
Les graines contaminées cultivées sur un sol stérile, et les graines désinfectées cultivées sur un sol contaminé, produisent en fin de cycle des plants infectés. La seule différence décelable entre les deux cas de figure est une colonisation plus rapide des racines et de la couronne dans le cas d'une infection endogène, provenant de la graine. Mais après la floraison, autour de la septième semaine, la maladie évolue de la même façon dans les deux situations pour aboutir aux mêmes niveaux d'infection en fin de cycle. Ces observations tendent à confirmer les résultats des études au champ.

Les plants témoins de la condition 1, issus de graines désinfectées cultivées sur un sol stérilisé, ont été envahis par le Fusarium presque aussi rapidement que dans la condition 2. Des contrôles effectués tout au long du cycle ont montré que la contamination des plants s'était effectuée au niveau du sol : évolution inattendue, imputable à l'infestation accidentelle de la terre des pots témoins par les conidies transportées par les courants d'air de la serre. Cet épisode témoigne de la grande sensibilité du maïs au F.moniliforme, et montre qu'il est difficile d'éviter la contamination de la plante, dès lors que des propagules infectieuses sont présentes dans son environnement immédiat.

## 6 - DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS AU CHAMP ET EN SERRE.

L'ensemble des résultats des isolements positifs sur les différentes variétés permet de proposer une première représentation, encore schématique, du développement de la fusariose interne (figure 4), au cours du cycle cultural de la plante.

Au cours des sept ou huit premières semaines, période pendant laquelle s'effectue l'essentiel du développement végétatif et notamment la croissance en longueur de la tige, le parasite n'est isolé qu'au niveau des racines et de la couronne. A partir de la septième ou de la huitième semaine, période qui correspond en général à la floraison mâle, le parasite est isolé de plus en plus haut dans la tige. Cette progression du Fusarium vers l'extrémité apicale du plant s'accomplit en quelques semaines, et semble-t-il, en deux phases. Une première phase rapide, de la huitième à la douzième semaine environ, au cours de laquelle le champignon atteint en moyenne le huitième noeud. Puis une seconde phase plus lente, de la douzième semaine à la fin du cycle, pendant laquelle le Fusarium est progressivement isolé dans les tissus nodaux de plus en plus proches de l'apex.



**FIGURE. 4**

Il faut toutefois souligner que tout au long de son apparente ascension vers l'apex, le parasite peut être isolé au niveau des noeuds, mais beaucoup plus difficilement, et rarement, dans les entre noeuds où la fréquence des isolements positifs ne s'élève qu'en fin de cycle végétatif, lorsque la tige est en état de sénescence avancée. Cette remarquable discrétion du champignon dans les tissus internodaux reliant des noeuds eux-mêmes infectés, a conduit les auteurs à s'interroger sur les voies empruntées par le parasite pour progresser vers le sommet du plant. Comment en effet le parasite envahit-il les noeuds successifs, sans laisser trace de son passage dans les entre-noeuds, s'il s'agit d'une infection réellement systémique ?

Plusieurs hypothèses sont envisageables.

Suivant la première, l'infection ne serait pas véritablement systémique : l'invasion des tissus nodaux résulterait non pas du déplacement du parasite de la base du plant vers son apex, à l'intérieur de la tige, mais proviendrait plutôt d'infections multiples, d'origine externe, se produisant au niveau de chaque noeud, par l'intermédiaire des conidies qui se déposent et germent à l'aisselle des feuilles, au point d'insertion sur la tige.

La seconde hypothèse procède de la connaissance du mode de développement histologique du plant de maïs. Rappelons en effet que chez cette plante, la totalité des feuilles, ainsi que les noeuds sur lesquels elles s'insèrent, sont différenciés très tôt, de 4 à 5 semaines après la germination de la graine, sous forme d'ébauches miniatures groupées à la base du bourgeon apical. Ce dernier se trouve alors à quelques centimètres au-dessus de la couronne, elle-même située au niveau du sol.

Or, il est démontré qu'à ce stade du développement, les racines et la base du plant sont déjà colonisées par le parasite. Il est donc vraisemblable que les ébauches des différents noeuds, différenciés entre le méristème apical et la couronne, sont elles-mêmes infectées de façon latente.

A partir de la huitième semaine, les ébauches florales apparaissent et les entre-noeuds s'allongent rapidement, entraînant la séparation des noeuds qui s'écartent les uns des autres.

Certains auteurs pensent que les tissus nodaux, qui se trouvent ainsi séparés, peuvent transporter les éléments fongiques en état latent qui les infectent, sans que les tissus internodaux en élongation rapide soient eux-mêmes envahis. Au terme de la croissance végétative du plant -soit autour de la huitième semaine - la plupart des noeuds serait donc ainsi potentiellement infectée. Le Fusarium passerait alors progressivement de l'état latent à une croissance active à partir de chaque noeud, et entreprendrait la colonisation des entre-noeuds.

La troisième hypothèse est celle d'une infection systémique classique caractérisée par une invasion progressive et ascendante des tissus de la tige, à partir de la graine lorsque cette dernière est contaminée avant le semis, ou à partir des organes souterrains de la plantule, racines et mésocotyle, s'il s'agit d'une infection d'origine exogène.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à ce problème (17, 18, 30). Leurs travaux tendent à montrer que la fusariose interne procède en fait d'une combinaison des trois modes d'infection, mais que la voie systémique joue un rôle prédominant.

Une étude histopathologique récente a en effet apporté des informations très précises sur le processus infectieux observé chez des plants de maïs doux issus de semences naturellement contaminées par F.moniliforme (17).

Chez la plantule, le premier fait marquant est la colonisation précoce du parenchyme sous-cortical, puis du xylème par le mycélium du parasite. Dans le même temps, et de la même manière, le mésocotyle est également envahi : les hyphes mycéliennes se ramifient entre les cellules du parenchyme sous-cortical, jusqu'au niveau de la couronne, puis légèrement au-dessus. Dans le mésocotyle, les vaisseaux du xylème sont obstrués par des dépôts de substances pectiques, mais ne présentent aucune trace de développement mycélien. L'invasion du système racinaire, de la couronne et de la base de la tige est généralement achevée dès la quatrième semaine après la germination de la graine. L'infection reste alors stationnaire et le parasite n'accomplit plus aucun progrès territorial sensible jusqu'à la floraison. Dès cette étape franchie, le Fusarium reprend sa progression. Le premier indice histologique de cette reprise est l'occlusion des vaisseaux du métaxylème de la tige par des dépôts pectiques, sans évidence de colonisation mycélienne. Cette dernière se développe par contre dans le parenchyme entourant les faisceaux vasculaires du xylème, mais surtout au niveau des noeuds dont les tissus sont plus gravement endommagés. La tige se trouve ainsi colonisée, parfois jusqu'à l'apex, où le parasite peut perforer l'épiderme pour sporuler à l'extérieur. Le rachis des épis n'échappe pas à l'infestation qui se développe suivant le même processus histologique que dans la tige.

La véritable colonisation de la tige débute donc juste après la floraison au moment où s'amorce, dans la plante, un changement métabolique important. La fin de la floraison induit en effet une rapide diminution de la teneur en sucres solubles, conséquence de la mobilisation des glucides par l'épi en formation et de la réduction presque concomitante du rendement photosynthétique due au

TABLEAU 4 : ESSAI DE POUEMBOUT.

Variété Sergeant. Amendement NPK sur vertisol modal peu épais. 25 épis prélevés par parcelle; 2 parcelles par condition.

Amendements	N°	% épis infectés	% grains infectés
<u>Condition 1</u>			
Urée = 90kg ha	15	81	23
P2 05= 60kg ha			
K2 0 = 0	29	88	15
<u>Condition 2</u>			
Urée = 180kg ha	4	100	19
P2 05= 120kg ha			
K2 0 = 45kg ha	45	96	27
<u>Condition 3</u>			
Urée = 270kg ha	42	95	23
P2 05= 180kg ha			
K2 0 = 90kg ha	1	92	4

TABLEAU 5 : ESSAI DE POUEMBOUT

Variété Sergeant en 1983; puis variété Sergeant et XL 82 en 1984. Amendements calciques sur solonetz solodisé sur alluvions anciennes. 25 épis prélevés pour chaque condition d'amendement en 1983; 5 épis en 1984.

Amendements	Essais de 1983		Essais de 1984	
Quantité de Ca hectare	%épis infectés	%grains infectés	%épis infectés	%grains infectés
Pas de Ca	0	10	100	100
2tonnes Ca ha:	5	6	100	100
4tonnes Ca ha:	25	5	100	100
6tonnes Ca ha:	45	10	100	100

TABLEAU 6 : Recherche de Fusarium dans les épis de divers hybrides et variétés testées par le CREA (essai EMPLEC).

Identification de l'hybride ou la variété testée	Année de récolte	Nombre d'épis fusariens	Nombre d'épis examinés
HC 1	1984	21	24
Général	"	13	24
XL 94	"	14	25
GH 390	"	16	25
HC 9	"	16	24
GH 5004	"	17	25
XL 82	"	21	25
XL 81	"	22	25
Major	"	23	25
Sergeant	"	23	25
Colonel	"	25	25
XL 82	1985	10	10
LIMAGRAIN HE1047	"	5	6
" HE6132	"	3	3
" HE1049	"	0	6
" HE1066	"	0	6
" HE1011	"	6	6
PIONEER PFA 21	"	5	6
" PFA 22	"	5	6
" PFA 23	"	6	6
" PFA 24	"	6	6
" PFA 25	"	6	6
CIBAGEIGY CG4733	"	6	6
" CG4141	"	5	6
" CG 493	"	5	6
" CG4502	"	6	6
IITA 8329-23	"	6	6
" 8329-15	"	2	6
" 8341-6	"	6	6
" 8326-17	"	6	6
" 8321-18	"	0	6
CYMMYT 8022	"	6	6
" 8043	"	3	6
" 8131	"	5	6
" 8082	"	4	6
IRAT 81	"	5	6
" 83	"	2	6
" 179	"	5	6

vieillessement du feuillage. Le véritable "puit métabolique" - selon l'expression de MESSIAEN (28) - ainsi créé par le drainage des sucres vers l'épi, ralentit le métabolisme des tissus racinaires dont les défenses cellulaires perdent de leur efficacité, ouvrant la voie aux micro-organismes du sol. Les racines attaquées ont alors tendance à dégénérer, ce qui accélère la sénescence des organes aériens de la plante et offre au Fusarium un terrain plus favorable à sa croissance.

Dans le but de vérifier ces hypothèses et afin de caractériser la présence de F. moniliforme dans les tissus du maïs nous avons entrepris une expérimentation ou l'utilisation de marqueurs nous permettra de détecter le parasite dans son hôte et de suivre sa progression.

Une première tentative de marquage à l'aide d'un marqueur fluorescent (sel disodique du 4,4'-bis (4-anilino-6-diéthylamino-s-triazin-2-ylamino)-2,2'-stilbene-disulfonic acid : nom commercial : Calcofluor White M2 R New' ou Cellufluor) s'est révélé être un échec. Le champignon en cours de croissance dans un milieu de culture absorbe bien le marqueur fluorescent additionné à celui-ci mais, après rinçage du mycélium et transfert sur un milieu non marqué, on constate que le marqueur ne migre pas dans les segments mycéliens néoformés.

Une deuxième tentative est en cours où nous essayerons d'utiliser un marqueur radioactif. Le tritium ( $^3\text{H}$ ) a été retenu car c'est un isotope à basse énergie d'utilisation courante. Nous avons choisi d'utiliser un précurseur spécifique : la Thymine. Cette base Pyrimidique ne se trouve que dans le DNA ce qui devrait éviter les diffusions intempestives par l'intermédiaire des RNA ribosomiques, de transferts ou messagers. Pour le moment, plusieurs expérimentations, destinés à définir les quantités optimum de marqueur, sont en cours et dès que possible, nous entamerons le processus de marquage radioactif, puis par historadiographie nous tenterons d'apporter notre contribution dans l'étude des processus d'infection du maïs par F. moniliforme.

#### 7- INFLUENCE DE LA NATURE DU SOL, DES AMENDEMENTS, ET DES CHOIX VARIÉTAUX SUR LE TAUX D'INFECTION DU GRAIN PRODUIT EN NOUVELLE-CALÉDONIE.

Plusieurs enquêtes ont été effectuées sur les essais conduits par la section d'agronomie de l'O.R.S.T.O.M. et par le C.R.E.A..

Dans un premier temps nous avons exploité quatre essais réalisés en 1983-1984. Les deux premiers avaient pour objectif de comparer l'efficacité de doses croissantes d'engrais N.P.K.. Le troisième était destiné à comparer l'action de diverses doses d'amendements

calciques. Le quatrième était un essai de comportement intervariétal.

La seconde série d'enquête a porté, en 1984-1985, sur deux essais : un essai d'amendements calciques et un essai intervariétal en saison chaude.

Dans chaque cas, nous avons recherché le Fusarium dans le rachis des épis et dans les grains, au moment de la récolte.

Sur chaque épis, la recherche du parasite a été réalisée sur 10 prélèvements tissulaires à l'intérieur du rachis, et sur 25 grains. Plusieurs milliers de tentatives d'isollements ont ainsi été effectuées. Leurs résultats sont résumés dans les tableaux 3,4,5 et 6.

Ces résultats confirment la présence du parasite dans toutes les situations culturales. Dans les essais d'amendement N.P.K., sur les sols d'alluvions de Bourail ou sur les vertisols de Pouembout, les taux d'infection des épis sont très élevés et semblent indépendants des quantités d'engrais apportées (tableaux 3 et 4).

Les premiers résultats enregistrés, en 1983, dans les essais d'amendements calciques semblaient mettre en évidence l'existence d'une corrélation positive entre le taux d'infection systémique et la dose de calcaire apportée au sol (tableau 5). L'absence de Fusarium dans les plants issus du sol sodique non amendé suggérait en outre un éventuel "effet supprimeur" de ce type de sol sur la Fusariose systémique. Ces résultats ont cependant été remis en question en 1984, lorsque, dans le même type d'essai, nous avons relevé dans toutes les conditions expérimentales des taux d'infection de 100%. Cette divergence des résultats produits par les essais de deux années consécutives n'a pas, pour le moment, d'explication logique. Ce problème sera de nouveau étudié en serre, dans des conditions expérimentales mieux contrôlées.

