

T D M
TRAVAUX ET DOCUMENTS
MICROFICHES

N° 73

F4

MYCOTOXINES DE FUSARIUM MONILIFORME IMPLIQUÉES DANS LA LEUCOENCÉPHALOMALACIE ÉQUINE

Dominique LAURENT

ORSTOM
Editions

THESE DE DOCTORAT de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : SPECTROCHIMIE

présentée par

Monsieur DOMINIQUE LAURENT

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**MYCOTOXINES DE *FUSARIUM MONILIFORME* IMPLIQUEES DANS
LA LEUCOENCEPHALOMALACIE EQUINE**

Soutenue le 7 mars 1991 devant le jury composé de :

**M. J-J. BASSELIER, Professeur
M. D. DAVOUST, Professeur
M. P. LAFONT, Docteur
M. J. LE BARS, Ingénieur
M. M-P. SAUVIAT, Docteur
Mme N. PLATZER, Professeur**

**Président
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur**

10 JUIL. 1991

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 24.134 ep 2

Cote : A

TDM 73



Editions de l'ORSTOM

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

Collection :

Travaux et Documents Microédités

PARIS 1991

ISBN : 2-7099-1048-9

© ORSTOM

F

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 « et 3 de l'article 41, d'une part, que les «copies ou reproductions « strictement réservées à l'usage privé du copiste et non des- « tinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les « analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et « d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, « ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses « ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé « que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par « les articles 425 et suivants du Code pénal.»

à mes parents
à Véronique
à Marie Eve et Arnaud
à tous mes amis

Avant d'aborder l'exposé de mes travaux, il m'est agréable d'exprimer mes plus vifs remerciements à ceux qui me font l'honneur de juger ce travail :

- Monsieur le Professeur J. J. BASSELIER, Directeur du laboratoire de Chimie Organique Structurale de l'Université PARIS VI, qui a accepté que cette thèse soit soutenue dans son Département, et qui préside ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude ;

- Monsieur D. DAVOUST, Rapporteur, Professeur à l'Université de Rouen ;

- Monsieur le Docteur Ph. LAFONT, Président de l'Association Tessier, qui a soutenu notre équipe et qui, par ses suggestions et conseils, nous a encouragé et aidé à poursuivre ces études. Qu'il reçoive ici le témoignage de ma reconnaissance ;

- Mr M. P. SAUVIAT, Chargé de Recherche à l'université PARIS XI, qui a dirigé l'étude effectuée en électrophysiologie ;

- Mr J. LE BARS, Ingénieur de Recherche à l'INRA de Toulouse ;

- et, bien sur, Madame N. PLATZER, Professeur à l'Université PARIS VI, qui a dirigé cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma sincère sympathie pour le soutien constant qu'elle m'a apporté.

Je tiens à remercier également :

Mr B. BOCCAS, Directeur de Recherche à l'ORSTOM, qui est à l'origine de cette recherche ;

Mr F. PELLEGRIN, Chargé de Recherche à l'ORSTOM, responsable du programme *Fusarium*, et Mr F. KOHLER, Ingénieur d'Etude, qui ont participé à toutes les phases de cette recherche multidisciplinaire et avec qui j'ai pu travaillé en étroite collaboration et en parfaite harmonie durant ces 6 dernières années ;

Mr J. P. COSSON, Ingénieur de Recherche au CNRS et Mr J. P. MERMOUD, Responsable de l'atelier reprographie, pour leurs conseils dans l'élaboration de ce document ;

