

MEMOIRES DE STAGE

PHYTOPATHOLOGIE

1988

CENTRE NATIONAL D'ETUDES AGRONOMIQUES DES REGIONS CHAUDES
ECOLE SUPERIEURE D'AGRONOMIE TROPICALE DE MONTPELLIER

DIPLOME D'AGRONOMIE TROPICALE
FILIERE : PROTECTION DES CULTURES

Etudes physiologiques de *Fusarium moniliforme*
en Nouvelle Calédonie

Présenté par
Etienne BENET
le 17 octobre 1988

Année universitaire 1987 - 1988

Stage effectué au Centre ORSTOM de Nouméa
Laboratoire de phytopathologie
Maître de Stage F. PELLEGRIN

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

ORSTOM

Centre de Nouméa

MEMOIRES DE STAGE

PHYTOPATHOLOGIE

1988

CENTRE NATIONAL D'ETUDES AGRONOMIQUES DES REGIONS CHAUDES
ECOLE SUPERIEURE D'AGRONOMIE TROPICALE DE MONTPELLIER

DIPLOME D'AGRONOMIE TROPICALE
FILIERE : PROTECTION DES CULTURES

Etudes physiologiques de *Fusarium moniliforme*
en Nouvelle Calédonie

Présenté par
Etienne BENET
le 17 octobre 1988

Année universitaire 1987 - 1988

Stage effectué au Centre ORSTOM de Nouméa
Laboratoire de phytopathologie
Maître de Stage F. PELLEGRIN

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

The logo for ORSTOM, consisting of the word "ORSTOM" in a stylized, bold, black font where the letters are interconnected.

CENTRE DE NOUMEA

TITRE DU MEMOIRE : ETUDES PHYSIOLOGIQUES DE *FUSARIUM*
MONILIFORME EN NOUVELLE - CALEDONIE.

PHYSIOLOGICAL STUDIES OF *FUSARIUM*
MONILIFORME IN NEW - CALEDONIA.

AUTEUR : Etienne BENET.

ENSEIGNANT DU CNEARC RESPONSABLE : Claude BOISSON,
Maître de Conférences en Protection des Cultures.

ETABLISSEMENT OU S'EST DEROULE LE STAGE :

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR
LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION (ORSTOM)

Laboratoire de Phytopathologie
B.P A 5 Nouméa cédex. NOUVELLE - CALEDONIE
Téléphone : 26 - 10 - 00

MAITRE DE STAGE : Frédéric PELLEGRIN.

RESUME :

Fusarium moniliforme (*Gibberella fujikuroi*) est un champignon pathogène qui sévit sur les productions céréalières et plus particulièrement sur le maïs, dans toutes les régions du monde.

En Nouvelle - Calédonie, ce champignon est peu dommageable sur les récoltes maïs, étant très toxicogène, il présente un danger pour la santé animale (Leucoencéphalomalacie équine...) et peut - être humaine.

La mise en évidence de deux formes physiologiques, l'une fortement toxicogène alors que l'autre semble ne pas l'être, nous a amené à étudier ces deux formes, à essayer de définir des conditions de culture permettant d'optimiser la production de toxines, ainsi qu'à aborder l'étude du déterminisme génétique de la toxicité.

MOTS CLES : *Fusarium moniliforme*, maïs, toxicogénie, formes physiologiques.

REMERCIEMENTS

Le programme *Fusarium* étant un travail d'équipe, je remercie le laboratoire de Phytopathologie de l'ORSTOM - Nouméa pour son accueil, et je tiens à exprimer à tous ses membres ma sincère reconnaissance pour m'avoir permis de suivre ce stage enrichissant et pour m'avoir dispensé de précieux conseils.

SOMMAIRE.

INTRODUCTION

I - ETAT D'AVANCEMENT DU PROGRAMME *FUSARIUM*.

1) Epidémiologie.

- A - Identification des différentes espèces de *Fusarium*. 3
- B - Contamination du maïs en Nouvelle - Calédonie. 3
- C - Infection du maïs par *Fusarium moniliforme*. 4
- D - Méthodes de lutte. 6

2) Toxicogénie.

- A - Recherche de l'extrait toxique. 6
- B - Recherche d'un test biologique. 7
 - a - Intérêt.
 - b - Différents essais.
 - c - Test par sondage oesophagien (gavage).
 - c₁ - matériel et méthodes.
 - c₂ - observation des symptômes (souche 81).
 - c₃ - résultats.

- C - Formes physiologiques de *Fusarium moniliforme*. 8

3) Intégration du stage dans ce programme. 9

II - ETUDES DES CONDITIONS DE CULTURE DE LA FORME MACROCONIDIALE.

11

1) But.

2) <u>Matériel et méthodes.</u>	12
A - <u>Expérimentation en Erlenmeyers.</u>	13
a - <u>Manipulations.</u>	
b - <u>Résultats - Interprétation.</u>	
B - <u>Expérimentation en fioles de Roux.</u>	14
a - <u>Intérêt.</u>	
b - <u>Manipulations.</u>	
c - <u>Résultats - Interprétation.</u>	
C - <u>Expérimentation en boîtes de Pétri.</u>	15
a - <u>Expérience préliminaire.</u>	
a ₁ - manipulations.	
a ₂ - résultats.	
b - <u>Expérience complémentaire.</u>	
b ₁ - manipulations.	
b _{1.1} - préparation du maïs.	
b _{1.2} - incubation.	
b ₂ - résultats - interprétation.	
3) <u>Conclusion.</u>	18
III - <u>ETUDE DES FORMES PHYSIOLOGIQUES DE F. MONILIFORME</u> <u>ET DU DETERMINISME DE LA TOXICITE.</u>	20
1) <u>But.</u>	
2) <u>Clônages.</u>	
A - <u>Méthodologie.</u>	21
B - <u>Résultats pratiques.</u>	22
3) <u>Recherche et étude de marqueurs.</u>	23

A - <u>Electrofocalisation.</u>	23
a - <u>Principe.</u>	
b - <u>Intérêt.</u>	
c - <u>Manipulations.</u>	
c ₁ - matériel biologique.	
c ₂ - préparation de la solution de protéines.	
c ₃ - migration.	
c ₄ - fixation - coloration - conservation.	
d - <u>Résultats - Interprétation.</u>	
B - <u>Test de dérive macroconidiale.</u>	26
a - <u>Principe.</u>	
b - <u>Réalisation pratique.</u>	
c - <u>Résultats.</u>	
C - <u>Formation de microsclérotés.</u>	30
D - <u>Vitesse de croissance.</u>	30
a - <u>Principe.</u>	
b - <u>Résultats - Interprétation.</u>	
E - <u>Analyse chimique des extraits.</u>	31
a - <u>Principe.</u>	35
b - <u>Extraction.</u>	
c - <u>Fractionnement.</u>	
d - <u>Perspectives.</u>	
F - <u>Pathologie différentielle.</u>	36
a - <u>Maïs.</u>	37

- a₁ - matériel et méthodes.
 - a_{1.1} - matériel végétal.
 - a_{1.2} - plantation en serre.
 - a_{1.3} - inoculation.
 - a_{1.4} - notation des résultats.
- a₂ - premiers résultats - commentaires.
- a₃ - expérience complémentaire sur maïs.
- a₄ - résultats - interprétation.

b - Melon - Tomate. 41

- b₁ - matériel et méthodes.
- b₂ - résultats - interprétation.

4) Conclusion. 41

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ETUDES PHYSIOLOGIQUES DE *FUSARIUM MONILIFORME* EN NOUVELLE-CALEDONIE

INTRODUCTION.

La première relation de la fusariose du maïs en Nouvelle-Calédonie est due à Bugnicourt, en 1958 (7). Dès cette époque, *F. moniliforme* et *F. graminearum* avaient été identifiés dans plusieurs secteurs du Territoire, en particulier dans la région de Bourail, où l'on observait régulièrement des attaques sur épis.

Dans la mycoflore associée au maïs (*Zea mays*), le genre *Fusarium* est représenté par de nombreuses espèces, en majorité saprophytes ou faiblement pathogènes. Trois d'entre elles sont cependant des parasites majeurs du maïs : *F. graminearum*, *F. moniliforme* et *F. 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 (44).

En Afrique, et plus généralement dans les régions tropicales, *F. moniliforme* 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.

Les attaques de *Fusarium* sur le maïs se traduisent par divers symptômes : fonte de semis, pourriture des tiges, des épis, infection latente ou active du grain (44). Les fontes de semis sont toujours liées à des conditions climatiques anormales (1), comme un excès d'humidité du sol accompagné de températures basses; elles représentent un phénomène exceptionnel en Nouvelle-Calédonie.

De même, la pourriture de la tige (stalkrot) est très rare sur le Territoire, alors qu'elle est responsable de dommages importants sur le maïs dans les régions humides des Etats-Unis et d'Australie (14). La pourriture du pied se manifeste souvent au moment de la floraison mâle, la base de la tige montrant une coloration brunâtre marquée au niveau des premiers noeuds, les tissus internes étant bruns et desséchés, on observe alors fréquemment une "verse parasitaire".

La pourriture des épis constitue un autre faciès classique de la fusariose, occasionnant des dégâts importants. Les *Fusarium* pathogènes peuvent en effet se développer dans le rachis et le pédoncule de l'épi, ainsi que dans les grains.

Le parasite détermine également des nécroses sur tous les organes aériens de la plante, les 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 prolifération du champignon et une efficace propagation de la maladie.

Quand une attaque faible permet la récolte du grain, celui-ci est entièrement colonisé par le champignon présent entre le péricarpe et l'endosperme, sous forme latente. Ce grain peut alors être pollué par des mycotoxines fusariennes, le genre *Fusarium* étant un des principaux producteurs de mycotoxines : 24 de ses espèces sont toxicogènes (12, 36), trente mycotoxines différentes ayant été identifiées à ce jour (19, 22, 30, 36, 43, 57), la plupart de la famille des trichothécènes, puissamment zootoxiques, en particulier envers les mammifères. La responsabilité des espèces de *Fusarium* associées au maïs est reconnue dans bon nombre de maladies animales voire humaines (3, 29, 31, 42).

En 1981, une épizootie a éclaté à Nouméa, sur une quarantaine de chevaux, entraînant la mort de cinq d'entre eux (15). Les premières investigations montrèrent que ces animaux avaient été intoxiqués par du maïs 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 que le cheval était mort de leucoencéphalomalacie (LEM) toxique, après avoir ingéré du maïs fortement infesté par ce même *Fusarium moniliforme*.

La LEM toxique équine est la seule maladie dont l'origine soit liée de façon certaine à l'ingestion d'aliments contaminés par *F. moniliforme* (2, 21, 23, 25, 36, 44, 47). Cette maladie neurotoxique des équidés se caractérise par des lésions nécrotiques et liquéfactives de la substance blanche des hémisphères cérébraux (40). Elle est connue depuis 1850 dans les états producteurs de maïs des U.S.A., où elle a provoqué la mort de milliers de chevaux au début du siècle, puis dans les années 30 (5). Récemment encore, en 1978-79, elle a été la cause du décès de plusieurs centaines de chevaux dans les états du Middlewest, et du Sud-Ouest des Etats-Unis (3, 37). La maladie a été également observée en Argentine, en

Chine, en Egypte et en Afrique du Sud (40).

L'étiopathologie de la LEM demeure mal connue, et l'on ignore totalement quelle est la toxine impliquée dans cette maladie.

I - ETAT D'AVANCEMENT DU PROGRAMME *FUSARIUM*.

Le laboratoire de phytopathologie de l'ORSTOM Nouméa a commencé son étude de la fusariose du maïs en Nouvelle-Calédonie en 1982. Les travaux ont concerné l'étiologie et l'épidémiologie de la maladie, mais également la toxicogénie de *Fusarium moniliforme* (15, 16, 17, 26, 32, 33, 34, 49, 50, 51).

1) Epidémiologie.

A - Identification des différentes espèces de *Fusarium*.

L'épidémiologie a tout d'abord permis l'identification des espèces de *Fusarium*, pathogènes dans les conditions climatiques du Territoire, d'après le système de détermination récemment mis au point par Nelson, Toussoun et Marasas (45) :

- *Fusarium moniliforme* Sheldon : il appartient à la section *Liseola*, qui est caractérisée par une absence de chlamydo-spores, et par une production de microconidies en chainettes, sur des conidiophores à monophialides (principale différence avec *F. subglutinans*). Sur le milieu de référence PDA (Potato Dextrose Agar), cette espèce développe un thalle blanc qui, après quelques jours de croissance à 25° C, prend parfois une teinte violette à lie de vin. La coloration rose-saumon, observée dans certaines cultures, indique la présence de sporodochies à macroconidies. On observe fréquemment une production de microsclérotés de coloration bleue-noire. La forme sexuée de *F. moniliforme* est un Ascomycète : *Gibberella fujikuroi*.

- *Fusarium graminearum* Schwabe. Cette espèce appartient à la section *Discolor* ; sur milieu PDA, 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. L'espèce ne produit pas de microconidies, les macroconidies sont formées en abondance, et les chlamydo-spores apparaissent tardivement. La forme sexuée de *F. graminearum* est *Gibberella zeae*.

B - Contamination du maïs en Nouvelle - Calédonie

Le taux de contamination du grain produit en Nouvelle-Calédonie a également été étudié : des échantillons de différentes régions productrices (carte) ont été analysés (mise en incubation en chambre humide et identification du champignon) et dans quasiment tous les cas, on a mis en cause *Fusarium moniliforme*, ce qui a conduit l'équipe à ne plus s'intéresser qu'à cette espèce.