Dans la perspective, encore hypothétique, d'un contrôle de la Fusariose du maïs en Nouvelle-Calédonie, les seuls éléments encourageants ressortent en définitive des résultats obtenus dans les essais intervariétaux (tableau 6). Trois hybrides récemment essayés par le C.R.E.A. ont en effet produit des épis sains, indemnes de Fusariose systémique, alors que toutes les autres variétés ont révélé leur sensibilité à la maladie en donnant des épis fortement contaminés. L'absence de Fusarium dans le rachis des hybrides LIMAGRAIN HE 1049 et HE 1066, et dans l'hybride IITA 8321 - 18, pourrait être la manifestation d'une résistance génétique à la maladie. Il convient donc d'éprouver ces trois hybrides sous une pression d'inoculum drastique.

Dans ce but et avec la collaboration des services

de l'Agriculture du Territoire, nous avons mis en place plusieurs essais.

- En ombrière les trois variétés ont été plantées en pot et inoculées massivement dès la germination ; des prélèvements réguliers permettront de vérifier leur résistance.

- Parallèlement, ces trois variétés ont été incluses à deux essais intravariétaux sur des sites (Tamoá et Bourail) fortement contaminés par F. moniliforme pour étudier leur comportement sur un cycle de saison fraîche. Il est à noter que toutes les variétés de ces essais seront, comme précédemment, analysées pour rechercher le Fusarium dans le rachis et dans les graines, au moment de la récolte.

## ETUDE DE LA TOXINOGENIE DU FUSARIUM MONILIFORME

Pour des raisons évidentes, il n'était pas possible d'aborder l'étude expérimentale de la toxinogénie du F. moniliforme sur l'espèce animale qui nous a révélé l'existence d'un problème de mycotoxines alimentaires en Nouvelle-Calédonie.

Nos premières investigations ont donc été orientées vers la mise au point de tests biologiques, permettant de mettre en évidence, de façon répétitive, fiable et rapide, le pouvoir toxigène des souches du parasite, sur des espèces mieux adaptées à l'expérimentation toxicologique que le cheval (17, 18, 19, 20, 21, 33).

### LES EXPERIMENTATIONS ANIMALES.

Nous envisagerons successivement les méthodes utilisées puis les résultats obtenus.

Une soixantaine d'isolats de F. moniliforme ont été éprouvés sur cinq espèces animales : le cheval, le rat, la souris, le caneton, le poussin et l'oeuf de poule embryonné, suivant diverses méthodes d'administration : injection intrapéritonéale, test cutané, per os et sondages oesophagiens.

#### 1 - LES METHODES DE PREPARATION DES CULTURES DE FUSARIUM.

Les souches isolées du maïs sont purifiées sur un milieu P.D.A. (Pomme de terre, Dextrose, Agar) à fort pouvoir antibiotique (Pénicilline, Colimycine), et conservées en tubes sur une terre stérilisée, substrat qui limite la croissance végétative du champignon et réduit en conséquence les risques de variations et de mutations. Les souches utilisées dans les épreuves d'intoxication sont en général des isolats monoconidiens (clones).

##### **Les substrats.**

Avant d'être administrées aux animaux du laboratoire, les isolats sont cultivés sur les substrats suivants :

Maïs : le maïs en grains entiers ou concassés est disposé en fioles d'Erlenmeyer de 5 l.; à raison de 1200 g de maïs et 1200 ml d'eau par fiole. Ce substrat est stérilisé 2 fois 1h 30 à 120°C. Le maïs stérilisé est ensemencé avec 30 ml d'une suspension de spores issues de cultures de Fusarium sur P.D.A..

Riz : il s'agit de riz étuvé. 400 g de riz additionné de 240 ml d'eau sont disposés en erlenmeyer de 2 litres, stérilisés puis ensemencés et incubés dans les mêmes conditions que le maïs.

Milieux de cultures semi synthétiques liquides : milieux de Czapeck, milieu de Ueno (19).

### **Les conditions de culture.**

Selon le type d'épreuve préparée, les températures et durées d'incubation des cultures varient de la façon suivante :

Pour les inoculations intra-péritonéales : les cultures sont préparées sur milieu de Czapeck ou de Ueno. Différents modes d'incubation ont été essayés, soit :

- \* 18 jours à 25° C, suivis de 6 jours à 14° C, ou
- \* 10 jours à 25° C, suivis de 10 jours à 12° C, ou
- \* 10 jours à 25° C, puis 7 jours à 12° C, puis 10 jours à 25° C, ou
- \* 3 semaines à 31° C, ou
- \* 8 jours à 25° C, puis 15 jours à 8° C, puis 8 jours à 25° C.

Pour l'administration per os : les cultures sont conduites sur maïs ou riz, sous différentes conditions :

- \* 10 jours à 25° C, puis 7 jours à 12° C, puis 10 jours à 25° C,
- \* 10-15 jours à 20° C, puis 10-15 jours à 12° C.
- \* 21 jours à température ambiante.

Pour l'administration par sondage oesophagien : Fusarium moniliforme est cultivé sur du riz additionné de 60 % d'eau. Le milieu est autoclavé deux fois à 110° C à 24 heures d'intervalle. Après inoculation, l'incubation pendant 21 jours se fait à température ambiante (25 à 27° C).

Pour dépôt cutané, sur la peau rasée les cultures sont préparées sur milieu Ueno et incubées.

- \* 21 jours à 20° C, ou
- \* 21 jours à 31° C, ou
- \* 7 jours à 25° C, puis 15 jours à 7° C, puis 15 jours à 25° C, ou
- \* 15 jours à 25° C, puis 7 jours à 12° C, ou
- \* 10 jours à 25° C, puis 7 jours à 25° C, puis 10 jours à 25° C, ou
- \* 10 jours à 20° C, puis 10 jours à 12° C.

La réaction locale (rougeur, nécrose) est notée tous les jours pendant 8 jours. Dans certains cas, l'application cutanée a été renouvelée plusieurs fois (jusqu'à 6 fois). Chaque extrait est testé sur au moins 2

rats.

Pour les inoculations dans l'oeuf embryonné : les souches de Fusarium sont cultivées sur milieu Ueno pendant :

- \* 21 jours à 20° C, ou
- \* 10 jours à 20° C, puis 10 jours à 12° C.

Dans les épreuves d'intoxication per os, le Fusarium et son substrat de culture, en l'occurrence riz ou maïs, sont inclus dans l'aliment distribué aux animaux, ou mélangé à leur eau de boisson après avoir été finement broyés.

Une série d'épreuves a cependant consisté en l'administration, dans l'eau de boisson, d'un surnageant filtré de culture sur milieu de Czapeck.

Il convient de souligner que lorsque la culture de Fusarium est administrée dans l'aliment, elle est séchée à 50° C ou 60° C pendant trois jours, alors que dans l'eau de boisson, la culture du champignon ne subit aucun chauffage, peut être susceptible de dénaturer les toxines.

Dans les inoculations intra-péritonéales, plusieurs types d'extraits ont été inoculés :

- \* surnageants de cultures en milieu liquide concentrés ou dilués, après lyophilisation.

- \* mycélium, obtenu après filtration ou centrifugation des cultures en milieu liquide.

- \* extraits, à partir des filtrats ou de mycélium, obtenus à l'aide de solvants variés :

- méthanol + eau
- éther de pétrole
- chlorure de méthylène
- acétate d'éthyle
- chloroforme

- \* broyats de cultures entières, traités aux U.V. et(ou) à la chaleur pour obtenir une stérilisation complète.

- \* macérations dans l'eau de cultures entières sur maïs concassé. Puis filtration du liquide obtenu.

Pour les dépôts sur la peau rasée, les mêmes méthodes d'extraction que pour les injections intra-péritonéales ont été employées.

Enfin, pour les inoculations dans l'oeuf de poule embryonné nous avons utilisé :

- \* du mycélium broyé,
- \* des surnageants de culture sur milieu Czapeck, bruts, dilués ou concentrés,

- \* des filtrats obtenus à partir du maïs fusarien macéré dans l'eau,

- \* des extraits chloroformiques de filtrats de culture ou de broyats de mycélium.

## 2 - LES METHODES D'ADMINISTRATION AUX ANIMAUX.

### Administration par injection.

- Sur oeufs de poules embryonnés (21) :

Les oeufs embryonnés de 5 à 6 jours sont désinfectés superficiellement à l'aide d'alcool iodé. Un volume de 0,05 à 0,2 ml est inoculé dans la chambre à air. Les oeufs sont ensuite placés dans un incubateur et sont mirés quotidiennement. La vérification finale a lieu au 7ème ou au 14ème jour en brisant la coquille.

- Injection intrapéritonéale chez la souris adulte.

Les extraits fusariens sont inoculés sous un volume de 0,5 à 1 ml. Le protocole vise à mettre en évidence une intoxication aiguë après une inoculation, ou chronique après une série d'inoculations à une dose plus faible.

### Administration par dépôt cutané.

Ce test, qui vise à mettre en évidence l'activité dermonécrosante des trichothécènes éventuellement présents dans l'extrait, est effectué de la façon suivante :

La peau du dos d'un rat de souche albino Sprague Dawley est rasée au rasoir mécanique, l'emplacement ainsi mis à nu reçoit le dépôt d'une goutte de 25 à 50  $\mu$ l de l'extrait étudié.

### Administration per os.

Chez la souris :

- cultures incluses dans la ration alimentaire :

La quantité de maïs fusarien inclu correspond à 50 % de l'aliment. Pour quelques souches, ce taux n'est que de 10 %.

L'aliment est préparée par le mélange de produits de base et de maïs fusarien en poudre. Les formules alimentaires ont été préparées par le Dr BREGEAT, en fonction des ingrédients disponibles.

Par exemple :

maïs fusarien sec .....	500 g
aliment pour chien .....	300 g
dont, protéines	21 %
lipides	6 %
matière minérale	7 %
cellulose	2,5%
H.R.	9 %
avoine .....	<u>200 g</u>
total =	1.000 g

Les aliments sont distribués sous formes de cubes de 2 cm de côté environ. Pour obtenir ces cubes, nous avons procédé de la façon suivante :

- \* séchage du maïs fusarien,
- \* broyage du maïs fusarien et des ingrédients complémentaires,
- \* réhumidification du mélange, qui est alors réparti et compacté sur des plateaux,
- \* découpage des cubes, à la manière des plaques de chocolat,
- \* séchage 48 h à 3 jours dans une étuve ventilée à 50 - 60° C.

Cet aliment s'effrite peu, ce qui permet d'éviter les pertes dans les cages à souris et donc de peser les quantités ingérées par les animaux d'expérience.

Les souris sont regroupées en lots de 5 à 10, selon les cas. Les poids vifs sont contrôlés chaque semaine, puis au moment de la sacrifice.

L'observation dure en général de 15 à 21 jours, mais pour certaines souches, cette période a été portée à 2 ou 3 mois, et même 6 mois dans un cas. Après autopsie des animaux morts durant la période d'observation, ou sacrifiés en fin d'expérience, un examen nécropsique puis, si besoin est, des prélèvements pour analyse histologique sont effectués. Quelques analyses hématologiques ont également été pratiquées.

- cultures incluses dans l'eau de boisson :

La toxicité per os a été recherchée en mélangeant des extraits de culture (filtrats) à l'eau de boisson, à raison de 30 % du volume du liquide total. L'observation dure 5 semaines et suit un protocole identique au précédent.

Chez le rat adulte :

La souche de rat utilisée est la souche albino Sprague Dawley. L'administration s'est faite en incluant les cultures fusariennes à l'aliment, dans les mêmes conditions que celles qui ont été décrites pour les souris.

La durée d'observation, pour une des souches étudiées, a atteint 6 mois.

Chez le rat de 20 jours (juste sevré) :

La souche de rats est la même que dans le cas précédent.

Lorsque les cultures sont incluses dans la ration alimentaire, le mode d'administration est le même que celui décrit pour les souris adultes.

La proportion de culture fusarienne sur riz ou

maïs dans l'aliment est en général de 50 %. Parfois, l'aliment distribué est constitué par la culture fusarienne pure. L'observation dure 15 jours.

Lorsque les cultures sont incluses dans l'eau de boisson, une certaine quantité de culture sur riz ou maïs est mélangée à l'eau de boisson, au taux de 15 à 20 % environ. L'observation dure 10 à 15 jours. Pour éviter les trop fortes contaminations bactériennes, les préparations sont changées tous les jours.

#### Chez le poussin :

Le principe est le même que pour les autres espèces animales : les cultures fusariennes sont incluses dans les aliments, au taux de 50 %.

Après séchage et broyage des cultures sur maïs, la farine obtenue est mélangée aux autres produits de base disponibles afin d'équilibrer la ration. Soit par exemple :

maïs fusarien .....	50	%
soja .....	31	%
farine de riz .....	12	%
chaux .....	2,05	%
bicalcique .....	1,5	%
premix .....	0,7	%
Na Cl .....	0,5	%
méthionine .....	0,1	%
tétrox .....	0,05	%
antioxydant .....	0,05	%
vitamines .....	0,05	%

L'aliment est distribué en poudre. L'observation des lots dure 15 jours et l'évolution des poids des animaux, les quantités d'aliment consommées, les éventuels signes cliniques et les lésions d'autopsie sont notés.

#### Chez le caneton Pékin de 1 jour :

L'épreuve est effectuée dans les mêmes conditions que pour les poussins de un jour. Les cultures de Fusarium se font en général sur maïs, mais parfois sur riz. Elles sont distribuées à un taux de 50 % dans l'aliment. Compte tenu des difficultés d'approvisionnement en canetons de un jour sur le Territoire, nous recevons des oeufs embryonnés, que nous incubons au laboratoire de l'I.E.M.V.T..

#### Chez le cheval :

La distribution à un cheval d'une ration contenant des quantités importantes de maïs fusarien a été réalisée une seule fois. La quantité de maïs contaminé ingéré était de 3 kg par jour. L'observation a duré deux mois.

### **Administration par sondage oesophagien**

Le maïs fusarien subit une extraction hydroalcoolique dans les conditions suivantes :

\* La culture fraîche est broyée au Vortex dans de l'éthanol à 80 %, agitée pendant 12 heures puis filtrée. La phase liquide est séchée au rotavapor, reprise dans de l'éthanol à 10 % et administrée à des rats de 20 jours par sonde oesophagienne. La phase solide est séchée puis administrée en per os.

\* La culture fraîche est lyophilisée puis broyée finement (5 $\mu$ ). Le broyat est mis en suspension dans de l'éthanol à 80 % et subit le même traitement que précédemment.