et tous les collègues des différents organismes de recherche de Nouvelle Calédonie ou de métropole qui, à un moment ou un autre, ont collaboré à ce travail : Melle J. HAMEURT et Mrs R. COSTA, P. DEMERSEMAN, J. DOMENECH, L. FOUQUET, N. GOASDOUE, J. GUILLAUMEL, M. HUERRE, J. KONGHOULEUX, C. LAMBERT, M. LANSON et J. THEVENON.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	9
<u>RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS</u>	14
A) MYCOLOGIE	16
B) TOXICOLOGIE	20
1) <u>La leucoencéphalomalacie équine (LEM)</u>	21
2) <u>Autres toxicoses imputées à <i>F. moniliforme</i></u>	23
3) <u>Fusariotoxicoses expérimentales</u>	27
4) <u>Tests biologiques</u>	30
C) CHIMIE : <u>Mycotoxines isolées de <i>F. moniliforme</i></u>	32
1) <u>Moniliformine</u>	33
2) <u>Fusarines</u>	35
3) <u>Fusariocines</u>	36
4) <u>Zéaralénone (F2)</u>	37
5) <u>Acide fusarique</u>	39
6) <u>Nitrosamines</u>	40
<u>RECHERCHES SUR LA LEM EN NOUVELLE CALEDONIE</u>	41
A) RECHERCHE D'UN TEST BIOLOGIQUE ET D'UNE SOUCHE TOXIQUE	42
1) <u>Tests de phytotoxicité</u>	45
2) <u>Tests d'ichthyotoxicité</u>	46
3) <u>Injection intrapéritonéale chez la souris adulte</u>	46
4) <u>Injection intrapéritonéale chez le rat de 20 jours</u>	47
5) <u>Administration <i>per os</i> chez la souris</u>	48
6) <u>Administration <i>per os</i> chez le rat adulte</u>	49
7) <u>Administration <i>per os</i> chez le rat de 20 jours</u>	50
8) <u>Administration <i>per os</i> chez le poussin</u>	52
9) <u>Administration <i>per os</i> chez le caneton de 1 jour</u>	53
10) <u>Injection dans l'oeuf embryonné de poule</u>	57
11) <u>Dépôt cutané sur le rat</u>	59
12) <u>Injections intrastomacales chez le souriceau</u>	59

13) <u>Injections intracérébrales chez le souriceau</u>	60
14) <u>Cultures de cellules</u>	60
15) <u>Conclusion</u>	60
B) RECHERCHE DE L'EXTRAIT TOXIQUE	61
1) <u>Administration par sondage œsophagien chez le rat de 20 jours</u>	62
2) <u>Administration par sondage naso-œsophagien chez le cheval</u>	64
3) <u>Méthodes de séparation</u>	67
4) <u>Conclusion</u>	70
C) TOXICOGENESE	73
1) <u>Clonage de la souche</u>	74
2) <u>Technique de production d'un mycélium à microconidies</u>	74
3) <u>Technique de production d'un mycélium à macroconidies</u>	75
4) <u>Résultats</u>	75
5) <u>Stabilité de la toxine</u>	77
6) <u>Conclusion</u>	77
D) PURIFICATION DES TOXINES	78
1) <u>Recherche de moniliformine</u>	79
2) <u>Purification des produits isolés de cultures macroconidiales</u>	79
3) <u>Purification des produits isolés de cultures microconidiales</u>	81
4) <u>Conclusion</u>	83
E) ETUDES TOXICOLOGIQUES	85
E1) EXTRAIT ET FRACTIONS TOXIQUES :	87
<u>Etudes électrophysiologiques</u>	87
1) <u>Rappel</u>	87
2) <u>Méthodologie</u>	90
3) <u>Résultats</u>	90
E2) PRODUITS ISOLÉS DE CULTURES MACROCONIDIALES :	95
<u>Toxicologie de la macrofusine</u>	
1) <u>Etudes toxicologiques chez le rat</u>	95
2) <u>Etudes histo-pathologiques chez le rat</u>	95
3) <u>Toxicité sur oeufs embrvonnés de poules</u>	97
4) <u>Toxicité sur oeufs fertilisés d'oursins</u>	97
5) <u>Toxicité sur bactéries</u>	97
6) <u>Toxicité sur cellules cancéreuses Kb</u>	97

7) <u>Toxicité par injection intrastomacale chez le souriceau</u>	98
8) <u>Toxicité par injection intracérébrale chez le souriceau</u>	98
9) <u>Etudes électrophysiologiques</u>	98
E3) PRODUITS ISOLES DE CULTURES MICROCONIDIALES	98
1) <u>Toxicologie de la microfusine</u>	98
2) <u>Toxicologie de la micromoniline</u>	98
E4) CONCLUSION	99
F) ANALYSES STRUCTURALES	100
F1) PRODUITS ISOLES DE CULTURES MACROCONIDIALES	102
1) <u>Analyse structurale de la macrofusine</u>	102
2) <u>Analyses structurales des dérivés de la macrofusine</u>	129
F2) PRODUITS ISOLES DE CULTURES MICROCONIDIALES	129
1) <u>Analyse structurale de la micromoniline</u>	129
2) <u>Analyse structurale des microfusines</u>	138
F3) CONCLUSION	142
G) LA FUMONISINE B₁ (macrofusine) DANS LA PATHOGENIE DE LA LEM	
143	
1) <u>Matériel et méthodes</u>	144
2) <u>Résultats</u>	145
3) <u>Discussion</u>	147
4) <u>Conclusion</u>	148
H) LA FUMONISINE A₁ DANS LA PATHOGENIE DE LA LEM	151
1) <u>Matériel et méthodes</u>	152
2) <u>Résultats et discussion</u>	153
3) <u>Conclusion</u>	156
I) CONCLUSION	159
<u>GLOSSAIRE</u>	161
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	166
<u>ANNEXES</u>	185

