

CONVENTIONS
SCIENCES DE LA VIE

PHYTOPATHOLOGIE

N° 2

1988

La fusariose du maïs
et les mycotoxines fusariennes
en Nouvelle Calédonie

* Frédéric PELLEGRIN

* Frantz KOHLER

** Dominique LAURENT

* LABORATOIRE DE PHYTOPATHOLOGIE

** LABORATOIRE DE CHIMIE DES
SUBSTANCES NATURELLES

CONVENTION ORSTOM / TERRITOIRE
AVENANT N° 3

DIRECTION DU DEVELOPPEMENT
DE L'ECONOMIE RURALE
DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

ORSTOM

Centre de Nouméa

CONVENTIONS
SCIENCES DE LA VIE

PHYTOPATHOLOGIE

N° 2

1988

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

* Frédéric PELLEGRIN

* Frantz KOHLER

** Dominique LAURENT

* LABORATOIRE DE PHYTOPATHOLOGIE

** LABORATOIRE DE CHIMIE DES
SUBSTANCES NATURELLES

CONVENTION ORSTOM / TERRITOIRE
AVENANT N° 3

**DIRECTION DU DEVELOPPEMENT
DE L'ECONOMIE RURALE
DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE**

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

The logo for ORSTOM, featuring the word "ORSTOM" in a stylized, bold, black font with a white outline. The letters are interconnected and have a slightly irregular, hand-drawn appearance.

CENTRE DE NOUMEA

NOTE PRELIMINAIRE.

Ce rapport concerne l'avenant n° 3 modificatif à la convention pour l'étude de la fusariose du maïs en Nouvelle-Calédonie.

Il récapitule les résultats partiels ou définitifs de l'ensemble de la convention et leur interprétation.

Les implications de ces recherches dépassant largement le cadre du Territoire, elles se poursuivent avec pour objectifs d'identifier la structure des molécules toxiques isolées et de caractériser les formes physiologiques les plus toxicogènes du parasite.

Les organismes ou services suivants ont collaboré ou collaborent à ces travaux :

- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM Centre de Recherche du Vézinet) ;
- Unité de physiologie cellulaire comparée de l'Université d'ORSAY ;
- Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ;
- Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire Tropicale (IEMVT de Nouvelle-Calédonie) ;
- Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie ;
- Laboratoire de diagnostics vétérinaires (SVPA de Nouvelle-Calédonie) ;
- Centre de Recherche et d'Expérimentation Agricole (CREA de Nessadiou - Nouvelle-Calédonie).

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	1
ETIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE DE LA FUSARIOSE DU MAIS	
1. Identification des espèces parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie	5
2. Taux de contamination du grain produit en Nouvelle-Calédonie	6
3. Les voies d'infection empruntées par <i>F. moniliforme</i>	9
4. Etude de l'évolution de la fusariose interne au cours du cycle cultural du maïs au champ	10
5. Etude de l'évolution de la fusariose interne au cours d'un cycle cultural en serre	10
6. Discussion des résultats obtenus au champ et en serre	11
7. Histologie de l'infection	13
8. Influence de la nature du sol, des amendements, et des choix variétaux sur le taux d'infection du grain produit en Nouvelle-Calédonie	16
9. Recherche de variétés génétiquement résistantes	18
10. Conclusion	21
ETUDE DE LA TOXICOGENIE DU FUSARIUM MONILIFORME.	
A/ RECHERCHE D'UN TEST BIOLOGIQUE.	
1. Injection intrapéritonéale chez la souris adulte	22
2. Injection intrapéritonéale chez le rat de 20 jours.	24
3. Injection dans l'oeuf embryonné de poule.	25
4. Dépôt cutané sur le rat.	25

5. Administration "per os" chez la souris.	26
6. Administration "per os" chez le rat adulte.	28
7. Administration "per os" chez le rat de 20 jours.	28
8. Administration "per os" chez le poussin.	31
9. Administration "per os" chez le caneton Pékin.	32
10. Conclusion.	36
B/ RECHERCHE DE L'EXTRAIT TOXIQUE.	
1. Administration par sondage oesophagien chez le rat de 20 jours.	36
2. Administration par sondage naso-oesophagien chez le cheval.	37
3. Conclusion	39
C/ FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AQUEUX.	
1. Solubilisation par différents solvants.	45
2. Extraction par différents solvants.	46
3. Précipitation par différents solvants.	46
4. Adsorption sur charbon actif.	46
5. Adsorption sur résine Amberlite XAD2.	46
6. Dialyse.	48
7. Ultrafiltration Amicon.	48
8. Séphadex.	48
9. Couplage de plusieurs procédés.	48
10. Schéma adopté.	53

D/ CONCLUSION ET PERSPECTIVES.

1. Tests biologiques.	55
a) cultures de cellules	
b) injection intrastomacale chez le souriceau	
c) tests bactériens de génotoxicité	
d) tests d'électrophysiologie.	
2. Chimie	56
a) double toxicité	
b) régénération de la toxicité	
CONCLUSION	58

INTRODUCTION.

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

Ces espèces ont été identifiées sur tous les continents, dans toutes les grandes zones de culture du maïs, avec des fréquences relatives qui varient en fonction des conditions géographiques ou climatiques (39). Ainsi, *F. graminearum* prédomine en Italie et dans le Sud de la France, alors qu'en Europe de l'Est *F. moniliforme* est plus fréquemment isolé pendant la période la plus chaude de l'été, avant d'être supplanté par *F. graminearum* qui se développe plutôt à l'automne, lorsque le maïs atteint sa maturité. Sur le continent nord américain où la culture du maïs s'étend sur plus de trente millions d'hectares, les trois espèces sont présentes. *F. moniliforme* est le plus répandu, avant *F. graminearum* et *F. subglutinans*, mais, cet ordre peut varier au cours des années et d'une région à l'autre (39,42). Il n'est pas rare cependant que des lots de grains soient contaminés à 100 % par la première espèce.

En Afrique, et plus généralement dans les régions tropicales, *F. moniliforme* (27) et, dans une moindre mesure, *F. subglutinans* sont les espèces les plus fréquemment présentes sur le maïs, *F. graminearum* apparaissant surtout dans les zones d'altitude élevée au climat plus frais. Ce schéma est respecté en Australie où *F. graminearum* précède *F. subglutinans* en Nouvelle-Galles du Sud au climat tempéré doux, alors que *F. moniliforme* prévaut au Queensland qui s'étend de part et d'autre du tropique du Capricorne.

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

Les espèces pathogènes peuvent se développer sur tous les organes reproductifs ou végétatifs du maïs tout au long du cycle cultural. Chacune de ces espèces intervient seule, ou plus rarement associée à d'autres au sein d'un complexe plurispécifique plus ou moins pathogène selon les circonstances et les conditions d'environnement.

Les attaques de *Fusarium* sur le maïs se traduisent par divers symptômes : fontes de semis, pourriture des tiges, des épis, ou infection latente ou active du grain (39).

Les fontes de semis provoquées par les *Fusarium* sont toujours liées à des conditions climatiques anormales (1). Ainsi, un excès d'humidité du sol accompagné de températures basses, inférieures à 22°C, favorisent l'attaque des plantules, par *F.moniliforme*.

Il est cependant rare que ce faciès revête un caractère épiphytique grave, notamment en Nouvelle-Calédonie où la fonte de semis imputable à *F. moniliforme* est un phénomène exceptionnel.

De la même manière, la pourriture de la tige (Stalkrot) n'est pas à l'heure actuelle une maladie fréquente sur le territoire, alors qu'en Australie et aux Etats-Unis (15), ce type d'attaque par *F.moniliforme* et *F.graminearum* cause des dommages importants dans les régions les plus humides. La pourriture du pied se manifeste souvent au moment de la floraison mâle. La base de la tige montre alors une décoloration brunâtre particulièrement marquée au niveau des premiers noeuds, les tissus internes sont également colorés de brun et desséchés. Le plant qui manifeste ces symptômes est généralement condamné par la désorganisation définitive du système vasculaire qu'entraîne le développement du parasite. Les plants atteints sont fragiles, cassants, et la maladie aboutit souvent à une "verse parasitaire" précédant la mort de la plante.

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

Le genre *Fusarium* est en effet un des principaux producteurs de mycotoxines. Vingt quatre de ses espèces sont toxicogènes (13,33). Elles le sont à des degrés divers, chacune d'entre elles se caractérisant par sa propre gamme de toxines. Au total, plus de trente mycotoxines différentes ont jusqu'à ce jour été identifiées chez les *Fusarium* (18,21,30,33,38,54). La plupart appartiennent à la famille chimique des trichothécènes qui compte des molécules puissamment zootoxiques, en particulier chez les mammifères.

Toutes les espèces associées au maïs sont capables de produire des toxines. A cet égard, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. tricinctum*, *F. graminearum* et *F. moniliforme* sont considérées comme les plus redoutables. Ces espèces ont été impliquées dans plusieurs maladies humaines, comme l'aleucie toxique alimentaire ou le cancer de l'oesophage (28,31,37). Leur responsabilité est également reconnue dans une longue liste de maladies animales. Elles sont à l'origine de syndromes hépatiques, neurologiques, oestrogéniques, hémorragiques ou émétiques, ou induisent chez les animaux intoxiqués des refus de nourriture (4). Certaines toxines, comme la toxine T2, ont très probablement des propriétés carcinogéniques, en particulier sur la peau et le tractus digestif. La diversité des substances toxiques produites par les *Fusarium* et notamment par les espèces associées au maïs, la variété et la gravité des symptômes induits chez de nombreuses espèces animales et probablement chez l'homme, font de l'étude de la toxicogénie de ces champignons un sujet de recherche d'intérêt général qui se développe activement au plan international.

En Nouvelle-Calédonie, la première relation de la fusariose du maïs date de 1958. Elle est due à Bugnicourt (10). Dès cette époque, la présence de *F. graminearum* et de *F. moniliforme* avait été identifiée dans plusieurs secteurs du territoire, et surtout dans la région de Bourail où elle occasionnait régulièrement des dommages sensibles en s'attaquant aux épis.

En 1981, notre attention se porta à nouveau sur ce problème après qu'une épizootie se fut déclarée à Nouméa chez une quarantaine de chevaux, entraînant la mort de cinq d'entre eux (16). Les premières investigations montrèrent alors 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 qu'un cheval était mort de leucoencéphalomalacie toxique après avoir ingéré du maïs fortement infesté par ce même *Fusarium*.

La leucoencéphalomalacie toxique équine (LEM) est la seule maladie dont l'origine soit liée d'une façon certaine à l'ingestion d'aliments contaminés par *F. moniliforme* (3,20,22,24,33,39,44). Cette maladie neurotoxique des équidés se caractérise par des lésions nécrotiques et liquéfactives de la substance blanche des hémisphères cérébraux. La LEM est connue depuis 1850 dans les états producteurs de maïs des U.S.A., où elle provoqua la mort de milliers de chevaux au début du siècle, puis dans les années 30 (7). Très récemment encore, en 1978-1979, la LEM a tué plusieurs centaines de chevaux dans les états du "middle west" et du sud ouest du continent nord américain (4,34). La maladie a également été observée en Argentine, en Chine, en Egypte et en Afrique du Sud. En Europe des cas de LEM, relativement peu nombreux, ont été signalés en France, en Allemagne et en Grèce.

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

Les premières observations de cette maladie en Nouvelle Calédonie ont brutalement révélé la réalité du danger que représentent les mycotoxines dans l'alimentation des animaux, et peut être dans celle des hommes. Cette constatation a conduit les responsables de l'agriculture du territoire à souhaiter que des recherches soient entreprises sur les *Fusarium* toxicogènes parasitant le maïs. Ces recherches ont été conduites par l'ORSTOM en association avec l'I.E.M.V.T. dans un premier temps puis, par l'ORSTOM avec la collaboration du Laboratoire Vétérinaire Territorial. Elles poursuivent un double objectif : parvenir à une connaissance approfondie de l'étiologie et de l'épidémiologie de la fusariose du maïs, d'une part, identifier les mycotoxines produites par les espèces de *Fusarium* associées à cette plante en Nouvelle Calédonie et déterminer leur toxicité sur les animaux d'élevage, d'autre part. Ces études ont pu se développer grâce à l'aide financière de la CEE (Direction Générale de la Science, de la Recherche et du Développement). Le présent rapport se propose de faire la synthèse des résultats obtenus au cours de ces recherches.

Quatre rapports de campagne ayant déjà été publiés, pour ne pas alourdir le texte, certains résultats détaillés sont renvoyés en annexe.

ETIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE DE LA FUSARIOSE DU MAIS.

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

Plusieurs centaines de souches de *Fusarium* ont été récoltées sur les différents organes de la plante, épis, tiges, racines, au cours des différents cycles culturaux et dans toutes les zones de culture du maïs. Deux espèces de *Fusarium* ont été identifiées (9) : *F. moniliforme* et *F. graminearum*. La première espèce est très largement dominante, elle représente en fait la presque totalité des isolats. La seconde n'a été que rarement trouvée sur les feuilles et les tiges.

Nos identifications sont fondées sur le système récemment mis au point par NELSON, TOUSSOUN, et MARASAS (40), qui établit une synthèse de tous les systèmes taxonomiques antérieurs. Les caractéristiques des deux espèces sont les suivantes :

- *Fusarium moniliforme* Sheldon.

Cette espèce appartient à la section LISEOLA. Sur le milieu de référence PDA (Potato, Dextrose, Agar), elle 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.

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

Les macroconidies, suivant les conditions de cultures, sont rares ou abondantes. Les microconidies sont portées par des conidiophores à monophialides et sont disposées typiquement en chaînettes parfois en fausses têtes. Dans une ambiance à forte humidité elles se forment en abondance. Les chaînettes de microconidies issues de monophialides d'une part, l'absence de chlamydospores d'autre part sont les caractères principaux permettant la détermination de l'espèce.

La forme sexuée de *Fusarium moniliforme* est *Gibberella fujikuroi*.

- *Fusarium graminearum* Schwabe.

Cette espèce appartient à la section DISCOLOR.

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

Les chlamydospores se forment assez tardivement dans les cultures, soit à partir de macroconidies, soit à partir de segments d'hyphe mycéliennes.

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

La principale caractéristique qui permet l'identification de cette espèce dans la section *Discolor*, est la taille et la forme des macroconidies produites sur le milieu de référence C.L.A. (pétales d'oeillet, agar) de NELSON et al. (45).

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

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

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

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

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

La formation des mycotoxines peut être antérieure à la récolte et accompagner la colonisation du grain en cours de maturation au champ, si le développement du parasite est facilité par des conditions d'environnement favorable (humidité, température). Elle peut aussi survenir après la récolte, si le grain n'est pas correctement séché ou (et) s'il est conservé dans des conditions induisant une reprise de la

croissance mycélienne du *Fusarium*. Il convient d'ailleurs de souligner que cette reprise de croissance sur un grain fortement contaminé et placé dans un environnement humide et chaud est extrêmement rapide et brutale : la quantité de spores infectieuses produites dans ces conditions après 48 heures d'incubation en chambre humide à 26°C atteint des chiffres considérables - jusqu'à 200 millions de microconidies par gramme de grains - témoignant de la vigueur de la croissance du champignon.

Le maïs produit en Nouvelle-Calédonie est presque toujours contaminé par *F.moniliforme* (Tableau 1), et les taux d'infection sont souvent très élevés. Ils le sont particulièrement chez les échantillons de grains récoltés en juin ou juillet, période souvent très humide, marquée par des températures nocturnes assez basses et des températures diurnes qui restent élevées, conditions qui favorisent le développement des maladies fongiques.

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

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

Les causes de ce surcroît de sensibilité à la forme la plus dommageable de la fusariose ne sont pas totalement élucidées, mais il est très probable qu'elles soient directement liées aux conditions climatiques du début de l'hiver. A cette saison, les températures moyennes sont en baisse, l'amplitude des variations thermiques jour-nuit augmente, et l'humidité demeure très élevée. Ces conditions ralentissent la maturation du grain qui conserve plus longtemps une teneur en eau élevée, offrant ainsi un substrat favorable au développement du *Fusarium* et, par voie de conséquence, à la production de mycotoxines.

TABLEAU 1.