Les extractions hydroalcooliques et les reprises pour sondages oesophagiens sont normalisées par rapport aux poids de cultures fraîches et aux poids de cultures lyophilisées.

### **3 - LES RESULTATS CLINIQUES DES ESSAIS D'INTOXICATION.**

#### **Administration par injection intrapéritonéale.**

Chez la souris adulte :

Pour mémoire, rappelons que l'injection intrapéritonéale est la première épreuve extensivement essayée chez la souris, dans la phase initiale de nos recherches. Ces expérimentations avaient alors concerné :

- \* 38 souches différentes,
- \* 3 substrats de culture :
  - . milieu de Czapek,
  - . milieu Pomme de terre - Dextrose,
  - . maïs concassé.
- \* 6 conditions de culture :
  - . 21 jours à 31° C
  - . 7 jours à 25° C, puis 15 jours à 14° C, puis 15 jours à 25° C
  - . 21 jours à 25° C, puis 7 jours à 14° C,
  - . 10 jours à 25° C, puis 10 jours à 12-15° C,
  - . 4 semaines en alternance : jour à 25° C - nuit à 10° C,
  - . 10 jours à 25° C, puis 7 jours à 12° C, puis 10 jours à 25° C.
- \* de nombreux types d'échantillons inoculés (concentrés 10 fois, bruts ou dilués 1/10 au 1/1000) :
  - . filtrats ou surnageants de culture bruts,
  - . mycéliums bruts ou broyés puis filtrés,
  - . mycéliums traités aux UV ou à la chaleur,
  - . extraits chlorométhyléniques de filtrats ou mycéliums,

mycéliums, . extraits méthanol-eau de filtrats ou  
entières, . extraits à l'acétate d'éthyle de cultures  
maïa contaminés. . filtrats de macérations (dans l'eau) de

\* deux modes d'intoxication :

. aigue : 1 injection d'une dose élevée,  
. chronique : plusieurs injections  
d'extraits dilués.

Globalement, plus de 250 types d'échantillons différents  
ont été inoculés à près de 1500 souris.

Lorsque les résultats étaient positifs, on a constaté les  
symptômes et lésions suivants :

- intoxication aigue : mortalité en quelques  
minutes à 24 h, sans lésion macroscopique.

- intoxication "chronique" : mortalité en  
plusieurs jours. Les lésions macroscopiques sont peu  
fréquentes mais souvent du même type : gastro-entérite  
parfois hémorragique, congestion et hémorragies pulmonaires.

Le bilan de cette expérimentation par voie  
intrapéritonéale chez la souris est cependant très modeste.  
Il n'est pas possible d'affirmer que le test est peu  
sensible mais, dans les conditions d'expérimentation que  
nous avons suivies, peu d'extraits se sont montrés  
toxiques. De plus, nous avons constaté que les résultats  
obtenus étaient souvent peu reproductibles.

#### Chez le rat de 20 jours.

Les substances injectées aux rats sont des  
filtrats de culture broyées à "l'ultra turrax" dans leur  
milieu. Les broyats bruts ainsi obtenus sont débarrassés de  
tous éléments solides par une série de centrifugation et de  
filtrations sur des tamis de plus en plus fins. La dernière  
filtration, sur membrane millipore de porosité 0,22 ,  
permet de recueillir un filtrat stérile qui est alors  
lyophilisé.

Le lyophilisat est injecté aux rats sous  
différentes concentrations après avoir été remis en  
solution dans l'eau physiologique stérile.

Quelques essais seulement ont été effectués à ce  
jour. Ils concernent les souches 109 et 68 B, faiblement  
toxigènes, et les souches 68 R et 110, fortement  
toxigènes. Les résultats sont indiqués dans le tableau 8.

Seule la toxicité aigue provoquant la mort des  
animaux a été recherchée dans cette première épreuve. Dans  
la majorité des cas, la mort survient dans les trente  
minutes suivant l'injection, parfois quelques heures plus  
tard seulement. L'autopsie des rats n'a révélé aucune  
lésion organique identifiable. Dans un seul cas, celui de

la souche 110 cultivée sur riz, l'injection à la concentration (x 10) a tué l'animal en 5 jours ; l'autopsie a alors révélé un ictère important.

Ce dernier cas conduit à penser qu'il serait peut être possible d'induire une toxicité chronique entraînant des lésion organiques importantes à l'aide d'injection répétée de concentrations réduites.

Il semble également que la toxicité de filtrats de culture sur riz liquide soit moins élevé que celle des filtrats de culture sur milieu Ueno.

Ces deux derniers points sont à l'étude. Mais d'ores et déjà, les premiers résultats obtenus doivent être considérés comme positifs et encourageants.

### **Injections dans l'oeuf de poule embryonné.**

La méthode de préparation des solutions injectées est la même que dans l'expérimentation précédente. Une seule épreuve a été réalisée pour le moment. Elle concernait les filtrats des souches 68 R et 110 cultivées sur riz liquide. Les résultats figurent dans le tableau 9.

Comme dans l'épreuve précédente sur le rat, les résultats de cette première expérimentation sont positifs et en accord avec les résultats des épreuves per os. Les essais dans cette voie seront donc poursuivis.

### **Dépôts cutanés.**

Aucun résultat positif reproductible n'a été obtenu avec cette méthode. Ce qui tend à indiquer que les souches de F. moniliforme soumises à cette épreuve ne produisent pas dans les conditions de nos essais de trichothécènes dermonécrosants. La souche 72 du F. graminearum n'a pas encore été testée.

### **Administration per os.**

#### Chez la souris :

Le mode de préparation des aliments ne pose pas de problème, de même que l'appétabilité.

Ce test sur souris paraît peu sensible puisque, dans nos conditions d'expérimentation, nous n'avons obtenu aucune intoxication après des épreuves concernant :

- \* 26 souches différentes,
- \* 2 conditions de cultures =
  - . 10 jours à 25° C + 7 jours à 12° C + 10 jours à 25° C, ou
  - . 12 jours à 20° C + 15 jours à 12° C.
- \* 1 substrat de culture : maïs concassé,
- \* observations durant 20 jours (18 souches) à 3 mois (7 souches) ou même 6 mois (1 souche).

TABLEAU 7 : Résultats de l'intoxication per os de rats de 20 jours, par du riz artificiellement contaminé par 49 isolats de Fusarium.

N° Souche	C.M.Q. (1)	G.M.Q. (1)	$\frac{G.M.Q.}{C.M.Q.}$	Mortalité		
				Testés	Morts	
Témoin (2)	6,3	---	1	0,15	38	0
13	5,6		0,9	0,16	3	0
109	3,5		0,5	0,14	5	0
81	2,9		0,27	0,09	3	1
89	4,3		0,36	0,08	5	0
9	5,1		0,38	0,07	3	0
111	5,3		0,33	0,06	3	0
7	4,1		0,2	0,048	4	0
80	2,3		0,15	0,044	8	1
86	2,6		0,1	0,038	3	0
61	5,4		0,2	0,037	4	0
60	2,6		0,09	0,034	3	1
74	3,8		0,1	0,026	4	0
82	3,6		0,08	0,022	3	0
43	4,7		0,10	0,021	3	0
108	3,2		0,05	0,015	4	0
93	2,8	-	0,01	- 0,003	5	0
72 (3)	2,7	-	0,02	- 0,007	3	1
3	2,9	-	0,05	- 0,017	5	0
92	2,7	-	0,05	- 0,018	5	0
87	2,3	-	0,05	- 0,021	5	0
101	3,4	-	0,10	- 0,029	4	0
68 B	2,6	-	0,11	- 0,042	16	0
106	3,6	-	0,20	- 0,05	3	0
70	1,8	-	0,09	- 0,05	3	1
115	4	-	0,29	- 0,071	3	0
119	2,7	-	0,20	- 0,074	3	0
24	3,3	-	0,26	- 0,078	3	0
83	2,1	-	0,17	- 0,080	3	0
114	2,9	-	0,24	- 0,08	3	0
112	2,2	-	0,30	- 0,13	3	0
113	3,7	-	0,71	- 0,19	3	0
117	1,8	-	0,2	- 0,11	3	2
84	1,3	-	0,3	- 0,23	3	1
90	2	-	0,66	- 0,33	3	1
118	0,5	-	0,27	- 0,54	3	3
122	0,9	-	0,6	- 0,66	3	0
123	0,4	-	0,31	- 0,75	3	2
79	0,9	-	0,8	- 0,88	3	3
M	1,04	-	1,29	- 1,24	3	3
91	0,6	-	0,8	- 1,30	3	3
120	0,4	-	0,53	- 1,32	3	3
121	0,75	-	1	- 1,33	3	3
75	0,4	-	0,6	- 1,50	5	5
68 R	0,65	-	1,40	- 2,15	25	24
116	0,2	-	0,50	- 2,50	3	3
88	0,5	-	1,4	- 2,8	3	3
110	0,5	-	1,7	- 3,4	15	15
77	0,8	-	2,8	- 3,5	3	3
85	0,2	-	0,7	- 3,5	3	3

(1) voir texte. (2) Aliment contenant 50% de riz sain.

(3) 72 = isolat de F.graminearum

Au total, les expériences ont porté sur près de 400 souris. Aucun symptôme n'a été relevé : pas d'anorexie, pas d'abattement, pas d'amaigrissement. Après sacrifice, les lésions rencontrées étaient minimes, se résumant à quelques pétéchies sur le foie ou le poumon, ou le plus souvent absentes. Quelques analyses hématologiques ont pu faire penser, au début, qu'il y avait leucopénie, avec neutrophile et lymphocytose. Mais avec plus de recul, on a observé que ces anomalies étaient très inconstantes d'une souche à l'autre mais également pour une même souche d'un animal à un autre.

#### Chez le poussin :

Nos épreuves ont concerné, au total :

- \* 23 souches de Fusarium
- \* 1 condition de culture, soit 10 jours à 25° C, puis 7 jours à 12° C, puis 10 jours à 25° C.
- \* 1 substrat de culture : le maïs en grains entiers.

L'observation a duré 15 jours pour chaque lot. Au total, 300 poussins ont été utilisés pour cette épreuve dont les résultats sont restés négatifs. Nous n'avons obtenu aucune intoxication identifiable.

#### Chez le cheval :

Une seule souche a été testée chez le cheval. Le résultat de l'épreuve a été négatif. Aucun signe d'intoxication n'a été observé.

#### Chez le caneton Pékin :

Nos expériences ont concerné :

- \* 43 souches différentes, dont la souche 72 qui est un isolat de F. graminearum.
- \* 2 conditions de culture :
  - . 30 jours à température ambiante, ou
  - . 20 jours à température ambiante, puis 10 jours à 10° C.
- \* 2 substrats de culture : maïs et riz,
- \* 1 mode d'administration de la culture fusarienne à 50 % dans l'aliment.

Dans chaque expérience, l'observation des animaux s'est étendue sur 15 jours. Au total 500 canetons ont été utilisés. Quelques souches se sont montrées toxiques induisant les symptômes suivants :

- anorexie, retards de croissance.
- défauts d'emplumement,
- lésions de proventriculite, ulcérations de la muqueuse du gésier, entérite.

Des analyses histologiques sont en cours pour déterminer la nature des lésions microscopiques associées aux symptômes précédents.

Mais d'une façon générale ce test, considéré comme le plus efficace par les Sud-Africains, (24) n'a pas totalement répondu à notre attente : ses résultats sont restés peu répétitifs et inconstants. Seule la souche 72 du

F. graminearum a induit une toxicose aigue entraînant la mort entre cinq et huit jours de tous les canetons traités. (voir chapitre 4 - "résultats nécropsiques et histologiques").

A la suite d'un échange de correspondance et de matériel biologique (souches) avec l'équipe Sud Africaine du Professeur Marasas, nous avons repris l'expérimentation sur les canetons. En effet, jusqu'à présent, nous avons pratiqués les tests en équilibrant rigoureusement la ration alimentaire par apport des quantités de produits de base nécessaires (protéines, vitamines, sels minéraux, etc...) pour compenser le déséquilibre entraîné par l'adjonction de 50 % de cultures fusariennes. Il semblerait que les Africains du Sud se contentent de mélanger 50 % de maïs fusarien à 50 % d'aliments pour volaille, il n'est pas exclu, dans ces conditions, que le déséquilibre alimentaire ainsi entraîné amplifie les effets toxicologiques des souches toxiques de F. moniliforme.

Cette expérimentation est en cours et pourrait nous permettre, si elle est concluante, de déboucher rapidement sur une étude sur le cheval afin de corréliser nos tests biologiques à l'étude de la L.E.M.

#### Chez le rat adulte :

Un seul essai a été effectué, à l'aide de maïs naturellement contaminé, récupéré dans le silo d'une coopérative après un cas douteux de LEM.

Cet essai est resté négatif : aucun symptôme, ni aucune lésion d'autopsie n'ont été observées pendant les 6 mois d'expérimentation.

#### Chez le rat de 20 jours :

Dans cette épreuve nous avons examiné 49 souches de Fusarium cultivées sous deux conditions d'incubation, soit 15 jours à 25° C suivis de 10 jours à 10° C, soit 30 jours à 25° C. Ces souches ont été préparées sur deux substrats : maïs et riz en grains entiers; elles ont été administrées aux rats de deux façons : incorporées à 50% dans l'aliment quotidien, ou à 20% dans l'eau de boisson. La souche 72 est un isolat de F.graminearum, toutes les autres appartiennent à l'espèce F.moniliforme. Dans chaque série, l'expérimentation s'est déroulée sur 15 Jours, terme au-delà duquel les animaux survivants étaient sacrifiés puis autopsiés.

Cette épreuve s'est révélée très sensible. Elle a donné des résultats reproductibles et constants. L'incorporation du maïs ou du riz contaminé à l'aliment donne de meilleurs résultats que l'administration des cultures finement broyées dans l'eau de boisson. La nature du substrat de culture des souches, riz ou maïs, est sans influence sur l'expression de la toxigenie. Le riz étant toutefois plus facile à utiliser que le maïs, c'est ce substrat que nous avons retenu pour l'examen de la collection de souches. De la même façon, comme les trois conditions d'incubation des cultures produisaient des

TABLEAU 8 : Résultats des premières séries d'injections intrapéritonéales chez le rat de 20 jours.