TABLEAUX ET ILLUSTRATIONS

Photo 1 : <i>Fusarium moniliforme</i> sur épis de maïs	11
Photo 2 : Cerveau d'un cheval atteint de leucoencéphalomalacie	11
Photo 3 : culture à développement microconidial sur maïs	11
Photo 4 : culture à développement macroconidial sur maïs	11
 Tableau 1 : Toxicités expérimentales chez les équidés de cultures de <i>F. moniliforme</i> sur maïs	 24
Tableau 2 : Résultats de l'intoxication <i>per os</i> de rats de 20 jours, par du riz artificiellement contaminé par 49 isolats de <i>Fusarium</i>	51
Tableau 3 : Composition des deux types d'aliments étudiés pour l'expérimentation canard	54
Tableau 4 : Toxicité chez le canard de certaines souches suivant la composition de la ration alimentaire	56
Tableau 5 : Recherche de l'aliment indispensable pour annuler la toxicité de l'aliment contaminé chez le canard	58
Tableau 6 : Biochimie sanguine d'un cheval traité par un extrait aqueux de maïs contaminé par <i>F. moniliforme</i>	66
Tableau 7 : Effet des extraits de <i>Fusarium moniliforme</i> (10 µg/ml) sur le potentiel de repos des fibres musculaires squelettiques de grenouille	91
Tableau 8 : Déplacements chimiques des protons et des carbones 13 de la macrofusine et de ses dérivés acétylé et méthoxylé dans CD ₃ OD	104
Tableau 9 : Etude de la macrofusine dans CD ₃ OD. Comparaison des valeurs mesurées et calculées des déplacements chimiques en RMN ¹³ C. Mesure des temps de relaxation T1	127
Tableau 10 : Données de RMN ¹ H et ¹³ C pour la micromoniline dans CD ₃ OD	131
Tableau 11 : Biochimie sanguine d'un cheval traité par injection intraveineuse de fumonisine B ₁	146
Tableau 12 : Toxicité chez le cheval de cultures de <i>F. moniliforme</i> sur maïs	149
Tableau 13 : Toxicité chez le cheval de la fumonisine B ₁	150
Tableau 14 : Expérimentations équine	155
 Figure 1 : Les espèces du genre <i>Fusarium</i> appartenant à la section LISEOLA	 18
Figure 2 : Répartition mondiale de la leucoencéphalomalacie équine	22
Figure 3 : Toxicité comparée entre deux extraits aqueux et entre les phases aqueuse et méthanolique d'élution d'une résine XAD2	63

Figure 4 : Toxicité comparée des fractions précipitée et solubilisée par l'acétone et de l'extrait de départ reconstitué	69
Figure 5 : Toxicité comparée de fractions de dialyse	69
Figure 6 : Toxicité comparée de fractions d'ultrafiltration	71
Figure 7 : Toxicité comparée entre les fractions d'élution d'une colonne de Sephadex G25	71
Figure 8 : Exemples de couplages de plusieurs procédés de fractionnement	72
Figure 9 : Différence de toxicogénie entre deux types de thalles de <i>F. moniliforme</i>	76
Figure 10 : Chromatographie sur plaque de gel de silice en phase inverse RP8 de la macrofusine et de la microfusine	80
Figure 11 : Schéma de purification de la macrofusine ou de la microfusine	82
Figure 12 : Schéma de purification de la micromoniline	84
Figure 13 : Canal membranaire aux ions sodium	89
A) Schéma illustrant les mécanismes d'ouverture et de fermeture du système de portes sous l'effet d'une impulsion dépolarisante	
B) Schéma du canal membranaire	
Figure 14 : Réduction de l'amplitude du courant entrant Na (A) et du courant sortant K (B) par les extraits de <i>Fusarium moniliforme</i>	93
Figure 15 : Réduction de l'amplitude du courant Na par les extraits de <i>F. moniliforme</i>	94
Figure 16 : Toxicité de la macrofusine chez le rat	96
Figure 17a : Spectre RMN ^{13}C de la macrofusine en solution ~ 0,2 M dans CD_3OD	106
Figure 17b : Spectre RMN ^{13}C de la macrofusine en solution ~ 0,04 M dans CD_3OD enregistré avec J modulation des signaux	107
Figure 18 : Spectre RMN ^{13}C de la macrofusine méthoxylée en solution ~ 0,2 M dans CD_3OD	108
Figure 19 : Spectre RMN ^1H de la macrofusine en solution ~ 10^{-3} M dans CD_3OD	110
Figure 20 : Spectre RMN ^1H de la macrofusine en solution dans D_2O	112
Figure 21 : Spectre RMN ^1H du dérivé acétylé de la macrofusine dans CD_3OD	114
Figure 22 : RMN 2D de corrélation hétéronucléaire $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$ obtenue pour la macrofusine dans CD_3OD	116
Figure 23: RMN 2D INADEQUATE de la macrofusine méthoxylée en solution ~ 0,5 M dans CD_3OD	117
Figure 24a : RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^1\text{H}$ (COSY 45) de la macrofusine en solution dans CD_3OD	119
Figure 24b : Expansion de la carte 24a dans la région des protons des zones non fonctionnalisées	120