TAUX D'INFECTION DU GRAIN RECOLTE EN NOUVELLE CALEDONIE.

Lieu de récolte	Variété de maïs	% grain infecté
GOMEN (ex Mediflor)	XL 81	100
GOMEN (Frouin)	XL 81	100
GOMEN (Silo)	XL 81	100
TAMOA	"Dent de cheval"	90
TAMOA	idem	100
KARIKATE	XL 81	20
KARIKATE	HY C9	50
KARIKATE	GH 128	30
TAMOA	GH 390	80
TAMOA	PX 422	10
TAMOA	PX 49	10
TAMOA	Sergeant	10
POUEMBOUT	"locale"	100
OUITCHAMBO	?	100
GOMEN	?	100
TAMOA	?	100
GOMEN	GH 5004	12
KOUMAC	GH 5004	20
TAMOA	?	100

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

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

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

la présence de *Fusarium* parmi les espèces de sa mycoflore naturelle.

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

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

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

Dans la majorité des cas, un équilibre s'établit ainsi entre le plant de maïs et le *Fusarium* qui se comporte en parasite faible à la surface de la plante. Parfois cependant, cet équilibre est rompu au profit du parasite qui peut alors causer de graves dommages. Si cette rupture intervient pendant la croissance végétative de la plante, le champignon provoque la pourriture de la tige et la mort du plant, mais ce faciès est rare sur le Territoire. Il peut néanmoins se présenter à la suite d'un "stress" hydrique important : par exemple lorsqu'un champ a subi, juste après la floraison, une période de grande sécheresse suivie d'une période d'humidité excessive.

Pour certains auteurs, la voie externe d'infection la plus fréquemment utilisée par *F. moniliforme* passerait par les soies au moment de l'épiaison (24). Les conidies germant sur celles-ci peuvent en effet donner naissance à des filaments mycéliens capables de progresser jusqu'au grain et de l'infecter dès sa formation.

La seconde voie d'infection empruntée par le *Fusarium* est interne (17). Cette forme d'infestation, très fréquente, est discrète. La plante ne manifeste aucun symptôme révélant la présence du parasite qui ne peut être mis en évidence que par des isollements réalisés à partir des tissus internes de la plante colonisée.

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

L'infection interne, ou systémique, d'un plant de maïs peut être d'origine endogène ou exogène. Elle est endogène si les semences étaient contaminées avant leur plantation (1,14). Elle est exogène si les souches de *Fusarium* vivant dans le sol pénètrent dans les racines de la plantule après germination de la graine (8).

L'une des premières questions à laquelle il convient d'apporter une réponse concerne la fréquence relative de ces deux sources d'infection : contamination préexistante des semences, ou néo-infection de la plantule à partir de l'inoculum présent dans le sol. Les méthodes de contrôle que l'on peut envisager de mettre en oeuvre dans ces deux éventualités ne sont en effet pas les mêmes (41).

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

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

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

- Aucune des plantations étudiées n'était indemne de *Fusarium*.

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

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

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

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

Les enseignements suivants peuvent être tirés de ces expérimentations.

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

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

L'ensemble des résultats des isollements positifs sur les différentes variétés permet de proposer une représentation du développement de la fusariose interne (Figure 1), au cours du cycle cultural de la plante.

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

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

Plusieurs hypothèses sont envisageables.

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

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

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

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

Certains auteurs pensent (17) que les tissus nodaux, qui se trouvent ainsi séparés, peuvent transporter les éléments fongiques en état latent qui les infectent, sans que les tissus internodaux en élongation rapide soient eux-mêmes envahis. Au terme de la croissance végétative du plant - soit autour de la huitième semaine - la plupart des noeuds serait donc ainsi potentiellement infectés. Le *Fusarium* passerait alors progressivement de l'état latent à une croissance active à partir de chaque noeud, et entreprendrait la colonisation des entre-noeuds.

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

Plusieurs auteurs se sont intéressés à ce problème (25,26,43). Leurs travaux tendent à montrer que la fusariose interne procède en fait d'une combinaison des trois modes d'infection, mais que la voie systémique joue un rôle prédominant.

Une étude histopathologique récente a en effet apporté des informations très précises sur le processus infectieux observé chez des plants de maïs doux issus de semences naturellement contaminés par *F. moniliforme* (26).

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

La véritable colonisation de la tige débute donc juste après la floraison au moment où s'amorce, dans la plante, un changement métabolique important. La fin de la floraison induit en effet une rapide diminution de la teneur en sucres solubles, conséquence de la mobilisation des glucides par l'épi en formation et de la réduction presque concomitante du rendement photosynthétique due au vieillissement du feuillage. Le véritable "puit métabolique" - selon l'expression de MESSIAEN (41) - ainsi créé par le drainage des sucres vers l'épi, ralentit le métabolisme des tissus racinaires dont les défenses cellulaires perdent de leur efficacité, ouvrant la voie aux micro-organismes du sol. Les racines attaquées ont alors tendance à dégénérer, ce qui accélère la sénescence des organes aériens de la plante et offre au *Fusarium* un terrain plus favorable à sa croissance.

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

7 - HISTOLOGIE DE L'INFECTION.

Une première tentative de marquage à l'aide d'un marqueur fluorescent (sel disodique du 4,4'-bis (4-anilino-6-diethylamino-s-triazin-2-ylamino)-2,2'-stilbene-disulfonic acid : non commercial : Calcofluor White M2 R New' ou Celluflor) s'est révélée être un échec. Le champignon en cours

de croissance dans un milieu de culture absorbe bien le marqueur fluorescent additionné à celui-ci mais, après rinçage du mycélium et transfert sur un milieu non marqué, on constate que le marqueur ne migre pas dans les segments mycéliens néoformés.

Une deuxième technique a donc été expérimentée en utilisant un précurseur spécifique marqué au ^{14}C : la thymine. Cette base pyrimidique ne se trouve que dans l'ADN nucléaire ce qui devrait éviter les diffusions intempestives par l'intermédiaire des ARN ribosomiques, de transferts ou messagers et les reprises par le métabolisme de l'hôte (2,5,12,29).

Différents essais ont montré que la composition du milieu de culture est déterminante pour l'absorption du précurseur radioactif. Le milieu le plus efficace est composé de 10 g de glucose, 0,5 g de sulfate de magnésium, 0,20 g de phosphate monopotassique, 0,1 g de nitrate d'ammonium pour un litre d'eau. Le pH est ajusté à 6,9 avec de l'ammoniaque.

En 10 jours de croissance, *F. moniliforme* incorpore 10 à 20 % de la radioactivité présente dans le milieu.

Les plants de maïs sont cultivés en pots dans une enceinte isolée, chaque plant est inoculé à la levée avec un broyat de *Fusarium* contenant 0,25 microcuries sous la forme d'un anneau mycélien cerclant la plantule.

Périodiquement six plants sont sacrifiés :

- Deux sont consacrés à la recherche du parasite sur milieu sélectif Potato - Dextrose - Agar complémenté en antibiotiques.

- Deux sont fragmentés noeud par noeud et la recherche de radioactivité est faite sur des aliquotes broyées finement, immergées dans de l'Aquasol II et comptées en scintillation sur un appareil Packard Tri-Carb 300.

- Les deux derniers sont analysés par historadiographie.

Historadiographie.

Les fragments de plants (noeuds, tissus du rachis) sont fixés dans du F.A.A. (Formol, Acide acétique, Alcool).

Après rinçage abondant (24h à l'eau courante), les coupes sont effectuées et pelliculées sur lame de microscope.

Le film radiosensible utilisé est du Kodak AR10, le temps d'exposition en chambre noire est de 2 mois avant révélation, fixation et examen au microscope.

RESULTATS

- Prélèvement 1 : 42 jours de croissance.

Isolements : positifs jusqu'au noeud 3.

Scintillation : radioactivité supérieure au bruit de fond jusqu'au noeud 4.

Historadiographie : Présence de Fusarium au niveau du plateau et du noeud 2.

- Prélèvement 2 : 57 jours de croissance.

Isolements : positifs jusqu'au noeud 6.

Scintillation : radioactivité supérieure au bruit de fond jusqu'au noeud 5.

Historadiographie : Présence de Fusarium au niveau du plateau et du noeud 4.

- Prélèvement 3 : 77 jours de croissance.

Isolements : positifs jusqu'au noeud 9.

Scintillation : radioactivité supérieure au bruit de fond jusqu'au noeud 9.

Historadiographie : Traces radioactives au niveau du plateau (dans les parois des cellules) et au niveau du noeud 7 (plaquées dans un vaisseau du xylème).

- Prélèvement 4 : 140 jours de croissance - maturité.

Isolements : 3 épis positifs sur 6 prélevés.

Scintillation : pas de résultats significatifs car le rachis des épis, très lignifié se prête mal au broyage et entraîne un quenching très important.

Historadiographie : Présence de Fusarium dans le noeud d'attache de l'épis et dans la tige de l'épis.

Les "traces" de *Fusarium* en historadiographie sont rares, environs 400 coupes ont été examinées et nous n'avons décelé la présence de traces radioactives que sur une vingtaine d'entre elles, toutes cantonnées dans certains tissus de soutien (sclérenchyme) ou dans les vaisseaux du xylème. Cette présence quasi-saprophytique de *F. moniliforme* justifie l'absence de symptômes chez la plante mais suffit à expliquer la colonisation des grains puisque à maturité des traces de radioactivité se retrouvent dans les épis.

Ces résultats montrent une bonne correspondance entre les différentes techniques de mise en évidence du *Fusarium* dans la plante. Ils sont à rapprocher des résultats obtenus dans l'étude de la dynamique de l'infection (Figure I) au champ et en serre et semblent prouver que la fusariose du maïs relève d'une contamination tellurique des plantules (néocontamination des semences ou présence de *Fusarium* dans la terre) et d'une infection systémique classique caractérisée par une invasion progressive et ascendante des tissus de la tige jusqu'au rachis de l'épis aboutissant à la colonisation des grains.

8 - INFLUENCE DE LA NATURE DU SOL, DES AMENDEMENTS, ET DES CHOIX VARIETAUX SUR LE TAUX D'INFECTION DU GRAIN PRODUIT EN NOUVELLE-CALEDONIE.

Plusieurs enquêtes ont été effectuées sur les essais conduits par la section d'agronomie de l'ORSTOM et par le C.R.E.A..

Dans un premier temps, nous avons exploité quatre essais. Les deux premiers avaient pour objectif de comparer l'efficacité de doses croissantes d'engrais N.P.K. Le troisième était destiné à comparer l'action de diverses doses d'amendements calciques. Le quatrième était un essai de comportement intervariétal.

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

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

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

Les premiers résultats enregistrés dans les essais d'amendements calciques semblaient mettre en évidence l'existence d'une corrélation positive entre le taux d'infection systémique et la dose de calcaire apportée au sol. L'absence de *Fusarium* dans les plants issus du sol sodique non amendé suggérait en outre un éventuel "effet supprimeur" de ce type de sol sur la fusariose systémique. Ces résultats ont cependant été remis en question l'année suivante lorsque, dans le même type d'essai, nous avons relevé dans toutes les conditions expérimentales des taux d'infection de 100 %. Cette

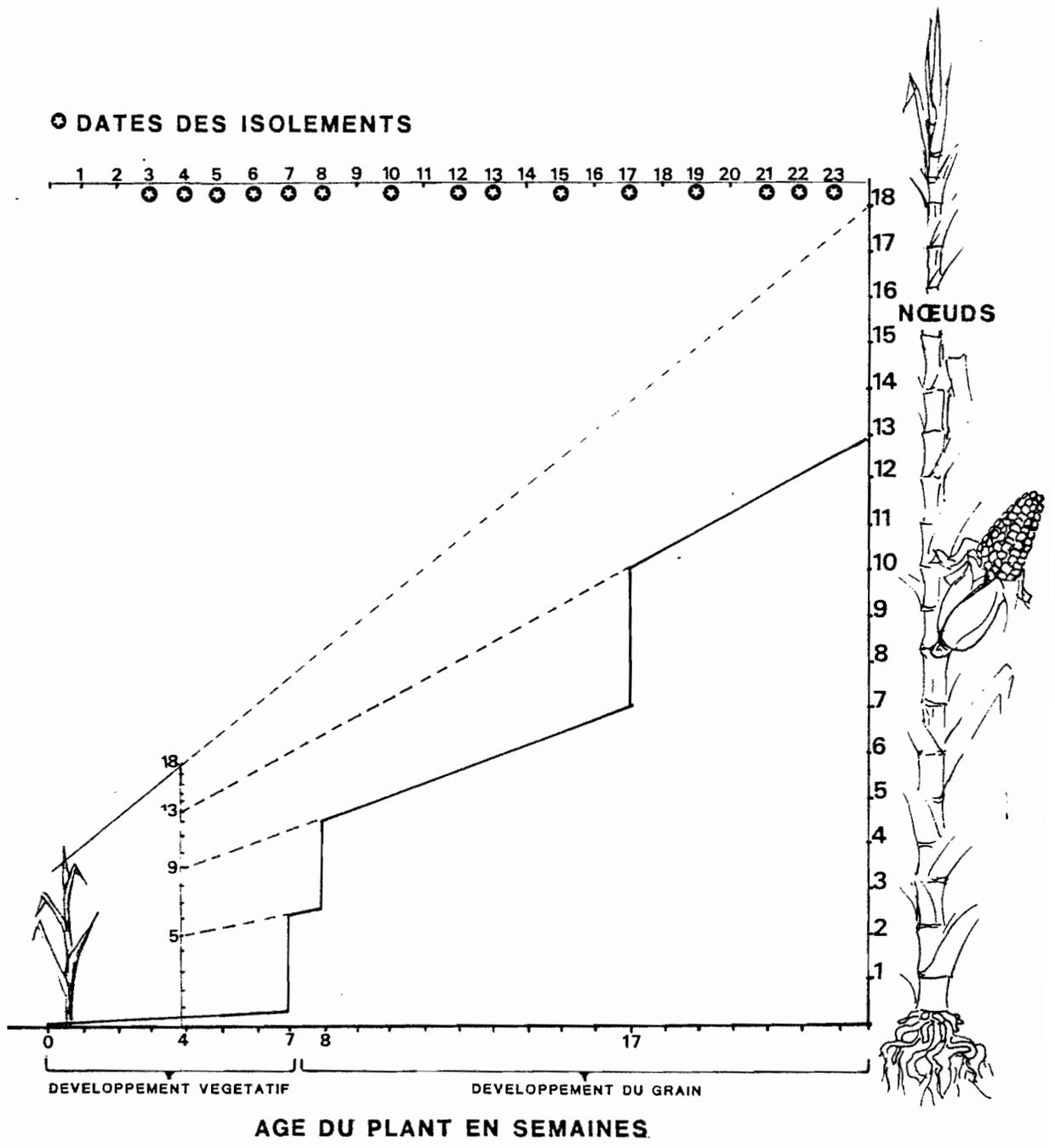


FIGURE. 1

divergence des résultats produits par les essais de deux années consécutives peut être attribuée au fait que le premier essai d'amendement calcique a été effectué sur une savane à niaoulis récemment défrichée. Il est probable que le terrain mis en culture pour la première fois présentait un inoculum tellurique hétérogène(56). Le deuxième cycle cultural sur le même terrain a du être confronté à un inoculum tellurique homogénéisé par le premier cycle cultural.

9 - RECHERCHE DE VARIETES GENETIQUEMENT RESISTANTES.

Dans la perspective, encore hypothétique, d'un contrôle de la fusariose du maïs en Nouvelle-Calédonie, les seuls éléments encourageants ressortent des résultats obtenus dans les essais intervariétaux. Trois hybrides récemment testés par le C.R.E.A. ont en effet produit des épis sains, indemnes de fusariose systémique, alors que toutes les autres variétés ont révélé leur sensibilité à la maladie en donnant des épis fortement contaminés (TABLEAU 2). L'absence de *Fusarium* dans le rachis des hybrides LIMAGRAIN HE 1049 et HE 1066, et dans l'hybride IITA 8321 - 18, pouvait être la manifestation d'une résistance génétique à la maladie. Il convenait donc d'éprouver ces trois hybrides sous une pression d'inoculum drastique.

Dans ce but et avec la collaboration des services de l'Agriculture du Territoire, nous avons mis en place plusieurs essais.