Souche	Milieu de culture	Concentration	Volume injecté	Pds moyen des rats	Mortalité
68 B	Ueno	x10	1ml	27,5	0/4
68 B	Ueno	x15	1ml	38,5	2/5
109	Ueno	x10	1ml	34,5	0/4
109	Ueno	x15	1ml	39,75	1/2
68 R	Ueno	x10	1ml	24,5	3/4
68 R	Ueno	x15	1ml	37,5	5/5
68 R	riz	x10	1ml	28,5	0/4
68 R	riz	x15	1ml	27,5	1/4
110	Ueno	x10	1ml	27	4/4
110	riz	x10	1ml	28,2	1/4
110	riz	x15	1ml	27,5	2/4
Témoin	Ueno filtré	x10	1ml	27,5	0/4
Témoin	riz filtré	x10	1ml	28	0/4

TABLEAU 9 : Résultats de la première série d'injections dans l'oeuf de poule embryonné.

Souche	Milieu de culture	Concentration	Mortalité des embryons
Témoin	riz filtré	0	0/5
Témoin	riz filtré	x10	0/4
68 R	riz	0	0/4
68 R	riz	x10	5/5
110	riz	0	0/3
110	riz	x10	5/5

résultats similaires, nous avons en définitive retenu la solution la plus simple : les cultures sur riz sont incubées 21 jours à la température du laboratoire (environ 21° C).

Le tableau 7 présente les résultats induits par 49 souches différentes--administrées per os à des lots de rats de 20 jours. Plusieurs paramètres ont été évalués dans cette expérimentation :

- La consommation moyenne quotidienne d'aliment (contenant 50% de riz infecté) par animal (C.M.Q.).
- Le gain moyen quotidien de poids par animal (G.M.Q.).
- Le rapport  $R = \frac{G.M.Q.}{C.M.Q.}$ , dont la variation est, en première estimation, une fonction inverse de la toxicité.
- la mortalité qui révèle les cas de toxicité aigue.

Enfin, les divers symptômes d'intoxication ont été relevés : anoxerie, amaigrissement, ictère, protéinurie marquée, lésions macroscopiques à dominante digestive (gastrite, entérite).

Dans le tableau 7, les 49 souches éprouvées sont classées, en fonction de la valeur de l'indice  $R = \frac{G.M.Q.}{C.M.Q.}$ , par ordre de toxicité croissante. Cet indice passe de  $R = 0.16$  chez la souche 13 ( $R = 0.15$  chez les témoins), à  $R = - 3,5$  chez les souches 77 et 85 qui sont les plus fortement toxigènes. L'augmentation de la toxicité se traduit par une inappétance croissante allant jusqu'au refus presque total de nourriture (cf. C.M.Q.), par un gain pondéral de plus en plus faible, puis par une perte de poids vif (cf. G.M.Q.), et par des taux de mortalité croissant jusqu'à 100% des animaux intoxiqués.

Il convient toutefois de souligner que la dimension modeste des lots de rats testés jusqu'à ce jour confère un caractère provisoire au classement présenté dans le tableau 7. Ce classement nous semble valide dans ses grandes lignes, mais il n'est pas exclu que les expérimentations ultérieures le modifie dans le détail.

D'ores et déjà cependant, il apparaît qu'une forte proportion des souches néo-calédoniennes du F. moniliforme provoque une intoxication chez le rat de 20 jours. Les symptômes de cette intoxication varie en intensité. Mais à l'exception des toutes premières souches mentionnées dans le tableau, tous les isolats administrés per os induisent l'anorexie et des troubles de l'assimilation aboutissant à une croissance pondérale ralentie ou à l'amaigrissement des rats. Avec les souches les plus fortement toxigènes ces perturbations s'amplifient et s'accompagnent d'ictère, de protéinurie marquée et de lésions hémorragiques du système digestif. Quatorze souches sur les quarante neuf mises à

l'épreuve - soit 28 % de la population d'isolats - tuent la totalité des animaux qui les ingèrent, en moins de 14 jours. (voir chapitre 4 - "résultats nécropsiques et histologiques").

L'administration per os de riz contaminé à des rats de 20 jours est l'épreuve la plus efficace parmi toutes celles que nous avons expérimentées. Elle constituera donc la technique de référence pour la suite des recherches. Cette technique présente cependant l'inconvénient de ne pas être très rapide : plus d'un mois de manipulations diverses sépare la mise en culture des souches sur leur substrat de l'observation des premiers symptômes de toxicité aigue. Ces délais s'accordent mal avec les nécessités de l'étude chimique des extraits de cultures, puis de leurs fractions, passage obligatoire vers l'identification des toxines.

C'est pourquoi nous essayons donc actuellement de mettre au point une épreuve permettant de révéler plus rapidement la toxicité d'une culture, ou de ses extraits, que ne le fait l'administration per os. Deux méthodes font l'objet d'essais. Dans la première, les filtrats ou les extraits de cultures fusariennes sont injectés, par voie intrapéritonéale, à de jeunes rats de 20 jours. Dans la seconde, les injections sont effectuées dans la chambre à air d'oeufs de poule embryonnés. Nous cherchons ainsi à mettre en évidence une toxicité aigue et à établir une corrélation entre les résultats attendus de cette expérimentation et ceux obtenus en administration per os avec les souches les plus fortement toxigènes. Parallèlement et afin de compléter les tests per os nous avons entrepris un nouveau mode d'administration : par sondage oesophagien.

#### **Administration par sondage oesophagien.**

##### Chez le rat de 20 jours :

Cette expérimentation est en cours, elle présente l'avantage par rapport aux tests per os de permettre la quantification plus rigoureuse des doses administrées. C'est le prélude à une analyse anatomo-pathologique fine des effets de la toxicité aigue et chronique de quelques souches reconnues toxiques dans les tests per os. (voir chapitre 5 - "procédures mises en route depuis le 15 Septembre").

La caractérisation des lésions anatomo-pathologiques servira de marqueur pour l'étude des différentes composantes des extraits hydroalcooliques fractionnés chimiquement (partition entre solvants, chromatographies sur colonne, etc...).

#### 4 - LES RESULTATS NECROPSIQUES ET HISTOLOGIQUES.

##### A / CANETONS

I - **Symptomatologie** : voir tableau 10.

II - **Nécropsie** : voir tableau 10.

III - **Histologie** :

C1 : foie : surcharge hépatocytaire diffuse : sans doute de nature glycogénique et liée au jeune âge - RAS.

C2 : poumon : une plage d'oedème (origine agonique) une petite hémorragie intrabronchique. (Quelle est la méthode de sacrifice ?).

C3 : illisible par surfixation.

C4 : duodénum et pancréas - RAS.

C5 : jejuno-iléon : autolyse moyenne des villosités - RAS.

C6 : intestin distal : RAS.

C7 : encéphale : spongieuse périvasculaire diffuse, sans réaction cellulaire. Nature autolytique très probable.

C8 : rate : RAS.  
foie : aspect microvacuolaire de tous les hépatocytes, à prédominance centrolobulaire. Nature glycogénique probable, liée au jeune âge, ou artefact (=C1).

C9 : foie : surcharge macrovacuolaire diffuse, plus marquée sur un lobe : Stéatose.  
rate : absente.

C10 : rate : RAS.  
proventricule : aspect non hémorragique. un flot lymphocytaire étendu, probablement normal (GALT).

C11 : encéphale : spongieuse périvasculaire (=C7).  
cervelet : RAS.

C12 I : foie : altérations autolytiques marquées et artefacts d'autopsie, lecture délicate. Apparemment pas de lésion.

(Autolyse possiblement accélérée par l'existence d'une atteinte dégénérative pré-mortem, mais celle-ci est peu compatible avec un sacrifice à terme).

- C12 II :proventricule\_ : RAS.
- C12 III : paroi : intègre, mis à part une petite exul-  
gastrique : cération. Celle-ci est surmontée  
d'une épaisse couche anhyste et  
éosinophile avec cellules desquamées  
(mucus ou fibrine) qui proviendrait  
d'un segment non intéressé par la  
coupe : réaction mucosécrétante à un  
ulcère par exemple.
- C13 : intestin : forte autolyse et oedème de la sous-  
muqueuse (qui est à un stade pré-  
ulcéreux).
- C14 I : foie : illisible - autolyse.
- C14 II :proventricule : plages de nécrose glandulaire  
avec infiltration de cellules  
mononucléées (inflammation  
subaigue).
- C14 III : gésier : aspect = à C12.  
muscleuse dilacérée par l'oedème  
et ou la technique d'autopsie.
- C15 : intestin : 2 coupes normales  
la 3ème montre une forte lyse des  
villosités (nécrose très probable)  
avec réaction mononucléée possible  
coupe très mal colorée).
- C16 I : foie : congestion et lyse (coupe diffi-  
cilement exploitable).
- C16 II :proventricule : infiltration mononucléée diffuse de  
la sous-muqueuse. Présence d'un  
nodule lymphocytaire.
- C16 III : gésier : ulcère flagrant semble-t-il (la  
coupe ne l'intéresse pas) avec une  
exulcération et une épaisse couche  
de mucus.  
muscleuse dilacérée par de l'oedème  
ou artéfact).
- C17 : intestin : inflammation congestive dans le  
chorion, masquée par une forte  
lyse (autolyse très probablement).

#### IV - Conclusion :

La symptomatologie, les modifications nécropsiques et histologiques s'accordent et évoquent une action essentiellement digestive chez le caneton :

C9 : spongieuse hépatocytaire qui peut signer une atteinte dégénérative.-

C12 III, C13, C14 II et III, C15, C16 II et III, C17 : atteinte de type ulcère avec réaction inflammatoire aigue, effective à différents étages du tractus digestif.

Les modifications morphologiques constatées sur les encéphales (C7 et C11) sont probablement de nature autolytique. Cependant, cette autolyse apparemment rapide pourrait être le fait d'une atteinte pré-mortem non visible ici. Les études à venir pourront préciser ce point.

Dans l'état actuel de notre investigation, les lésions chez le caneton sont exclusivement à siège digestif.

#### B / RATS

I - Symptomatologie : voir tableau 11.

II - Nécropsie : voir tableau 11.

III - Histologie :

R1 : foie	: surcharge hépatocytaire diffuse et modérée, à prédominance périlobulaire (glycogène lié au jeune âge probablement).
R2 : poumons - rein	: RAS.
rate - pancréas	: RAS.
R3 : estomac	: RAS.
jejunum	: coupe très mauvaise.
R4 : jejunum - iléon	: RAS.
R5 : colon	: RAS -+prélèvement non signalé, non identifiable, mais évoquant un reste embryonnaire de gonade indifférenciée.
R6 : foie	: RAS - Surcharge glycogénique modérée, diffuse. Distension des gros vaisseaux.
R7 : foie	: RAS (=R6).
R8 I : foie	: RAS (=R6).
R8 II : foie	: RAS - Gros vaisseaux dilatés (sans

signification patho). Une petite  
plage d'autolyse.

- R9 I : foie : surcharge hépatocytaire diffuse -  
Gros vaisseaux dilatés. Autolyse  
et aspect "cuit" lié au Bouin  
--- surcharge glycogénique .
- R9 II : intestin : RAS.
- R10 I : foie : autolyse + altération due au Bouin  
- RAS.
- R10 II : intestin : autolyse - RAS.
- R11 I : foie : surcharge diffuse, à prédominance  
périlobulaire des hépatocytes :  
glycogène probablement, lié au  
jeune âge et ou au stress de  
l'anoréxie.
- R11 II : intestin : RAS.
- R12 I : foie : RAS - Petite congestion des gros  
vaisseaux (par absence de  
saignée. Début d'autolyse :  
évoque en fait un prélèvement con-  
gelé avant fixation.
- R12 II : intestin : coupe peu lisible  
RAS apparemment.
- R13 : cerveau : congestion des vaisseaux superfi-  
ciels et profonds, sans réaction  
cellulaire (l'absence de saignée  
explique cet aspect, au moins en  
partie). Spongiose périvasculaire  
et périneuronale pouvant évoquer  
un oedème cérébral.  
Méninges : RAS.
- R14 I : poumon : aspect congestivo-hémorragique  
modéré (lésion agonique).
- R14 II : rate : hémosidérose semblant augmentée.  
Aspect de splénocontraction.
- pancréas : RAS.
- R16 : foie : congestion marquée des gros  
vaisseaux et légère des sinu-  
soïdes (l'absence de saignée  
peut expliquer cet aspect, en  
partie au moins). Nécrose et ou  
autolyse en foyers disséminés,  
qui évoque un prélèvement congelé  
avant fixation.

- R17 : estomac : malpighien : RAS.  
sécrétoire : congestion modérée et diffuse du chorion (animal mort, non saigné).
- R18 I : intestin : infiltration modérée du chorion par des cellules mononucléées ; cet aspect est exagéré dans certains segments.
- R18 II : intestin : autolyse totale, peut être facilitée par une atteinte pré-mortem. Infiltration mononucléée du chorion.
- R19 I : foie : aspect vacuolaire de tous les hépatocytes, surtout en zone péri-lobulaire (lésion de surcharge glycogénique, ou plus probablement aspect glycogénique normal pour un rat jeune).
- R19 II : rein : RAS.
- R20 I : foie : RAS.
- R20 II : rein : autolyse marquée.
- R21 I : foie : une petite plage de sinus dilatés, avec infiltration mononucléée très discrète.
- R21 II : reins : autolyse marquée (l'hypothèse de nécrose tubulaire semble incompatible avec la survie de l'animal).
- R22 I : estomac : un microulcère en région glandulaire - présence d'helminthes semble-t-il.
- R22 II : colon : RAS - autolyse.
- R23 I : foie : RAS - dilatation des gros vaisseaux surfixation au Bouin.
- R23 II : rein : RAS - quelques dilatations de tubes droits (lésion non toxique et banale).
- R24 : cerveau : spongieuse de la substance blanche, sans réaction cellulaire ; même aspect dans le bulbe. Il y a peu d'oedème périvasculaire (autolyse ?).