Figure 24c : Expansion de la carte 24a dans la région des protons des acides propanetricarboxyliques	121
Figure 25 : RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^1\text{H}$ (COSY RCT) de la macrofusine en solution dans CD_3OD	123
Figure 26 : RMN 2D de corrélation HOHAHA de la macrofusine en solution dans CD_3OD	124
Figure 27 : Spectre RMN ^1H de la micromoniline en solution dans CD_3OD	132
Figure 28 : Spectre RMN ^{13}C de la micromoniline en solution dans CD_3OD	133
Figure 29 : RMN 2D INADEQUATE de la micromoniline en solution dans CD_3OD	135
Figure 30 : RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$ de la micromoniline en solution dans CD_3OD	136
Figure 31 : Spectre RMN ^1H de la micromoniline en solution dans le diméthylsulfoxyde deutérié	137
Figure 32 : Spectre RMN ^{13}C de la microfusine, sel minérale de la macrofusine	140
Figure 33 : Spectre RMN ^1H ; comparaison de la macrofusine et de la microfusine, sel minéral de la macrofusine. Expansion des signaux des protons des acides tricarboxyliques	141
Figure 34 : Spectre RMN ^{13}C de la fumonisine A ₁ synthétisée, en solution dans CD_3OD	154
Figure 35 : Cinétiques des aspartates aminotransférases (ASAT) pour les 4 expérimentations équine	155
Figure 36 : Cinétiques de la bilirubine totale (TBr) pour les 4 expérimentations équine	157
Figure 37 : Cinétiques des phosphatases alcalines (ALP) pour les 4 expérimentations équine:	158

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Entièrement situé dans la zone intertropicale, entre 20° et 22° 30 de latitude sud, l'archipel néocalédonien est soumis à un climat déterminé par les variations annuelles en latitude de la ceinture anti-cyclonique sub-tropicale et celles des basses pressions intertropicales. Quatre saisons se succèdent sur l'archipel. De mi-novembre à avril, une saison chaude et pluvieuse durant laquelle des cyclones abordent parfois le territoire. De mi-avril à mi-mai, une saison de transition pendant laquelle la pluviosité et la température diminuent; de mi-mai à mi-septembre, c'est l'"hiver" calédonien avec des pluies parfois fortes et des températures généralement basses. Enfin, de la mi-septembre à la mi-novembre, une saison sèche marquée par des températures en hausse progressive. La côte Est, au vent, reçoit en moyenne 2 000 mm de pluie chaque année, la côte Ouest, sous les vents dominants, est beaucoup moins arrosée avec une pluviosité voisine de 1 000 mm.

En Nouvelle Calédonie, la première relation de la fusariose du maïs date de 1958 (1). Dès cette époque, la présence de *F. graminearum* et de *F. moniliforme* avait été repérée dans plusieurs secteurs du territoire où elles occasionnaient régulièrement des dommages sensibles en s'attaquant aux épis.