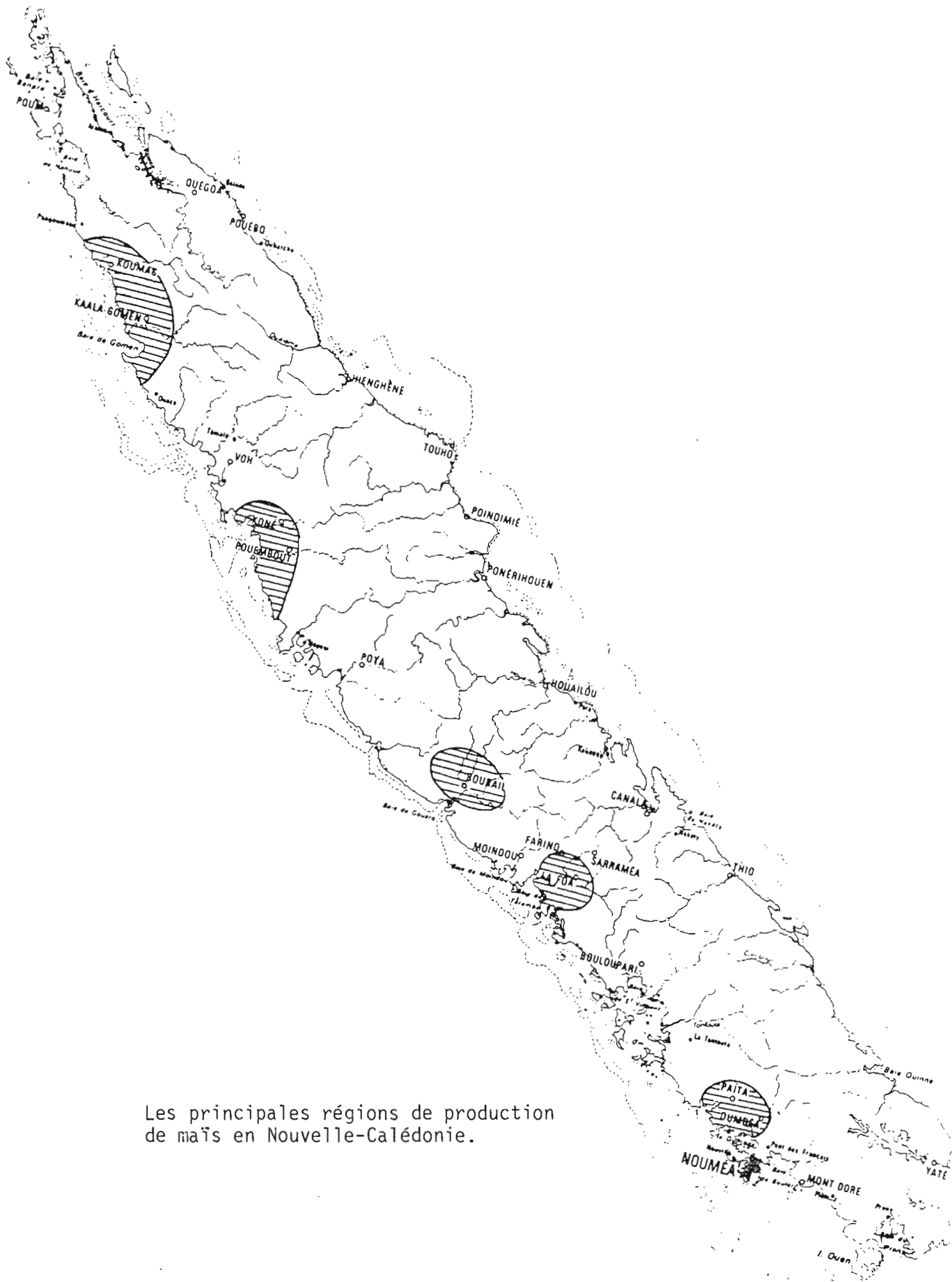
Le maïs produit en Calédonie est presque toujours contaminé par *F. moniliforme*, et les taux d'infection sont souvent très élevés, particulièrement pour les échantillons récoltés en saison humide. La plupart du temps, la contamination est discrète et aucun indice extérieur ne permet de distinguer les grains porteurs du champignon de ceux qui ne le sont pas. Seules la réhydratation du grain et son incubation en chambre humide permettent de révéler la présence de *Fusarium*, parmi les espèces de la mycoflore naturelle du maïs. Cette constatation a conduit l'équipe à s'interroger sur l'origine de l'infection du grain.

C - Infection du maïs par *F. moniliforme*

La première voie d'infection possible est externe : les spores du champignon transportées par divers vecteurs (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. Pour certains auteurs, la voie externe d'infection la plus fréquemment utilisée par *F. moniliforme* passerait par les soies au moment de l'épiaison (25).

La seconde voie d'infection pouvant être empruntée par le *Fusarium* est interne (18). Progressant vers le sommet du plant, le champignon parvient jusqu'au rachis de l'épi et s'installe dans les grains où il demeure en état de latence. Cette infection systémique peut être d'origine endogène ou exogène. Endogène si les semences sont contaminées avant leur plantation (1, 13), exogène si les souches de *Fusarium* vivant dans le sol pénètrent dans les racines de la plantule après germination de la graine (6). Les méthodes de lutte à envisager ne seront pas les mêmes dans les deux cas (46).

Après des études en champ et en serre, avec une partie histologique faisant intervenir un marquage radioactif, on a pu confirmer l'hypothèse de l'infection systémique préférentielle, sans pouvoir donner plus d'importance à l'infection endogène ou à l'infection exogène, les deux aboutissant au même résultat, c'est à dire à la contamination



Les principales régions de production de maïs en Nouvelle-Calédonie.

finale du grain.

En zone tropicale, le taux d'humidité des grains à la récolte est rarement inférieur à 16-20 % : il est évident que ces conditions ne peuvent que favoriser le développement du champignon sur les récoltes stockées en silo et, en conséquence, la production de toxines.

D - Méthodes de lutte.

Différentes méthodes de prévention sont envisageables (53, 39) comme le séchage des récoltes à des taux d'humidité inférieurs à 14 %, qui inhibent le développement du champignon, ou bien le stockage en silo sous atmosphère inerte ou contrôlée. Mais ces méthodes sont onéreuses et les recherches doivent plutôt s'orienter vers la sélection et la promotion de variétés résistantes ou tolérantes, empêchant la contamination des grains avant la récolte.

Diverses variétés de maïs et quelques hybrides ont été testés à ce propos, et deux variétés sont prometteuses car elles ont donné des taux de contamination nuls pendant le cycle cultural de saison fraîche de longue durée. Il est peu probable que des variétés résistantes pour ce cycle long (5,5 mois) ne le soient pas pour un cycle court de saison chaude (3,5 mois). Les recherches se poursuivent pour confirmer ces résultats.

2) Toxicogénie.

Les travaux ont été menés avec deux objectifs prioritaires: l'identification de la toxine et la recherche d'un test biologique.

A - Recherche de l'extrait toxique

La première étape a permis de démontrer que la toxine responsable de la LEM était hydrosoluble, puis différents procédés de partitions chimiques ou physiques ont été essayés (4, 8, 52, 54, 55, 56) pour isoler cette toxine: solubilisation, extraction, précipitation par différents solvants, adsorption, dialyse, ultrafiltration.

Il a été retenu un schéma de purification aboutissant à la séparation de deux toxines ou complexes toxiques, l'un de poids moléculaire supérieur à 3500, l'autre de poids moléculaire inférieur à 1000, agissant probablement en synergie. Ces observations vont dans le sens de la double

action des toxines de *F. moniliforme* chez le cheval : l'action hépatique et rénale, et celle, plus précise, de la LEM (observations histologiques après intoxication d'un cheval).

B - Recherche d'un test biologique

a - Intérêt

Pour des raisons évidentes, il n'était pas possible d'aborder l'étude expérimentale de la toxicogénie de *F. moniliforme* sur l'animal qui a révélé l'existence du problème de mycotoxines alimentaires en Nouvelle-Calédonie, c'est à dire le cheval. Les premières investigations ont donc été orientées vers la mise au point de tests biologiques, permettant de mettre en évidence, de façon répétitive et rapide, le pouvoir toxicogène des souches du champignon, sur des espèces mieux adaptées à l'expérimentation toxicologique.

De nombreuses espèces animales avaient déjà été utilisées par différents auteurs, avec plus ou moins de succès, et des résultats parfois contradictoires : chevaux, ânes, poulets, rats, cochons d'Inde, souris, hamsters, lapins, babouins, moutons, (24, 27, 28, 29, 31, 40, 41, 42, 58).

b - Différents essais

A Nouméa, une soixantaine d'isolats de *F. moniliforme* ont été éprouvés sur cinq espèces animales (cheval, rat, souris, caneton, poussin, oeuf embryonné de poule), avec diverses méthodes d'administration : injection intrapéritonéale, test cutané, alimentation libre (per os) et sondage oesophagien (gavage).

Dans le cas de l'alimentation libre, on additionne du maïs infecté à une ration alimentaire équilibrée, et l'on distribue le tout *ad libitum*. Dans les cas d'injection et de gavage, on peut donner des filtrats ou des surnageants de culture, du mycélium brut ou traité, des extraits obtenus avec différents solvants.

c - Test de sondage oesophagien (gavage)

Le test de sondage oesophagien sur rat est celui qui, en fin de compte, a donné le plus de satisfaction. Il a notamment permis de sélectionner et de classer les souches toxiques, d'après un rapport $R = \frac{MGMQ}{MCMQ}$ (MGMQ : moyenne des gains moyens quotidiens en poids des rats, MCMQ : moyenne des consommations moyennes quotidiennes des rats) dont la variation est, en première estimation, une fonction inverse de

la toxicité.

Ce test a notamment servi à démontrer la toxicité de la souche 81 macroconidiale.

c₁ - matériel et méthodes.

La technique pour obtenir une culture macroconidiale est décrite en I 2 c, la façon de disposer d'un grain fusarien en II 1, et d'un extrait toxique en III 3 E b et c.

Les rats sont issus d'une lignée albino Sprague - Dawley, entretenue à l'IEMVT de Port Laguerre. Quatre rats de poids initiaux homogènes forment l'échantillon, quatre autres le témoin.

L'extrait toxique est administré chaque jour, par sondage oesophagien au moyen d'une seringue. Chaque rat reçoit un centimètre cube d'extrait.

Quotidiennement, les rats et l'aliment distribué (croquettes pour chien) sont pesés, ce qui permet de calculer le rapport R.

c₂ - observation des symptômes pour la souche 81.

Dès le deuxième jour de gavage, les symptômes observés sont un jaunissement des oreilles, des diarrhées, une attitude apathique et une perte de poids.

c₃ - résultats.

Le gavage sur rats avec la 81 a donné comme résultat un MGMQ/MCMQ de - 0,061, ce qui démontre la toxicité de cet extrait (le lot témoin ayant un R de 0,5 ce qui veut dire qu'en moyenne, chaque rat a grossi de 0,5 g par gramme de nourriture ingérée).

Les animaux gavés sont tous morts au bout de cinq jours.

C - Formes physiologiques de *F. moniliforme*.

Le laboratoire de l'ORSTOM a été confronté à un problème relativement fréquent en mycothèque de champignons toxicogènes: la perte de toxicité des souches. Il est apparu que l'atotoxicité (pas de pouvoir toxicogène) ou l'anatotoxicité (perte de pouvoir toxicogène) avaient comme origine l'absence ou la perte de capacité d'une souche à induire la formation des organes produisant des macroconidies (le morphotype à macroconidies pourrait être toxicogène grâce à un métabolisme différent de celui à microconidies).

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

Ceci a amené l'équipe à une découverte très intéressante: on peut restaurer la toxicogénie d'une souche anatoxique ou l'induire chez une souche atoxique, en récupérant des sporodochies (organes de fructification donnant des macroconidies) sous le mycélium aérien, puis en les mettant en suspension dans l'eau, et en les étalant sur PDA. On obtient quelques jours après un thalle dit "pionnotal", toxique. Ceci a été vérifié sur plusieurs souches, et on a pu ainsi distinguer les cultures dites microconidiales à thalle blanc-crème, aérien, floconneux, "sec", non toxique et les cultures dites macroconidiales à thalle rose-saumon, ras, grumeleux, "humide" toxique (photos).

Cette différence nette était passée inaperçue dans les années précédentes, car on obtenait une culture la plupart du temps à thalle aérien, avec parfois quelques sporodochies cachées sous le mycélium à microconidies. On pouvait difficilement attribuer la toxicité de la souche à quelques pustules pratiquement invisibles sous un feutrage aérien.

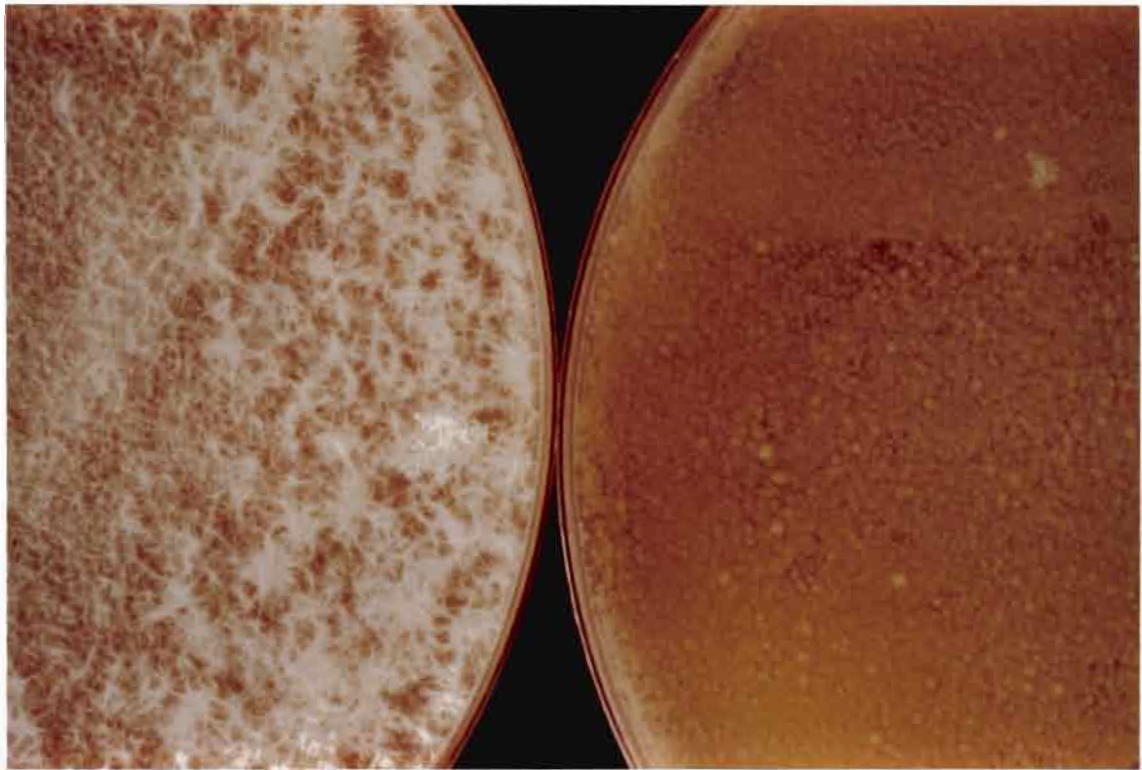
Ces deux formes physiologiques ont depuis été cultivées séparément, et l'on conserve d'un côté les cultures microconidiales en tube, et de l'autre (pour quelques souches seulement) les cultures macroconidiales en boîte de Pétri, car elles nécessitent des repiquages fréquents (mise en suspension et étalement) sous peine d'évoluer en cultures microconidiales.