- En ombrière, les trois variétés ont été plantées en pot et inoculées massivement dès la germination ; des prélèvements réguliers ont permis de vérifier leur résistance (57).

- Parallèlement, ces trois variétés ont été incluses à deux essais intravariétaux sur des sites (TAMOA et BOURAIL) fortement contaminés par *F. moniliforme* pour étudier leur comportement sur un cycle de saison fraîche.

Les trois variétés qui présentaient une bonne résistance lors du cycle de saison chaude, n'ont pas montré les mêmes dispositions en conditions naturelles pour le cycle de saison fraîche. En conditions artificielles, une certaine résistance semble se manifester. En effet, malgré un apport massif d'inoculum à la plantation, la progression du parasite dans les plantes semble "retardée".

Les essais en serre ont montré précédemment qu'à la 17ème - 18ème semaine, l'invasion atteint le 13ème noeud. Dans cet essai, parmi les 3 variétés, infestées à 100 % - notons le -, la variété IITA 8321 - 18 est colonisée au moins jusqu'au 9ème noeud, c'est-à-dire au delà du point d'attache de l'épis, les variétés Limagrain ne sont, par contre, colonisées en moyenne que jusqu'au noeud 5. En outre, le taux de contamination des

TABLEAU 2 : Recherche de Fusarium dans les épis de divers hybrides et variétés testées par le CREA (essai EMPLEC).

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

TABLEAU 3

ESSAI INTERVARIETAL - C.R.E.A. - BOURAIL

HYBRIDE OU VARIETE	EPIS INFECTES	EPIS EXAMINES	HYBRIDE OU VARIETE	EPIS INFECTES	EPIS EXAMINES
TEMOIN : XL 82	24	36	I AO 23	4	5
HE 1049	3	5	IRAT 81	4	5
HE 1066	4	5	IRAT 83	4	5
HE 6132	2	5	IRAT 178	2	4
HE 1047	5	5	IRAT 179	5	5
HE 1011	2	5	8239-15	3	5
CTM 8	4	5	8322-13	2	5
PAC 030	1	1	8341-06	2	5
E 188	5	5	8326-17	5	5
CTM 19	3	5	8321-18	3	5
FBH 1	4	5	8329-23	5	5
PFA 21	4	5	CTM-18	4	5
PFA 22	4	5	FBH-04	3	5
PFA 23	5	5	E 607	4	5
PFA 24	1	5	HYCORN 09	1	3
PFA 25	3	5	XL 81	4	5
G 491	0	5	GENERAL	1	5
G 493	2	5	DENT DE CHEVAL	4	4
G 4733	4	5	3183	2	5
CG 4141	5	5	GH 5006	5	5
CG 4502	2	5	CTM 20	4	5
GUAYMAS 8022	5	5	6875	2	5
ACROSS 8043	4	5	3165	5	5
SUWAN 8131	5	5	IRAT REUNION	1	5
ILONGA 8032	0	4	XL 94	4	5
SERGEANT	5	5	GH 5004	4	5
X 304 C	5	5	PAC 009	4	5
IAO 25	3	5			

épis est très faible pour les 3 variétés. Ces faits semblent démontrer la présence d'une certaine résistance générale, insuffisante en ce qui concerne un cycle long de saison fraîche en conditions naturelles (5,5 mois) mais qui se manifeste lors des cycles courts de saisons chaudes (3,5 mois) ou, en ombrière où les conditions optimales de culture favorisent une croissance et une maturité rapide (4 mois).

Parallèlement aux essais portant sur les trois hybrides précédents, nous avons effectué une nouvelle enquête sur un essai intervariétal en saison fraîche (TABLEAU 3).

Deux variétés : G 491 et ILONGA 8032 ont donné des résultats négatifs pour ce cycle de longue durée (5,5 mois), elles seront intégrées au prochain essai intervariétal de saison chaude pour confirmation.

Ces deux variétés, sélectionnées en 1986 n'ont pu être intégrées à l'essai intervariétal de saison chaude (fin 1986 - début 1987) car les semences sélectionnées destinées à cet essai sont arrivées sur le Territoire non accompagnées du certificat phytosanitaire obligatoire, elles ont été détruites par le Service du contrôle phytosanitaire. Un nouvel essai est programmé fin 1987-début 1988.

10 - CONCLUSION.

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

Différentes méthodes de prévention sont envisageables (50,35) comme le séchage des récoltes à des taux d'humidité inférieures à 14 % qui inhibent le développement du champignon ou bien, comme 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.

Deux variétés sont actuellement prometteuses (G 491 et Ilonga 8032) car elles ont donné des taux de contamination nuls pendant le cycle cultural de saison fraîche de longue durée. Il reste à les éprouver pendant le cycle court de saison chaude mais nos études ayant démontré que la colonisation des grains de maïs passait par une contamination tellurique des plantules puis une invasion systémique, il est peu probable que des variétés de maïs résistantes pour un cycle long de 5,5 mois ne le soient pas pour un cycle court de 3,5 mois.

ETUDE DE LA TOXICOGENIE DU FUSARIUM MONILIFORME :

A/ RECHERCHE D'UN TEST BIOLOGIQUE.

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

Nos premières investigations ont donc été orientées vers la mise au point de tests biologiques, permettant de mettre en évidence, de façon répétitive et rapide, le pouvoir toxicogène des souches du parasite, sur des espèces mieux adaptées à l'expérimentation toxicologique que le cheval (11, 12, 13, 14, 15, 20).

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

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

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

Maïs : le maïs en grains entiers ou concassés est disposé en fioles d'Erlenmeyer de 5 l., à raison de 1200 g de maïs et 1200 ml d'eau par fiole. Ce substrat est stérilisé 2 fois 1h30 à 120°C. Il est ensemencé avec 30 ml d'une suspension de spores issues de cultures de *Fusarium* sur P.D.A.

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

Milieux de cultures semi synthétiques liquides : milieu de Czapeck, milieu de Ueno (13).

1. Injection intrapéritonéale chez la souris adulte.

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

Ces expérimentations ont concerné :

- * 38 souches différentes,
- * 3 substrats de culture :
 - . milieu de Czapek,
 - . milieu Pomme de terre - Dextrose,
 - . maïs concassé.
- * 6 conditions de culture :
 - . 21 jours à 31°C,
 - . 7 jours à 25°C, 15 jours à 14°C,
puis 15 jours à 25°C,
 - . 21 jours à 25°C, 7 jours à 14°C,
 - . 10 jours à 25°C, puis 10 jours à 12-15°C,
 - . 4 semaines en alternance : jour à 25°C,
nuit à 10°C,
 - . 10 jours à 25°C, 7 jours à 12°C,
puis 10 jours à 25°C.
- * de nombreux types d'échantillons inoculés (concentrés 10 fois, bruts ou dilués 1/10 au 1/1000) :
 - . filtrats ou surnageants de cultures brutes,
 - . mycéliums bruts ou broyés puis filtrés,
 - . mycéliums traités aux UV ou à la chaleur,
 - . extraits chlorométhyléniques de filtrats ou mycéliums,
 - . extraits méthanol-eau de filtrats ou mycéliums,
 - . extraits à l'acétate d'éthyle de cultures entières,
 - . filtrats de macérations (dans l'eau) de maïs contaminés.
- * deux modes d'intoxication :
 - . aiguë : 1 injection d'une dose élevée,
 - . chronique : plusieurs injections d'extraits dilués.

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

Les symptômes et lésions suivants ont été relevés :

- intoxication aiguë : mortalité en quelques minutes à 24 h, sans lésion macroscopique.
- intoxication "chronique" : mortalité en plusieurs jours. Les lésions macroscopiques sont peu fréquentes mais souvent du même type : gastro-entérite parfois hémorragique, congestion et hémorragies pulmonaires.

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

2. Injection intrapéritonéale chez le rat de 20 jours.

Les substances injectées aux rats sont des filtrats de cultures broyées à "l'Ultra Turrax" dans leur milieu. Les broyats bruts ainsi obtenus sont débarassés de tous les éléments solides par centrifugation suivie de filtrations sur des tamis de plus en plus fins. La dernière filtration, sur membrane Millipore de porosité 0,22 μ , permet de recueillir un filtrat stérile qui est alors lyophilisé.

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

Les essais ont été effectués sur les souches 109 et 68B, faiblement toxicogènes, et les souches 68R et 110, fortement toxicogènes. Les résultats sont indiqués dans le tableau 4.

TABLEAU 4 - Résultats des premières séries d'injections intrapéritonéales chez le rat de 20 jours.

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

Seule la toxicité aiguë provoquant la mort des animaux a été recherchée dans cette première épreuve. Dans la majorité des cas, la mort survient dans les trente minutes suivant l'injection, parfois quelques heures plus tard seulement. L'autopsie des rats n'a révélé aucune lésion organique identifiable. Dans un seul cas : celui de la souche 110 cultivée sur riz, l'injection à la concentration (x10) a tué l'animal en 5 jours ; l'autopsie a alors révélé un ictère important.

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

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

Il apparaît, à ce stade, que le test par injection intrapéritonéale chez le rat de 20 jours est plus fiable que le même test chez la souris.

3. Injection dans l'oeuf embryonné de poule.

Les souches de *Fusarium* sont cultivées sur milieu Ueno pendant :

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

Plusieurs types d'extraits ont été utilisés, il s'agit de:

- * mycélium broyé
- * surnageants de culture sur milieu Czapeck, bruts, dilués ou concentrés,
- * filtrats obtenus à partir de maïs fusarien macéré dans l'eau,
- * extraits chloroformiques de filtrats de culture ou de broyats de mycélium.

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

Les essais ont été effectués avec les souches 68R et 110. Les résultats enregistrés sont encourageants et en accord avec les résultats des épreuves "per os".

4. Dépot cutané sur le rat.

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

La peau du dos d'un rat de souche albino Sprague Dawley est rasée; l'emplacement ainsi mis à nu reçoit le dépôt d'une goutte de 25 à 50 µl de l'extrait étudié.

Les cultures sont préparées sur milieu Ueno et incubées :

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

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

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

5. Administration "per os" chez la souris.

Les cultures sont conduites sur maïs ou riz, sous différentes conditions :

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

Elles sont ensuite incluses dans la ration alimentaire dans la proportion de 50 % de l'aliment. Pour quelques souches, ce taux n'est que de 10 %.

L'aliment est préparé par le mélange de produits de base et de substrat fusarien en poudre. Les formules alimentaires ont été équilibrées par le Dr BREGEAT, en fonction des éléments de base disponibles.

Par exemple : maïs fusarien sec.....	500g
aliment pour chien.....	300g
dont, protéines	21 %
lipides	6 %
matière minérale	7 %
cellulose	2,5 %
H.R.	9 %
avoine.....	200g
TOTAL	<hr/> 1000g.

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

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

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

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

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

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

Le mode de préparation des aliments ne pose donc pas de problème, de même que l'appétence, mais ce test sur souris paraît peu sensible puisque, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons obtenu aucune intoxication sur des épreuves concernant :

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

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

6. Administration "per os" chez le rat adulte.

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

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

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

Ces essais sont restés négatifs : aucun symptôme, ni aucune lésion n'ont été observés pendant les 6 mois d'expérimentation.

7. Administration "per os" chez le rat de 20 jours

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

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

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

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

Dans cette épreuve nous avons examiné 49 souches de *Fusarium* cultivées sous deux conditions d'incubation, soit 15 jours à 25°C suivis de 10 jours à 10°C ; soit 30 jours à 25°C. Ces souches ont été préparées sur deux substrats : maïs et riz en grains entiers (47) ; elles ont été administrées aux rats de deux façons : incorporées à 50 % dans l'aliment quotidien, ou à 20 % dans l'eau de boisson. La souche 72 est

un isolat de *F. graminearum*, toutes les autres appartiennent à l'espèce *F. moniliforme*. Dans chaque série, l'expérimentation s'est déroulée sur 15 jours, terme au-delà duquel les animaux survivants ont été sacrifiés puis autopsiés.

Cette épreuve s'est révélée très sensible. Elle a donné des résultats reproductibles et constants. L'incorporation du maïs ou du riz contaminé à l'aliment donne de meilleurs résultats que l'administration des cultures finement broyées dans l'eau de boisson. La nature du substrat de culture des souches, riz ou maïs, est sans influence sur l'expression de la toxicogénie. Le riz, étant toutefois plus facile à utiliser que le maïs, c'est ce substrat que nous avons retenu pour l'examen de la collection de souches. Comme les trois conditions d'incubation des cultures produisaient des résultats similaires, nous avons en définitive retenu la solution la plus simple : les cultures sur riz sont incubées 21 jours à la température du laboratoire (environ 25°C).

Le tableau 5 présente les résultats induits par 49 souches différentes administrées "per os" à des lots de rats de 20 jours. Plusieurs paramètres ont été évalués dans cette expérimentation :

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

Enfin, divers symptômes d'intoxication ont été relevés : anorexie, amaigrissement, ictère, protéinurie marquée, lésions macroscopiques à dominante digestive (gastrite, entérite) (58).

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

Il convient toutefois de souligner que la dimension modeste des lots de rats testés confère un caractère provisoire au classement présenté dans le tableau 5. Ce classement nous semble valide dans ses grandes lignes, mais il n'est pas exclu que les expérimentations ultérieures le modifie.

TABLEAU 5 : Résultats de l'intoxication per os de rats de 20 jours, par du riz artificiellement contaminé par 49 isolats de Fusarium.

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

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

(3) 72 = isolat de F.graminearum

Il apparait qu'une forte proportion des souches néo-calédoniennes du *F. moniliforme* provoque une intoxication chez le rat de 20 jours. Les symptômes de cette intoxication varient en intensité. Mais à l'exception des toutes premières souches mentionnées dans le tableau, tous les isolats administrés "per os" induisent l'anorexie et des troubles de l'assimilation aboutissant à une croissance pondérale ralentie ou à l'amaigrissement des rats. Avec les souches les plus fortement toxicogènes, ces perturbations s'amplifient et s'accompagnent d'ictère, de protéinurie marquée et de lésions hémorragiques du système digestif. Quatorze souches sur les quarante neuf mises à l'épreuve - soit 28 % de la population d'isolats - tuent la totalité des animaux qui les ingèrent, en moins de 14 jours.

L'administration "per os" de riz contaminé à des rats de 20 jours est l'épreuve la plus efficace parmi toutes celles que nous avons expérimentées. Elle constituera donc la technique de référence pour la suite des recherches.

Cette technique présente cependant l'inconvénient de ne pas être très rapide : plus d'un mois de manipulations diverses sépare la mise en culture des souches sur leur substrat de l'observation des premiers symptômes de toxicité aiguë. Ces délais s'accordent mal avec les nécessités de l'étude chimique des extraits de cultures, puis de leurs fractions, passage obligatoire vers l'identification des toxines. En outre, cette technique ne permet pas la maîtrise des doses ingérées par l'animal.

Les résultats de cette expérimentation font l'objet d'un article publié dans la revue M.A.N. (Microbiologie - Aliment - Nutrition) (48).

8. Administration "per os" chez le poussin.

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

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

maïs fusarien	50	%
soja	31	%
farine de riz	12	%
chaux	2,05	%
bicalcique	1,5	%
prémix	0,7	%
NaCl	0,5	%
méthionine	0,1	%
tétrox	0,05	%
antioxydant	0,05	%
vitamines	0,05	%

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

Nos épreuves ont concerné, au total :

* 23 souches de *Fusarium*.

* 1 condition de culture, 10 jours à 25°C,
7 jours à 12°C, puis 10 jours à 25°C.

* 1 substrat de culture : maïs en grains entiers.

Au total, 300 poussins ont été utilisés pour cette épreuve dont les résultats sont restés négatifs. Nous n'avons obtenu aucune intoxication identifiable.

9. Administration "per os" chez le caneton Pékin de 1 jour.

Afin d'établir une relation entre les résultats obtenus chez le rat, et ceux qu'ont, par ailleurs, obtenus d'autres équipes chez le caneton Pékin, une expérimentation a été réalisée sur cette espèce animale (36).

Les cultures de *Fusarium* sont pratiquées sur maïs selon la technique habituelle puis séchées à 40°C et broyées finement.