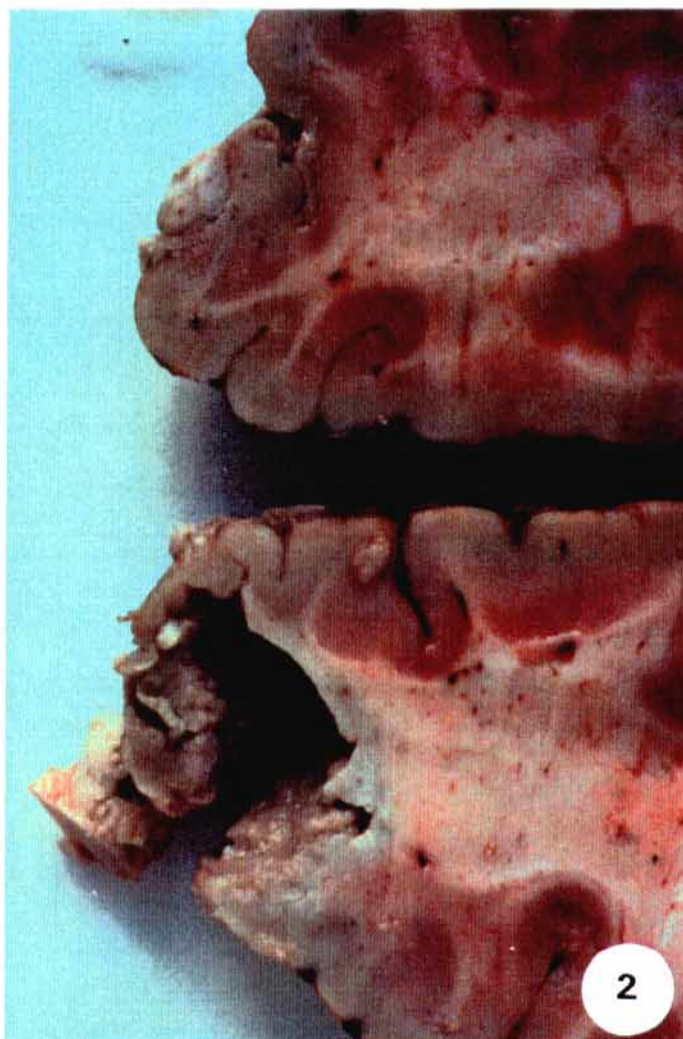
En 1981, notre attention se porta sur ce problème après qu'une épizootie se fut déclarée à Nouméa chez une quarantaine de chevaux entraînant la mort de cinq d'entre eux (2). Les premières investigations montrèrent alors que ces animaux avaient été intoxiqués par du maïs récolté en Nouvelle Calédonie, après une forte attaque de *Fusarium* (Photo 1). 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 contaminé par *F. moniliforme* (3).

Les premières observations de cette maladie, la diversité des substances toxiques produites par les *Fusarium*, la variété et la gravité des symptômes induits chez de nombreuses espèces animales, ont brutalement révélé la réalité du danger que représentent les mycotoxines dans l'alimentation des animaux, et peut être dans celle des hommes. Cette constatation a conduit les responsables de l'agriculture du Territoire à souhaiter que des recherches soient entreprises sur les *Fusarium* toxigènes parasitant le maïs, sujet de recherche d'intérêt général qui est aussi développé activement au plan international.

En Nouvelle-Calédonie, ces recherches ont eu un double objectif : d'une part, parvenir à une connaissance approfondie de l'étiologie et de l'épidémiologie de la fusariose du maïs, d'autre part, identifier la ou les toxines responsables de la leucoencéphalomalacie équine.

Légende des photos (photos F. KOHLER) :

- Photo 1 : *Fusarium moniliforme* sur épis de maïs; épis apparemment sain (à droite); épis de la même récolte ayant été incubé en chambre humide (à gauche).
- Photo 2 : cerveau d'un cheval atteint de leucoencéphalomalacie, montrant des lésions nécrotiques liquéfactives.
- Photo 3 : culture à développement microconidial sur maïs
- Photo 4 : culture à développement macroconidial sur maïs



Elles ont été conduites par les laboratoires de Phytopathologie et de Pharmacologie de l'ORSTOM en association avec l'ITEMVT dans un premier temps puis, avec le Laboratoire Vétérinaire Territorial et enfin, en ce qui concerne les études des mycotoxines, en collaboration avec le laboratoire de Chimie Organique Structurale de l'université P. et M. Curie (Paris VI) et le laboratoire de Physiologie Comparée de l'université Paris XI.

C'est dans ce cadre que ce sujet de thèse s'insère :

**les mycotoxines de *Fusarium moniliforme* impliquées dans
la leucoencéphalomalacie équine**

Ces programmes ont bénéficié des soutiens financiers de la CORDET et de la CEE.

RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

Le domaine des mycotoxicooses et des toxines associées est très vaste et de nombreux livres de synthèse ou d'articles généraux ont parus sur ce sujet (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

Aussi, en ce qui concerne la mycologie, nous ne décrivons que les espèces rencontrées en Nouvelle Calédonie; pour la toxicologie, nous ne traiterons que les toxicoses dues à *F. moniliforme* ; par contre, les différents tests biologiques *in vitro* et *in vivo* utilisés pour détecter les diverses mycotoxines fusariennes seront exposés; enfin, pour la chimie, nous n'aborderons que les métabolites secondaires toxiques isolés de *F. moniliforme* . Les autres métabolites de *F. moniliforme* ainsi que ceux des autres espèces de *Fusarium* seront décrits en annexes.