3) Intégration du stage dans ce programme.

Les cultures macroconidiales sont utilisées pour ensemercer du maïs, destiné aux tests de toxicité ou à l'analyse chimique des toxines. Mais certains problèmes se sont posés : faible rendement en toxines, contaminations extérieures fréquentes dues aux manipulations, travail empirique, temps de mise en culture trop important, méthode non reproductible.

D'autre part, la question du déterminisme de la toxicité était posée : quel est le support génétique de la différence physiologique?

Le but et l'intérêt du stage étaient donc clairs : il



Fusarium moniliforme : aspect d'un thalle aérien à microconidies.

Fusarium moniliforme : aspect d'un thalle pionnotal à macroconidies.



Culture de maïs inoculé avec la forme microconidiale (non toxique).



Culture de maïs inoculé avec la forme macroconidiale (toxique).

fallait d'une part essayer d'analyser, de quantifier, de standardiser, et donc d'améliorer les conditions de culture favorisant la formation de macroconidies; d'autre part, étudier le déterminisme de la toxicité, ce qui impliquait de définir et d'étudier des marqueurs spécifiques à l'une ou l'autre des deux formes physiologiques du champignon.

Enfin, ce stage a été l'occasion de tournées sur le Territoire, pour la collecte d'échantillons de maïs et l'isolement de nouvelles souches (ou présumées nouvelles) de *Fusarium moniliforme*, permettant de renouveler la mycothèque (en vue d'études présentes ou programmées) et d'augmenter la diversité du matériel biologique à notre disposition.

Les échantillons ramenés au laboratoire sont traités de la façon suivante :

- les cannes sont effeuillées et désinfectées superficiellement à l'alcool à 95°, puis sectionnées en rondelles au niveau des noeuds (trois rondelles par noeud). Les rondelles sont placées en boîtes de Pétri, sur PDA complémenté en antibiotiques.

Au bout de quelques jours, le mycélium de *Fusarium moniliforme*, séparé des contaminants bactériens et fongiques, est repiqué sur PDA additionné d'un antibiotique différent du précédent. Cette opération répétée deux ou trois fois, permet d'obtenir une nouvelle souche de *Fusarium*.

- les épis sont débarassés de leurs spathes et sectionnés longitudinalement. Les prélèvements se font au niveau du rachis, le processus d'isolement et de purification des souches étant le même que dans le cas des rondelles de cannes.

II - ETUDE DES CONDITIONS DE CULTURE DE LA FORME MACROCONIDIALE.

1) But.

Comme nous l'avons dit, le but de cette étude est d'agir sur les paramètres de croissance et de fructification de *F. moniliforme*, afin de favoriser la forme macroconidiale, pour augmenter le rendement en toxines (diminution du temps de culture, augmentation pondérale de toxines pour un même poids de grain inoculé), les tests de toxicologie étant peu économes en principes toxiques.

A mon arrivée au laboratoire, les cultures étaient conduites de la façon suivante : le grain est mis en culture à raison de 300 g par Erlenmeyer de 2 litres, on ajoute 80 ml

d'eau, puis on stérilise 1/2 h à 120° C. Après inoculation avec une suspension de culture macroconidiale, l'Erlenmeyer est couché (pour augmenter l'interface culture / air) et agité de temps en temps pour que le champignon colonise tout le substrat.

Après cette phase d'environ une semaine, le grain contaminé est étalé en plateau (moule à tarte en pyrex recouvert d'un couvercle plat plus grand). Tous les jours ou tous les deux jours, les grains sont agités pour casser les agglomérats et la condensation est essuyée sur le couvercle pour diminuer l'humidité ambiante (les sporodochies n'apparaissant dans la culture que pour des humidités assez faibles).

Toutes ces manipulations entraînaient de fréquentes contaminations, en particulier par des champignons du genre *Penicillium*, pouvant rendre la culture impropre à l'extraction et à l'analyse chimique.

Cette méthode très empirique, non reproductible et peu performante n'était pas satisfaisante, il convenait donc de l'optimiser pour la rendre fiable et limiter au maximum les manipulations. Nous avons donc entrepris de déterminer dans la mesure du possible les différents paramètres de croissance et de fructification du champignon.

2) Matériels et méthodes.

Dans tous les cas, les manipulations préliminaires sont identiques : pesée des grains, ajustement de l'humidité, stérilisation, inoculation en Erlenmeyer avec une suspension de macroconidies, incubation pendant environ une semaine.

La suite de l'étude comprend les variantes suivantes : culture en Erlenmeyers, en fioles de Roux, en boîtes de Pétri. L'idée est d'une part, d'étudier les paramètres de croissance et de fructification du champignon, en fixant humidité, température, cycle lumineux et temps de culture ; d'autre part, de préciser l'influence exacte de la variation d'humidité, ce paramètre paraissant important pour l'équipe du laboratoire de phytopathologie; l'impression étant que l'humidité de la culture est le facteur limitant, il nous fallait vérifier si c'était la valeur absolue de cette humidité, ou sa variation qui conditionne la formation de sporodochies.

Le grain de maïs utilisé est à 15 % d'humidité par rapport au poids sec (100 g de grain rejetant 13 g d'eau en 24

h, au four Pasteur à 105°C, $13/87 = 0,15$). Ce calcul qui s'écarte des règles habituelles de l'agronomie (humidité relative) permet de comparer les résultats à partir d'une valeur intangible : le poids sec d'un grain.

A - Expérimentation en Erlenmeyers.

a - Manipulations.

Dans un premier temps, nous ne nous sommes préoccupé que de la valeur de l'humidité de la culture, pas de ses variations. Nous avons donc préparé une série d'Erlenmeyers de 500 ml, contenant chacun 50 grammes de grain à 15 % d'HR.

Nous avons testé quatre températures différentes (étuves à 20, 23, 28°C et température ambiante à 25°C) et pour chacune de ces températures, quatre humidités différentes concernant l'humidité mesurée d'une culture produisant des sporodochies (50 %) : 45, 48, 52, 55 %, avec deux répétitions par humidité.

Nous avons donc huit Erlenmeyers par température, mais les étuves étant éclairées en permanence, nous avons ajouté deux Erlenmeyers à 45 % d'humidité et deux autres à 52 % (à 20 et 25° C) soit huit Erlenmeyers, enveloppés dans du papier aluminium pour étudier l'influence de la lumière sur la croissance et la production de sporodochies. Nous disposions donc en tout de quarante Erlenmeyers.

Chaque Erlenmeyer de 50 g de grain reçoit (après ajustement de l'humidité et stérilisation à l'autoclave 1/2 heure à 120° C) un centimètre cube d'inoculum de la souche de référence : 68 macro. La mise en incubation suit l'inoculation.

b - Résultats - Interprétation.

Cette expérience a été un échec car les Erlenmeyers étant fermés par un bouchon de coton hydrophobe, lui-même encapuchonné dans du papier aluminium,, la culture a été, pratiquement dès le début, placée en anaérobiose, ce qui a favorisé la croissance active de bactéries anaérobies (cette expérience nous a permis de découvrir que toutes nos souches et en particulier celle destinée aux inoculum, étaient bactériennes, ce qui n'a pas manqué d'entraîner de nombreux problèmes pour les études suivantes).

De plus, ce milieu confiné, très humide, a entraîné la contamination des bouchons de coton, donc des cultures, par de nombreux champignons, en particulier des genres *Penicillium*,

Aspergillus... Les cultures dégagent une forte odeur de fermentation, et présentant parfois des pourritures humides, l'expérimentation a été stoppée.

B - Expérimentation en fioles de Roux.

a - Intérêt.

Ces fioles ont été utilisées car nous voulions éviter les phénomènes d'anaérobiose précédents, mais nous ne pouvions pas nous servir d'Erlenmeyers non hermétiques, par crainte de perdre beaucoup d'humidité au cours de la culture : les fioles de Roux paraissaient donc intéressantes puisqu'elles présentent un orifice plus petit que celui des Erlenmeyers, disposé à l'horizontale, ce qui limite l'évaporation a priori. De plus, la surface d'étalement du grain est meilleure que celle d'un Erlenmeyer, et la condensation se fait sur la face supérieure de la fiole.

b - Manipulations.

L'étude de la croissance et de la fructification de *Fusarium moniliforme* se fait en fixant les différents paramètres, avec préparation d'autant de fioles de Roux qu'il y avait d'Erlenmeyers dans l'expérience précédente (mêmes humidités pour les mêmes températures + 8 fioles à l'obscurité soit trente deux fioles).

Chaque fiole contenant 50 g de grain, l'eau nécessaire est additionnée avant stérilisation (1/2 heure, 120° C) puis l'ensemencement se fait avec 1 ml d'inoculum de 68 macro (environ 50 millions de spores/ml). L'incubation se poursuit dans les fioles disposées à plat, le grain se disposant sur une seule couche au fond de la fiole. On reste ici en lumière continue.

c - Résultats - Interprétation.

La manipulation en fioles de Roux a duré de mi-juin à début août, soit un mois et demi (trois fois plus longtemps qu'une culture de macroconidies empirique en plateau), et n'a donné aucun résultat valable : les variations d'humidité en fin d'expérimentation sont très importantes entre les fioles, et pas toujours dans le sens souhaité ; la production de sporochies est très faible, et les cultures ont fréquemment été polluées par des contaminants extérieurs ou présents dans l'inoculum.

A ce moment, nous avons conclu que ce sont plus les

variations d'humidité qui interviennent sur le déterminisme macroconidial que la valeur absolue de départ de cette humidité. C'est a priori la seule explication valable de l'absence de sporodochies dans des cultures de *Fusarium* placées en conditions très différentes (température, humidité, lumière).

Croyant un moment à une influence de l'agitation, nous avons secoué une fiole sur deux, sans succès. Les seuls résultats concrets tirés de cette manipulation sont que l'optimum de croissance mycélienne est de 28°C (ce qui confirme des travaux précédents), et que la pigmentation rosée des cultures n'intervient qu'à la lumière, les cultures à l'obscurité restant parfaitement blanches. De plus, il est confirmé que les cycles lumineux n'ont pas d'incidence sur la vitesse de croissance mycélienne.

C - Expérimentation en boîtes de Pétri.

Les Erlenmeyers et les fioles de Roux ayant montré leurs limites, nous avons testé les cultures en boîte de Pétri, ces conditions étant plus proches des cultures originales en plateaux.

a - Expérience préliminaire.

Une première expérience a été menée, parallèlement à la manipulation en fioles de Roux, pour étudier la formation de sporodochies en fonction de la variation d'humidité dans les cultures.

a₁ - manipulations.

Cinq Erlenmeyers, contenant 100 g de grain chacun, sont inoculés et mis à incuber selon le protocole déjà décrit.

Au bout d'une semaine, les grains sont répartis en boîtes de Pétri : deux témoins à humidité fixe (T), deux boîtes dont on essuie la condensation (sur le couvercle) une fois par semaine (1/S), deux boîtes essuyées deux fois par semaine (2/S) et deux boîtes essuyées trois fois par semaine (3/S). Ceci est répété pour chaque température : 20, 23, 25 et 28°C.

a₂ - résultats.

Les résultats de cette première expérience n'ont pas été à la hauteur des espérances : les étuves ventilées créant une ambiance extrêmement desséchante, toutes les cultures à

20, 23 et 28°C ont très vite été déshydratées, ce qui a faussé tous les résultats.

Les boîtes à 25°C ont présenté des sporodochies, mais sans que l'on puisse hiérarchiser cette production en fonction de la fréquence des essuyages. De plus, les contaminants étaient assez nombreux (dès le passage des Erlenmeyers aux boîtes de Pétri en début de manipulation, on sentait déjà une forte odeur de fermentation, indiquant la présence de contaminants).

b - Expérience complémentaire.

Cette expérimentation est la continuité de la manipulation précédente et de l'étude en fioles de Roux. La méthodologie utilisée est à peu près la même, mais toutes les cultures sont conduites en boîtes de Pétri, qu'elles soient à paramètres fixes ou à humidité variable.

On ajoute un facteur supplémentaire : l'origine de l'inoculum. En effet, depuis toujours, les inoculations se faisaient avec la 68 macro (issue d'un clonage de la 68 sauvage provenant de La Foa). Or, par des repiquages successifs de sporodochies, nous avons créé un inoculum de la souche 81 (souche sauvage provenant de Bourail), et il était intéressant de tester son aptitude à donner des sporodochies en culture sur grains de maïs (pour corréler éventuellement cette aptitude avec une production de toxine).

b₁ - manipulations.

b_{1.1} - préparation du maïs.

400 g de grain sont utilisés pour l'étude de la variation du paramètre humidité, en deux Erlenmeyers de 2,5 l contenant chacun 200 grammes de maïs. Pour chaque Erlenmeyer, 70 ml d'eau sont ajoutés (60 ml d'eau permutée avant stérilisation, 10 ml d'inoculum après stérilisation) ; le grain est donc à une humidité initiale de $70 + (200 - 2 \times 13) / 2 \times (100 - 13) = 55 \%$.

Le grain est mis à incuber dans les Erlenmeyers pendant trois jours, puis il est réparti dans les boîtes de Pétri, à raison de 10-15 g par boîte environ : deux boîtes de Pétri pour chaque humidité variable (T, 1/S, 2/S, 3/S), pour chaque température, soit 2 x 4 x 4 : 32 boîtes par inoculum.

On prépare également 100 g de grain en Erlenmeyers à 44, 38, 32 et 26 % d'humidité. Après une

incubation de trois jours, les grains sont répartis en boîtes de Pétri avec pour chaque température, deux boîtes aux humidités précitées, destinées à rester fixes. Ces humidités ont été choisies car proches de l'humidité mesurée d'une culture empirique et également (pour 32 et 26 %) pour situer le seuil inférieur d'humidité permettant le développement du *Fusarium* et la production de sporodochies.

b_{1.2} - incubation.