L'aliment définitif comprend 50 % de maïs moisi et 50 % d'aliment complémentaire. Ce dernier est, soit un aliment commercial pour poulette, soit un mélange dont les proportions de produits de base permettent d'obtenir un aliment final équilibré et correctement supplémenté en vitamines et acides aminés essentiels (mis au point par le D. BREGEAT Vétérinaire nutritionniste de l'I.E.M.V.T.). La composition des deux types d'aliments est donnée dans le tableau 6.

Des lots de canetons Pékin de 1 jour sont composés de 4 à 8 individus suivant les disponibilités.

Les aliments sont distribués *ad libitum* aux canetons dès le 2ème jour de vie sous forme de pâtée (farine/eau, 1/2, poids/volume).

L'expérimentation est conduite pendant 15 jours. L'évolution du poids des animaux, les quantités d'aliments consommés, les éventuels signes cliniques et les lésions vues à l'autopsie sont notés.

Quarante trois souches de *F. moniliforme* isolées en Nouvelle-Calédonie ont été éprouvées après avoir été incorporées à l'aliment IEMVT. Aucune mortalité n'a été observée chez les canetons. Les seuls symptômes d'intoxication observés furent : quelques signes d'anorexie, des retards de croissance, des défauts d'emplumement, quelques lésions du proventricule, quelques ulcérations de la muqueuse du gésier et des entérites.

TABLEAU 6

COMPOSITION DES DEUX TYPES D'ALIMENTS ETUDIES

	Aliment "poulette" commercial	Aliment IEMVT
Maïs fusarien	500	520 g
Soja	+	310 g
Farine de riz	-	120 g
Blé	150	-
Orge	50	-
Maïs	214	-
Sorgho	+	-
Son (brisures)	+	-
Tournesol	+	-
Farine de viande	84	-
Phosphate bicalcique	-	15 g
Sel	5	5 g
Méthionine	+	1 g
Lysine	+	-
Chaux	+	21 g
Antioxydant	-	0,5 g
Prémix		
- mat. minérale totale	+	1,4 g
- P	3,5 g	7 mg
- Ca	5 g	0,7 g
- Nacl	-	0,35 g
- Insolubles chlorhydriques	-	1,4 g
- Vit. A	7500 UI	1 260 000 UI
- Vit. D3	1000 UI	420 000 UI
- Vit. E	10 UI	2 100 UI
Vitamines A	-	500 UI
D3	-	125 UI
E	-	0,1 mg
B1	-	0,06 mg
B2	-	0,16 mg
B6	-	0,06 mg
C	-	1,5 mg
K3	-	0,08 mg
PP	-	0,1 mg

+ Présent en quantité indéterminée

- Absent.

La même méthode utilisée pour tester une souche d'origine sud-africaine (souche MRC 826), considérée comme fortement toxigène pour le caneton par l'équipe de Marasas, a produit un résultat négatif (27).

Ces divergences entre nos résultats et ceux de Marasas nous ont conduits à incriminer le complément alimentaire utilisé et nous avons donc comparé le comportement des canetons soumis à un complément alimentaire équilibré (IEMVT) à celui des canetons soumis au complément alimentaire utilisé par les sud-africains (aliment commercial poulette) - (Tableau 7).

Les résultats de cette expérimentation mettent en évidence les faits suivants :

- Une faible assimilation de l'aliment poulette par rapport à l'aliment IEMVT. A consommation sensiblement égale, la perte de poids est de 50 % chez les canetons nourris avec l'aliment du commerce.

- L'effet toxique n'apparaît que chez les canetons malnutris. Ainsi, la souche 68 R, léthale pour le rat de 20 jours, l'est également pour le caneton Pékin lorsqu'elle est incorporée à l'aliment du commerce. Dans ce cas, la mortalité intervient en 4 à 6 jours sans gain de poids des animaux intoxiqués. Dans les mêmes conditions expérimentales, la souche sud-africaine MRC 826 tue les canetons en 5 à 8 jours, ce qui confirme les résultats rapportés par Kriek (27).

- La souche 68 B, non toxigène pour le rat, ne provoque pas de mortalité chez le caneton, quelque soit le type d'aliment auquel on l'incorpore.

- Lorsque la souche 68 R, toxigène, est incorporée à la ration poulette, la consommation de l'aliment est 32 fois plus faible que lorsque cette souche est incorporée à la ration IEMVT. La présence de la souche 68 R dans l'aliment du commerce induit donc un refus de nourriture très significatif chez les canards ; ce phénomène n'est pas observé avec un aliment équilibré. Ce refus de nourriture semble dû à une action rapide de la toxine sur le tractus digestif des animaux; les autopsies ont en effet révélé d'importantes lésions hémorragiques du tube digestif (intestin grêle) et des atteintes hépatiques après ingestion de l'aliment du commerce contaminé par une souche toxigène, alors que ces symptômes n'existent pas chez les canards ayant reçu l'aliment équilibré contaminé par la même souche.

- L'hypothèse qu'un ou plusieurs éléments de la ration IEMVT empêche(nt) la toxine de s'exprimer étant envisageable, nous avons abordé cette étude en supprimant dans la ration IEMVT différents éléments un par un. Les résultats (tableau 7) montrent que tous ces éléments sont indispensables puisque la suppression d'un seul d'entre eux suffit à rendre l'aliment toxique en présence de la souche 68 R.

TABLEAU 7

TOXICITE SELON COMPOSITION DE LA

RATION ALIMENTAIRE

Ration Alimentaire	nb. morts	Temps de survie	consommation tot.	Pds moyens	
	nb. total		par caneton	morts	vivants
Témoïn IEMVT	0/18	-	566 g	-	363 g
Témoïn Poulette	0/13	-	562 g	-	181 g
68R IEMVT	0/14	-	486 g	-	324 g
68R Poulette	20/20	5,2 j.	15 g	40,2 g	-
MRC 826 IEMVT	0/14	-	400 g	-	300 g
MRC 826 Poulette	10/13	5,8 j.	32 g	48 g	89 g
68B IEMVT	0/10	-	560 g	-	335 g
68B Poulette	0/10	-	240 g	-	131 g
68R Ext. aqueux (gavage) IEMVT	0/13	-	488 g	-	119 g
68R Ext. aqueux (per os) Poulette	4/7	8,7 j.	167 g	35 g	112 g
68R culot Poul- lette	5/7	7,7 j.	58 g	30 g	98 g
MRC 826 Ext. aq. (per os) Poulette	7/7	5 j.	28 g	38,5 g	-
MRC 826 culot Poulette	6/7	6,7 j.	54 g	33 g	106 g
68R IEMVT (- Pré- mix)	3/7	5 j.	190 g	39 g	123 g
68R IEMVT (-Vita- mines)	4/7	9,1 j.	228 g	54 g	140 g
68R IEMVT (-Méth- iominé)	6/7	8,7 j.	177 g	70 g	98 g
68R IEMVT (-1/2 soja)	7/7	4,2 j.	10 g	38 g	-
68R Poulette (+ 1/2 soja)	6/7	6,9 j.	57 g	40 g	67 g

- L'extrait aqueux de la souche 68 R est toxique pour les canetons quand le complément distribué à ces animaux est l'aliment poulette, et non toxique, quand le complément se compose de la ration IEMVT. La toxicité de l'extrait aqueux est inférieure à celle de la culture totale (temps de survie moyen respectif 5,2 jours et 8,7 jours) ; l'explication en est donnée par la présence de toxicité dans le culot. Il est donc probable que l'extraction aqueuse n'épuise pas la toxicité d'une culture et que l'on ne récupère qu'une partie des principes toxiques. Nous verrons plus loin, en analysant les résultats de la toxicité sur rats, que la toxicité résiduelle du culot est de même nature que la toxicité de la fraction aqueuse de l'extrait.

La nature de ces résultats nous a conduit à interrompre les expérimentations sur les canetons. Ces expérimentations reprendront si le besoin s'en fait sentir, en particulier pour trouver une éventuelle méthode de détoxification des lots de céréales contaminées par complémentation des rations alimentaires en un ou plusieurs éléments neutralisant les effets toxiques.

Les résultats de cette expérimentation ont fait l'objet d'un article publié dans "M.A.N." (Microbiologie - Aliments - Nutrition) (32).

10°) Conclusion

Il semble donc que le rat soit l'animal le plus sensible à la toxine de *F. moniliforme*. Le test par administration "per os" a permis de sélectionner les souches toxiques et la suite de l'étude va être consacrée à la recherche du solvant d'extraction le plus efficace. Dans cette optique, et pour favoriser un suivi plus rigoureux de la dose administrée, nous avons testé la méthode d'administration par sondage oesophagien chez le rat de 20 jours.

B/ RECHERCHE DE L'EXTRAIT TOXIQUE

1) Administration par sondage oesophagien chez le rat de 20 jours

Cette expérimentation a servi de support à une analyse anatomo-pathologique fine des effets de la toxicité aiguë et chronique de quelques souches reconnues toxiques dans les tests "per os".

Pour ce type d'administration, *F. moniliforme* est cultivé sur du riz ou du maïs additionné de 60 % d'eau. Le milieu est autoclavé 2 fois à 110°C à 24 heures d'intervalle. Après inoculation, l'incubation pendant 21 jours se fait à température ambiante (25 à 27°C).

Les premières extractions ont été effectuées avec un mélange hydroalcoolique dans les conditions suivantes :

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

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

Les extractions hydroalcooliques et les reprises pour sondages oesophagiens sont normalisées par rapport aux poids de cultures fraîches et aux poids de cultures lyophilisées. Tout extrait est administré sous le volume de 1ml et à une dose de 7,6 grammes équivalents de culture fusarienne fraîche.

En parallèle, le riz contaminé ayant subi l'extraction (culot d'extraction) était incorporé (à 50 % en poids) dans l'aliment commercial pour chien afin d'être testé.

A l'aide de leur gain pondéral et de la quantité d'aliments qu'ils ont ingéré, il nous est possible de calculer pour chaque expérimentation, un indice MGMQ/MCMQ (rapport de la moyenne des gains moyens quotidiens sur la moyenne des consommations moyennes quotidiennes) qui, rapproché du taux de mortalité, est un bon indicateur de la toxicité de l'échantillon testé.

Cette toxicité peut aussi être visualisée en traçant la courbe de l'évolution pondérale du lot des rats. Sur la fig. 2, nous pouvons comparer la toxicité d'un extrait aqueux d'une souche toxique (68 R) à celle d'un extrait aqueux d'une souche non toxique (68B).

Les lésions anatomo-pathologiques caractérisées auraient du servir de marqueurs pour l'étude des différentes fractions des extraits.

Une mission à Toulouse, du Vétérinaire en charge des expérimentations sur rats, devait permettre de confirmer et d'affiner l'histologie abordée au laboratoire. Les comptes rendus des examens cliniques, nécropsiques et histologiques en notre possession permettent de conclure que, pour les souches toxiques, les organes lésés sont les reins, le foie, l'estomac, le thymus et la rate.

Ces résultats n'étant que partiels, ils n'ont pas permis l'analyse exhaustive des expérimentations sur rats ni, à fortiori, leur utilisation pour les études chimiques. L'indice MGMQ/MCMQ et le taux de mortalité sont donc devenus les critères de toxicité utilisés en routine pour tester les différentes fractions des extraits totaux.

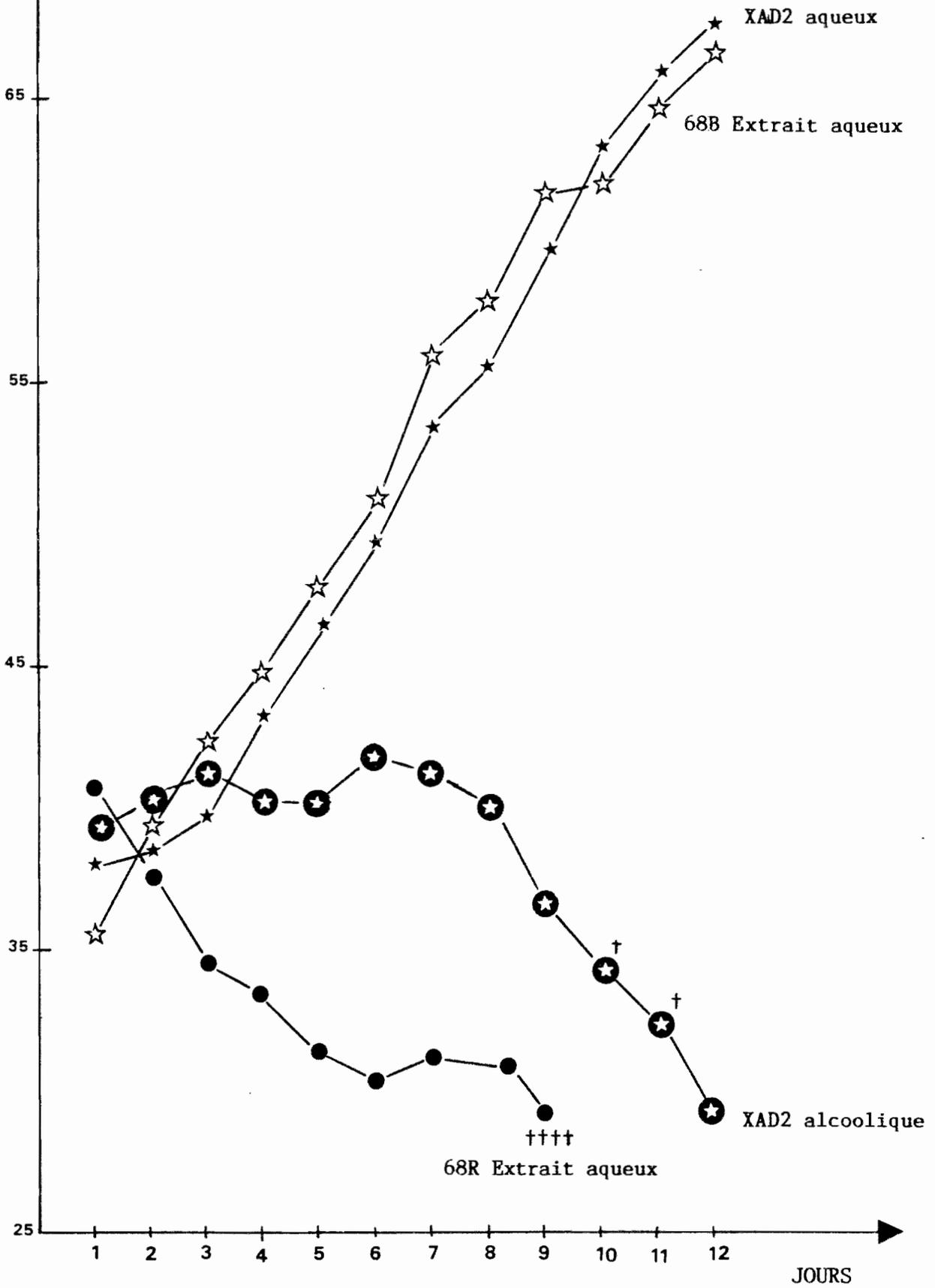
Après confirmation de la toxicité de l'extrait hydroalcoolique, une partition alcool-eau a été réalisée et a mis en évidence une fraction aqueuse très toxique (comparable à la toxicité de l'extrait total) et une fraction alcoolique de toxicité moyenne. Nous en avons conclu que le(s) principe(s) toxique(s) est (sont) hydro-soluble(s), de polarité telle que sa (leur) solubilité dans l'éthanol reste importante.

2°) Administration par sondage naso-oesophagien chez le cheval

Afin de corréliser cette toxicité enregistrée chez le rat à la leucocéphalomalacie équine, un extrait aqueux toxique a été administré par sondage naso-oesophagien à un jument de 14 ans, pesant 320 kg. La mort de l'animal survint au

POIDS MOYEN (g)

FIGURE 2



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

Le suivi clinique pendant l'expérimentation a montré un épisode fugace de diarrhée à J = 5, puis une reprise à J = 13, l'apparition d'un ictère notable à J = 11 qui s'accroît à J = 14, une tachycardie importante et terminale, des signes nerveux modérés et terminaux (J = 13 et J = 14) ainsi qu'une perte d'appétit totale vers J = 12.