A) MYCOLOGIE

Dans la mycoflore associée à *Zea mais*, les micromycètes du genre *Fusarium* sont représentés par de nombreuses espèces (11), pour la plupart faiblement pathogènes ou saprophytes. Cependant, trois d'entre elles sont dotées d'un pouvoir pathogène plus élevé et sont des parasites majeurs du maïs. Il s'agit de *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme* et *F. subglutinans*.

Ces espèces ont été identifiées sur tous les continents, dans toutes les grandes zones de culture du maïs, avec des fréquences relatives qui varient en fonction des conditions géographiques ou climatiques. Par exemple, en Afrique, et plus généralement dans les régions tropicales, *F. moniliforme* et dans une moindre mesure *F. subglutinans*, sont les espèces les plus fréquemment présentes sur le maïs, *F. graminearum* apparaissant surtout dans les zones d'altitude élevée au climat plus frais.

Parmi les autres espèces du genre *Fusarium* communément associées au maïs, certaines sont des parasites faibles dont la présence ne pose jamais de problèmes pathologiques importants. *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 espèces peuvent également être isolées du maïs : *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum* et *F. solani*, .

Deux espèces de *Fusarium* ont été identifiées en Nouvelle Calédonie : *F. moniliforme* et *F. graminearum*; la première étant largement dominante.

Nos identifications sont fondées sur la révision de la taxonomie du genre *Fusarium* par Nelson, Toussoun et Marasas (11). Les caractéristiques de ces espèces sont les suivantes :

- *Fusarium moniliforme* Sheldon (= *F. verticillioides* (Sacc.) Nitenberg)

Cette espèce appartient à la section LISEOLA. Sur le milieu de référence P.D.A. (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 microscélérotés de coloration bleu-noir.

Les macroconidies suivant les conditions de culture, sont rares ou abondantes. Les microconidies, toujours abondantes, disposées en chaînettes ou en fausses têtes, sont produites par des conidiophores à monophialides.

Les chaînettes de microconidies issues de monophialides d'une part, l'absence de chlamydospores d'autre part, sont les caractères permettant la détermination de l'espèce; en effet, dans la section LISEOLA, seule l'espèce *moniliforme* n'a que des conidiophores à monophialides, les autres (*F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. anthophyllum*) possèdent des conidiophores à polyphialides (Figure 1).