Les cultures ne sont restées qu'une quinzaine de jours en étuve ou à température ambiante, car nous avons été confrontés à une invasion massive d'acariens. De toute manière, ce délai a été suffisant pour obtenir des résultats intéressants.

b₂ - résultats - interprétation.

Des résultats positifs ont été obtenus essentiellement à 25° C, car dans les étuves, malgré l'arrêt de la ventilation et la mise en place de coupelles d'eau, l'ambiance très desséchante a encore faussé les essais.

L'inoculum 81 est un très bon producteur de macroconidies : à 25°C, toutes les boîtes T, 1/S, 2/S, 3/S et les boîtes à humidité fixe 44 et 38 % (dans une moindre mesure) présentent au bout d'une semaine d'incubation de très nombreuses sporodochies, et un feutrage mycélien aérien non recouvrant. Les boîtes à 32 et 26 % d'humidité ne présentent pas de sporodochies, et l'on n'observe pas de développement mycélien, ces taux d'humidité étant vraisemblablement trop bas pour la croissance du champignon.

L'inoculum 68 a, lui aussi, produit des sporodochies dans pratiquement toutes les boîtes à 25°C (sauf 32 et 26 % d'humidité où il n'y avait pas, là non plus, de développement du champignon), mais la manipulation ayant commencé plus tard, le temps de culture a été plus court à cause de l'arrêt prématuré de l'expérience dû aux acariens.

Les conclusions semblent intéressantes même si elles sont entachées de certains problèmes. La production de sporodochies est maximale à 25°C, ce qui est la température ambiante du laboratoire, donc la plus pratique : ceci incite à conserver les manipulations à cette température et à éviter des manipulations en étuve, plus contraignantes.

En outre, il semble que la variation d'humidité par essuyage ne soit pas nécessaire, puisque les cultures

produisent autant de sporodochies dans les boîtes à humidité fixe et relativement basse, que dans celles à humidité abaissée à partir d'une humidité plus élevée.

Ce résultat serait idéal si les mesures d'humidité a posteriori avaient confirmé la stabilité de cette humidité dans les boîtes. Tel n'est pas le cas, et pour toutes les cultures à humidité "fixe", on observe une diminution importante de cette humidité, ce qui semble indiquer qu'il y a évaporation dans les boîtes de Pétri non étanches, et que cette variation d'humidité a son importance.

Cette constatation est évidemment gênante puisque cette évaporation est très difficile à standardiser. De plus, d'autres problèmes se sont greffés autour de la notion d'humidité.

Tout d'abord la variation du taux d'humidité après autoclavage : la stérilisation entraîne en effet une baisse d'humidité dans les Erlenmeyers. Ceci a été vérifié par une manipulation ultérieure en calculant très précisément l'humidité initiale, puis en mesurant l'humidité à la sortie de l'autoclave. On a pu ainsi dresser une courbe étalon Humidité réelle = f (Humidité théorique), représentée sur la figure I.

Ensuite, après de nombreuses mesures, nous avons eu la surprise de constater que l'humidité d'une culture ne baisse pas proportionnellement à l'intensité des essuyages, et surtout qu'on peut, après plusieurs essuyages, obtenir une humidité dans la culture supérieure à celle de départ. Nous en sommes réduits pour l'instant à des suppositions sur l'influence de l'humidité intrinsèque des grains et de l'humidité ambiante dans les boîtes, ainsi que sur les possibilités de réhydratation d'un grain séché, et sur l'effet ventilation dans une boîte de Pétri.

3) Conclusion.

Peut-on dire que le processus de production des macroconidies a été amélioré, et peut-on proposer une méthode rationnelle, rapide, reproductible pour disposer d'un grain toxique en peu de temps ?

Des résultats positifs ont été obtenus : détermination de la température optimale, confirmation du peu d'incidence des cycles lumineux, obtention d'un inoculum 81 vraisemblablement plus "performant" que l'inoculum 68, affranchissement de l'essuyage lourd qui est source de contaminations multiples.

Humidité

réelle %

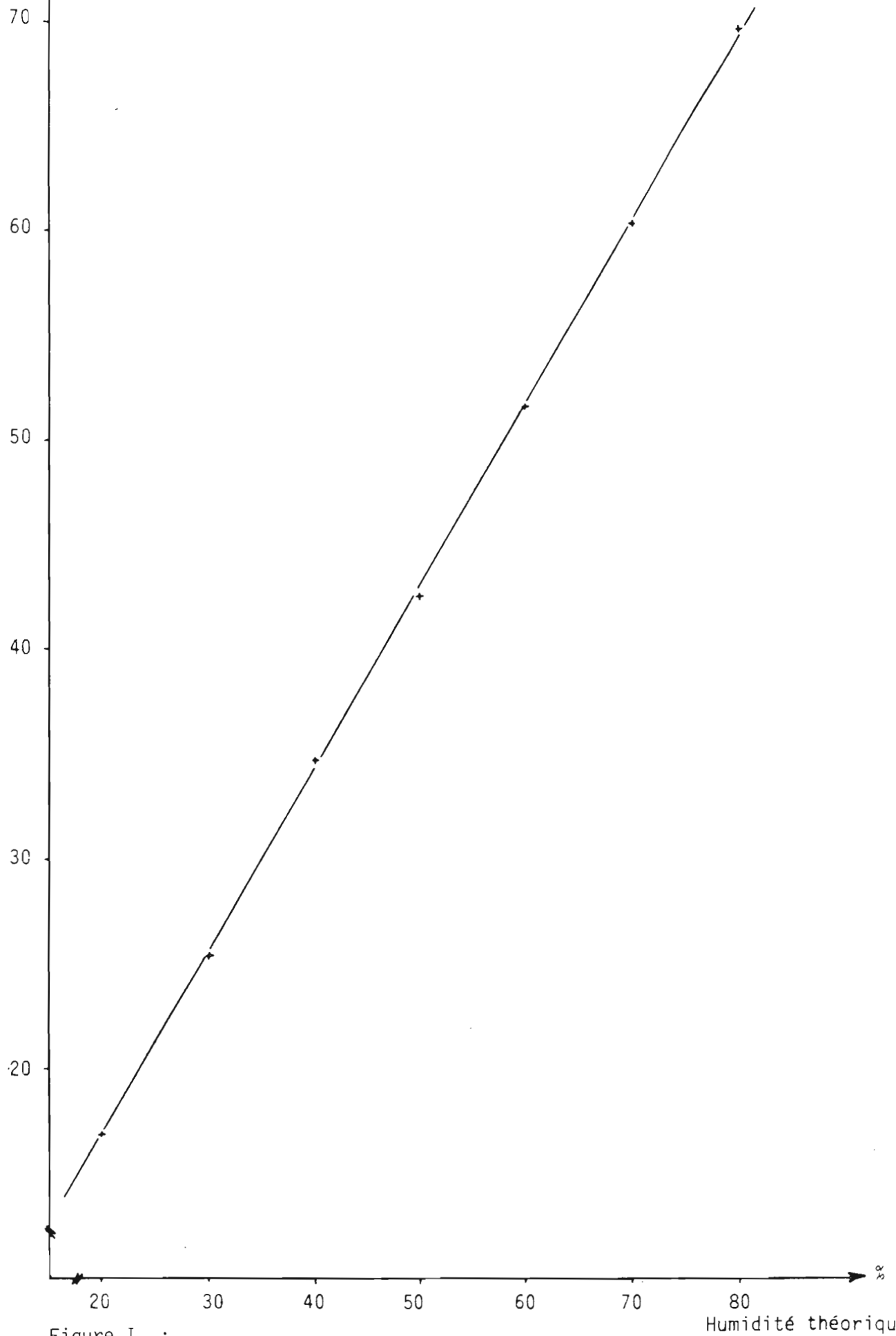


Figure I :

Influence de l'autoclavage : courbe étalon donnant l'humidité réelle d'un lot de maïs après autoclavage, en fonction de l'humidité théorique de départ.

En revanche, nous ne pouvons pas encore proposer de technique de production de sporodochies idéale du type : prendre tant de grain, additionner telle quantité d'eau, inoculer avec la souche x à raison de tant de spores par ml et laisser incuber tant de temps à telle température.

Avant d'arriver à ce stade, il faudra perfectionner quelques points (effet de l'essuyage, problème de l'humidité qui ne reste pas fixe), et refaire quelques expérimentations.

III - ETUDE DES FORMES PHYSIOLOGIQUES DE *FUSARIUM MONILIFORME* ET DU DETERMINISME DE LA TOXICITE.

1) But.

Nous nous proposons dans ce chapitre d'étudier les morphotypes microconidiaux et macroconidiaux, de comprendre le déterminisme de la toxicité et de tester les hypothèses qui ont été émises quant à la transmission du potentiel toxicogénique.

La toxicité peut être liée à un métabolisme particulier de la forme physiologique macroconidiale auquel cas, on peut essayer de mettre en évidence une différence entre la forme macroconidiale et la forme microconidiale, ou bien il existe un gène d'accumulation, c'est-à-dire qu'il y aurait augmentation de la toxicité au cours des cycles de culture par voie macroconidiale, par duplication des gènes responsables de la toxicité (Laboratoire de Cryptogamie, Orsay. Communication personnelle), auquel cas on peut essayer de démontrer une tendance évolutive au cours de clônages.

Laville et Folin (35) avaient déjà observé en 1966 des différences morphologiques dans les cultures de *F. oxysporum* fsp *cubense* selon qu'elles avaient été obtenues à partir de microconidies, macroconidies, chlamydospores, hyphes âgées ou en croissance, mais sans relier ces variations morphologiques à des variations de virulence ou d'agressivité. Le *F. moniliforme* allait-il montrer une variabilité liée à une origine morphologique ?

Pour répondre à cette question, les deux hypothèses ont été éprouvées au moyen de tests et de marqueurs adaptés aux différents niveaux d'étude: morphologie, biochimie, toxicogénie et pathologie.

2) Clônages.

Si la première hypothèse (métabolisme particulier d'une forme physiologique) peut se vérifier assez aisément par tout moyen de laboratoire permettant de mettre en évidence une différence biochimique entre deux organismes, la deuxième hypothèse nécessite au préalable de créer des lignées du champignon, par clônages soit à partir de macroconidies, soit à partir de microconidies. Les deux lignées provenant de clônages macroconidiaux systématiques ou microconidiaux systématiques sont comparées à des lignées mixtes (clônages à partir de macroconidies et de microconidies pour une même lignée).

Si l'on note un clône (de la souche S) issu de microconidie : S_1 , et issu de macroconidie : S_2 , on aura, par exemple après quatre clônages successifs, un clône S_{1111} , un clône S_{2222} et quatorze autres clônes ($S_{1211}, \dots, S_{2212}, \dots$). Ceci donne un éventail assez large, pour éventuellement confirmer la deuxième hypothèse.

A - Méthodologie.

Pour clôner une souche sauvage, on commence par faire un étalement sur lame, pour apprécier les quantités respectives de macroconidies et microconidies dans la culture (un très faible taux de l'une des deux formes entraîne automatiquement sa disparition pendant le clônage). Puis la boîte contenant le champignon est raclée et l'ensemble récupéré (mycélium, macroconidies, microconidies) est mis en suspension dans un petit Erlenmeyer d'eau stérile.

En prélevant un échantillon de cette suspension et en le plaçant sur cellule de Malassez, on détermine les pourcentages des deux formes physiologiques, et le nombre total de spores par ml. Ainsi, on peut calculer la dilution à effectuer pour étaler 1/10e de ml de la solution finale, ce volume devant contenir environ 50 spores.

Le milieu d'étalement utilisé est de l'eau gélosée, à 20 g de gélose/litre, pauvre en éléments nutritifs, qui évite une croissance trop rapide du champignon. De plus, on visualise mieux les spores au microscope sur ce substrat que sur PDA.

L'opération est répétée cinq fois pour obtenir cinq boîtes de Pétri d'eau gélosée contenant chacune une cinquantaine de spores. On laisse germer les spores une nuit sous lumière artificielle.

Le lendemain, les boîtes sont examinées au microscope et,

après avoir repéré les spores ayant germé, on sélectionne et prélève au scalpel les microconidies ovoïdes, unicellulaires, de l'ordre de 5 μ de long, présentant un seul tube germinatif et les macroconidies longues (50 μ), arquées, fines, pluriseptées (environ 7 cellules) possédant plusieurs tubes germinatifs. Toutes les formes intermédiaires sont délaissées.

Les manipulations sous microscope étant délicates puisqu'inversées, on utilise un artifice : après avoir repéré la spore et s'être assuré qu'elle est isolée, on remonte complètement le condensateur du microscope et on ferme presque totalement le diaphragme. Un halo lumineux apparaît alors sur la gélose autour de la spore, assez net pour pouvoir être découpé au scalpel sans regarder par l'oculaire. La spore est ainsi prélevée avec un cube d'eau gélosée.

Une dizaine de spores de chaque origine est sélectionnée et repiquée sur PDA. Après deux-trois jours de croissance, on choisit un clone de chaque forme, si possible présentant un aspect morphologique différent.

On obtient ainsi un clone macroconidial et un clone microconidial qu'il faut faire pousser pour étudier leurs caractéristiques, et pour renouveler un clonage qui sera dit de deuxième génération.

B - Résultats pratiques.

Si la technique du clonage est facile à acquérir, il y a en revanche de nombreux impondérables : clones refusant obstinément de produire des macroconidies ou des microconidies suivant les cas, non-germination de spores après étalement sur eau gélosée, mortalité de spores prélevées sur eau gélosée et repiquées sur PDA, contaminations bactériennes.

Sur quatre générations, nous avons pu obtenir les clones suivants : 81, 81 1., 81 2., 81 1.2. secteur (secteur apparu dans une culture de 81 1.2.) 81 1.2.1., 81 1.2.2., 81 1.2.1.1., 81 1.2.1.2., 81 2.2.

Pour la souche 113 nous nous sommes arrêtés à 113 1. et 113 2., ces deux clones ne produisant plus aucune macroconidie, malgré une tentative de régénération par passage sur maïs (infection de maïs par un broyat de culture, réisolement du champignon à partir du collet des plants tués).

Avoir les clones et les lignées ne suffit pas, il a fallu également rechercher et étudier des marqueurs pour les lignées évoluant vers des formes physiologiques différentes.

3) Recherche et étude de marqueurs.

A - Electrofocalisation.

a - Principe.