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

Le suivi de la biochimie sanguine et l'hématologie montre que la perturbation des fonctions hépatiques commence à J = 7 et que l'atteinte musculaire ou myocardique ainsi que rénale ne se fait qu'en phase terminale.

Les lésions macroscopiques de l'encéphale, des reins et du foie sont en faveur de l'hypothèse de la LEM, hypothèse qui a été confirmée par l'observation des coupes histologiques (23, 46).

3°) Conclusion

A ce stade, nous avons donc la confirmation que la toxine responsable de la LEM est hydrosoluble. Le test par administration par sondage oesophagien chez le rat de 20 jours s'applique très bien aux échantillons solubles dans l'eau. C'est donc cette expérimentation que nous avons choisie pour suivre le fractionnement chimique, en essayant néanmoins de le corréler avec deux autres tests qui ont l'avantage de donner des résultats plus rapides : l'injection intrapéritonéale chez le rat et l'oeuf embryonné de poule.

De nombreuses expériences ont été effectuées pour arriver à ce résultat et il s'en est suivi de nombreuses modifications par rapport aux protocoles de départ.

Cette évolution est récapitulée dans le tableau 8 (préparation et administration des substrats), qui exprime les données suivantes :

1) Série voie orale : cette colonne récapitule les numéros de série des différentes expérimentations par voies orales sur le rat.

2) Série I.P. : Comme ci-dessus, cette colonne permet de se rapporter aux expérimentations sur rats par voie intrapéritonéale.

3) Souche : Inventaire des différentes souches étudiées.

TABLEAU 8 - PREPARATION ET ADMINISTRATION DES SUBSTRATS

DATES	SERIE VOIE ORALE	SERIE I.P.	SOUCHE	SUBSTRAT NATURE ET QUANTITE	DESTINATION	TRAITEMENT	ADMINISTRATION	EXTRACTIONS	RENDEMENTS	DOSES	REMARQUES
23/09/85	2	1/4	68R	Riz = 3 kg	rats	lyophilisé frais	per os + gavage " " " "	hydro-alcoolique " " " "	123 mg/g lyo. 36,8 mg/g frais	0,28 g " 50 %	culot + extrait " "
30/09/85	4		110	Riz = 3 kg	rats	lyophilisé frais	per os + gavage " " " "	hydro-alcoolique " " " "	174 mg/g lyo. 58,4 mg/g frais	0,44 g 50 %	culot + extrait " "
04/10/85	3		68R	Liquide V8 maïs pt pois	rats "	broyat lyophi- lisé	gavage		2,74 g/300 ml 2,35 g/300 ml	68,5 mg/ml 58,7 mg/ml	
25/10/85			MRC 826	Maïs = 3,6kg	canetons	sec	per os			50 %	complément IEMVT
25/10/85			68R	Maïs = 3,6kg	canetons	sec	per os			50 %	complément IEMVT
29/10/85	5		68B	Riz = 3 kg	rats	lyophilisé frais	per os + gavage " " " "	hydro-alcoolique " " " "	260 mg/g lyo 125,6 mg/g frais	50 %	culot + extrait " "
12/11/85	2		Témoin	Riz = 1 kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	5 mg/g frais	0,038 g	
03/12/85	7/8		68R	Riz = 2,1kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	83,2 g/g frais infection probable	0,63 g	toxicité < à la normale infections ?
11/12/85	6		68R	Maïs = 9,6kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	36,4 g/g frais	0,28 g	toxicité < à la normale = t° incubation ?
					canetons	sec	per os			50 %	complément Poulette et IEMVT

TABLEAU 8 (suite)

DATES	SERIE VOIE ORALE	SERIE I.P.	SOUCHE	SUBSTRAT NATURE ET QUANTITE	DESTINATION	TRAITEMENT	ADMINISTRATION	EXTRACTIONS	RENDEMENTS	DOSES	REMARQUES
16/12/85	6		77	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	
16/12/85	6		110	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	
16/12/85	6		MRC 826	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	toxicité < à la normale
16/12/85	6		68 R	Riz = 0,5kg	rats	frais	per os			50 %	
16/12/86		1	Témoin	Riz = 600 g	rats	frais	I.P.	hydro-alcoolique	2,9 mg/g frais	0,022 g	
16/12/85	7/8	2	68 R	Riz = 2,4kg	rats	frais	gavage + I.P.	hydro-alcoolique	83,2 g/g frais infections probables	0,63 g	toxicité < à la normale infections ? partition H2O/ EtOH hexane
04/02/86			68B	Maïs = 2 kg	canetons	sec	per os			50 %	Poulette } Témoins maïs sain + Poulette et IEMVT
04/02/86			68B	Maïs = 4 kg	canetons	sec	per os			50 %	Poulette } Témoins maïs sain + Poulette et IEMVT
					rats	sec	gavage	hydro-alcoolique	31,1 mg/g frais	0,236 g	Témoin canetons
14/02/86	9/10	3/4	68R	Riz = 1,8 kg	rats	frais	gavage + I.P.	hydro-alcoolique	34,7 mg/g frais	0,263 g 0,0657 g 0,0263 g	Partition sur aliquote entre H2O et EtOH absolu (chronique)
14/02/86			68B	Riz = 1,8 kg	rats	frais	gavage	hydro-alcoolique	135 mg/g frais	1,03 g	Témoin chronique ci-dessus
05/03/86	11/12	1/5	68R	Riz = 3 kg	rats	frais frais	gavage + I.P. " "	hydro-alcoolique aqueuse	64,6 mg/gfrais 68,7 mg/gfrais	0,491 g 0,522 g	Partition H2O/EtOH absolu

TABLEAU 8 (Suite)

DATES	SERIE VOIE ORALE	SERIE I.P.	SOUCHE	SUBSTRAT NATURE ET QUANTITE	DESTINATION	TRAITEMENT	ADMINISTRATION	EXTRACTIONS	RENDEMENTS	DOSES	REMARQUES
13/03/86	14	9	13	Maïs = 2,4kg	rats	sec	gavage + I.P.	aqueuse	63,6 mg/g sec	0,338 g	
18/03/86	14	9/12	MRC 826	Maïs = 2,4kg	rats canetons	sec sec	gavage + I.P. per os	aqueuse	87,6 mg/g sec	0,466 g 50 %	Témoin caneton Complément Poulette voir (21.05.86)
03/04/86	13	6/8/11	68R	Riz = 3,6kg	rats canetons	frais frais	gavage + I.P. gavage	aqueuse aqueuse	100 mg/gfrais " " "	0,760 g "	2 phases : "huileuse" + aqueuse + maïs sain + Poulette
19/04/86			68R	Maïs = 6,7kg	canetons	sec	per os			50 %	Contrôle ration alimentaire IEMVT
21/05/86			68B	Maïs = 10,4kg	canetons	sec	per os			50 %	Complément Poulette et IEMVT
21/05/86	14	7/9/11 12	68R	Maïs = 4,8kg	rats canetons	sec sec	gavage + I.P. gavage	aqueuse "	50 mg/g frais " "	0,38 g "	Témoin canetons Complément maïs sain + poulet te
19/06/86	15		68R	Maïs = 15,2kg	cheval rats	sec sec	gavage gavage	aqueuse aqueuse	61 mg/g frais " "	130/65 g 0,46 g	Echelonnement de doses 1500 à 750 g maïs/jour Témoin cheval
18/07/86			MRC 826	Maïs = 4 kg	canetons	sec	per os	aqueuse	53 mg/g frais	ad. libitum	Poulette (culot, extrait, culture totale)
18/07/86	16/17	10/13/ 14/15/ 16/17	68R	Maïs = 10,5 kg	rats + cell VERO canetons	sec sec	gavage + I.P. per os	aqueuse aqueuse	52 à 63mg/gfrais	0,4 à 0,48 g ad. libitum	Dialyse, acétone, charbon acti. Poulette (culot, extrait, culture totale)

TABLEAU 8 (suite)

DATES	SERIE VOIE ORALE	SERIE I.P.	SOUCHE	SUBSTRAT NATURE EN QUANTITE	DESTINATION	TRAITEMENT	ADMINISTRATION	EXTRACTIONS	RENDEMENTS	DOSES	REMARQUES
30.07.86	23		MRC 826	Mais = 12 kg	rats	sec	gavages	EtOH, H ₂ O précipitation	28 mg/g. frais 62 mg/g. frais	0,22 g 0,47 g	XAD ₂ , ultrafiltration, dialyses
14.08.86	18		68 R	Mais = 14 kg	rats	sec	gavages	EtOH H ₂ O filtration silice	46 mg/g. frais	0,35 g	perte de la toxicité
23.08.86	19		68 R	Mais = 12 kg	rats	sec	gavages - I.P.	H ₂ O filtration silice	60 mg/g. frais	0,46 g	perte de la toxicité en gavage
09.09.86	19-20, 22-24, 25-26		68 R	Mais = 14 kg	rats souriceaux	sec	gavages + I.P. intrastomacales	H ₂ O	51 mg/g. frais	0,39 g	XAD ₂ , dialyses, séphadex, traitements avec levures pour éliminer les sucres
09.01.87	21-22, 24-27		68 R	Mais = 18 kg	rats souriceaux	sec	gavages intrastomacales	H ₂ O	63 mg/g. frais	0,48 g	perte de toxicité
01.04.87	28-29		68 R	Mais = 17 kg	rats	sec	gavages	H ₂ O filtration silice et centrifugation haute vitesse	57 mg/g. frais	0,43 g	perte de toxicité
06.05.87	29		68 R	Mais = 17 kg	rats	frais	gavages	H ₂ O	55 mg/g. frais	0,42 g	perte de toxicité
23.06.87	30		68 R	Mais = 6 kg	rats	frais	gavages	H ₂ O puis précipitation EtOH	43 mg/g. frais	0,33 g	perte de toxicité
23.06.87	30-31		MRC 826	Mais = 6 kg	rats	frais	gavages	"	49 mg/g. frais	0,37 g	perte de toxicité
23.06.87	30		110	Mais = 7 kg	rats	frais	gavages	"	47 mg/g. frais	0,36 g	perte de toxicité
08.07.87			68 R après clonage = R1, R2, R3, RA, B1	Mais = 1,2 kg	rats	frais	gavages	H ₂ O	37 mg/g. frais	0,28 g	perte de toxicité
19.08.87			68 R macro et micro-conidées	Mais = 1,8 kg	rats souriceaux	frais	gavages intrastomacales	H ₂ O	68 mg/g. frais en moyenne	0,52 g en moyen ne	en cours

4) Substrat - Nature et quantité : Nous avons utilisé essentiellement comme substrat du riz étuvé ou du maïs entier. Une tentative a été faite en utilisant, sous forme liquide, du "V8 Juice", une décoction de maïs et une décoction de petits pois ; les résultats toxicologiques espérés n'ayant pas été obtenus avec les milieux liquides, nous avons abandonné cette méthode. Progressivement le maïs a remplacé le riz, ceci s'explique par le fait que les extractions aqueuses sont nécessairement suivies de filtrations or, les extraits à partir de cultures sur riz sont très riches en amidons plus ou moins dégradés qui colmatent très rapidement les filtres. Les extraits à partir des cultures sur maïs entier sont moins difficiles à filtrer.

Les quantités exprimées représentent les poids de maïs ou de riz sains utilisés comme substrats de culture. Additionnés de 60 % d'eau avant stérilisation, ils sont ensemencés par une suspension conidienne de *F. moniliforme* puis incubés 21 jours à 25°C en moyenne avec une alternance de 12 h de lumière, 12 h d'obscurité. Après 21 jours d'incubation, on récupère la culture fraîche qui représente 91 à 93 % du substrat à 60 % d'humidité de départ. Les poids secs effectués sur ces cultures fraîches ont permis de constater qu'il n'y avait pas de pertes d'humidité mais une perte de matière, probablement sous forme de dégagement de CO₂ du au métabolisme du champignon.

5) Destination : Animaux ayant consommé la culture correspondante.

6) Traitement : Pour conservation ou prétraitement avant extraction, les cultures fraîches ont pu être, tout d'abord lyophilisées, puis, après que nous ayons eu la preuve que la toxicité n'était pas thermolabile, séchées dans un tunnel à air pulsé chauffé à 40°C par infra-rouge.

Par lyophilisation on obtient 30 à 32 % en poids de la culture fraîche.

Par séchage on obtient 46 à 48 % en poids de la culture fraîche.

7) Administration : Les différentes cultures ont été administrées aux animaux de deux façons :

- "Per os" : Pour les rats le substrat est mélangé à 50 % à un aliment commercial pour chien.

Pour les canetons, différentes compositions d'aliments ont été étudiées que l'on retrouve dans la colonne "Remarques" sous les noms de "complément Poulette et/ou complément IEMVT".

- Gavage : Nous avons désigné sous ce terme les sondages oesophagiens.

8) Extractions : Les premières tentatives d'extraction ont été faites avec de l'éthanol à 80°, nous nous sommes ensuite rendu compte que la toxine était hydrosoluble ; nous

ne pratiquons donc plus actuellement que des extractions aqueuses selon la technique suivante :

- Broyage au Waring Blendor de 200 g de culture fraîche dans 1 litre d'eau permutée.
- Agitation pendant 4 heures.
- Centrifugation à 1500 t/minute pendant 1/2 heure.
- Récupération du surnageant.
- Filtration sur Buchner (préfiltre en silice de diatomée + filtre papier Whatmann), (ou précipitation EtOH suivie d'une centrifugation à 2500 t/minute).
- Evaporation au Rota-Vapor (40°C maximum).
- Lyophilisation de l'extrait concentré.

9) Rendements : Les rendements sont exprimés en poids d'extrait lyophilisé par gramme de culture.

10) Doses : La dose de base utilisée a été calculée à partir des premières expérimentations de toxicité aiguë sur rats, elle correspond à l'équivalent de 7,6 g de culture fraîche pour les gavages et les intrapéritonéales.

Dans les tests "per os", les aliments contiennent, en règle générale, 50 % de culture et 50 % de compléments divers selon que l'on a à faire à des rats ou à des canetons.

11) Remarques : Cette colonne contient les commentaires destinés à faciliter le suivi et l'interprétation des tests animaux.

C) FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT AQUEUX

Les différents procédés de partitions chimiques ou physiques suivants ont été essayés (6, 11, 49, 51, 52, 53).

1) Solubilisation par différents solvants

L'extrait aqueux lyophilisé est mis à macérer dans des solvants de polarités différentes (Hexane, Acétone, Acétate d'éthyle, Chloroforme, Butanol, Tétrahydrofurane et Méthyléthylcétone). La phase soluble est récupérée par filtration et le résidu est repris par de l'eau distillée.

Les deux fractions, solubles et insolubles, sont testées par injection intrapéritonéale (i.p.) chez le rat et sur oeufs embryonnés de poule. La toxicité est retrouvée exclusivement dans les insolubles.

2) Extraction par différents solvants

L'extrait aqueux est mis en solution dans l'eau et cette solution est extraite par les solvants suivants : Chlorure de méthylène, Butanol-Toluène (1-1), Acétate d'éthyle, Hexane. Les deux phases, après évaporation, sont testées sur oeufs embryonnés. Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec le procédé précédent.

3) Précipitation par différents solvants

- Précipitation à l'acétone

L'extrait aqueux est mis en solution dans une petite quantité d'eau et ajouté lentement à de l'acétone. Le précipité qui se forme est séparé par filtration ou centrifugation.

Les deux fractions sont testées par i.p. et par sondage oesophagien chez le rat. La toxicité par i.p. est enregistrée dans la fraction précipitée, alors qu'elle n'est pas retrouvée par sondage. Un test sur la combinaison des deux fractions, soluble et précipité, permet de régénérer la toxicité par sondage oesophagien. (fig. 3).

- Précipitation à l'alcool

La même expérience avec de l'éthanol à 96° a été effectuée. Les résultats obtenus par sondage oesophagien montrent que la toxicité se retrouve entièrement dans la phase soluble.

4°) Adsorption sur charbon actif

L'extrait aqueux est mis en solution dans de l'eau distillée auquel est ajouté du charbon actif sous forme de granulés. Après filtration, le charbon est élué par du méthanol.