- cervelet : RAS.
- R25 I : foie : congestion modérée, à prédominance centrolobulaire, pas d'atteinte hépatocytaire.
- R25 II : colon ---: congestion modérée de la sous-muqueuse (animal non saigné). Infiltration lymphoplasmocytaire du chorion : entérite aigue.
- R26 : cerveau : spongieuse de la substance blanche pouvant évoquer un oedème ou une démyélinisation, mais pouvant aussi être mise en relation avec une forte autolyse ; pas de congestion.
- bulbe : même aspect.
- cervelet : RAS.
- méninges : un petit foyer lymphocytaire.
- R27 I : foie : congestion des gros vaisseaux (animal mort, non saigné). Stéatose à prédominance centrolobulaire très modérée.
- R27 II : surrénale : stéatose des cellules médullaires dans la zone glomérulée.
- rein : nécrose tubulaire diffuse, sans atteinte des glomérules, ou simple autolyse.
- R28 : colon : autolyse avancée.
- R29 I : poumon : infiltration lymphocytaire des septa, avec hémorragie et oedème.
- R29 II : rate : RAS.
- pancréas : RAS.

#### IV - Conclusion :

Les lésions macroscopiques et microscopiques s'accordent avec les symptômes constatés, à participation digestive.

On note un microulcère gastrique (R22 I) et différents degrés d'entérite (R18 I, R18 II, R25 II).

Au niveau hépatique on constate une surcharge glycogénique (R1, R6, R7, R8, R9 I, R11 I, R19 I) qui correspond très probablement au jeune âge des animaux ; cette modification peut reconnaître aussi une cause

partielle dans l'anorexie.

On note aussi sur un animal (R27 I) une stéatose hépatique dont la nature dégénérative est probable.

Il est à regretter qu'aucun examen histologique des reins et de la rate n'ait été pratiqué, ces organes participant à coup sûr au symptôme de l'ictère.

C'est pourquoi toutes les séries d'expériences réalisées depuis août 1985 comprennent une autopsie minutieuse avec prélèvement systématique des principaux organes (voir procédure d'autopsie).

Les images de spongioses cérébrales quant à elles sont de nature autolytique, sans pouvoir préciser si une composante de nécrose ou de démyélinisation a pu l'augmenter.

Tableau 10 - EXPERIENCE FUSARIUM SUR CANETONS

Boîte	Référence	Date de prélèvements	N° de la souche	Organe	Commémoratifs Mort ou Sacrié à j + - symptômes	Lésions macroscopiques
N° 1	C 1	20.08.84	Témoin	foie	sacrié à 15 jours	aucune
	C 2	"	"	poumon	"	"
	C 3	"	"	proventricule + rate	"	"
	C 4	"	"	partie ant. du TD	"	"
	C 5	"	"	partie moy. du TD	"	"
	C 6	"	"	partie post. du TD	"	"
	C 7	"	"	encéphale	"	"
	C 8	17.08.84	61	foie	sacrié à 12 jours	légèrement coloré
	C 9	"	68	foie - rate	"	aucune
	C 10	"	68	proventricule + rate	"	piqueté hémorragique
	C 11	20.08.84	68	encéphale	sacrié à 15 jours	aucune
	C 12 I	25.09.84	110	foie	sacrié à 15 jours	prolifération de la muqueuse
	C 12 II	"	"	proventricule	anorexie - déplumement	production de mucus abondant
	C 12 III	"	"	gésier	au niveau du cou (en arrière de la tête)	
	C 13	"	"	intestin	"	aspect normal
C 14 I	"	68	foie	sacrié à 15 jours	foie décoloré	
C 14 II	"	68	proventricule	anorexie amaigrissement	proventricule plein d'un abondant mucus	
C 14 III	"	68	gésier	déplumement sur le cou	muqueuse du gésier ulcéré	
C 15	"	68	intestin		portion antérieure d'aspect inflammatoire	

Tableau 10 - EXPERIENCE FUSARIUM SUR CANETONS (suite)

Boîte	Référence	Date de prélèvements	N° de la souche	Organe	Commémoratifs Mort ou Sacrié à j + - symptômes	Lésions macroscopiques
N° 1	C 16 I	25.09.84	68 F	foie	sacrifié à 15 j. anorexie amaigrissement déplumement sur le cou	aucune proventricule plein d'un abondant mucus. ulcération de la muqueuse du gésier. aspect congestif.
	C 16 II	"	"	proventricule		
	C 16 III	"	"	gésier		
	C 17	"	"	intestin		

Tableau 11 - EXPERIENCE FUSARIUM SUR RATS

Boîte	Référence	Date de prélèvements	N° de la souche et mode de distribution	Organe	Commémoratifs Mort ou Sacrié à j + - symptômes	Lésions macroscopiques
N° 2	R1	9.08.84	Témoin (dans l'aliment)	foie	sacrifié après 14 jours d'expérience	aucune
	R2	"	"	poumon + rein + rate	"	"
	R3	"	"	estomac + duodenum	"	"
	R4	"	"	partie moyenne de l'intestin	"	"
	R5	"	"	partie post. de l'intestin	"	"
	R6	"	7 dans l'aliment	foie	"	"
	R7	"	74 dans l'aliment	foie	"	"
	R8 I	"	101 dans l'aliment	foie	"	légèrement congestionné
	R8 II	"	101 dans l'aliment	foie	"	"
	R9 I	17.10.84	61 dans la boisson	foie	"	aucune
	R9 II	"	"	intestin	"	"
	R10 I	"	61 dans l'aliment et la boisson	foie	"	"
	R10 II	"	"	intestin	"	"
	R11 I	"	68 dans la boisson	foie	"	"
	R11 II	"	"	intestin	"	"
	R12 I	"	68 aliment + boisson	foie	"	congestionné
	R12 II	"	"	TD	"	légère entérite
	R13	24.10.84	68 R dans l'aliment	encéphale	mort à 7 jours après fort amaigrissement et anorexie	congestion méningée
	R14 I	"	"	poumon		aucune lésion
	R14 II	"	"	rate		"

Tableau 11 - EXPERIENCE FUSARIUM SUR RATS (suite)

Boîte	Référence	Date de prélèvements	N° de la souche et mode de distribution	Organe	Commémoratifs Mort ou Sacrié à j + - symptômes	Lésions macroscopiques
N° 2	R15	24.10.84	68 R dans l'aliment	rein	mort à 7 jours après fort amaigrissement et anorexie	aucune lésion
	R16	"	"	foie		congestionné
	R17	"	"	estomac		congestion
	R18 I	"	"	partie ant. de l'intestin		aspect congestif
	R18 II	"	"	partie moyenne de l'intestin		aucune
	R18 III	"	"	partie post. de de l'intestin		"
	R19 I	27.10.84	68 B	foie	sacrifié à 11 jours	aucune lésion
	R19 II	"	"	rein	"	"
	R20 I	"	68 BF	foie	"	"
	R20 II	"	"	rein	"	"
N° 3	R21 I	"	68 R	foie	seul survivant du lot sacrifié à 11 jours	"
	R21 II	"	"	rein		"
	R22 I	"	"	estomac	sacrifié à 11 jours	"
	R22 II	"	"	intestin		"
	R23 I	26.10.84	68 R dans l'aliment	foie	aucune	aucune
	R23 II	"	"	rein		"
	R24	13.11.84	68 R maïs dans aliment	encéphale	mort à 8 j.-amaigrisse- ment-anorexie-ictère	congestionné
	R25 I	"	"	foie	aucune	"
R25 II	"	"	intestin	couleur rouge foncé		
R26	14.11.84	68 R riz dans aliment	encéphale	mort à 9 j. mêmes symptômes	congestionné	

Tableau 11 - EXPERIENCE FUSARIUM SUR RATS (suite)

Boîte	Référence	Date de prélèvements	N° de la souche et mode de distribution	Organe	Commémoratifs Mort ou Sacrié à j + - symptômes	Lésions macroscopiques
N° 3	R27 I	14.11.84	68 R riz dans aliment	foie	mort à 9 jours mêmes symptômes	
	R27 II	"	"	rein		
	R28	"	"	intestin		aspect congestif
	R29 I	15.11.84	110 maïs dans aliment	poumon	mort à 10 jours mêmes symptômes	aucune
	R29 II			rate		aucune

## PROCEDURE DE TOXICOLOGIE CLINIQUE

### CARACTERISTIQUES DES ANIMAUX

Les animaux sont des rats de souche albino SPRAGUE-DOWLEY produits localement (Animalerie des Services Vétérinaires Territoriaux).

Un lot de 60 animaux des deux sexes est réceptionné chaque 15 jours, il répond aux critères suivants :

- 30 mâles et 30 femelles.
- âge : 18 jours, sevrés la veille.
- poids corporel homogène compris entre 30 et 40 grammes.

Ces animaux sont issus d'une population reproductrice gérée selon des modalités constantes (voir procédure d'identification et de gestion de l'élevage de rats).

### MAINTENANCE DES ANIMAUX

#### 1/ lieu de maintenance :

Les animaux sont maintenus dans l'animalerie du centre ORSTOM de Nouméa.

Cette animalerie est divisée en 8 box dans lesquels peuvent être installées 20 cages de 5 animaux ainsi que les commodités correspondantes (aliment - litière - poste d'eau - matériel de pesée - matériel d'injection).

Les conditions ambiantes ne sont pas contrôlées ; le local étant clos par des moustiquaires doubles, la lumière, la température et l'humidité sont approximativement celles du milieu environnant.

Cette animalerie est conçue de sorte à éviter l'intrusion de rongeurs et d'insectes.

#### 2/ allotement :

Les animaux sont répartis en lots de 5 lors de leur réception ; chaque lot comprend 2 mâles et 3 femelles, ou l'inverse, choisis au hasard dans une gamme de poids réduite.

Ainsi, un lot mis en expérimentation est constitué d'animaux de même âge et de poids corporel homogène.

#### 3/ cages :

Chaque lot est placé dans une cage lavée et séchée présentant les caractéristiques suivantes :

- longueur : 45 cm
- largeur : 25 cm
- hauteur : 12 cm

Le bac est en PVC, surmonté d'une grille en inox faisant mangeoire.

Au sein d'un lot, les animaux sont numérotés de 1 à 5 par percée des oreilles.

Sur la cage est apposée une étiquette portant mention de :

- la date de réception des animaux.
- leur date de naissance.
- la date de mise en expérimentation.
- la voie d'administration.
- la nature et la présentation de l'extrait administré.

(On entend par présentation de l'extrait sa forme liquide ou solide, sa concentration s'il est liquide, son taux d'incorporation dans l'aliment s'il est solide).

#### 4/ alimentation - abreuvement - litière :

L'aliment est, à l'exclusion de tout autre, de l'aliment complet pour chiens, de marque TAYO, présenté en croquettes. Il comporte notamment :

- matières protéiques ..... 20 %
- matières grasses ..... 5 %
- matières minérales ..... 8 %
- cellulose ..... 3 %
- humidité ..... 12 %
- Vitamine A : 500.000 UI/100 kg
- Vitamine D3 : 500.000 UI/100 kg
- Vitamine E : 4.500 UI/100 kg.

Chaque lot reçoit quotidiennement 100 grammes de cet aliment, après que les restes de la veille aient été pesés. Ainsi, la consommation quotidienne d'aliment peut être appréhendée (étant admis par approximation que la quantité d'aliment gaspillé est faible et comparable entre les lots).

L'abreuvement est satisfait avec l'eau de la ville, présentée en biberon gradué de 150 ml ; la consommation de boisson est évaluée chaque jour, puis les biberons sont vidés, rincés et réemplis.

La litière : les animaux sont placés sur copeaux de bois, renouvelés tous les 4 jours. Ces copeaux sont issus de bois non traités et sont débarrassés sommairement d'éventuels débris métalliques.

### MISE EN EXPERIMENTATION DES ANIMAUX

#### 1/ Phase d'adaptation :

Les animaux sont réceptionnés, sexés, pesés et mis en lots le vendredi matin ; une cage est attribuée à chaque lot, pourvue d'aliment et de boisson, puis les animaux sont laissés au repos durant 48 heures pour acclimatation.

#### 2/ Mise en expérimentation :

Toutes les expérimentations débutent le lundi matin. Pour chaque série d'expériences (un produit à éprouver sous une même voie d'administration) 4 lots de rats sont mis en place :

- un lot témoin
- trois lots-test, correspondant à 3 doses du produit étudié.

Ces 4 lots sont entretenus simultanément, dans les mêmes conditions, la seule différence étant la dose de produit fusarien administrée.

## DUREE DES EXPERIMENTATIONS

Aucune limitation n'est fixée à la durée des expérimentations, en retenant que nous portons notre intérêt sur la toxicité subaiguë et chronique des produits à éprouver.

En conséquence, les expérimentations sont prévues, dans une phase initiale, sur deux semaines, les produits étant administrés 14 jours consécutifs et l'euthanasie des animaux n'intervenant qu'à partir du quinzième jour.

Dans une phase ultérieure, des expérimentations de toxicité chronique sur un mois et sur trois mois avec les mêmes extraits seront envisagées pour mieux cerner les aspects cliniques et lésionnels des effets toxiques.

## ETUDE CLINIQUE DES ANIMAUX

Tous les événements cliniques sont consignés à mesure de leur survenue dans une fiche d'observation clinique. Cette fiche correspond à un lot d'animaux, chacun des rats y étant individualisé.

Les opérations de traitement, d'alimentation et d'abreuvement sont mises à profit pour une observation matinale, une seconde observation est réalisée l'après-midi dans la mesure du possible.

Les événements cliniques sont les suivants :

1. Mort ou Survie : les animaux trouvés morts en cours d'étude sont immédiatement retirés de la cage et autopsiés (voir procédure d'autopsie).

les animaux dont il est estimé en cours d'étude qu'ils ne survivront pas jusqu'à l'observation suivante sont sacrifiés (voir procédure d'euthanasie) et autopsiés immédiatement.

2. Gain de poids corporel : les animaux sont pesés chaque jour, à heure fixe, un par un.

3. Prise d'aliment : la consommation journalière d'aliment par chaque lot est appréhendée par pesée différentielle.

4. Abreuvement : il est mesuré quotidiennement pour chaque lot, grâce à l'emploi de biberons gradués.

5. Analyse d'urine : une analyse d'urine simple est habituellement pratiquée au 7ème et au 14ème jours au moyen de bandelettes réactives. Les paramètres suivants sont appréhendés :

- pH
- protéines
- glucose
- corps cétoniques
- sang
- bilirubine
- urobilinogène.

Un volume d'urine proche de 1 ml est récupéré pour chaque animal, sur un verre de montre, lors des manipulations de pesée et de sondage oesophagien.

Cette méthode sera appliquée jusqu'à la mise en place de cages à métabolisme.

6. Tout signe en symptôme pouvant être appréhendé par l'observation ou la palpation.

7. Hématologie : un prélèvement sanguin est effectué sur EDTA, lors du sacrifice, par ponction de l'aorte abdominale ou de l'artère rénale droite (voir procédure d'euthanasie).