On fait migrer une solution de protéines dans un gel de polyacrylamides et d'ampholines grâce à un courant électrique : les polyacrylamides créent dans le milieu des mailles sélectionnant les protéines d'après leur taille, les ampholines établissant un gradient de pH entre anode et cathode. Les protéines migrent jusqu'à leur point isoélectrique, et s'y arrêtent, à cause du pouvoir tampon élevé du milieu.

Nous avons utilisé la technique en plaque, qui offre de nombreux avantages sur la technique en tube : meilleur refroidissement, temps d'expérimentation plus court, nombreux échantillons traités en même temps et dans les mêmes conditions (possibilité de comparaisons directes).

Cette technique a déjà été utilisée pour la comparaison ou l'identification des protéines : identification d'organismes responsables de maladies par comparaison avec des références (20), détection d'additifs végétaux dans les produits agro-alimentaires d'origine animale (38), taxonomie (9, 10, 11), caractérisation et étude de répartition de populations de champignons (48).

b - Intérêt.

Cette technique paraît a priori souple et d'interprétation aisée, une différence de métabolisme ayant de fortes chances d'être corrélée avec une différence de spectre protéique. Une différence nette de bandes protéiques entre une culture macroconidiale et une culture microconidiale prêterait en faveur de la théorie du métabolisme différentiel des formes physiologiques, une bande s'atténuant ou se renforçant le long d'une lignée pouvant indiquer la présence d'un gène "d'accumulation".

c - Manipulations.

c₁ - matériel biologique.

Nous avons choisi les clones résultant des lignées obtenues par clônages : 81, 81 1., 81 2., 81 1.2., 81 1.2. secteur, 81 2.2. (dans un premier temps), 81 1.2.1., 81

1.2.2., 81 1.2.1.1., 81 1.2.1.2. (par la suite) 113, 113 1., 113 2.; ainsi que des souches de références : 68 sauvage, 68 R (inoculum); 81 inoculum, Marasas (souche sud-africaine), 110 (clône déjà étudié), 72 (*Fusarium graminearum*), 60 (souche produisant un thalle particulièrement aérien); enfin , des souches ramenées lors de collectes récentes : 201, 209 (Bourail, La Foa) et 225 (tournée dans le Nord de l'Ile).

Ces trois dernières souches pourraient mettre en évidence une éventuelle dégénérescence des vieilles souches (68, 110, 60...) dont l'isolement date de plusieurs années, repiquées maintes fois en tube, ayant subi des attaques d'acariens et des invasions bactériennes (succédant la plupart du temps aux précédentes attaques).

c₂ - préparation de la solution de protéines.

Le mycélium est raclé au scalpel sur les boîtes de Pétri, puis il est broyé au mortier, à froid, après avoir ajouté du tampon (volume pour poids), et du sable de Fontainebleau. Le tampon utilisé est du Sorensen phosphate 0,03 M ajusté à pH 6; il doit être très peu concentré pour éviter des cristallisations locales de sels sur la plaque, entraînant des points de chauffe, et donc des défauts de migration des protéines.

Ce tampon permet d'avoir un milieu homogène et comparable pour toutes les expériences et de charger par ionisation de leurs radicaux les protéines qui ne le seraient pas.

L'intégrité des protéines est garantie par la mise au froid rapide après le broyage, et par la continuité de la chaîne du froid.

c₃ - migration.

En fonction de manipulations déjà effectuées sur d'autres champignons, la puissance du courant est fixée à 20 Watt et l'intensité maximale à 50 mA, le voltage restant libre de varier en fonction des fluctuations de résistivité du support de migration.

Les protéines sont déposées en ligne du côté cathode (-), au moyen de confettis de papier filtre préalablement trempés dans le broyat mycélien (15 μ l par confetti). Le front de migration est marqué par du Bleu de Bromophénol, petite molécule visible migrant facilement et rapidement.

Les protéines se déplacent vers l'anode, entraînées par

le flux d'électrons et s'arrêtent à leur point isoélectrique, déterminé par le gradient de pH instauré par les ampholines. On observe alors un spectre protéique en bandes, relativement spécifique si les bandes sont bien séparées.

c₄ - fixation - coloration - conservation.

Dans un premier temps, la plaque est trempée dans un bain d'acide trichloracétique à 10 %, qui a pour but de fixer les protéines d'une part, et d'éliminer les ampholines d'autre part (sinon, celles-ci donneraient un "fond" de plaque hétérogène).

On colore l'ensemble de la plaque dans un bain de Bleu de Coomassie (mélangé à du méthanol, de l'acide sulfosalicylique et de l'acide trichloracétique) pendant 15 minutes à 60°C. La décoloration fait intervenir une solution d'eau, d'éthanol et d'acide acétique en plusieurs bains, et aboutit à un spectre protéique en bandes (le Bleu de Coomassie se fixant spécifiquement sur les liaisons peptidiques des protéines).

Enfin, après trempage dans une solution de préservation contenant du glycérol, la plaque est séchée à température ambiante, et recouverte d'une pellicule de cellophane en évitant d'emprisonner des bulles d'air.

d - Résultats - Interprétation.

La première manipulation a fait intervenir la méthodologie décrite : le résultat est peu satisfaisant, les bandes sont claires, peu marquées et on ne peut pas tirer de conclusions quant à des différences ou à des analogies éventuelles. Certains spectres sont même pratiquement illisibles.

Voulant améliorer la méthodologie, nous avons changé de protocole : le courant a été appliqué avant dépose des extraits, ce qui établit le gradient de pH avant la migration des protéines. De plus, les extraits ont été centrifugés (élimination de la gélose, des amas mycéliens...) et le surnageant concentré par évaporation au congélateur. Le résultat a malheureusement été encore très médiocre.

Nous sommes revenus à l'établissement du gradient de pH parallèlement à la migration des protéines. Cependant, après prélèvement du mycélium dans les boîtes de Pétri, et addition du tampon et du sable de Fontainebleau, le mélange est mis au congélateur, le broyage se faisant sur du matériel congelé. Après obtention d'une pâte semi-liquide, une centrifugation

permet de récupérer le surnageant. Le résultat s'est encore révélé décevant.

Enfin, après deux nouveaux essais infructueux, l'un faisant intervenir une lyophilisation des extraits, et l'autre une électrofocalisation immédiatement après le broyage, il faut reconnaître que la maîtrise de cette technique, dans le cas du *Fusarium*, s'est révélée problématique.

Le manque de résultats ne nous permet pas d'interprétation valable. Plusieurs facteurs peuvent être incriminés :

- le tampon doit être expérimenté pour d'autres valeurs du pH. En effet, seuls des tampons aux pH < 7 ont été utilisés. Riches en cations, ils peuvent ne pas correspondre aux radicaux des polypeptides extraits de *Fusarium moniliforme*. Des tampons à pH > 7 (riches en anions) seront utilisés dans les prochaines manipulations.

- les spectres observés montrent que les protéines de *Fusarium moniliforme* migrent de façon excessive vers l'anode. Outre le problème du pH du tampon, on peut penser que la gamme de pH (3,5 - 9,5) des supports électrophorétiques est mal appropriée. Des supports à gamme de pH acides (2,5 - 6) seront utilisés ultérieurement.

- enfin, l'extraction des protéines est probablement défectueuse. Le *Fusarium moniliforme* étant un champignon cloisonné, une bonne extraction implique une action mécanique énergique, pour éclater et vider de leur contenu un maximum de cellules. Mais pour empêcher la dénaturation des protéines, le broyage doit éviter toute production de chaleur, ce qui limite les moyens d'intervention (ultra sons...).

Cette technique ne permet pas pour le moment de vérification de l'une ou l'autre des hypothèses de départ. On n'observe pas entre la 81 sauvage et la 81 macro d'apparition ou de disparition de bandes protéiques; de même, aucune bande ne se renforce ou ne s'affaiblit de la 81 sauvage à la 81 2.2. ou à la 81 1.2.1.1. .

Il faut noter que cette étude a été contrariée par les délais d'approvisionnement en matériel du laboratoire : quatre mois après la commande, les nouvelles plaques d'électrofocalisation ne sont toujours pas arrivées.

B - Test de dérive macroconidiale.

a - Principe.

Ce test consiste à dénombrer les macroconidies et les microconidies dans un prélèvement , et à calculer les pourcentages respectifs des deux formes physiologiques. Ceci est fait à chaque génération, pour chaque clône, afin de détecter une éventuelle dérive macroconidiale, c'est à dire une tendance à augmenter le pourcentage de macroconidies dans les lignées issues de plusieurs clônages à partir de cette forme physiologique, et inversement une tendance à diminuer ce pourcentage dans les lignées issues de clônages à partir de microconidies.

b - Réalisation pratique.

On laisse pousser le clône jusqu'à ce qu'il couvre la boîte de Pétri. Le mycélium est raclé avec une petite spatule, sur deux diamètres , en croix. Le prélèvement est mis en suspension dans l'eau par agitation , puis les spores sont dénombrées à la cellule de Mallassez, ce qui permet d'établir les pourcentages respectifs de microconidies et de macroconidies.

c - Résultats.

Les souches 60, 110 et 68 M présentent un thalle très aérien ce qui correspond aux souches classiques, produisant rarement de sporodochies ; il est donc logique que les microconidies représentent 100 % du total des spores.

La souche sauvage 113, les clônes 113 1. et 113 2. mais également 113 1.R et 113 2.R (clônes régénérés par passage sur maïs) montrent la même prédominance de la forme microconidiale.

Les résultats obtenus avec les clônages de la souche 81 sont présentés dans le graphique de la page 28 (figure II).

La souche sauvage développant un thalle très aérien (100% de microconidies), on pourrait penser au premier abord que les clônages ont une influence sur la proportion de macroconidies dans les cultures puisque, chez tous les descendants de la 81 sauvage, quelle que soit la forme physiologique dont ils sont issus, les macroconidies sont en quantité notable sinon prépondérante (sauf dans le cas de la 81 1.2.S, secteur de la 81 1.2. ayant vraisemblablement évolué vers une forme purement microconidiale, bien que présentant un thalle rose).

Les cultures s'enrichissent en macroconidies entre les

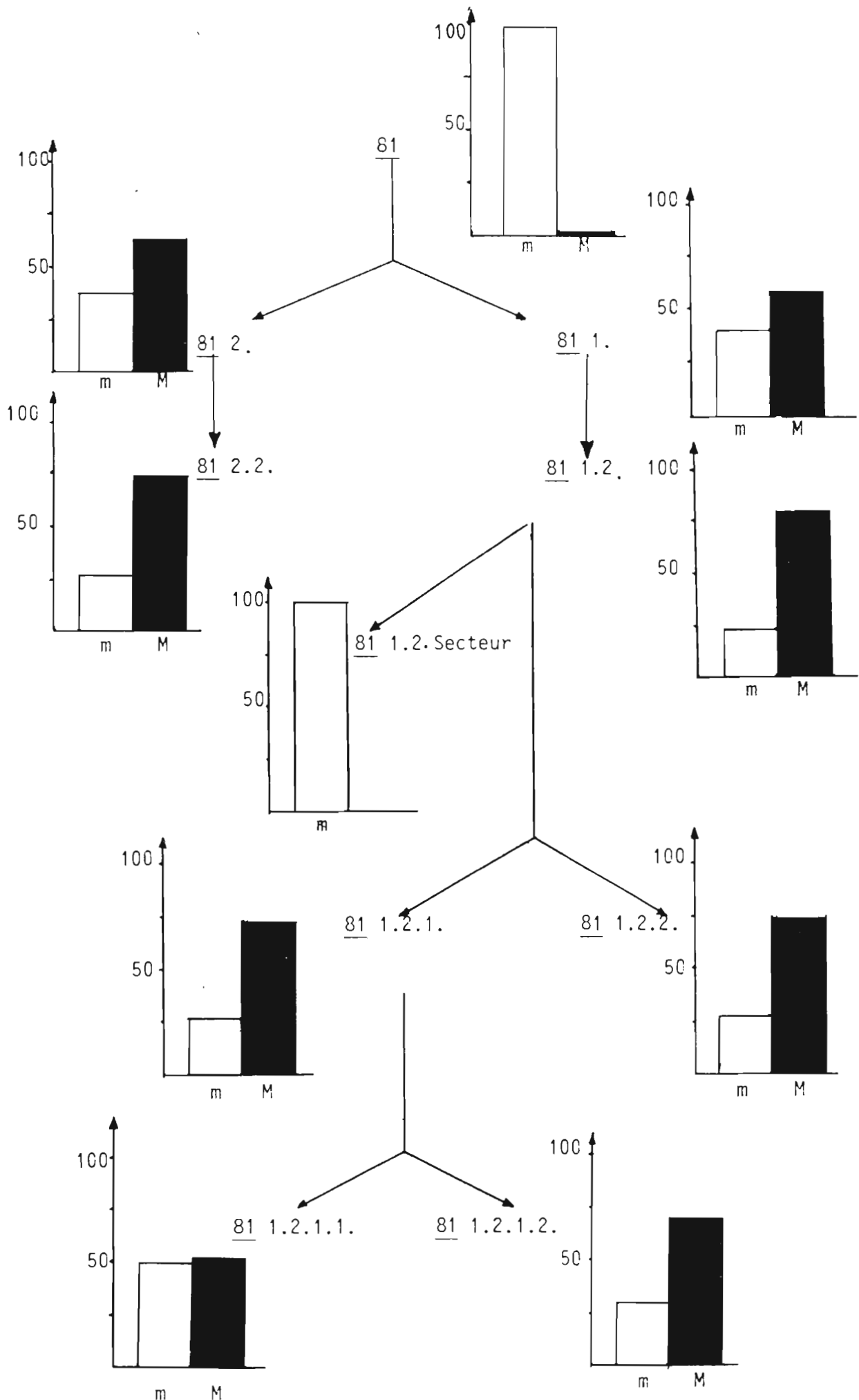


Figure II :
 Etude de la dérive macroconidiale sur la lignée 81 : évolution des pourcentages respectifs de microconidies (blanc) et de macroconidies (noir) en fonction des clônages.

clônes 81 et 81 2., 81 2. et 81 2.2., 81 1. et 81 1.2., alors qu'il y a appauvrissement en ce type de spores entre les clônes 81 1.2.1. et 81 1.2.1.1. Ceci aurait pu indiquer un effet de dérive macroconidiale, mais cette augmentation s'observe également au passage de la 81 à la 81 1. alors que les pourcentages restent stables entre la 81 1.2. et la 81 1.2.2., de même qu'entre la 81 1.2.1. et la 81 1.2.1.2.