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

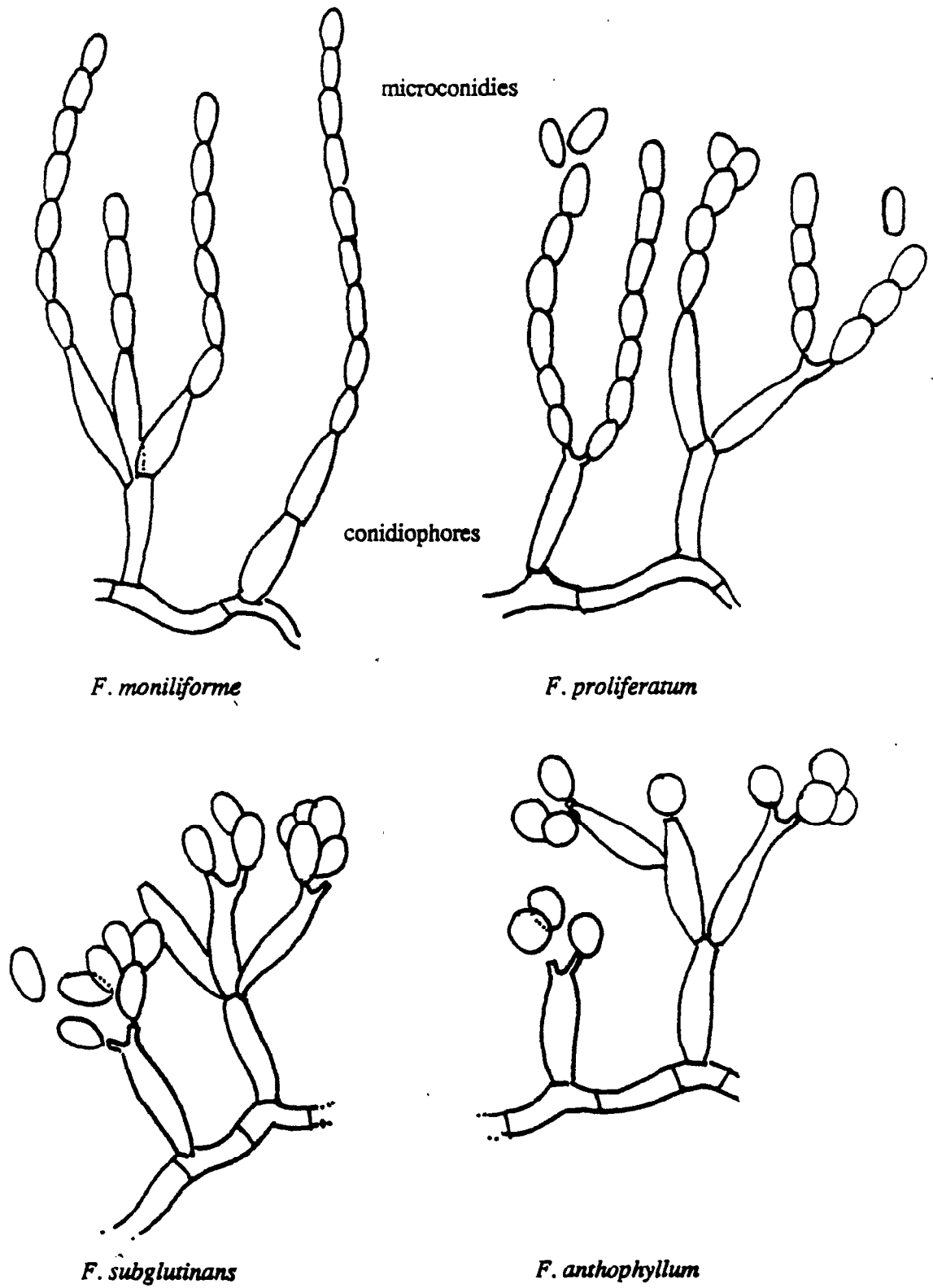


Figure 1 : Les espèces du genre *Fusarium* appartenant à la section LISEOLA

- *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 sur des segments d'hyphes mycéliennes.

L'espèce ne produit pas de microconidies. Les macroconidies sont formées en abondance par des monophialides simples ou ramifiées. Elles 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. (Carnation Leaf, Agar) (4).

B) TOXICOLOGIE

B) TOXICOLOGIE

1) <u>La leucoencéphalomalacie équine (LEM)</u>	21
1-1) Description	21
1-2) Localisation	21
1-3) Lésions cliniques et pathologiques	23
1-4) Fusariotoxicoses équines expérimentales	23
2) <u>Autres toxicoses imputées à <i>F. moniliforme</i></u>	23
2-1) Cancer de l'œsophage humain	23
2-2) Maladie des articulations	27
3) <u>Fusariotoxicoses expérimentales</u>	27
3-1) Babouin	27
3-2) Canard	28
3-3) Cochon d'Inde	28
3-4) Hamster	28
3-5) Lapin	28
3-6) Mouton	28
3-7) Oie	28
3-8) Porc	28
3-9) Rat	29
3-10) Souris	29
3-11) Vache	29
3-12) Volaille	29
4) <u>Tests biologiques</u>	30
4-1) Végétaux	30
4-2) Oeufs embryonnés de poule	30
4-3) Larves de crustacés	30
4-4) Embryons et larves de poissons	30
4-5) Bactéries	31
4-6) Fibroblastes humains ou animaux	31
4-7) Cellules tumorales	31
4-8) Réticulocytes de lapin	31

Le genre *Fusarium* est un des principaux producteurs de mycotoxines. Vingt quatre de ses espèces sont toxigènes, à des degrés divers, chacune d'entre elles se caractérisant par sa propre gamme de toxines.

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'œsophage. Leur responsabilité est également reconnue dans une longue liste de maladies animales dont la leucoencéphalomalacie équine (7).

1) La leucoencéphalomalacie équine (LEM)

1-1) Description

La leucoencéphalomalacie (LEM) est une maladie des équidés caractérisée cliniquement par des signes neurologiques d'origine centrale (incoordination, marche sans but, cécité,...) mis en relation à l'autopsie avec des lésions nécrotiques liquéfactives de la substance blanche des centres nerveux et, notamment des hémisphères cérébraux (12).

Le rôle de *Fusarium moniliforme* a été formellement établi dans cette mycotoxicose animale (13).