Les paramètres suivants sont étudiés :

- numération des globules blancs et rouges.
- formule leucocytaire.
- taux d'hémoglobine sanguin.
- hématocrite.
- volume moyen globulaire.
- taux globulaire moyen en hémoglobine.
- concentration globulaire moyenne en hémoglobine.

La formule leucocytaire est établie par comptage à l'immersion ; les autres paramètres sont fournis par un COULTER-COUNTER.

## ADMINISTRATION ET CONSERVATION DES PRODUITS A TESTER

### 1/ Présentation des produits :

Les produits à tester sont toujours le résultat d'une culture de *Fusarium moniliforme* sur un milieu variable, liquide ou solide. Dans tous les cas donc nous devons tester chez l'animal une phase solide et une phase liquide.

### 2/ Administration des produits solides :

Ces produits ne peuvent être administrés que par voie orale ; ils sont incorporés dans l'aliment complet, dans la proportion maximale de 50 %, au-delà de laquelle les animaux refusent de s'alimenter et reçoivent une ration par trop déséquilibrée. Cette proportion de 50 % peut être abaissée dans le but de réaliser une expérience plus longue à dose plus faible.

L'aliment toxique est distribué quotidiennement sous forme de croquettes, à la dose de 100 grammes et à la place de l'aliment complet habituel.

### 3/ Administration des produits liquides :

#### 3.1 - voies d'administration :

Compte-tenu des résultats préliminaires (de 1982 à Août 1985) et des objectifs à atteindre :

a) définition de lésions anatomiques et histologiques retrouvées de façon constante chez le rat lors d'intoxication par des produits de culture de *Fusarium moniliforme* ;

b) modification éventuelle de toxicité des produits lors d'administration orale ou parentérale ;

c) détermination d'un test biologique fiable, reproductible et aussi rapide que possible de mise en évidence des principes toxiques de *Fusarium moniliforme*,

deux voies d'administration des produits liquides sont retenues :

- la voie orale, par sondage oesophagien quotidien,
- la voie péritonéale, également quotidienne.

Par ces deux voies, les mêmes extraits sont administrés, de sorte que les doses et leurs effets puissent toujours être comparés.

### 3.2 - volume d'administration :

Pour chacune des 2 voies, il est convenu de toujours administrer les inoculats sous le même volume, choisi égal à 1 ml.

Ainsi, les faibles doses sont des dilutions à volume constant des fortes doses dans du sérum physiologique (Na Cl 9‰ - solution aqueuse) lors d'injection, dans de l'eau potable lors de sondage oesophagien.

### 4/ Horaire d'administration :

Chaque jour, les animaux sont traités à heure fixe ; par commodité, les inoculations sont débutées chaque matin entre 8 h 00 et 9 h 00 et réalisées toujours selon la même chronologie entre les lots.

### 5/ Conservation des produits :

5.1 - les produits solides sont incorporés dans un aliment final à faible taux d'humidité (12 % environ) ; ils sont alors conservés à température ambiante, dans des bocaux fermés.

Ces aliments sont entreposés dans l'animalerie.

5.2 - les produits liquides sont divisés en aliquots qui correspondent aux besoins d'une journée ; ils sont entreposés dans le réfrigérateur du laboratoire.

Les dilutions éventuelles sont réalisées juste avant leur administration aux animaux.

## DETERMINATION ET EXPRESSION DES DOSES D'EXPERIMENTATION

### 1/ Détermination des doses :

Pour chaque produit à tester et chaque voie d'administration, nous recherchons par évolution décroissante :

- la dose léthale 50 % (DL 50) : la dose maximale qui, après une administration unique, provoque la mort de 50 % des animaux.

- la dose cumulée maximale (DCM) : la dose quotidienne maximale qui provoque la mort de 50 % des animaux dans les 72 heures.

- la dose cumulée tolérable (DCT) : la dose quotidienne maximale qui, après 15 jours, n'entraîne pas une perte moyenne de poids corporel supérieure à 10 %.

En pratique, la plus forte dose essayée pour un produit est la dose maximale contenue dans le volume choisi d'administration de 1 ml ; cette dose peut être inférieure à la DL 50, ou même à la DCM. Toute détermination de dose débute par cette dose maximale autorisée sous nos conditions ; si elle s'avère inférieure à la DCT, on considère que le produit éprouvé est d'une toxicité trop faible pour entrer dans le cadre de nos études.

### 2/ Doses d'expérimentation :

Ainsi définies la DL 50, la DCM et la DCT, nous choisissons pour doses d'expérimentation :

- lot grande dose (G) : dose =  $\frac{DCM}{2}$

- lot petite dose (P) : dose = DCT

- lot dose intermédiaire (I) : la dose choisie permet la survie de tous les animaux du lot pendant 1 semaine au moins ; elle est de l'ordre de  $\frac{DCM}{4}$  le plus souvent.

### 3/ Expression des doses :

La possibilité de comparer les résultats entre tous les extraits de culture d'une même souche fusarienne nous semblant impérative, il est décidé d'exprimer toutes les doses en équivalent-grammes de culture de départ.

La dose ainsi exprimée est calculée à partir :

- du poids de la culture de départ ;
- de la quantité de produit extrait d'une culture ;
- de la concentration de l'inoculat ;
- du volume administré (produits liquides) ou de la quantité quotidienne moyenne d'aliment ingéré (produits solides).

Cette notion d'équivalent-grammes de culture de départ suppose une méthode de culture du champignon codifiée et stable (voir procédure correspondante).

A l'inverse, dans l'expression des résultats, la notion d'unité-rat (quantité de substance provoquant la mort d'un gramme de poids corporel de rat, sans précision du délai de survie) peut s'avérer utile pour établir des comparaisons de toxicité.

--oOo--

# PROCEDURE DE SACRIFICE

## DES ANIMAUX

### LES BUTS DU SACRIFICE

Il doit satisfaire à deux buts prioritaires :

l'un est conservatoire : le sacrifice doit être conduit de sorte à pouvoir effectuer ensuite tous les prélèvements voulus dans le meilleur état de conservation des organes ;

l'autre est éthique : les souffrances inutiles doivent être épargnés aux animaux et le sacrifice ne doit pas en engendrer de nouvelles.

### LES ANIMAUX A SACRIFIER

#### 1 - Sacrifices à terme :

Tous les animaux survivants au terme de l'étude clinique sont sacrifiés en vue de l'autopsie et des examens histologiques. Ceci s'applique également aux animaux-témoins. Le sacrifice à terme est pratiqué par lots entiers à partir du 15ème jour de toxicologie clinique ; l'autopsie est immédiate.

#### 2 - Sacrifices en cours d'étude clinique :

Les animaux malades en cours d'étude et dont il est estimé qu'ils ne peuvent survivre jusqu'à l'observation clinique suivante sont sacrifiés immédiatement et aussitôt autopsiés. Ceci permet tout particulièrement de diminuer le nombre d'animaux trouvés plusieurs heures après leur mort et sur lesquels les examens nécropsiques et histologiques ne pourraient être conduits dans des conditions satisfaisantes.

### METHODE DE SACRIFICE

#### 1 - Enregistrement de la date :

Dès qu'un animal doit être sacrifié, la date est immédiatement portée :

- sur le registre d'observation clinique.
- sur le registre d'autopsie.
- sur l'étiquette du flacon de prélèvements histologiques.

## 2 - Anesthésie de l'animal à sacrifier :

L'anesthésie d'un animal n'intervient qu'après l'autopsie complète du précédent.

Elle est obtenue par injection intra-péritonéale de KETAMINE (IMALGENE N.D.) à la dose de 15 mg pour 100 g de poids vif.

En pratique, on injecte 0,5 ml d'une solution préparée extemporanément (75 mg de Kétamine dans 2,5 ml de soluté isotonique injectable de Na Cl).

Le stade de l'anesthésie chirurgicale est atteint en 3 à 5 mn.

## 3 - Prélèvement sanguin et exsanguination :

Dès l'anesthésie chirurgicale, l'animal est contenu en décubitus dorsal sur une planche de liège, puis on pratique, aux ciseaux une large laparotomie médiane.

L'artère rénale droite est dégagée et ponctionnée ; dès que le prélèvement sanguin est réalisé on pratique une exsanguination totale par section aux ciseaux fins de la même artère.

L'autopsie débute aussitôt après ; elle est pratiquée sans temps d'arrêt.

## **METHODE DE PRELEVEMENT SANGUIN**

Une seringue à insuline montée d'une aiguille de 0,45 x 13 mm est préalablement pourvue de 0,10 ml d'une solution aqueuse à 10 % d'EDTA.

Un tube sec de 2 ml est identifié au numéro de l'animal à sacrifier.

L'artère rénale droite est ponctionnée, puis on prélève le plus grand volume de sang possible (de 0,2 à 0,9 ml selon la taille des animaux).

Le tube de sang est alors bouché, agité et placé au réfrigérateur.

Lorsque tous les prélèvements sanguins de la journée ont été faits, ils sont dilués un par un avec un liquide isotonique approprié (ISOTON N.D.) de sorte à obtenir dans chaque tube le volume minimum requis par le compteur automatique de cellules (Coulter Counter). Ce volume est de 0,8 ml ; les dilutions vont de 1 à 14 selon les animaux. Pour chaque animal, le volume de sang prélevé et la dilution faite sont notés sur la fiche d'autopsie.

## PROCEDURE D'AUTOPSIE

L'autopsie vise à repérer et reconnaître les éventuelles lésions macroscopiques liées chez le rat à l'absorption de produits fusariens ; elle doit aussi permettre d'effectuer tous les prélèvements d'organes voulus, dans les meilleures conditions pour que leur étude microscopique soit ensuite efficace.

Pour ce faire, l'autopsie doit être immédiate, rapide, sans temps d'arrêt, tout en restant soignée.

Afin de cerner effectivement le panorama lésionnel engendré par les produits fusariens nous pratiquons des autopsies complètes, exception faite temporairement de l'oeil et de ses annexes ainsi que de l'hypophyse.

### TEMPS PREPARATOIRES

La veille du terme (soit le lundi) : le local d'autopsie est préparé, rangé, éventuellement nettoyé ; le matériel d'autopsie est préparé.

Le premier jour de l'expérimentation clinique : les flacons de prélèvements histologiques sont préparés, remplis de formol isotonique à 3 % et étiquetés avec mention :

- de la nature de l'inoculat ;
- de la voie d'administration ;
- de la dose administrée ;
- du n° d'ordre de l'animal et de son lot ;

les fiches d'autopsie sont préparées.

### TEMPS OPERATOIRES

#### 1 - état des animaux autopsiés :

Il est noté sur la fiche d'autopsie (qui reprend les mentions de l'étiquette de prélèvements) et sur cette étiquette :

- . trouvé mort : TM.
- ou
- . sacrifié : S.

#### 2 - date effective d'autopsie :

Dans tous les cas, l'autopsie est précoce : elle suit immédiatement le sacrifice ou la découverte d'un animal mort en cours d'étude.

La date est notée sur la fiche d'autopsie et sur l'étiquette des prélèvements.

### 3 - enregistrement des données d'autopsie :

Les poids d'organes et toutes les modifications morphologiques constatées sont enregistrées au cours de l'autopsie, sur une fiche d'autopsie propre à chaque lot, où sont individualisés les 5 animaux du lot.

### 4 - glossaire des organes à prélever :

- encephale : cerveau et cervelet (+ bulbe rachidien),
- moëlle épinière et vertèbres : 2 niveaux,
- le sternum (moëlle osseuse),
- les deux reins et la vessie,
- le foie,
- la rate et le pancréas,
- les deux portions gastriques,
- l'intestin grêle : les 3 niveaux,
- le colon et le caecum,
- le ganglion mésentérique,
- les ovaires ou les testicules et épидидymes,
- l'utérus et la vagin ou les vésicules séminales et la prostate,
- les poumons et la trachée ; l'oesophage,
- le coeur,
- un muscle fessier,
- un nerf sciatique,
- la langue et une joue,
- les glandes surrénales ; la thyroïde,
- les glandes salivaires,
- l'aorte thoracique,
- le thymus, les gg. retromandibulaires,
- une mamelle et la peau.

### 5 - glossaire des organes à peser :

- foie,
- rate,
- thymus,
- tractus digestif entier (après dégraissage et vidée de l'estomac).

## TECHNIQUE D'AUTOPSIE

L'autopsie nécessite deux opérateurs qui travaillent simultanément.

### 1 - Premier opérateur :

#### 1.1 - examen externe :

Pratiqué durant les opérations de sacrifice.

#### 1.2 - autopsie abdominale :

- examen sous-cutané, des deux côtés de l'abdomen,

du thorax et du cou.

- examen abdominal, organes en place.
- isolement du bloc digestif (estomac, intestins, foie, pancréas, mésentère et rate).
- prélèvement de la surrénale gauche.
- prélèvement du rein gauche.
- prélèvement en bloc de la surrénale et du rein droit.
- pour les femelles : prélèvement en bloc des ovaires, de l'utérus, du vagin et de la vessie.
- pour les mâles : prélèvement des testicules et épидидymes, puis prélèvement en bloc des vésicules séminales, de la prostate et de la vessie.

### 1.3 - ouverture crânienne :

Elle est pratiquée d'arrière en avant, aux ciseaux ; puis le bloc cérébro-cérébelleux et le bulbe sont réclinés et prélevés en bloc.

### 1.4 - autopsie de la tête et du cou :

- prélèvement en bloc de la parotide, de la sous-maxillaire, des ganglions rétromondibulaires et du lobe thyroïdien droits ;
- prélèvement en bloc de la parotide, de la sous-maxillaire et des ganglions rétromondibulaires gauches.
- prélèvement du lobe thyroïdien gauche.
- prélèvement de la langue et d'une joue (si lésion macroscopique).

### 1.5 - autopsie thoracique :

- ouverture transverse du diaphragme le long du bord costal, puis section des côtes d'arrière en avant ; prélèvement du sternum.
- examen thoracique, organes en place.
- prélèvement du thymus, en le réclinant d'arrière en avant, et pesée.
- section du pharynx et réclinaison de la trachée, de l'oesophage et de tout le bloc cardio-pulmonaire.
- prélèvement ensemble de la trachée et de l'oesophage.