Il est donc prématuré de tirer des conclusions sur la base de ces résultats. Cette expérimentation demande à être répétée et précisée, avec des lignées complètes (dans ce cas, chaque clône doit donner des spores viables pour chaque forme physiologique, ce qui n'a pas été toujours le cas dans nos manipulations), et surtout, avec des cultures totalement axéniques.

En effet, les pourcentages respectifs des deux types de fructification sont fortement influencés par les contaminations bactériennes venues contrarier l'expérience.

Une culture très contaminée présente dans tous les cas un thalle ras, englué de bactéries. Le mycélium aérien ne peut pas se développer, les chainettes de microconidies n'apparaissent pas et l'on observe essentiellement des macroconidies dans la culture.

Nous avons déployé beaucoup d'efforts pour nous débarrasser de ces bactéries, sans grand succès. Différentes techniques de purification ont été employées :

- cultures sur eau gélosée, milieu pauvre en éléments nutritifs pour les bactéries.

- cultures sur milieux complétés avec six antibiotiques ou antibactériens différents (Pénicilline, Colimycine, Gentamycine, Streptomycine, Totapen, Rose Bengale).

- balayage du mycélium aérien avec une pointe de scalpel (chauffée et trempée dans du PDA) et repiquage des spores récupérées.

- isolement sous la loupe binoculaire puis repiquage d'extrémités d'hyphes en croissance.

L'échec de ces différentes tentatives nous a incité à faire appel au département de bactériologie de l'Institut Pasteur, qui a vainement essayé d'isoler l'agent bactérien pour pratiquer un antibiogramme (seize milieux différents ont

été utilisés).

Il semble que l'agent bactérien soit étroitement lié au champignon. Une culture sur PDA + Bénomyl a d'ailleurs confirmé cette hypothèse, car l'inhibition de la croissance du *Fusarium* a également inhibé la croissance de l'agent bactérien; de même, une tentative d'isolement par la technique des stries a été un échec, l'agent bactérien se révélant indissociable du champignon.

C - Formation de microsclérotos.

Lors du premier clonage avec la souche 55, nous avons remarqué qu'en repiquant à partir d'eau gélosée, des microconidies et des macroconidies sur la même boîte de PDA, il se formait au niveau des zones de confluence des thalles, des microsclérotos et ceci uniquement quand les thalles confluent provenaient de formes physiologiques différentes.

Cette constatation paraissait intéressante car cela laissait penser à deux métabolismes différents se contrariant et entraînant la formation de microsclérotos (aggrégation de mycélium).

Cependant, cette observation n'a pu être répétée, avec aucune des souches testées par la suite. Nous avons donc abandonné l'idée de nous servir de ce test comme marqueur pour l'étude des deux formes physiologiques de *Fusarium moniliforme*.

Dans le cas contraire, nous aurions pu envisager la manipulation suivante : mettre en présence un thalle d'une des formes physiologiques et un broyat de thalle de l'autre forme. La formation de microsclérotos aurait été la preuve d'une différence entre deux métabolismes. Cette expérience n'a pu se poursuivre avec la souche 55, celle-ci n'ayant pas résisté à une attaque conjointe d'acariens et de bactéries.

D - Vitesse de croissance.

a - Principe.

Toujours dans le but de vérifier une différence éventuelle de métabolisme entre les formes physiologiques, ou une évolution dans les lignées, nous avons pensé à utiliser la vitesse de croissance des clones comme marqueur.

Pour cela, on découpe à l'emporte-pièce cinq pastilles par clone représentant la même surface de départ et l'on

positionne chaque pastille au milieu d'une boîte de Pétri. Les boîtes sont mises à l'étuve à 23°C, température relativement basse pour que les cultures ne couvrent pas trop vite les boîtes, et pour que les différences entre clones puissent s'exprimer.

Tous les jours, on mesure deux diamètres en croix par boîte, ce qui fait dix mesures par clone (ou souche), l'expérience durant environ une semaine. Les données sont ensuite traitées pour mettre en évidence une éventuelle différence statistique entre les clones.

b - Résultats - Interprétation.

La moyenne, l'écart - type et l'intervalle de confiance de la moyenne sont calculés de la façon suivante :

si n est le nombre d'observations par clone et par jour (n = 10)

- moyenne : $\mu = \Sigma x_i / n$

- écart - type estimé : $S^2 = 1/n-1 (\Sigma x_i^2 - n.\mu^2)$ d'où S

- bornes de l'intervalle de confiance: $t_1, t_2 = \mu \pm t.S/\sqrt{n}$
le t de Student prenant une valeur de 1,96 pour un risque $\alpha=0,05$.

Pour ne pas surcharger le tableau et les graphiques, nous n'avons présenté que les moyennes (tableau I, figures III et IV).

Les souches ou clones sont répartis en quatre groupes et les vitesses de croissance comparées. Des différences significatives sont rarement mises en évidence. Les comparaisons quotidiennes montrent quelques différences significatives, mais qui sont inconstantes et qui changent fréquemment de sens durant la période d'observation, certaines souches poussant lentement en début de culture puis rapidement et vice versa.

Ces résultats n'indiquent pas d'évolution stable des lignées. Un test de croissance à différentes températures permettrait éventuellement de caractériser des variations entre souches, mais une telle manipulation pose des problèmes matériels car, à titre indicatif, le test à 23°C a demandé 90 boîtes de Pétri et 180 mesures par jour.

E - Analyse chimique des extraits.

CLONES

	113	113-1	113-2	113-1R	113-2R	81	81-1	81-2	81-1.2
JOURS									
1	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2	8	8,3	7,8	8,7	9,6	10,9	11,6	8,8	7,9
3	22,4	19,9	18,6	17,6	21,4	21,3	20,3	19,5	18,4
4	37,4	36,5	36,2	31,5	36,8	34,7	33,5	33,9	32,7
5	48,2	46,5	45,5	43,9	47,4	44,7	43,8	43,3	42,1
6	60,1	57,3	57	55,8	59,4	57,6	54,9	52,7	53,2
7	73,2	70	71,5	68,8	71,9	69,4	68,1	66,7	66,3

	81-1.2S	81-2.2	81-1.2.1	81-1.2.2	81-1.2.1.1	81-1.2.1.2	60	110	68M
JOURS									
1	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2	7,8	8,2	10	10,1	8,4	9,4	8,5	9,5	8
3	18,1	17,6	20,3	22,6	18	20,1	23,7	22,8	21,1
4	35,9	31,8	33,6	36,1	29,9	33	39,7	38,4	37
5	48,6	42,1	43,1	46	39	43,5	51,6	48,8	47,7
6	60,4	54,6	53,6	58,6	51,1	54,7	64,2	61,1	59,2
7	72,9	65,5	65,5	69,3	62,1	67,1	76,4	73,7	72,7

Tableau I :
Croissance moyenne quotidienne de souches et de clones de
Fusarium moniliforme : diamètre des cultures en mm.

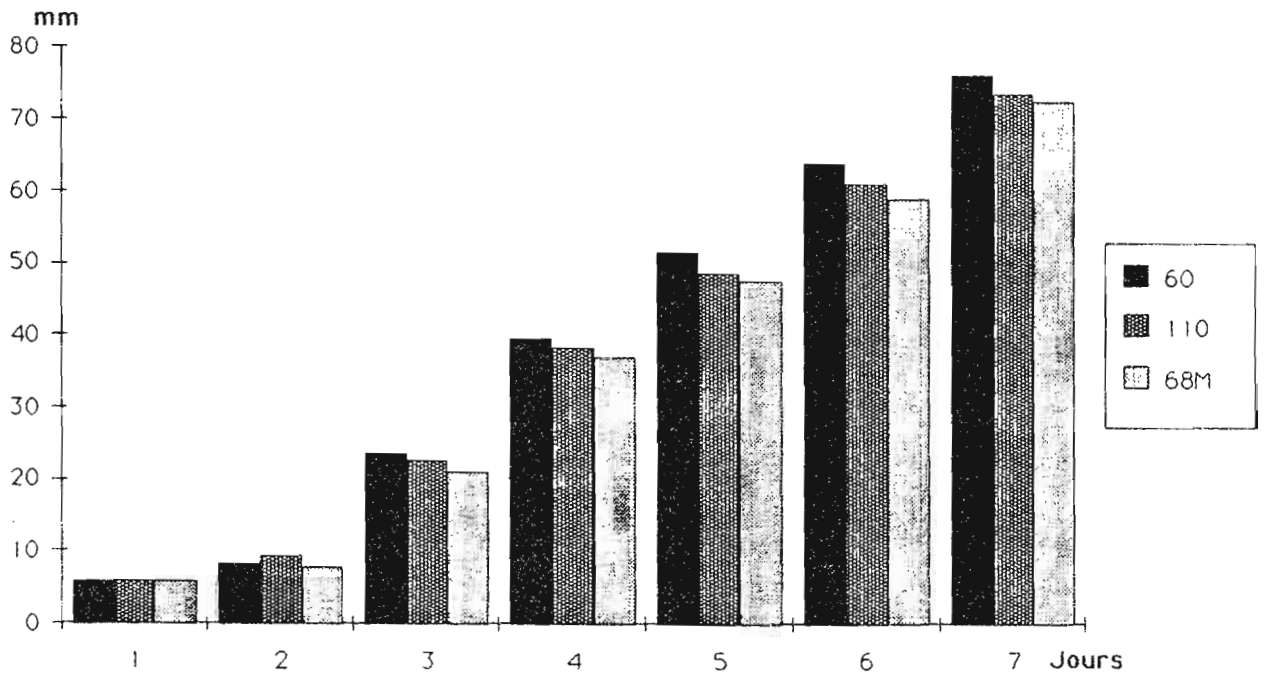
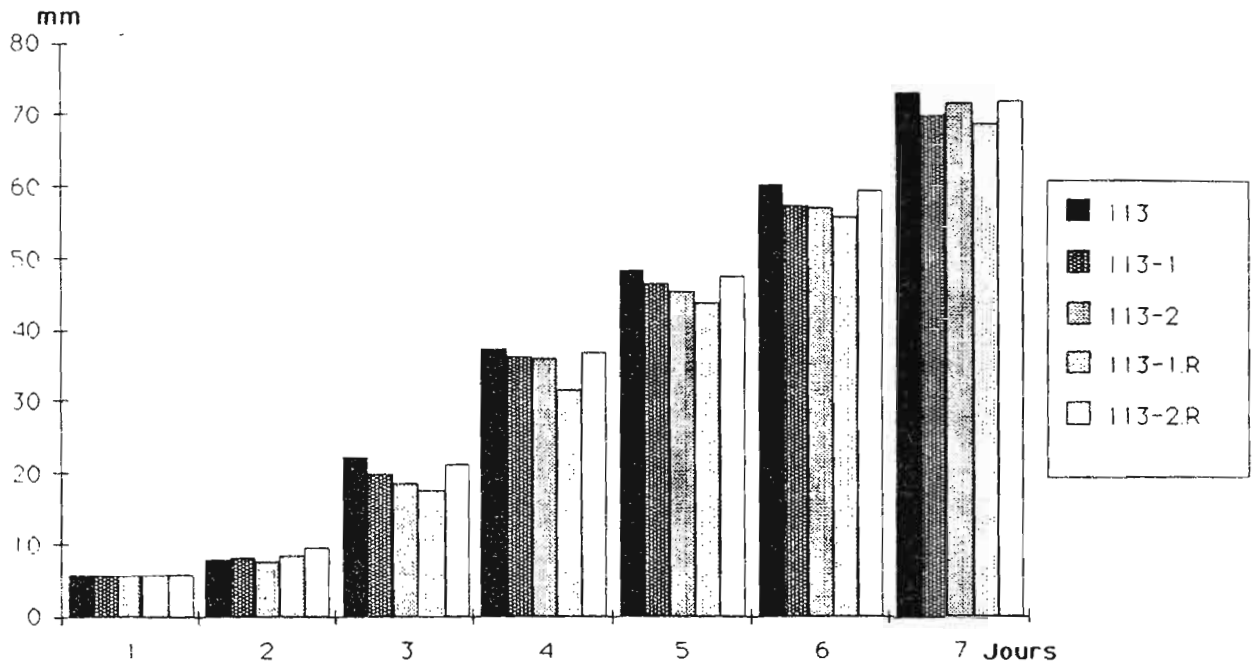


Figure III :
 Histogramme de croissance de souches et de clones de *Fusarium moniliforme*
 (lignée 113 et souches de référence).