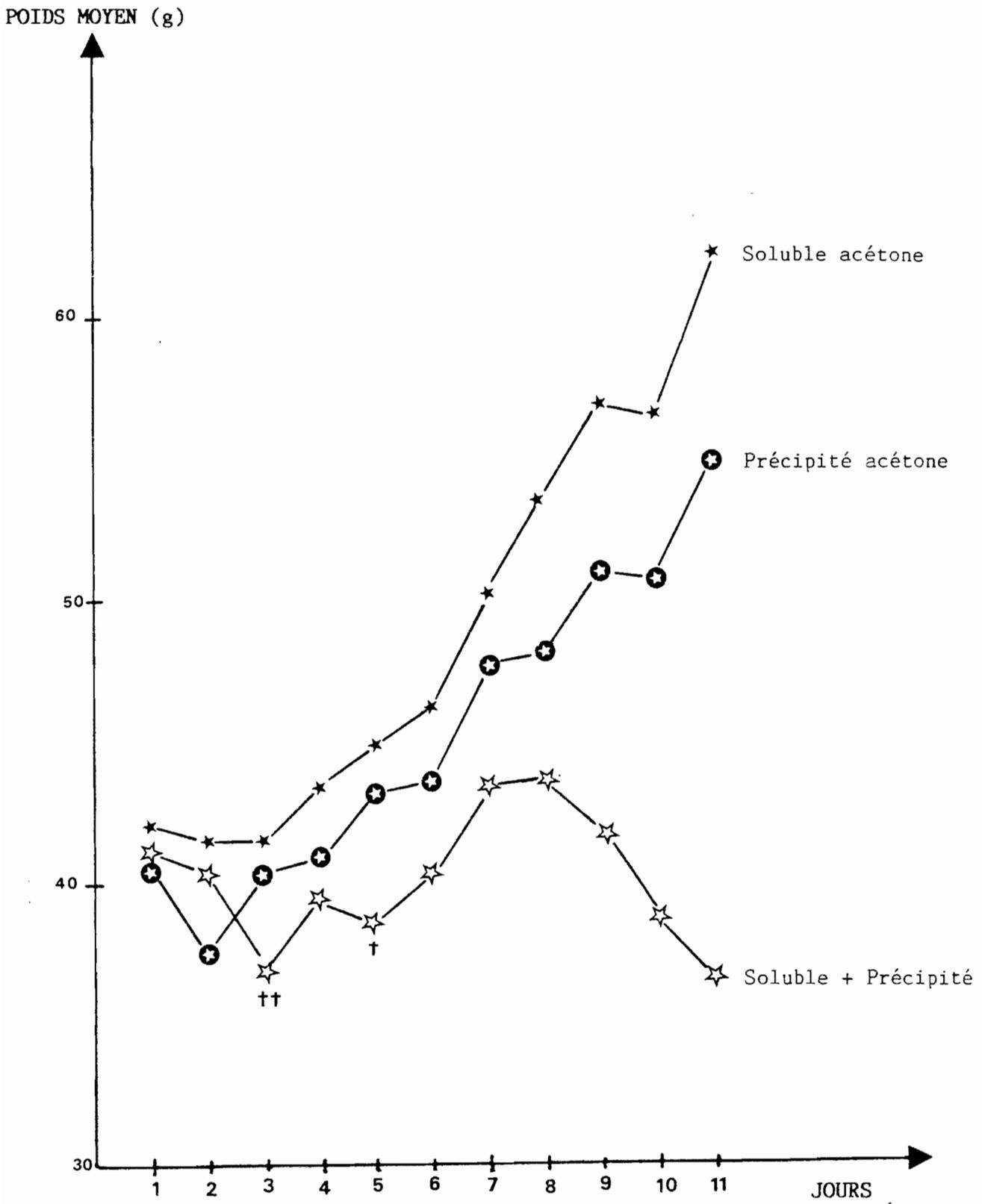
Les deux fractions, aqueuse et méthanolique, sont testées par i.p. (seule la fraction aqueuse est toxique) et par sondage oesophagien (toxicité retrouvée dans aucune des deux fractions).

5°) Adsorption sur résine Amberlite XAD 2

Le principe est identique à celui du charbon actif.

Ces deux phases ont été testées par i.p., par sondage oesophagien et sur oeufs embryonnés. La toxicité est absente de la phase aqueuse et se retrouve pour une grande part dans l'extrait méthanolique (fig. 2). Les rendements chimiques sont très intéressants, 5 % en poids dans l'extrait toxique, mais 10 % en poids reste accroché sur la résine.

FIGURE 3



6°) Dialyse

Ce procédé, en utilisant différentes membranes de dialyse, permet de fractionner l'extrait suivant le poids moléculaire. Plusieurs essais ont été effectués avec les "cut off" suivants : 25000, 12-14000, 6-8000, 3500, 2000, 1000.

Les différentes fractions ont été testées par i.p., sur oeufs embryonnés, et certaines par sondages oesophagiens.

Les résultats i.p. sont en faveur d'une toxine supérieure à 3500 et d'une autre plus petite alors que, par sondage oesophagien, il semble là encore, que la combinaison des 2 fractions soit nécessaire pour que la toxicité soit équivalente à celle de l'extrait total initial (fig. 4).

7°) Ultrafiltration

Ce procédé permet un fractionnement suivant le poids moléculaire ; il a l'avantage d'être plus rapide et plus complet que le précédent. L'extrait aqueux étant très complexe, un colmatage de la membrane était probable ; nous avons donc utilisé l'extrait méthanolique de la XAD 2 comme échantillon de départ. Les membranes de fractionnement 25000, 5000 et 500 ont été utilisées ; la toxicité sur rats par sondage oesophagien a été enregistrée dans la fraction de poids moléculaire entre 500 et 5000 (fig. 5).

8°) Séphadex

Nous avons utilisé un séphadex G25 medium qui sépare les molécules de poids compris entre 1000 et 5000. Pour éviter, là aussi, un phénomène de colmatage, une fraction méthanolique d'XAD2 a été choisie comme échantillon de départ.

Les 3 fractions obtenues ont été testées par sondage sur rats et la toxicité a été mise en évidence dans le premier volume d'éluion qui correspond aux molécules de poids voisin ou supérieur à 5000 (fig. 6).

9°) Couplage de plusieurs procédés

Les premiers résultats obtenus avec les test i.p. chez le rat ayant été satisfaisants, nous avons suivi la toxicité de cette manière sur les expériences suivantes :

FIGURE 4

POIDS MOYEN (g)

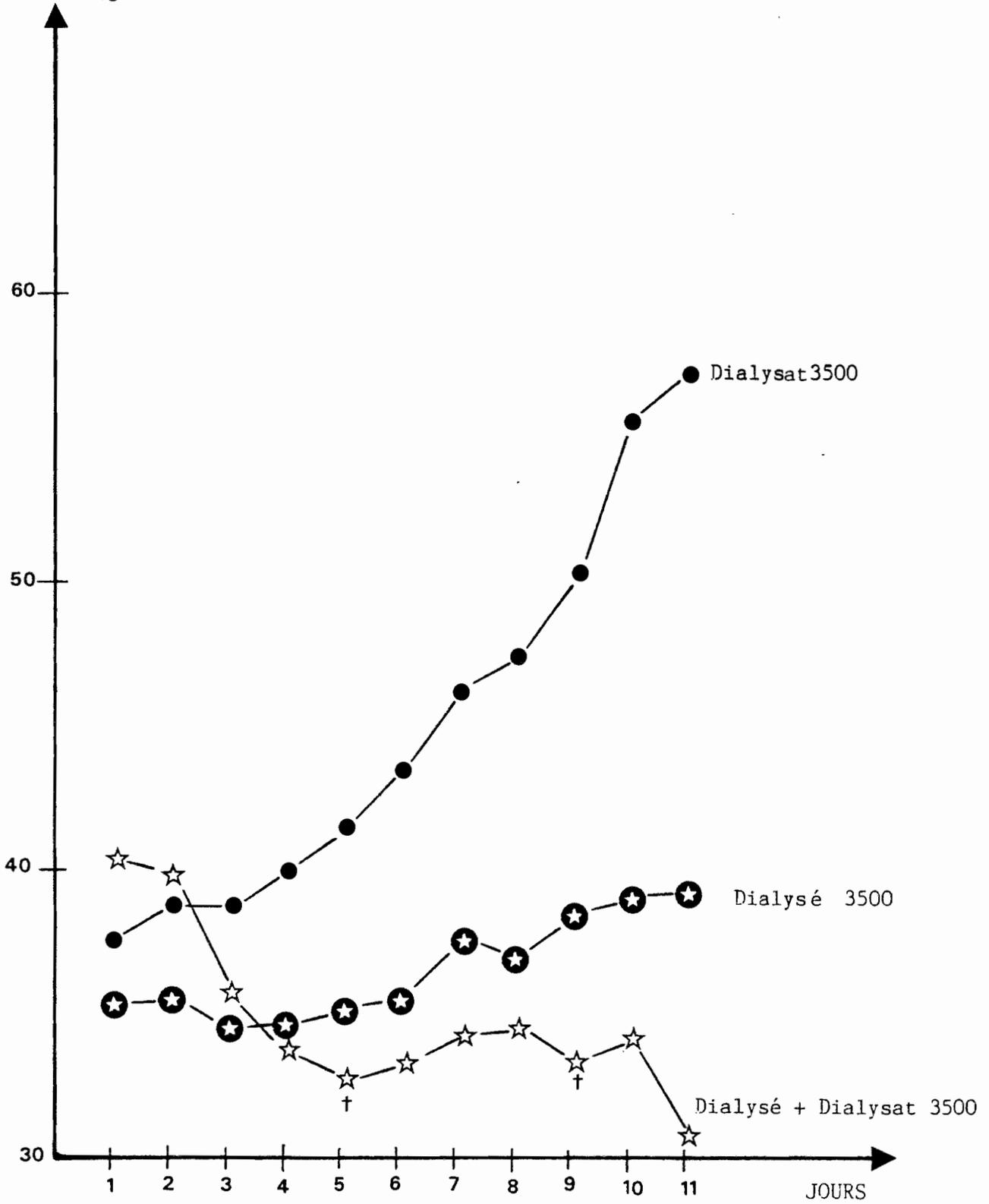


FIGURE 5

POIDS MOYEN (g)

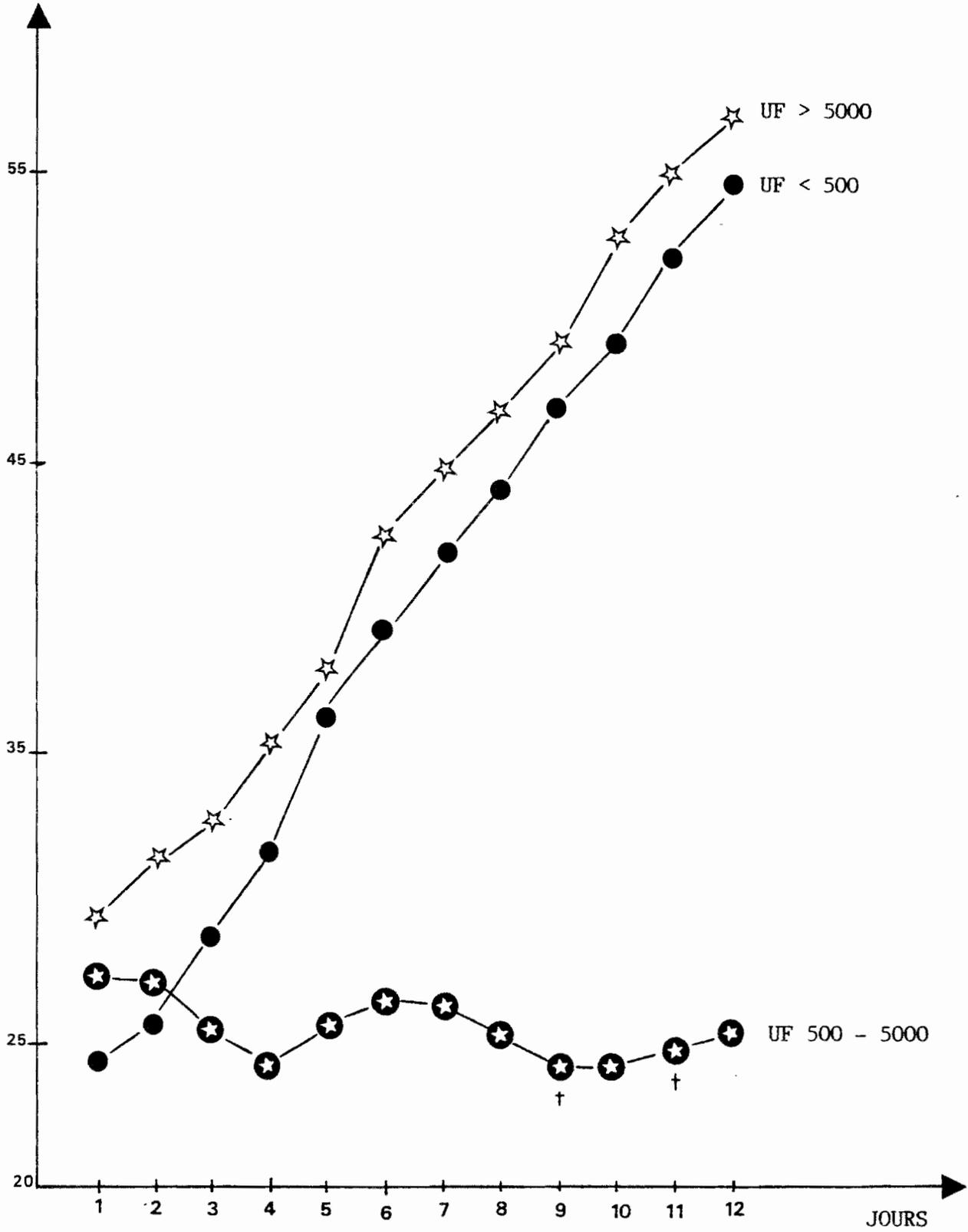
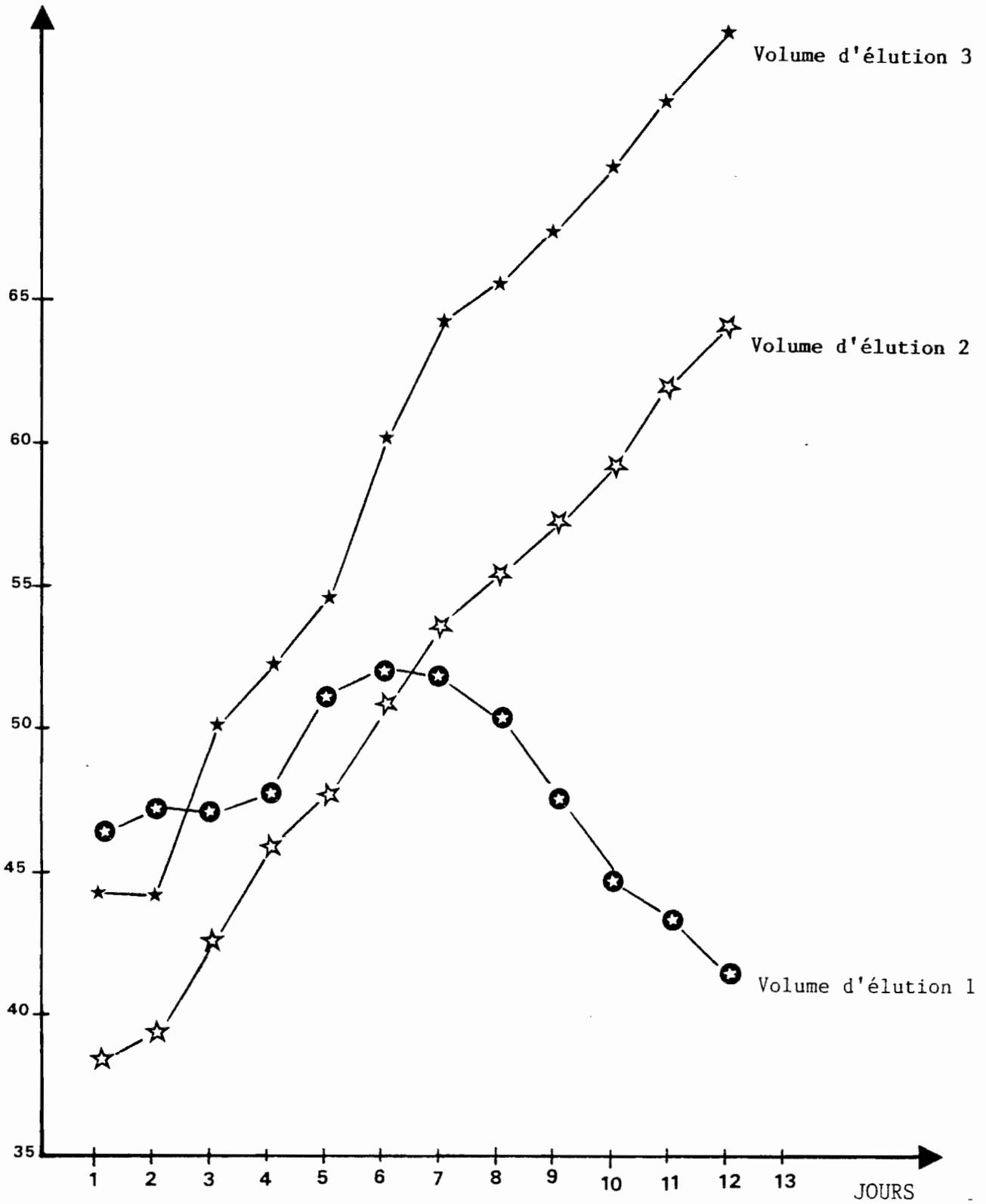
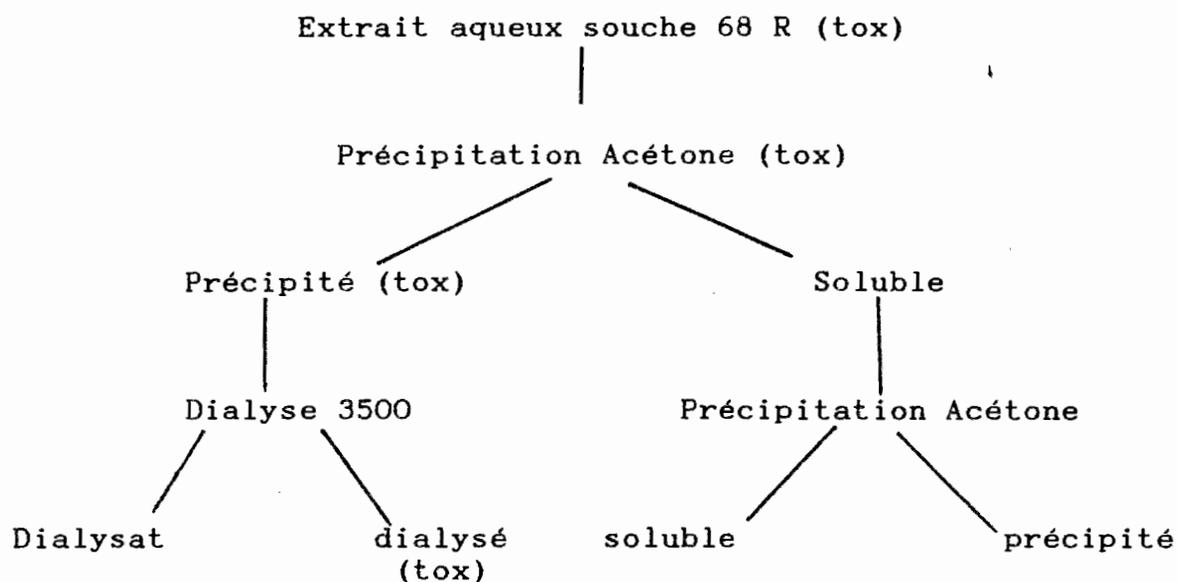