### 1.6 - stade final de l'autopsie :

- prélèvement de l'aorte thoracique.
- prélèvement de la dernière vertèbre cervicale et de la première lombaire.
- prélèvement de peau abdominale au niveau d'une mamelle.
- prélèvement d'un muscle fessier.
- prélèvement d'un nerf sciatique.

## 2 - Deuxième opérateur :

### 2.1 - autopsie du bloc digestif :

- prélèvement du pancréas, en région gastrique ;
- séparation du foie, pesée de l'organe et prélèvement du lobe diaphragmatique gauche ;
- prélèvement et pesée de la rate ;
- séparation, ouverture et vidée de l'estomac ;
- déroulement du tube digestif, dégraissage, et prélèvement du ganglion mésentérique ;
- pesée globale de la masse intestinale et de l'estomac ;
- séparation des éléments digestifs et lavage individuel dans du sérum physiologique, avant de les plonger dans le formol :
  - . l'estomac entier ;
  - . le duodénum (portion initiale) ;
  - . l'iléon (portion terminale) ;
  - . le jéjunum (prélèvement de la portion moyenne du grêle) ;
  - . le caecum (prélèvement de la pointe) ;
  - . le colon, en zone moyenne.

### 2.2 - autopsie du bloc cardio-pulmonaire :

- prélèvement du lobe diaphragmatique du poumon gauche ;
- prélèvement du coeur entier.

## 3 - conditions de prélèvement :

Les différents organes sont prélevés comme indiqué ci-dessus ; les organes volumineux sont placés directement dans le flacon de formol isotonique à 3 % tandis que les organes petits (thyroïde, surrénales, glandes salivaires, thymus, ganglions lymphatiques) ou flottants (poumon, trachée) sont préalablement rassemblés dans une cassette plastique Tissue-tek III.

La préparation finale en vue d'histologie intervient lors de la recoupe et tout particulièrement pour :

- le coeur : section longitudinale, perpendiculaire au septum ;
- l'estomac : isolement de la grande courbure intéressant les deux portions gastriques.

Cette technique d'autopsie, et tout particulièrement sa chronologie, sont toujours respectées.

P R O C E D U R E   D E   T R A I T E M E N T   E T  
D E   L E C T U R E   D E S   P R E L E V E M E N T S  
H I S T O L O G I Q U E S

PRELEVEMENTS A L'AUTOPSIE

1 - Nature des prélèvements :

Les organes soumis à prélèvement sont ceux prévus dans le glossaire de la procédure d'autopsie.

2 - Conditions de prélèvement :

Les prélèvements sont tous réalisés au cours de l'autopsie ; au moyen d'un scalpel chirurgical à lame fine jetable et de ciseaux fins, en évitant de les écraser lors des manipulations.

Dans tous les cas, ces prélèvements sont fins : l'une au moins de leurs dimensions n'excède jamais 0,5 cm.

Au fur et à mesure de leur réalisation, les prélèvements d'un même animal sont immergés dans un flacon de 120 ml de formol (solution aqueuse isotonique à 3 % de formaldéhyde).

3 - Etiquetage et fixation :

Le flacon à prélèvement est rempli de formol isotonique et étiqueté au premier jour de la mise en expérimentation des animaux. Il est pourvu d'un bouchon étanche.

L'étiquette porte mention :

- du numéro de l'animal et de son lot.
- de la nature de l'inoculat.
- de la voie d'administration.
- de la dose administrée.
- de la date effective d'autopsie.
- de la mention "trouvé mort" ou "sacrifié".

A l'issue de l'autopsie, les prélèvements sont laissés dans ce flacon durant 7 jours au minimum, sans changement de fixateur.

Passé ce délai, ils sont une nouvelle fois manipulés pour la recoupe :

1/ les prélèvements recoupés sont mis en cassette plastique (Mégacassette Tissue - Tek III - marque AMES) et replongés dans une solution neuve de formol ; les cassettes sont identifiées au crayon gras par le numéro de l'animal d'origine et de son lot.

2/ le reste des prélèvements est replacé, pour archivage, dans le flacon dont on a renouvelé le fixateur.

## GLOSSAIRE DES PRELEVEMENTS A TRAITER

Compte-tenu de nos disponibilités en temps, en matériel et en personnel, il apparaît peu possible de traiter en vue d'histologie tous les prélèvements effectués à l'autopsie.

Cependant, il nous semble important d'effectuer tout de même ces prélèvements et de les archiver, nous réservant ainsi la possibilité d'effectuer ultérieurement des études histologiques rétrospectives complètes.

En conséquence, nous ne traitons en vue d'histologie qu'un nombre limité de prélèvements, dont la liste est dressée arbitrairement en fonction :

- 1/ de l'importance physiologique des organes considérés ;
- 2/ de leur implication fréquente dans un quelconque mécanisme de toxicité ;
- 3/ des lésions microscopiques constatées lors des études préliminaires et des lésions macroscopiques vues lors des autopsies.
- 4/ de nos possibilités de traitement.

Les prélèvements ainsi traités sont les suivants :

- 1 - cerveau
- 2 - cervelet
- 3 - une vertèbre (moelle épinière et moelle osseuse)
- 4 - le rein Droit et la surrénale Droite
- 5 - un lobe hépatique
- 6 - la rate
- 7 - les 2 portions gastriques ; l'oesophage
- 8 - les 3 segments de l'intestin grêle
- 9 - le colon et le caecum ; le ganglion mésentérique
- 10 - un poumon
- 11 - le coeur
- 12 - le thymus.

Ils sont mis en cassette comme suit :

- cassette 1 : cerveau, cervelet, rein, rate, surrénale.
- cassette 2 : coeur, poumon, estomac, vertèbre, foie, gg. mésentérique.
- cassette 3 : 3 segments du grêle, colon, caecum, thymus.

Ainsi pourvues, les cassettes d'un même lot (5 x 3 = 15 cassettes) sont immergées dans un même bain de fixateur (500 ml environ) pendant 48 heures pour complément de fixation. Elles sont alors soumises au traitement de déshydratation-inclusion. (fixateur : solution aqueuse isotonique à 3 % de formaldéhyde).

## TRAITEMENT DE DESHYDRATATION - IMPREGNATION

Ce traitement est réalisé dans un automate, Duplex-SHANDON, programmable.

Les prélèvements subissent une déshydratation par alcools croissants, puis un entraînement de l'alcool par le toluène, avant d'être imprégnés par la paraffine ; le cycle choisi est le suivant :

n° du bain	liquide d' immersion	temps d' immersion
1	formol à 3 %	1 h 00
2	éthanol 75°	1 h 00
3	éthanol 95°	1 h 30
4	éthanol 95°	1 h 00
5	éthanol absolu	30 mn
6	éthanol absolu	1 h 00
7	éthanol absolu	1 h 30
8	toluène	30 mn
9	toluène	1 h 00
10	toluène	1 h 00
11	paraplast 58°C	30 mn
12	paraplast 58°C	jusqu'au matin

A l'issue de ce cycle, les prélèvements restent dans le dernier bain de paraffine, en attente de l'inclusion.

(la paraffine utilisée est du PAPAPLAST-PLUS = paraffine purifiée et DMSO).

## INCLUSION DES PRELEVEMENTS

Après imprégnation, les prélèvements sont inclus en trois blocs, correspondant aux trois cassettes d'imprégnation. Le couvercle de celles-ci sert de socle et permet dans le même temps l'identification du bloc.

Les blocs sont coulés dans des moules HISTO-MOLD à usage unique, posés sur une plaque réfrigérante (plaque de verre surmontant une cuve en polystyrène emplie de glace).

## REALISATION DES COUPES

Les coupes sont réalisées au moyen d'un microtome LEITZ 1512 à rotation ; leur épaisseur est de 4-5  $\mu\text{m}$ .

Elles sont ensuite étalées et collées sur lame porte-objet, à l'eau albumineuse. Les lames sont alors identifiées par gravure à la pointe et mises à sécher sur platine chauffante.

Pour chaque bloc, deux lames sont réalisées d'emblée.

## TRAITEMENT DE COLORATION DES LAMES

Une lame de chaque bloc est colorée par l'hémalum - érythrosine, en vue de la lecture de routine.

Le traitement de coloration est le suivant :

- déparaffinage au toluène ..... 10 mn
- alcool à 95° ..... 1 passage  
  rinçage à l'eau
- blanchissement à l'eau lithinée ..... 10-15 secondes  
  rinçage à l'eau
- coloration à l'hémalum ..... 4-5 mn  
  rinçage à l'eau
- virage à l'eau lithinée  
  rinçage à l'eau
- coloration à l'érythrosine ..... 2 mn  
  rinçage à l'eau
- temps facultatif et } - éthanol absolu ..... 2 bains  
exceptionnel        | - coloration au safran (solution alcoolique) ..... 2 mn
- | - éthanol absolu ..... 4 passages
- | - toluène ..... 5 passages

On aboutit alors à un stade d'arrêt où la lame est recouverte d'une lamelle porte-objet et montée à l'EUKITT (résine synthétique à séchage rapide).

La seconde lame est archivée blanche, en vue d'une éventuelle coloration spéciale.

### LECTURE DES LAMES

Les lames sont lues sans ordre particulier et en toute connaissance des commémoratifs cliniques et nécropsiques.

Les résultats de lecture sont consignés pour chaque lot d'animaux dans une fiche d'histologie ; cette fiche pourra être rapprochée des fiches cliniques et nécropsiques.

--o0o--

P R O C E D U R E    D ' I D E N T I F I C A T I O N  
E T    D E    G E S T I O N    D E    L ' E L E V A G E  
D E    R A T S    R E P R O D U C T E U R S

---

Cet élevage de rats reproducteurs est conçu et géré de sorte à satisfaire aux besoins de l'expérimentation toxicologique. il doit fournir chaque quinzaine (un vendredi sur deux) 60 animaux des deux sexes, aussi homogènes que possible :

- mêmes origines génétiques (même souche ; mêmes origines parentales).
- même âge : 18 jours, sevrés la veille.
- même poids corporel : entre 30 et 40 g.

#### LIEU DE L'ELEVAGE

Cet élevage reproducteur est placé dans l'animalerie du Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire et est totalement séparé de l'animalerie où sont conduites les expérimentations toxicologiques.

#### COMPOSITION DE L'ELEVAGE

Il se compose exclusivement de rats albinos, de souche SPRAGUE-DOWLEY, produits localement à partir d'un lot parental originellement importé d'Australie.

On y distingue :

- les animaux en âge de reproduire et effectivement en activité de reproduction : 10 mâles, et 40 femelles réparties en quatre séries (A,B,C,D.) ;
- les animaux jeunes, des deux sexes, voués au remplacement cyclique des premiers.
- un petit groupe de mâles et de femelles en âge de reproduire et destinés à des remplacements éventuels.

#### MAINTENANCE DES ANIMAUX

1 - maintenance des mâles :

Ils sont maintenus dans des cages individuelles en grillage

(L = 40 cm ; l = 40 cm ; H = 30 cm) et nourris à volonté avec l'aliment complet pour chiens de marque TAYO(cf. procédure de toxicologie clinique).

Sur chaque cage est apposée une étiquette portant mention :

- du numéro d'identification du mâle ;
- de sa date de naissance ;
- de sa date de réforme prévue.

les cages des mâles servent de cages d'accouplement ; elles sont posées sur une étagère à clair voie et jamais déplacées.

## 2 - maintenance des femelles :

Elles sont maintenues dans des cages individuelles en PVC surmontées d'une grille en inox faisant mangeoire (L = 30 cm ; l = 25 cm ; H = 15 cm) et tapissées de copeaux de bois renouvelés régulièrement.

Ces cages sont placées sur un portoir à quatre étages (un étage pour chaque série de femelles).

Chaque cage porte une étiquette faisant mention :

- du numéro d'identification de la femelle et de son numéro de série.
- de sa date de naissance.
- de sa date de réforme prévue.

Les femelles sont nourries avec l'aliment complet TAYO, donné à volonté.

## 3 - maintenance des animaux de remplacement :

Ils sont maintenus dans des cages identiques à celles des femelles, où ils sont regroupés en lots de même âge et de même sexe, après identification.

Ces mentions sont portées sur l'étiquette de la cage.

L'aliment est également l'aliment complet TAYO, donné à volonté.

## **CONDUITE DES ACCOUPLEMENTS**

### 1 - périodicité des accouplements :

Un accouplement est pratiqué chaque 15 jours entre les 10 mâles et une série de 10 femelles.

A ce moment, la série de femelles précédente (donc accouplée 15 jours plus tôt) est en gestation tandis que la suivante est au repos suite au sevrage ; la quatrième série de femelles est alors en lactation.

Les quatre séries de femelles connaissent ainsi une rotation continue (accouplement - gestation de 3 semaines - lactation de 18 jours - repos) qui s'étale sur 8 semaines.

## 2 - modalité de l'accouplement :

Les 10 femelles d'une même série sont accouplées avec les 10 mâles dans les cages de ces derniers.

Les couples sont ainsi maintenus durant 5 jours, les femelles réintégrant leurs cages d'origine à la fin du cinquième jour.

## 3 - rotation entre femelles :

A la rotation entre séries qui s'étale sur 8 semaines s'ajoute une rotation entre femelles au sein de chaque série : entre deux mises à la reproduction successives d'une même série, on pratique en effet un décalage d'un rang, de sorte qu'une même femelle (ou sa descendante) ne peut rencontrer un même mâle (ou son descendant) qu'au 11ème accouplement.

## **MISES-BAS ; LACTATION ET SEVRAGE**

En conduisant ainsi les accouplements, nous constatons que les mises-bas d'une même série s'étalent sur deux jours et assez rarement sur trois jours.

les portées sont alors maintenues avec leurs mères, puis sevrées à 18 + ou - 1 jours. Les animaux voués à l'expérimentation reçoivent donc la première administration de produits à 20 + ou - 1 jours.

Dès la mise-bas, toutes les portées sont réduites à 6 petits de manière à limiter les écarts d'allaitement.

## **REFORMES ET REMPLACEMENTS**

### 1 - réforme et remplacement programmés des mâles :

Les mâles entrent en reproduction à 17 semaines et sont normalement utilisés pendant 10 accouplements (soit 20 semaines). Ils sont alors remplacés par un de leurs fils issu de leur premier accouplement.

En pratique, le sexage étant fait à 15 jours, nous préférons garder deux descendants :

- pour palier à une éventuelle erreur de sexage ;
- pour assurer effectivement le renouvellement même dans le cas où un descendant serait défaillant (mort, non fertilité...).