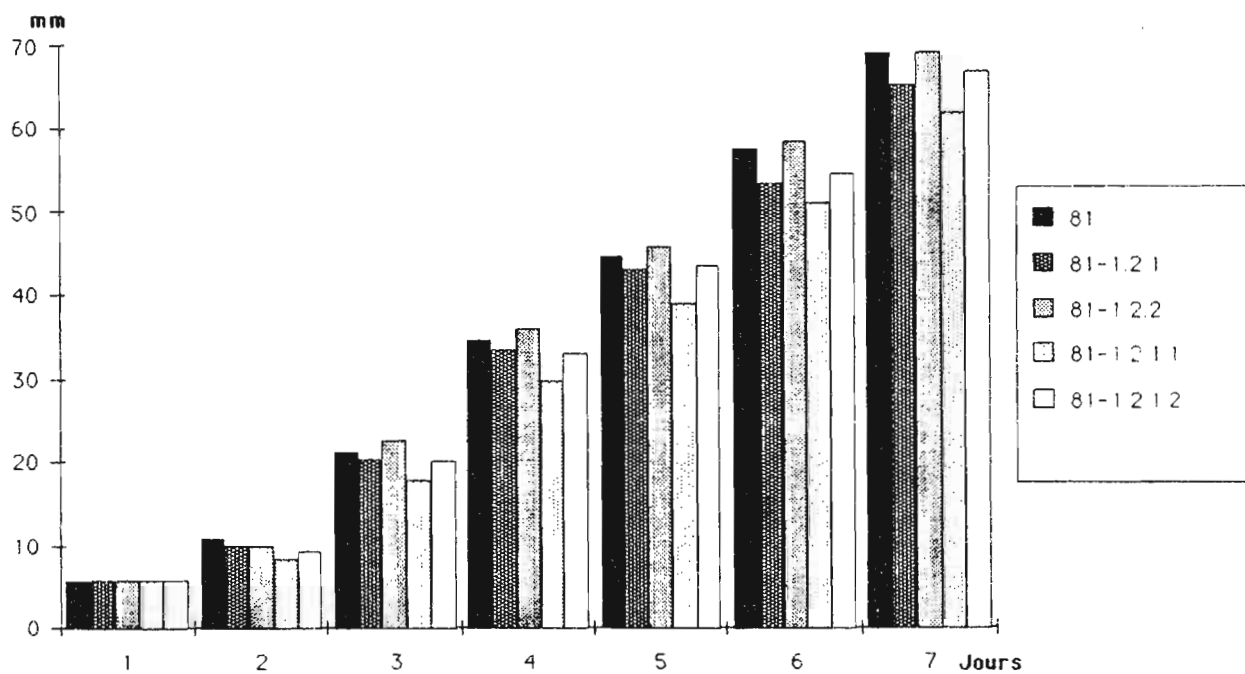
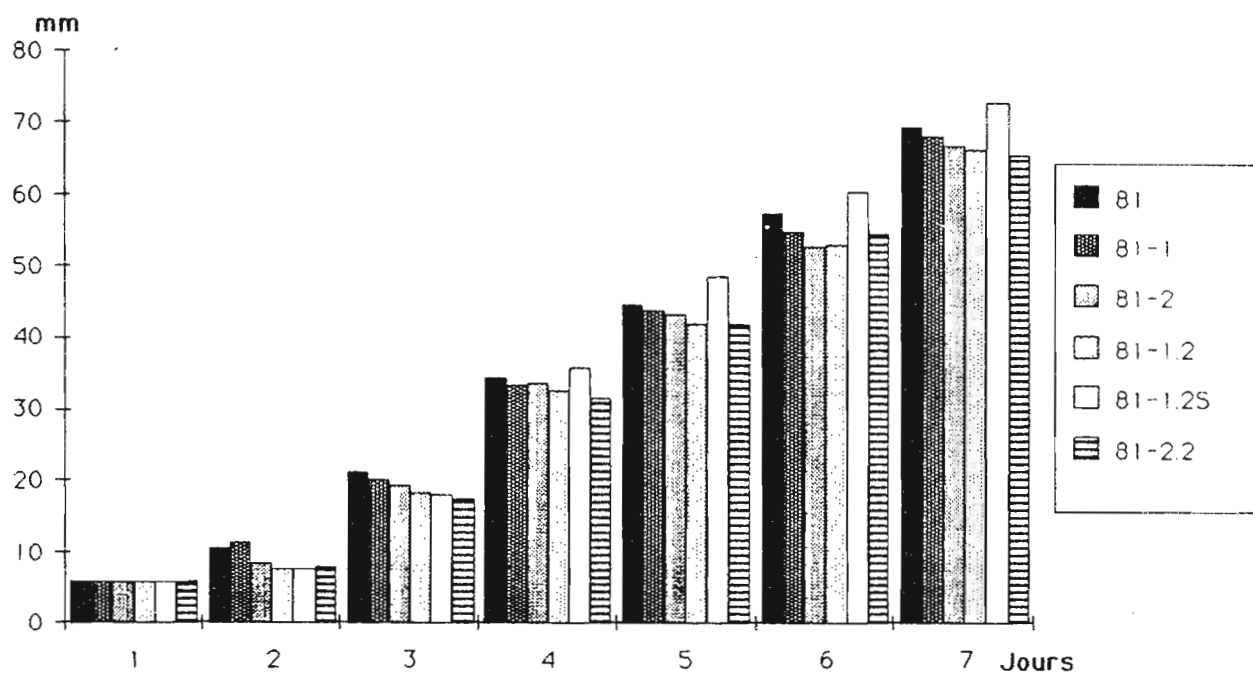


Figure IV :
Histogramme de croissance de clones de *Fusarium moniliforme*
(lignée 81).

La connaissance du déterminisme de la toxicité étant l'une des finalités de l'étude, il paraissait naturel d'aborder ce test, relatif à la capacité de production de toxines des souches. Là encore, une différence tranchée, ou à l'inverse, une tendance évolutive auraient privilégié l'une des deux hypothèses de départ.

a - Principe.

On cultive les souches ou clones sur maïs pendant deux semaines, puis après extraction des toxines, on pratique une analyse chimique des extraits, en chromatographie sur couche mince (CCM).

b - Extraction.

Le maïs fusarien cultivé en plateau (environ 300 grammes par plateau) est broyé au mixer dans un litre d'eau permutée par plateau, puis mis à macérer sous agitation pendant quatre heures : on obtient alors un extrait aqueux toxique, les toxines étant hydrosolubles.

On centrifuge à 1500 tpm pendant une demi-heure pour éliminer les résidus de grains de maïs et récupérer le surnageant, qui est réduit au rotavapor à 50°C. Le concentré est précipité à l'alcool à 95°, ce qui a pour but de flocculer les amidons restants; le précipité est éliminé par centrifugation à 2000 tpm pendant trente minutes. L'alcool est évaporé au rotavapor, puis la phase aqueuse restante est lyophilisée pour une meilleure conservation.

c - Fractionnement.

L'extrait lyophilisé est repris dans de l'eau distillée, puis déposé sur une colonne de résine Amberlite XAD2. Celle-ci est rincée à l'eau distillée puis éluée au méthanol. La phase aqueuse non toxique est éliminée et la phase méthanolique séchée au rotavapor.

L'extraction des toxines se poursuit par une partition à l'éthanol absolu. Les deux fractions qui en résultent sont toxiques; la fraction soluble comprenant les produits les moins polaires et 75 % de toxines, l'insoluble étant composé des produits les plus polaires et de 25 % de toxines.

Ces deux fractions sont étudiées en chromatographie, sur colonnes de silice en phase inverse RP8, avec des mélanges éluants méthanol/eau de différentes compositions (5/5, 6/4 et

7/3, V/V), ce qui permet d'isoler la toxine responsable de la mortalité chez le rat.

La pureté du produit est vérifiée par chromatographie sur plaque de silice (en phase inverse RP8) avec le mélange éluant MeOH/H₂O (7/3, V/V) ayant montré le meilleur pouvoir séparateur.

d - Perspectives.

Si ce test peut s'avérer très intéressant, puisque l'on a ici une analyse chimique quantitative (partant toujours du même poids de maïs contaminé avec la même quantité d'inoculum, on peut en déduire un rendement, éventuellement différent selon les clones), il est en revanche très lourd à mettre en place et demanderait à lui seul six mois de stage ; il peut être donc noté en tant que perspective prometteuse.

En effet, une culture en plateau demande entre 15 jours et trois semaines, l'extraction proprement dite (du broyage au passage à l'éthanol absolu) une semaine, et la purification et l'analyse deux autres semaines (les multiples passages sur colonnes de silice, avec rinçage de la colonne par les éluants respectifs entre chaque manipulation, demandent énormément de temps). Les colonnes étant très chères et peu disponibles, on ne peut conduire l'analyse que d'un seul extrait à la fois. Ayant au minimum une dizaine d'extraits à analyser (sans compter les analyses du laboratoire en vue de la toxicologie), ce test sera développé à partir de clones isolés par un stagiaire restant plus de six mois au laboratoire.

F - Pathologie différentielle.

Si la partie toxicologique du *Fusarium moniliforme* en Nouvelle-Calédonie a été très étudiée, l'aspect pathologie sur maïs n'a pas été négligé. Cependant, cet aspect paraissait plus aléatoire puisque dans les conditions géographiques et climatiques du Territoire, des dégâts importants sur les cultures (stalkrot ou autres...) n'ont pratiquement jamais été observés.

Certes, pratiquement 100 % du maïs calédonien est infecté par ce *Fusarium*, mais on peut parler d'infection latente, non épiphytique, et surtout grave en cas de mauvaise conservation du grain.

Etudiant les différences entre les formes physiologiques de *F. moniliforme*, il était logique que nous nous intéressions à une éventuelle pathologie différentielle sur le maïs. C'est

pourquoi nous avons mené des essais en serre sur cette plante, mais également sur melon et tomate, d'emploi plus souple et d'utilisation fréquente en phytopathologie expérimentale.

a - Maïs.

a₁ - matériel et méthodes.

a_{1.1} - matériel végétal.

Le maïs utilisé est une variété locale, de la coopérative "La Calédonienne", non fixée et hétérogène.

Les grains sont mis à germer dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre humidifié (boîte et papier étant stérilisés à l'autoclave), après désinfection par trempage dans une solution aqueuse de formol à 3 ‰ pendant quatre heures.

a_{1.2} - plantation en serre.

Nous avons testé deux supports de culture : la terre, et la vermiculite. Les grains germés sont plantés par cinq dans de grands pots de terre, par deux dans de petits pots de vermiculite. On dispose de 10 plants en terre et de 10 plants en vermiculite par souche testée.

Chaque plant reçoit, à intervalles réguliers, trois ml d'une solution nutritive préparée au laboratoire, et contenant pour un litre :

- 175 g de NH₄NO₃ (soit environ 60 g d'azote)
- 86 g de KH₂PO₄ (environ 20 g de phosphore et 30 g de potassium)
- 28 g de K₂SO₄

Tout plant reçoit également, au cours de son cycle, 10 ml d'une solution d'oligoéléments contenant pour un litre : 17,5 mg de Bore; 39,8 mg de Cuivre; 4,5 mg de Molybdène; 27,5 mg de Zinc; 130 mg de Fer et 33 mg de Manganèse.

La formule de l'engrais a été établie à partir de travaux du laboratoire d'agronomie et modifiée pour la culture en vermiculite. Pour les cultures en terre, on retire le Fer et le Manganèse, les terres de Nouvelle-Calédonie en étant très bien pourvues.

Si l'expérimentation en vermiculite est programmée pour durer 20 jours (au delà, le système racinaire ayant envahi le

substrat, les plants sont en état de stress physiologique), il est prévu de garder après ce délai un plant vivant sur les cinq contenus dans un grand pot, pour vérifier, après quelques mois de croissance si le champignon a colonisé la plante de manière systémique, sans que celle ci exprime des symptômes de fusariose.

Etant en saison fraîche, la température de la serre est relativement fixe autour de 25°C, et l'humidité relative de l'ordre de 60 %.

a_{1.3} - inoculation.

Préparation de l'inoculum :

les clones ou souches à tester sont cultivés en milieu liquide. Pour cela, quatre pastilles par clone sont découpées à l'emporte-pièce dans des cultures en boîte de Pétri, et plongées dans 50 ml de milieu liquide PD (Potato-Dextrose), dans des Erlenmeyers de 500 ml. La période de croissance est d'une dizaine de jours. On observe alors un développement mycélien important dans l'Erlenmeyer.

Il est à noter d'ailleurs que ce type de culture liquide ne favorise pas spécialement une forme physiologique plutôt que l'autre, et la pathologie que l'on observera sera plus due au potentiel pathogène des clones qu'à la forme physiologique inoculée.

Inoculation :

la culture est broyée à l'Ultra Turax pendant quelques minutes, rincée à l'eau permutée, puis la suspension est inoculée à raison de 2 ml par plantule, autour du collet, sur le milieu support (terre ou vermiculite).

a_{1.4} - notation des résultats.

Pendant 20 jours, nous vérifions quotidiennement la symptomatologie et l'étendue des dégâts. Sont notés essentiellement les effets de dépérissement, nécrose, flétrissement, mortalité, car il n'est pas possible de comparer la taille des plants ou des feuilles avec un témoin, dans des populations aussi hétérogènes.

a₂ - premiers résultats - commentaires.

Les premiers symptômes sont observés 9 à 10 jours après inoculation : flétrissement, nécroses du collet, dépérissement

Tableau II.

Mortalité de plants de maïs, inoculés avec différents clônes de *Fusarium moniliforme*, après 20 jours d'incubation.

t : terre comme support de culture.

v : vermiculite comme support de culture.

	Nombre initial de plants	Nombre de plants nécrosés après 3 semaines.	Nombre de ré-isolements de <i>F. moniliforme</i> à partir du collet.
Clône <u>113</u> 1. (provenant de la souche 113 par clônage microconidial)	terre : 10	t : 4	t : 4
	vermiculite : 10	v : 2	v : 2
Clône <u>113</u> 2. (clônage macroconidial)	terre : 10	t : 1	t : 1
	vermiculite : 10	v : 8	v : 8
Clône <u>81</u> 1. (clônage microconidial)	terre : 10	t : 0	t : 0
	vermiculite : 10	v : 8	v : 8
Clône <u>81</u> 2. (clônage macroconidial)	terre : 10	t : 0	t : 0
	vermiculite : 10	v : 1	v : 1

généralisé, apparition de mycélium à la base de la tige.

Comme on peut le voir sur le tableau II, on ré-isole systématiquement *Fusarium moniliforme* à partir des plants nécrosés (au niveau du collet), ce qui confirme sa responsabilité dans la mort des plantules. Les résultats sont assez hétérogènes, et il semble difficile de tirer une tendance générale de ce premier essai : la terre paraît être un mauvais support pour l'expression du pouvoir pathogène des cultures. En effet, quatre plants sont morts en terre pour le clone 113 1., et aucun (81 1., 81 2.) ou quasiment aucun (113 2.) dans les autres cas. On peut envisager une compétition entre microorganismes du sol dans cette terre non stérilisée, donc une perte de disponibilité de l'inoculum.

La vermiculite est vraisemblablement un meilleur support car des différences nettes entre clones sont observées. Cependant, pour la lignée 113, c'est la filiation macroconidiale qui est pathogène, alors que pour la lignée 81, c'est la filiation microconidiale. Cette expérimentation donne des résultats en "tout ou rien" (8, 9, 10 plants morts correspondent à un fort pouvoir pathogène; 1, 2 plants morts correspondent à un pouvoir pathogène faible).

Ces résultats semblent a priori contradictoires, et ne renforcent ni la théorie des métabolismes différents, ni la théorie "évolutive".

Ce test de pathologie ayant besoin d'être précisé, nous y avons apporté des compléments : clones plus nombreux issus de chaque lignée, test sur les souches sauvages 113 et 81 qui servent de référence, test sur melon et tomate, abandon de la terre comme support.

a₃ - expérience complémentaire sur maïs.

Des Erlenmeyers de milieu liquide PD sont inoculés avec des pastilles de tous les clones de la lignée 81 : 81, 81 1., 81 2., 81 1.2., 81 1.2.S., 81 2.2., 81 1.2.1., 81 1.2.2., 81 1.2.1.1., 81 1.2.1.2. Il est prévu 20 jours de culture.