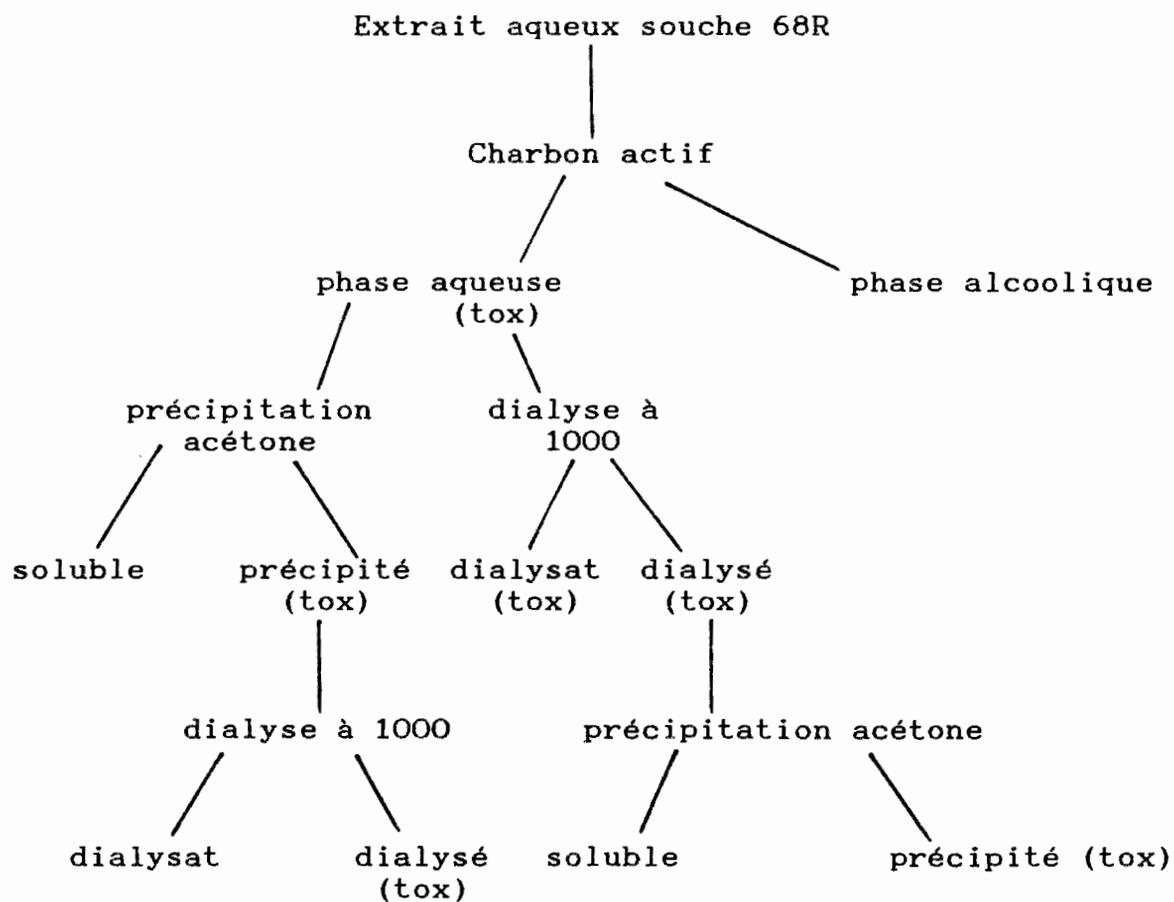
FIGURE 6

POIDS MOYEN (g)





La toxicité est enregistrée dans le dialysé à 3500 (molécule de taille supérieure à 3500) alors qu'elle est inexistante dans le dialysat et les fractions solubles.

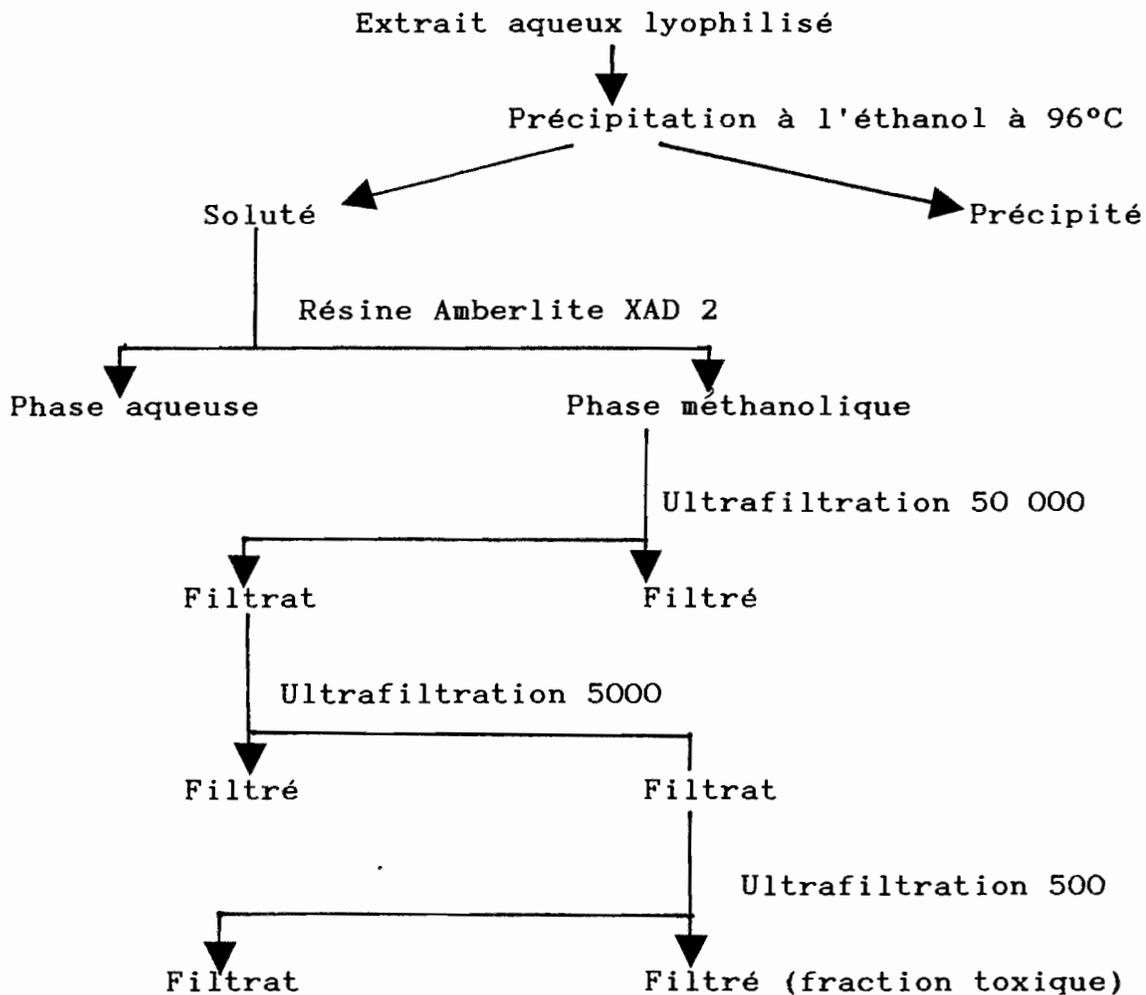


En final, nous retrouvons la toxicité dans le dialysé (supérieure à 1000) et dans le précipité à l'acétone. Mais notons que dans les étapes intermédiaires, le dialysat à 1 000 s'est révélé aussi toxique.

Les résultats de ces deux expériences sont donc en faveur de la présence de deux toxines de poids moléculaire supérieure à 3500 pour l'une et inférieure à 1000 pour l'autre. Il semble également que le procédé de précipitation à l'acétone masque la toxicité inférieure à 1000.

10°) Schéma adopté

Le schéma de purification que nous avons retenu, à la suite de ces différents essais, est le suivant :

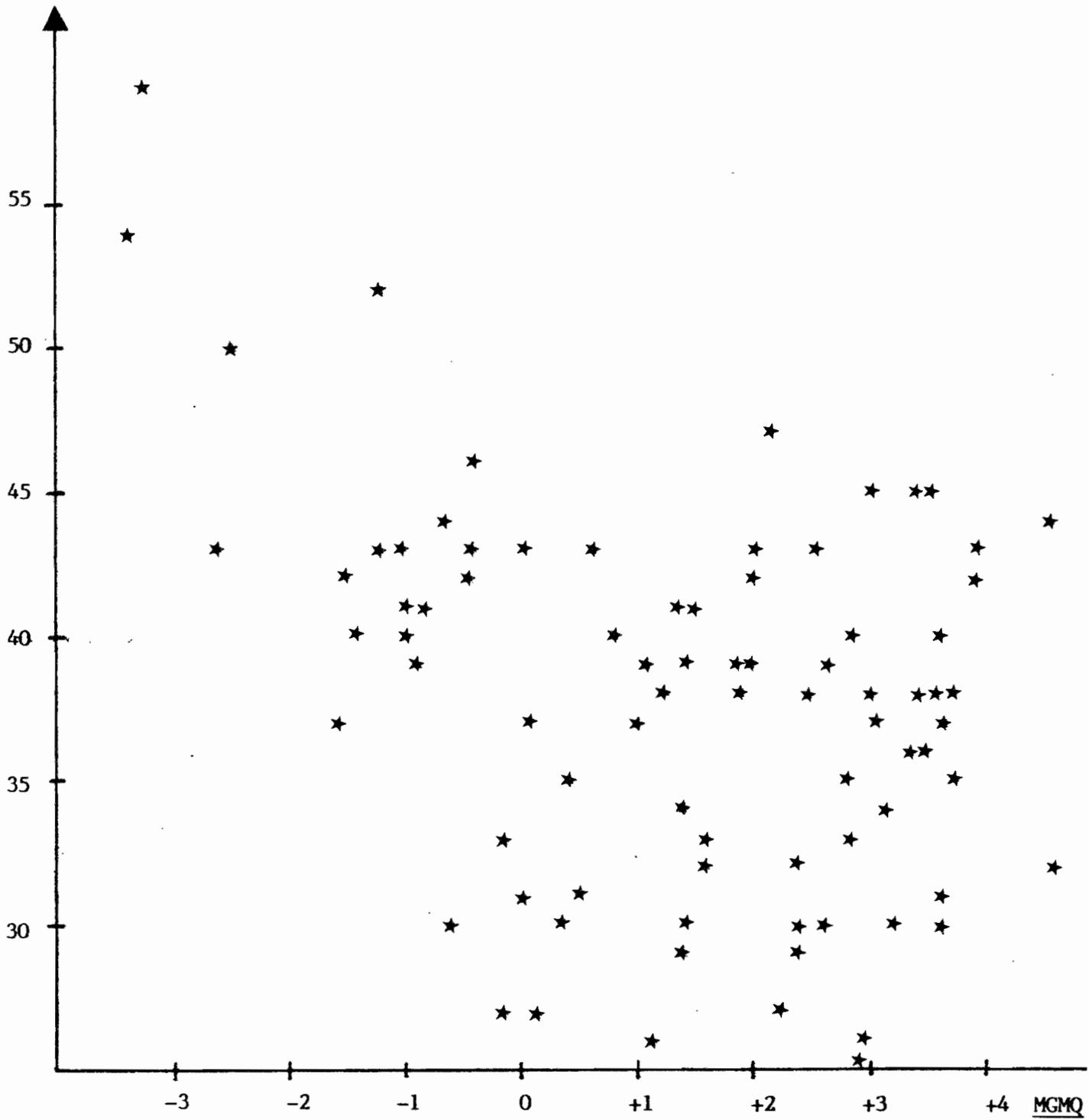


Le test de toxicité par sondage oesophagien chez le rat de 20 jours s'avère en définitive le plus fiable. Notons, comme le montre la fig. 7, qu'il est indépendant du poids initial de l'animal.

Le test par injection intrapéritonéale chez le rat pose quelques problèmes de reproductibilité et est parfois non corrélable avec le test par sondage.

FIGURE 7

POIDS DE DEPART (g)



Quant au test sur oeufs embryonnés de poule, la présence dans nos extraits d'une substance "coagulante" de l'oeuf masque la toxicité et le rend difficilement interprétable.

D) CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1/ Tests biologiques

Le test de toxicité par sondage oesophagien nécessite des quantités non négligeables d'extraits et nous recherchons toujours un test rapide, simple, peu consommateur de produit et, si possible, corrélié à la LEM, pour conduire le fractionnement chimique.

a) Culture de cellules

Nous avons ainsi testé l'effet des extraits fusariens sur les cultures de cellules : cellules cancéreuses Kb et cellules Vero ; l'inactivité sur les premières et la mauvaise corrélation des résultats avec ceux des tests chez le rat pour les secondes ne nous ont pas permis de retenir ces expérimentations.

b) Injection intrastomacale chez le souriceau

Par contre, nous portons beaucoup d'espoir sur un test par injection intrastomacale chez le souriceau de 1 jour. Celui-ci consiste à injecter directement dans l'estomac d'un souriceau des quantités de 50 μ l d'extrait à l'aide d'une microseringue.

Les premiers résultats obtenus, en particulier avec la phase méthanolique de l'XAD2, ont montré l'apparition d'un effet au niveau du cerveau, action hémorragique avec lyse de la matière cérébrale.

Les différences de résultats enregistrées entre les portées de souriceaux nous font craindre des différences de sensibilité suivant les géniteurs. Une sélection des souris est donc en cours.

Il est à signaler que c'est la première fois qu'une action sur le cerveau est notée chez un animal autre que le cheval avec des extraits fusariens. Si ce test est bien corrélié à la L.E.M., il pourra peut-être nous permettre de déterminer la toxine responsable spécifiquement de ce symptôme, voire devenir le test d'analyse de routine pour les récoltes suspectes.

c) Tests bactériens de génotoxicité

Avec le concours du Dr P. Lafont, responsable du laboratoire de microbiologie appliquée à l'alimentation et à la nutrition de l'INSERM du Vésinet, un extrait aqueux et une fraction purifiée ont subi des tests bactériens de génotoxicité, test de Kada et test de Ames.

Les deux produits se sont avérés inactifs dans le test de Kada. En revanche, ils sont inhibiteurs du phénomène d'entométallaxie. En ce qui concerne les essais sur *Salmonella typhimurium* (test de Ames), les résultats obtenus sont contradictoires et d'interprétation difficile, le nombre de colonies révertantes restant par trop proche de celui des témoins.

Tous ces résultats demandent à être vérifiés et complétés et on ne peut pas encore dire si ces tests présentent un grand intérêt pour nous. Nous comptons les poursuivre avec des extraits très purifiés.

d) Tests d'électrophysiologie

Une autre collaboration a été instaurée avec le Dr M.P. Sauviat du laboratoire de physiologie comparée de l'Université de Paris XI pour étudier les effets électrophysiologiques de nos toxines sur le potentiel et courant de membrane du muscle squelettique de la patte de grenouille.

Les résultats préliminaires sont décrits dans l'annexe 15 ; ils montrent que l'inhibition de la conductance sortante est le premier événement qui apparaît lors de l'application de l'extrait. Là encore, ce nouveau test biologique devra être approfondi pour évaluer son intérêt dans la poursuite des opérations chimiques destinées à isoler puis identifier le(s) principe(s) toxique(s).

2) Chimie

a) Double toxicité

Les différentes expériences sont en faveur de la présence de deux complexes toxiques, l'un de faible poids moléculaires (500 à 1000) et l'autre d'un poids moléculaire plus conséquent, de l'ordre de 5000.

La synergie des deux est, semble-t-il, importante pour que la toxicité s'exprime totalement dans nos tests biologiques.

Ces observations vont d'ailleurs 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 L.E.M.

Ces résultats méritent d'être confirmés mais nos recherches ont été retardées par la perte de toxicité de nos souches de référence.

b) Régénération de la toxicité.

La perte de toxicité, après un certain temps de conservation, des souches de champignons toxicogènes est un phénomène bien connu qui ne nous a pas épargné et que nous avons du étudier.

- Il apparait que l'atotoxicité ou l'anatotoxicité pourrait avoir comme origine l'absence, ou la perte de capacité, d'une souche, à induire la formation des organes de production des macroconides. Le morphotype à macroconidies serait toxicogène grâce à un métabolisme différent de celui à microconidies.

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

- Lors de la conservation en silos de grains contaminés ; le thalle selon les conditions de sa croissance, évoluerait vers l'un ou l'autre type, ce qui expliquerait l'apparition de cas fortuits de toxicité induisant la leucoencéphalomalacie équine dont l'étiopathologie est encore mal connue.

Le choix de l'inoculum et la méthode de culture favorisant la production de macroconidies, permettent de restaurer la toxicogénèse chez les souches anatoxiques et de l'induire chez des isolats atoxiques (19, 55).

CONCLUSION

Nos investigations ont mis en évidence qu'en Nouvelle-Calédonie, *Fusarium moniliforme* se comporte en parasite faible vis à vis du maïs, ne provoquant que rarement des lésions superficielles. Les analyses des récoltes montrent cependant que près de 100 % des grains produits sont contaminés.

La dynamique d'invasion des plants de maïs, confirmée par l'étude de l'histologie de l'infection, rendue possible par l'utilisation d'un marqueur radioactif spécifique du parasite, révèle que la fusariose du maïs relève d'une contamination tellurique des plantules et d'une infection systémique ascendante au travers des tissus de soutien de la tige.

Cette présence quasi-saprophytique de *F. moniliforme* justifie l'absence de symptômes chez la plante mais suffit à expliquer la colonisation des grains.

En zone subtropicale, le taux d'humidité des récoltes est élevé ce qui, dans de mauvaises conditions de stockage, ne peut que favoriser le développement du parasite et, par voie de conséquence, la production de toxines.

Différentes méthodes de prévention sont envisageables comme le séchage des récoltes à des taux d'humidité inférieurs à 14 % (34) ou le stockage en silo sous atmosphère inerte ou contrôlée, mais ces méthodes sont onéreuses et nos recherches se sont orientées vers la sélection de variétés résistantes ou tolérantes. Deux de ces variétés ont été retenues et sont en cours d'expérimentation.

La recherche de la (ou des) toxine(s) responsable(s) de la LEM passait sur la mise au point d'un test biologique simple, rapide et peu consommateur d'extrait.

C'est pourquoi, nous avons essayé les tests suivants :

- Injection intrapéritonéale chez la souris ou le rat de 20 jours
- Injection dans l'oeuf embryonné de poule
- Dépôt cutané sur le rat
- Administration "per os" chez la souris, le rat adulte, le rat de 20 jours, le poussin et le caneton.
- Administration par sondage oesophagien chez le rat de 20 jours
- Cultures de cellules
- Tests bactériens de génotoxicité
- Test d'électrophysiologie

- Injection intrastomacale chez le souriceau.

Finalement nous avons retenu le sondage oesophagien chez le rat de 20 jours pour suivre le fractionnement chimique. Nous fondons beaucoup d'espoir sur le test par injection intrastomacale chez le souriceau qui, comme la LEM équine, a le cerveau comme organe cible. Ce test est en cours de normalisation pour une utilisation en routine.

Après avoir vérifié que la (ou les) toxine(s) recherchée(s) était(en) hydrosoluble(s), en reproduisant artificiellement les symptômes de la LEM (nécrose de la substance blanche du cerveau) chez une jument après administration par sondage naso-oesophagien d'un extrait aqueux fusarien, nous avons fractionné cet extrait par les différentes méthodes suivantes :

- Solubilisation, extraction ou précipitation par différents solvants.
- Adsorption sur charbon actif ou résine Amberlite XAD2
- Dialyse
- Ultrafiltration
- Sephadex.

La méthode finalement retenue utilise la précipitation à l'alcool, l'adsorption sur résine XAD2 et des suites d'ultrafiltrations.

Au stade actuel des recherches, nous pouvons avancer l'hypothèse de l'existence de deux toxines ou complexes toxiques, l'un, de faible poids moléculaire (500 - 1000), et l'autre de poids moléculaire plus conséquent, de l'ordre de 4 à 5000. La synergie des deux fractions est, semble-t-il, nécessaire pour l'expression de la toxicité aiguë de l'extrait. Ces observations vont dans le sens de la double action des toxines de *F. moniliforme* chez le cheval : action hépatique et rénale et celle, plus précise, de la LEM.

La perte de toxicité, après un certain temps de conservation, des souches de champignons toxicogènes est un phénomène bien connu qui ne nous a pas épargné et que nous avons dû étudier.

Il s'avère que, seul le thalle pionnotal sur lequel se forment les macroconidies, induit la toxicogénèse. Le type de culture privilégiant le mycélium aérien qui produit les chainettes de microconidies, évolution naturelle d'une souche en mycothèque, n'est pas toxicogène.

Le choix de l'inoculum et la méthode de culture, favorisant la production de macroconidies, permettent de restaurer la toxicogénèse chez les souches anatoxiques ou de l'induire chez des isolats atoxiques.

Les résultats obtenus associés aux nouvelles observations qui semblent mettre en évidence deux types de développement de *F. moniliforme* méritent d'être exploités et approfondis sur trois plans.

- Déterminisme et hérédité des caractères au travers des deux modes de fructification.

- Pathogénie différentielle sur le maïs des macro. et microconidies.

- Toxicogénie : La maîtrise de la production des principes toxiques et l'état d'avancement des études chimiques nous donnent de bons espoirs de pouvoir, prochainement, purifier et identifier les toxines.

B I B L I O G R A P H I E.

1 - ANDEREGG (J.), GUTHRIE (J.W.) - Seedborne *Fusarium moniliforme* and seedling infection in hybrid sweet corn. *Phytopathology*. 1981, 71 : 1196-1198.

2 - ANGELIER (N.), BOUTEILLE (M.) et al - Détection of Nucleic Acids by means of ultrastructural autoradiography - *J. Microscopie Bio. Cell.*, 1976, 27 : 215-230.

3 - BADIALI (L.), ABOU-YOUSSEF (M.H.), RADWAN (A.I.), HAMDY (F.M.), HILDEBRANDT (P.K.) - Moldy corn poisoning as the major cause of an encephalomalacia syndrome in egyptian equidae. *Am. J. Vet. Res.*, 1968, 29 (10) : 2029-2035.

4 - 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.

5 - BERNIER (G.), BRONCHART (R.) - Application de la technique d'historadiographie à l'étude de l'incorporation de Thymidine tritiée dans les méristèmes caulinaires - *Bull. Soc. Royale Sciences Liège*, 1963, 32 (3-4) : 269-283.

6 - BETINA (V.) - Mycotoxins - Production, isolation, separation and purification - Ed. ELSEVIER. 1984, 528pp.

7 - 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.

8 - 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.

9 - BOOTH (C.) - The genus *Fusarium* - CMI, 1971, 237p.

10 - BUGNICOURT (F.) - Sur une maladie du maïs. Publication de l'Institut Français d'Océanie, ORSTOM, 1958.

- 11 - BURMEISTER (H.R.) et al - Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRRL 6322 : Purification and toxicity. Appl. Environ. Microbiol., 1979, 37 (1) : 11-13.
- 12 - CALAS (A.) - La radiographie et ses applications en biologie - Rapport CNRS, 1978, 7pp.
- 13 - 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.
- 14 - DANIELS (B.A.) - Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. Plant Disease. 1983, 67 (6) : 609-611.
- 15 - DODD (J.L.) - Grain sink size and predisposition of *Zea mays* to stalk rot. Phytopathology. 1979, 70, (6) : 534-535.
- 16 - DOMENECH (J.), BREGEAT (D.), BOCCAS (B.) - Les mycotoxines en pathologie animale : Intérêt de leur étude en Nouvelle-Calédonie. Rev. Elev. Med. Vet. Nouv. Calédonie. 1982, (1) : 11-18.
- 17 - FOLEY (D.C.) - Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. 1962, 52 : 870-872.
- 18 - GELDERBLOM (W.C.A.), THIEL (P.G.), VAN DER MERWE (K.J.), MARASAS (W.F.O.), SPIES (H.S.C.) - A mutagen produced by *Fusarium moniliforme*. Toxicon. 1983, 21 (4) : 467-473.
- 19 - GOTH (R.W.), JOHNSTON (S.A.) - Induction of macroconidium formation in *Fusarium moniliforme*. Mycologia. 1981, - 73 : 282-287.
- 20 - 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.
- 21 - JEMMALI (M.) - Les Mycotoxines dans l'alimentation - IIIème Symposium international I.U.P.A.C. sur les mycotoxines dans l'alimentation - Annales de la nutrition et de l'alimentation - édition C.N.R.S., 1977 : 403-1042.

- 22 - JOFFE (A.Z.), PALTI (J.), ARBEL-SHERMAN (R.) - *Fusarium moniliforme* Sheld. in Israel (*Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wollenv.). Mycopathologia et Mycologia applicata. 1973, 50 (2) : 85-107.
- 23 - KELLERMAN (T.S.) et al - A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme*. Sheldon. A preliminary communication. Onderstepoort. J. Vet. Res. 1972, 39 (4) : 205-208.
- 24 - KING (S.B.), SCOTT (G.F.) - Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. 1981, 71 (12) : 1245-1247.
- 25 - KOEHLER (B.) - Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. Journal of Agricultural Research. 1942, 64 (8) : 421-442.
- 26 - KRIEK (N.P.J.), MARASAS (W.F.O.), STEYN (P.S.), VAN RENSBURG (S.J.), STEYN (M.) - Toxicity of a moniliformin-producing strain of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* isolated from maize. Toxicol. 1977, 15 : 579-587.
- 27 - 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.
- 28 - 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.
- 29 - KULIGOWSKI - ANDRES (J.), TOURTE (Y.) - Première étude, par autoradiographie, de la fécondation chez une Ptéridophyte. Biol. Cellulaire ; 1978, 31 (1) : 101-108.
- 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, 363pp.
- 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.) et al - Toxicité aiguë sur canetons Pékin de souches de *Fusarium moniliforme* isolées du maïs en Nouvelle Calédonie - Microbiologie, Aliments, Nutrition, 1987, 5 : 11-15.

33 - 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.

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

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

36 - MARASAS (W.F.O.) et al.- Mycotoxicological investigation on Zambian maize. Fd. Cosmet. Toxicol. 1978, 16 : 39-45.

37 - 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.

38 - 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.

39 - 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.

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

41 - 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.

- 42 - MILLER (J.K.), HACKING (A.), HARRISON (J.), GROSS (V.J.) - Stillbirths, neonatal mortality and small litters in pigs associated with the ingestion of *Fusarium* toxin by pregnant sows. *Vet. Rec.* 1973, 93 : 555-559.
- 43 - MIROCHA (C.J.), CHRISTENSEN (C.M.), NELSON (G.H.) - Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. *Biotechnology and bioengineering.* 1968, X : 469-482.
- 44 - NEISH (G.A.), FARNWORTH (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.
- 45 - NELSON (P.E.), TOUSSOUN (T.A.), COOK (R.J.) - *Fusarium*. Diseases, Biology and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press University Park and London, 1981.
- 46 - NYACK (B.), PADMORE (C.L.) - Suspected equine leukoencephalomalacia. *Equine Practice*, 1983, 5 (2), 33-36.
- 47 - PAYEN (J.), LAFONT (P.), PARACHE (R.M.), BOLLER (F.) - Détection des souches toxiques de *Fusarium*. *Collection de médecine légale et de toxicologie médicale.* 1978, 107 : 111-117.
- 48 - PELLEGRIN (F.) et al - Potentiel toxigène des souches de *F. moniliforme* parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie. *Microbiologie, Aliments, Nutrition.* 1986, 4 : 157-161.
- 49 - RABIE (C.J.) et al - Moniliformin, a mycotoxin from *Fusarium fusarioides* - *J. Agric. Food Chem.* 1978, 26 (2) : 375-379.
- 50 - 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.
- 51 - SAMUELSSON (G.) et al - Preliminary chemical characterization of pharmacologically active compounds in aqueous plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology.* 1985, 14 : 193-201.

52 - SHIMIZU (Y.) - Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds. Journal of Natural Products. 1985, 48 (2) : 223-235.

53 - STEYN (M.) et al - Isolation and purification of moniliformin - J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1978, 61 (3) : 578-580.

54 - STEYN (P.S.), VELGGAAR (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, 545pp.

55 - SUNG (J.M.), LEE (E.j.), PARK (J.S.) - effect of water potential on mycelial growth, reproduction and spore germination by *Fusarium moniliforme*. Kor. J. Mycol., 12 (3) : 99-103.

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

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

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

Imprimé par le Centre ORSTOM
de NOUMEA

Mai 1988

ORSTOM/NOUMEA