#### 2 - réforme et remplacement programmés des femelles :

Les femelles entrent en reproduction à 21 semaines et sont normalement utilisées pendant 4 portées. Il convient donc de conserver l'une de leurs filles issues de leur deuxième mise-bas.

En pratique deux descendantes sont conservées.

#### 3 - réformes accidentelles :

Il peut arriver qu'un animal reproducteur doive être réformé prématurément ; c'est le cas de quelques femelles, pour infertilité, infécondité ou agalaxie. Les réformes prématurées sont exceptionnelles chez les mâles.

Dans un tel cas, le remplaçant est choisi au hasard dans un petit lot de mâles et de femelles en âge de reproduire, entretenu et renouvelé régulièrement en marge du cheptel reproducteur proprement dit. On perturbe alors le brassage génétique homogène que nous entretenons dans notre élevage, mais cette solution permet à faible coût de ne jamais manquer d'animaux d'expérience.

#### 4 - brassage génétique :

Le schéma d'accouplement présenté correspond en fait à un croisement alternatif à 10 étages entre animaux consanguins. La stabilité génétique de la population est donc assurée.

Les mâles reproduisent toutes les 2 semaines et sont réformés à la vingtième ; les femelles reproduisent toutes les 8 semaines et sont réformées à la vingt quatrième ; un accouplement entre un mâle et une femelle issus d'un même couple-parent est donc impossible avant plusieurs générations. De ce fait aussi, la consanguinité ne peut pas être notablement augmentée.

### **IDENTIFICATION DES ANIMAUX**

#### 1 - identification des mâles reproducteurs :

Les 10 mâles reproducteurs sont identifiés par percée de

l'oreille GAUCHE selon le code suivant :

0	:	0	:	0	:	0	:	:
1	:	0	:	0	:	1	:	:
2	:	0	:	1	:	0	:	:
3	:	0	:	1	:	1	:	:
4	:	1	:	0	:	0	:	:
5	:	1	:	0	:	1	:	:
6	:	1	:	1	:	0	:	:
7	:	1	:	1	:	1	:	:
8	:	2	:	0	:	0	:	:
9	:	2	:	0	:	1	:	:
	:	:	:	:	:	:	:	:

0 = rien  
1 = un trou  
2 = une encoche

latéral      central      médial

Ce numéro d'ordre est rappelé sur l'étiquette de la cage.

### 2 - identification des femelles reproductrices :

Dans chaque série, les femelles reproductrices sont numérotées de 0 à 9 et identifiées à l'oreille GAUCHE selon le même code.

Le numéro de série est porté à l'oreille DROITE selon le code suivant :

série A	:	aucun trou
série B	:	1 trou
série C	:	2 trous
série D	:	3 trous

Les numéros de série et d'ordre dans la série sont rappelés sur l'étiquette de chaque cage.

### 3 - identification des jeunes de remplacement :

Les jeunes de remplacement sont identifiés par percée des oreilles dès qu'ils ont été choisis :

- les 2 mâles de remplacement sont identifiés par le même numéro que celui de leur père (oreille GAUCHE).

- les 2 femelles de remplacement prennent de même le numéro d'ordre et le numéro de série de leur mère.

#### 4 - identification des jeunes destinés à l'expérimentation :

Les jeunes animaux ne sont pas identifiés dans l'animalerie de reproduction. Ils sont rassemblés en un groupe de mâles et un de femelles lors du sexage.

C'est dans ces deux groupes que sont choisis les animaux d'expérience, après avoir éliminé les extrêmes de poids corporel.

L'identification des animaux d'expérience intervient après leur mise en lots de 5, par percée des oreilles :

n° 1	:	un trou	)	
n° 2	:	deux trous	(	à l'oreille
n° 3	:	trois trous	)	DROITE
n° 4	:	quatre trous	(	
n° 5	:	aucun trou	)	

#### PLANNING DE GESTION DE L'ELEVAGE REPRODUCTEUR

La gestion de l'animalerie telle que décrite ci-dessus satisfait à un planning pré-établi chaque année. Y sont notamment programmés tous les évènements tels que :

- accouplements.
- réformes et remplacements des mâles.
- réformes et remplacements des femelles.

Sur les mêmes registres sont notés, au moment de leur survenue, tous les évènements non programmés :

- nombres de petits pour chaque portée.
- dates effectives des mises-bas.
- dates effectives des sevrages.
- réformes accidentelles avec leurs causes.
- remplacements suite à ces réformes avec les caractéristiques du nouveau reproducteur.

## CONCLUSION

La mise au point des épreuves biologiques permettant d'identifier les souches toxigènes dans la population d'isolats du Fusarium moniliforme a été laborieuse. Les difficultés expérimentales à surmonter étaient en effet multiples. Le choix des souches, de leurs substrats de culture, des espèces animales, du mode d'administration des substances toxiques, constituaient autant de problèmes qui sont aujourd'hui en grande partie résolus. Nous disposons désormais d'une épreuve biologique fiable, donnant des résultats reproductibles, et de deux autres techniques prometteuses dont la mise au point est en voie d'achèvement.

Beaucoup cependant reste à faire.

Il faut notamment chercher à savoir pourquoi l'épreuve biologique considérée comme la mieux adaptée par l'équipe sud africaine, à savoir l'administration per os à des canetons de Pékin, ne produit pas, dans nos essais, les résultats escomptés.

Il faut aussi établir que les toxines qui tuent les rats de vingt jours, sont bien celles qui sont par ailleurs impliquées dans la LEM.

Il convient également d'envisager une expérimentation visant à étudier la toxicité chronique, alors que nous nous sommes surtout attachés à mettre en évidence les cas de toxicité aigue.

Il convient enfin, et d'une façon prioritaire, d'engager les études chimiques d'identification des toxines.

Ces différentes opérations sont en cours et seront développées dans le prochain rapport.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ANDEREGG (J.), GUTHRIE (J.W.). - Seedborne Fusarium moniliforme and seedling infection in hybrid sweet corn. *Phytopathology*. 1981, 71 : 1196-1198.
- 2 - BADIALI (L.), ABOU-YOUSSEF (M.H.), RADWAN (A.I.), HAMDY (F.M.), HILDEBRANDT (P.K.). - Moldy corn poisoning as the major cause of an encephalomalacia syndrome in egyptian equidae. *Am. J. Vet. Res.*, 29 (10) : 2029-2035.
- 3 - BEASLEY (V.R.), BUCK (W.B.), VESONDER (R.F.), ELLIS (J.J.). - Feed refusal in cattle associated with Fusarium moniliforme in corn. *The veterinary Record*. 1982, 111-394.
- 4 - BIESTER (H.E.), SCHWARTE (L.H.). - Moldy corn poisoning (Leucoencephalomalacia) in horses with history of previous attack as well as recovery from virus Encephalomyelitis. *The North American Veterinarian*. 1938, 20, 17-19.
- 5 - BOLKAN (H.A.), DIANESE (J.C.), CUPERTINO (F.P.). - Survival and colonization potential of Fusarium moniliforme var. subglutinans in soil. *Phytopathology*. 1979, 69 (12) : 1298-1301.
- 6 - BUGNICOURT (F.). - Sur une maladie du maïs. Publication de l'Institut Français d'Océanie, O.R.S.T.O.M. 1958,
- 7 - COLE (R.J.), KIRSKY (J.W.), CUTLER (H.G.), DOUPNIK (B.L.), PECKHAM (J.C.). Toxin from Fusarium moniliforme : Effects on plants and animals. *Science*. 1973, 179 : 1324-1326.
- 8 - DANIELS (B.A.). - Elimination of Fusarium moniliforme from corn seed. *Plant Disease*. 1983, 67 (6) : 609-611.
- 9 - DODD (J.L.). - Grain sink size and predisposition of Zea mays to stalk rot. *Phytopathology*. 1979, 70 (6) : 534-535.
- 10 - DOMENECH (J.), BREGEAT (D.), BOCCAS (B.). - Les mycotoxicooses en pathologie animale : Intérêt de leur étude en Nouvelle-Calédonie. *Rev. Elev. Med. Vet. Nouv. Calédonie*. 1982 (1) : 11-18.
- 11 - FOLEY (D.C.). - Systemic infection of corn by Fusarium moniliforme. *Phytopathology*. 1962, 52 : 870-872.
- 12 - GELDERBLOM (W.C.A.), THIEL (P.G.), VAN DER MERWE (K.J.), MARASAS (W.F.O.), SPIES (H.S.C.). - A mutagen produced by Fusarium moniliforme. *Toxicon*. 1983, 21 (4) : 467-473.

- 13 - IWANOFF (X), YUAN CHANG-kuo, FANG SHIH-chich. - Uber die toxische Enzephalomalazie (Moldy corn poisoning) der Einhufer in China. Archiv fur experimentelle Veterinarmendizin. 1975, 11 : 1035-1056.
- 14 - JOFFE (A.Z.), PALTI (J.), ARBEL-SHERMAN (R.). - Fusarium moniliforme Sheld. in Israel (Gibberella fujikuroi (Saw.) Wollenv.). Mycopathologia et Mycologia applicata. 1973, 50 (2) : 85-107.
- 15 - KING (S.B.), SCOTT (G.F.). - Genotypic differences in maize to kernel infection by Fusarium moniliforme. Phytopathology. 1981, 71 (12) : 1245-1247.
- 16 - KOEHLER (B.). - Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. Journal of Agricultural Research. 1942, 64 (8) : 421-442.
- 17 - KRIEK (N.P.J.), MARASAS (W.F.O.), STEYN (P.S.), VAN RENSBURG (S.J.) STEYN (M.). - Toxicity of a moniliformin-producing strain of Fusarium moniliforme var. subglutinans isolated from maize. Toxicol. 15 : 579-587.
- 18 - KRIEK (N.P.J.), MARASAS (W.F.O.), KELLERMAN (T.S.). - Aspects of equine leukoencephalomalacia. Journal of the South African Veterinary Association. 1981.
- 19 - KRIEK (N.P.J.), KELLERMAN (T.S.), MARASAS (W.F.O.). - A comparative study of the toxicity of Fusarium verticillioides (= F. moniliforme) to horses, primates, pigs, sheep and rats. Onderstepoort J. vet. Res. 1981, 48 : 129-131.
- 20 - KRIEK (N.P.J.), MARASAS (W.F.O.), THIEL (P.G.). - Hepato and cardiotoxicity of Fusarium verticillioides (= F. moniliforme) isolates from southern African maize. Toxicol. 1981, 19 : 447-456.
- 21 - LAFONT (J.), LAFONT (P.), GAILLARDIN (M.). - Sensibilité de l'embryon de poulet à des mycotoxines. Bull. Acad. Vét. de France. 1979, 52 : 119-124.
- 22 - LAWRENCE (E.B.), NELSON (P.E.), AYERS (J.E.). - Histopathology of sweet corn seed and plants infected with Fusarium moniliforme and F. oxysporum. Phytopathology. 1981, 71 (4) : 379-385.
- 23 - LUNSFORD (J.M.), FUTRELL (M.C.), SCOTT (G.E.). - Maternal influence on response of corn to Fusarium moniliforme. Phytopathology. 1974, 65 : 223-225.

- 24 - MARASAS (W.F.O.), KRIEK (N.P.J.), WIGGINS (V.M.), STEYN (P.S.), TOWERS (D.K.), HASTIE (T.J.). - Incidence, geographic distribution, and toxigenicity of Fusarium species in south african corn. *Phytopathology*. 1979, 69 (11) : 1181-1185. ---
- 25 - MARASAS (W.F.O.), WEHNER (F.C.), VAN RENSBURG (S.J.), SCHALKWYK (D.J.). - Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, Southern Africa. *Phytopathology*. 1981, 71 (8) : 792-796.
- 26 - MARASAS (W.F.O.), KRIEK (N.P.J.), FINCHAM (J.E.), VAN RENSBURG (S.J.). - Primary liver cancer and oesophageal basal cell hyperplasia in rats caused by Fusarium moniliforme. *Int. J. Cancer*. 1984, 34 : 383-387.
- 27 - MARASAS (W.F.O.), NELSON (P.E.), TOUSSON (T.A.). - Toxinogenic Fusarium species. 1984, The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
- 28 - MESSIAEN (C.M.), BEYRIES (A.). - Etude des facteurs favorisant la pourriture des tiges chez le maïs en conditions chaudes et sèches. *Agronomie*. 1981, 1 (5) 409-411.
- 29 - MILLER (J.K.), HACKING (A.), HARRISON (J.), GROSS (V.J.). - Stillbirths, neonatal mortality and small litters in pigs associated with the ingestion of Fusarium toxin by pregnant sows. *Vet. Rec.* 1973, 93 : 555-559.
- 30 - MIROCHA (C.J.), CHRISTENSEN (C.M.), NELSON (G.H.). - Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. *Biotechnology and bioengineering*. 1968, X : 469-482.
- 31 - NELSON (P.E.), TOUSSON (T.A.), COOK (R.J.). - Fusarium. Diseases, Biology and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press University Park and London, 1981.
- 32 - NYACK (B.), PADMORE (C.L.). - Suspected equine leukoencephalomalacia. *Equine Practice*. 1983, 5 (2) : 33-36
- 33 - PAYEN (J.), LAFONT (P.), PARACHE (R.M.), BOLLER (F.). - Détection des souches toxiques de Fusarium. *Collection de médecine légale et de toxicologie médicale Masson n° 107* : 111-117.
- 34 - RAJU (C.A.), LAL (S.). - Efficacy of fungicides in controlling seed-borne infection of Cephalosporium acremonium and Fusarium moniliforme in maize. *Indian phytopathology*. 1977, 30 : 17-20.
- 35 - SIDHU (G.S.). - Sexual and parasexual variability in soil fungi with special reference to Fusarium moniliforme. *The American Phytopathology Society*. 1983, 73 (6) : 952-955.

36 - SUTTON (J.C.). - Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by Fusarium graminearum. Canadian journal of plant pathology. 1982, 4 : 195-209.

37 - TRIMBOLI (D.S.), BURGESS (L.W.). - Reproduction of Fusarium moniliforme basal stalk rot and root rot of grain sorghum in the greenhouse. Plant disease. 1983, 67 (8) : 891-894.

38 - VAN RENSBURG (S.J.), PURCHASE (I.F.H.), ROSE (E.F.), ROACH (W.A.). - Structural alterations in the rat oesophagus epithelium after ingestion of the transkei diet. S.A. Medical journal. 1974, 48 : 2361-2362.