Les grains de maïs germés sont plantés en vermiculite, à raison de 15 plants par clone, et sont inoculés avec 2 ml de suspension de broyat mycelien.

a₄ - résultats - interprétation.

Après douze jours de culture post inoculation, le maïs ne présente pas de symptômes de fusariose et l'on n'observe pas

de cas de mortalité.

Le délai de 20 jours n'étant pas écoulé au moment du tirage de ce rapport, le manque de résultats ne nous permet pas d'interprétation.

b - Melon - Tomate.

b₁ - matériels et méthode.

Les plants de melon et de tomate sont issus de graines récupérées dans des fruits de supermarché, car l'emploi de graines sélectionnées, traitées avec des fongicides, est évidemment exclu.

Ces plantes ne sont testées qu'en vermiculite, à raison de deux individus par pot et de cinq pots par souche de *Fusarium*. Elles reçoivent le même engrais que le maïs et sont inoculées de la même façon.

b₂ - résultats - interprétation.

Les premières expériences ont été très retardées à cause d'une germination très hétérogène, et d'une levée des plants en vermiculite particulièrement mauvaise. D'autres expériences sont prévues, en cas de meilleure maîtrise des conditions de culture de ces espèces végétales. Une manipulation avec la 113, 113 1. et 113 2. a cependant donné les résultats suivants.

Dans le cas du melon, on observe une mortalité de 100 % quelle que soit la culture, l'attaque étant assez soudaine. Les réisolements sur PDA font apparaître la présence de *Fusarium moniliforme* dans tous les cas.

Il semble que cette plante soit trop sensible, dans ces conditions expérimentales, pour mettre en évidence des différences de pouvoir pathogène entre les clones.

Concernant la tomate, on constate une mortalité de 66 %, là encore pour tous les clones. On ne peut donc pas tirer de conclusions quant à une pathologie différentielle entre les souches et clones de *Fusarium moniliforme*.

4) Conclusion.

Les résultats obtenus lors des différentes expérimentations ne nous permettent pas de répondre à la question du déterminisme de la toxicité. Aucun des marqueurs

choisis n'a amené de confirmation sur l'une ou l'autre des hypothèses de départ.

Si nous savons qu'il existe des différences morphologiques et toxicologiques entre les formes microconidiales et macroconidiales de *Fusarium moniliforme*, nous ne pouvons pas proposer, à l'heure actuelle, d'explication quant au déterminisme génétique de la toxicité et à son fonctionnement.

CONCLUSION GENERALE.

L'étude de l'optimisation des conditions de culture de la forme macroconidiale nous donne bon espoir de proposer, dans un avenir proche, une méthode rationnelle et reproductible, qui devrait permettre une production plus conséquente de toxines et donc de progresser dans la connaissance de leurs structures moléculaires et de leurs effets.

L'aspect pratique peut également être intéressant: en connaissant les conditions exactes de développement et de fructification du champignon, il sera possible d'extrapoler à la situation en silo, et de construire un modèle de prévention, du seuil de risque d'un grain (potentiellement infecté) qui, conservé à telle humidité, telle température pendant tant de temps, pourrait présenter tel danger pour le bétail.

Concernant l'étude des formes physiologiques de *Fusarium moniliforme* et du déterminisme de la toxicité, certains marqueurs, comme le test de formation de microsclérotés ou la vitesse de croissance, ont montré leurs limites.

Malgré des échecs dus à une succession d'impondérables, nous fondons beaucoup d'espoirs sur la combinaison d'autres marqueurs. En effet, il devrait être possible de trouver une corrélation entre des variations protéiques en électrofocalisation et des variations quantitatives de toxines produites, le tout lié éventuellement à une dérive macroconidiale (une corrélation avec le pouvoir pathogène n'étant pas obligatoire puisque les souches les plus toxigènes ne sont pas forcément les plus pathogènes sur maïs).

Il est nécessaire pour cela de créer des lignées complètes (avec des microconidies et des macroconidies à

chaque génération et pour chaque clone) et de purifier les cultures de leurs contaminants bactériens, puis de recommencer les expériences en maîtrisant mieux les techniques. Alors seulement, les résultats seront interprétables et les hypothèses de départ vérifiées ou non.

Ce stage a été l'occasion de participer à un programme de longue durée et de m'intégrer à une équipe de chercheurs et à leurs méthodes de travail.

Il m'a également permis d'utiliser des appareils et d'acquérir des techniques indispensables à tout travail de laboratoire, tout en ne négligeant pas les investigations sur le terrain.

Mais ce travail m'a surtout fait comprendre ce qu'est une recherche avec, d'un côté, la théorie, et de l'autre, la réalisation pratique, capricieuse, ne livrant des résultats qu'au prix de nombreux efforts, tâtonnements et remises en question.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

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-YOUSEF (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.* 1968, 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, 393-394.
4. BETINA (V.). Mycotoxins - Production, isolation, separation and purification - Ed. ELSEVIER. 1984, 528 pp.
5. 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.
6. 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.
7. BUGNICOURT (F.). Sur une maladie du maïs. Publication de l'Institut Français d'Océanie, ORSTOM, 1958.
8. BURMEISTER (H.R.), CIEGLER (A.), VESONDER (R.F.). Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRRL 6322 : Purification and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 37 (1) : 11-13.
9. CHANG (L.O.), STEWARD (L.C.). Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. *Nature*. 1962, 193 : 756-759.
10. CLARE (B.G.). Starch-gel electrophoresis of proteins as an aid in identifying fungi. *Nature*. 1963, 200 : 803-804.
11. CLARE (B.G.), ZENTMYER (G.A.). Starch-gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. *Phytopathology*. 1966, 56 : 1334-1335.

12. 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.
13. DANIELS (B.A.). Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. *Plant Disease*. 1983, 67 (6) : 609-611.
14. DODD (J.L.). Grain sink size and predisposition of *Zea mays* to stalk rot. *Phytopathology*. 1979, 70, (6) : 534-535.
15. DOMENECH (J.), BREGEAT (D.), BOCCAS (B.). Les mycotoxines en pathologie animale : Interêt de leur étude en Nouvelle-Calédonie. *Rev. Elev. Med. Vet. Nouv. Calédonie*. 1982, (1) : 11-18.
16. DOMENECH (J.), BOCCAS (B.), PELLEGRIN (F.), LAURENT (D.), KOHLER (F.). Etude de la fusariose du maïs à *Fusarium moniliforme* en Nouvelle-Calédonie, et de la pathologie épine associée : la leucoencéphalomalacie toxique. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 1984, 37, (3) : 253-259.
17. DOMENECH (J.), BOCCAS (B.), PELLEGRIN (F.), LAURENT (D.), KOHLER (F.), LAMBERT (C.), MAGNOL (J.). Equine leucoencephalomalacia in New Caledonia. *Australian Veterinary Journal*. 1985, 62, (12) : 422-423.
18. FOLEY (D.C.). Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. 1962, 52 : 870-872.
19. GELDERBLUM (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.
20. GILL (H.S.), KHARE (M.N.), POWELL (D.). The use of polyacrylamide gel electrophoresis in the identification of *Xanthomonas fragariae* Ken & King. *Transactions of Illinois State Academy of Science*. 1968, 61, (2) : 177-181.
21. IWANOFF (X.), YUAN CHANG-kuo, FANG SHIH-chich. Uber die toxische Enzephalomalazie (Moldy corn poisoning) der Einhufer in China. *Archiv fur experimentelle Veterinarmedizin*. 1975, 11 : 1035-1056.
22. JEMMALI (M.). Les mycotoxines dans l'alimentation - IIIème Symposium international I.U.P.A.C. sur les mycotoxines dans l'alimentation - édition C.N.R.S., 1977 : 403-1042.
23. JOFFE (A.Z.), PALTI (J.), ARBEL-SHERMAN (R.). *Fusarium moniliforme* Sheld. in Israël (*Gibberella fujikuroi* Saw &

Wollenv.). Mycopathologia et Mycologia applicata. 1973, 50 (2) : 85-107.

24. KELLERMAN (T.S.), MARASAS (W.F.O.), PIENAAR (J.C.), NAUDE (T.W.). A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. A preliminary communication. Onderstepoort. J. Vet. Res. 1972, 39 (4) : 205-208.

25. KING (S.B.), SCOTT (G.F.). Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. 1981, 71 (12) : 1245-1247.

26. KOHLER (F.), PELLEGRIN (F.), LAURENT (D.). La toxicogénèse chez *Fusarium moniliforme*. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 1988. A paraître.

27. KRIEK (N.P.J.), MARASAS (W.F.O.), STEYN (P.S.), VAN RENSBURG (S.J.), STEYN (M.). Toxicology of a moniliformin-producing strain of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* isolated from maize. Toxicol. 1977, 15 : 579-587.

28. 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.

29. 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.

30. KURATA (H.), UENO (Y.). Toxigenic Fungi - Their toxins and health hazard. Proceedings of the Mycotoxin symposia - Third International Mycological Congress, Tokyo, 1983 - Ed. ELSEVIER, 1984, 363 pp.

31. LAFONT (J.), LAFONT (P.), GAILLARDIN (M.). Sensibilité de l'embryon de poulet à des mycotoxines. Bull. Acad. Vét. de France. 1979, 52 : 119-124.

32. LAURENT (D.), PELLEGRIN (F.), KOHLER (F.), LAMBERT (C.), HAMEURT (J.), BOCCAS (B.), DOMENECH (J.). Toxicité aigüe sur canetons Pékin de souches de *Fusarium moniliforme* isolées du maïs en Nouvelle-Calédonie - Microbiologie, Aliments, Nutrition. 1986, 5 : 11-15.

33. LAURENT (D.), KOHLER (F.), PELLEGRIN (F.), GERMANI (Y.), BEGAUD (E.). Test biologique pour l'étude de la toxicité de *Fusarium moniliforme* Sheldon. Microbiologie, Aliments,

Nutrition. 1988. A paraître.

34. LAURENT (D.), PELLEGRIN (F.), KOHLER (F.), LAMBERT (C.), FOUQUET (L.), BOCCAS (B.). *Fusarium moniliforme* du maïs en Nouvelle-Calédonie. Toxicologie animale. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 1988. A paraître.

35. LAVILLE (E.), FOLLIN (J.C.). Variations chez le *Fusarium oxysporum* fsp *cubense*. Comportement des lignées issues de différents organes de multiplication. Fruits. 1966, 21, (6) : 261-268.

36. 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.

37. LEY (W.B.). Mycotoxins in stored corn linked to fatal equine disease. Feedstuffs, 1985, 57 (4) : 7.

38. LLEWELLYN (J.W.), FLAHERTY (B.). The detection and estimation of soya protein in food products by isoelectric focusing. J. of Fd. Technol. 1976. 11 : 555-563.

39. LUNSFORD (J.M.), FUTRELL (M.C.), SCOTT (G.E.). Maternal influence on response of corn to *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. 1974, 65 : 223-225.

40. MARASAS (W.F.O.). *Fusarium moniliforme* : a mycotoxicological miasma. in STEYN (P.S.) and VLEGGAAR (R.). Mycotoxins and Phycotoxins. 1986. Elsevier Science Publisher, Amsterdam : 19-28.

41. MARASAS (W.F.O.), KELLERMAN (T.S.), PIENAAR (J.G.), NAUDE (T.W.). Leucoencephalomalacia : a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. Onderstepoort J. Vet. Res. 1976, 43 (3) : 113-122.

42. 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.

43. MARASAS (W.F.O.), WEHNER (F.C.), VAN RENSBURG (S.J.), SCHALKWYK (D.J.). Mycoflora of corn produced in human oesophageal cancer areas in Transkei, Southern Africa. Phytopathology. 1981, 71 (8) : 792-796.

44. 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.

45. MARASAS (W.F.O.), NELSON (P.E.), TOUSSOUN (T.A.). Toxinogenic *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 1984.

46. 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.

47. NEISH (G.A.), FARNWORH (E.R.), GREENHALGH (R.), YOUNG (J.C.). Observations on the occurrence of *Fusarium* species and their toxins in corn in eastern Ontario. Canadian Journal of Plant Pathology. 1983, 5 : 11-16.

48. PELLEGRIN (F.). Dynamique des populations de *Phytophthora* phytopathogènes dans les sols tropicaux. 1980. THESE - Orsay.

49. PELLEGRIN (F.), KOHLER (F.), LAURENT (D.), FOUQUET (L.), KONGHOULEUX (J.), BOCCAS (B.), DOMENECH (J.), STACHURSKI (F.). La fusariose du maïs et les mycotoxines fusariennes en Nouvelle-Calédonie. 1987. Rapport de convention CEE-ORSTOM. Multigraphié. 1. Rapport de synthèse 66 pages. 2. Annexes 200 pages.

50. PELLEGRIN (F.), KOHLER (F.), LAURENT (D.), BOCCAS (B.). *Fusarium moniliforme* en Nouvelle-Calédonie. Relations hôte-parasite. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 1988. A paraître.

51. PELLEGRIN (F.) et al. Potentiel toxigène des souches de *F. moniliforme* parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie. Microbiologie, Aliments, Nutrition. 1986, 4 : 157-161.

52. RABIE (C.J.), LUBBEN (A.), LOUM (A.I.), RATHBONE (E.B.), STEYN (P.S.), VLEGGAR (R.). Moniliformin, a mycotoxin from *Fusarium fusarioïdes*. J. Agric. Food Chem. 1978, 26 (2) : 375-379.

53. 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.

54. SAMUELSSON (G.). Preliminary chemical characterization of pharmacologically active compounds in aqueous plant extracts. Journal of Ethnopharmacology. 1985, 14: 193-201.

55. SHIMIZU (Y.). Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds. *Journal of Natural Products*. 1985, 48 (2) : 223-235.
56. STEYN (M.), THIEL (P.G.), VAN SCHALKWYK (G.C.). Isolation and purification of moniliformin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1978, 61 (3):578-580.
57. STEYN (P.S.), VLEGGAR (R.). Mycotoxins and Phycotoxins. Collection of invited papers presented at the Sixth International I.U.P.A.C. Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins - Ed. ELSEVIER. 1986, 545 pp.
58. WILSON (B.J.), MARONPORT (R.R.). Causative fungus agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *Veterinary Record*. 1971, 88 : 484-486.