1-2) Localisation

Décrite sous des appellations variées : méningite, leucoencéphalite, encéphalomyélite, vertige, malaise, étouffement, encéphalite hémorragique, empoisonnement au maïs moisi, cette toxicose chez les chevaux est connue depuis 1850 dans les régions céréalières des Etats Unis (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Des milliers de chevaux sont morts dans le Maryland au début du siècle, et dans les états du middlewest durant les années 1930. En 1974, Lock rapporte deux cas de LEM chez des "Quarter Horses" en Illinois (21). Plus récemment, en 1978-1979, la maladie a été responsable de la mort de centaines de chevaux (22). Un épisode de LEM eut lieu en 1983-1984 dans le sud est de la Pennsylvanie et l'année suivante, de nombreux autres états (Virginie, Caroline du Nord, Georgie, Floride, Alabama, Mississipi, Tennessee, Louisiane, Indiana et Iowa) furent touchés (23). Durant cette épidémie, la présence de la LEM était associée pour la première fois à des aliments commerciaux (24). En 1987, 14 cas ont été vérifiés par autopsie dans le Maryland (25).

Mais cette maladie n'est pas spécifique des Etats Unis. Elle a été mentionnée en Amérique du Sud, plus particulièrement en Argentine (26, 27) et au Brésil (28, 29); en Chine, où plus d'une centaine de chevaux en furent victimes en 1955 (30); plus récemment, en Egypte chez les ânes, la maladie étant liée aux crues annuelles du Nil (31); en Afrique du Sud où entre 1970 et 1981, quatre accidents de LEM ont été relatés touchant une quinzaine de chevaux (32); en Europe, et plus précisément en Grèce, en Allemagne (16, 33) et en France où un cas a été suspecté en 1983 (34) (Figure 2).

En Nouvelle Calédonie, la première apparition de cette mycotoxicose a eu lieu en 1982 et un seul cas a été signalé deux ans plus tard (2, 3).

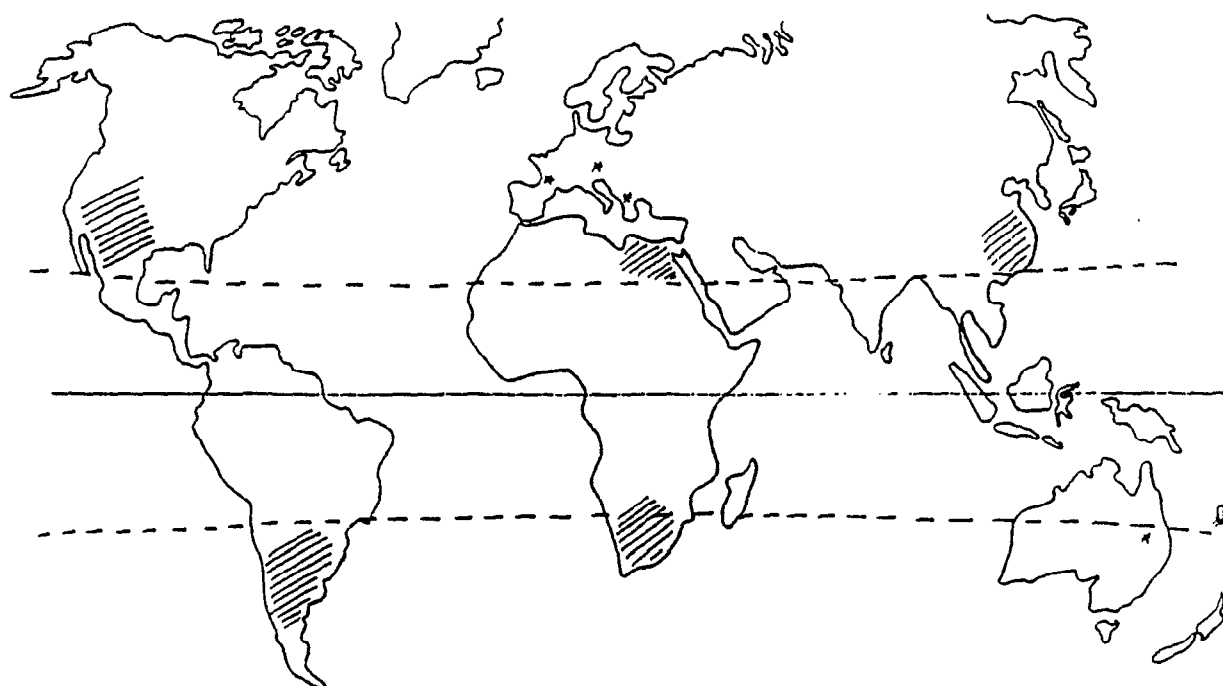


Figure 2 : Répartition mondiale de la leucoencéphalomalacie équine

/// épizooties
* cas isolés

L'apparition de la LEM est liée à des conditions climatiques particulières. Aux Etats Unis, elle est le plus fréquemment rencontrée entre novembre et mars lors de saisons marquées par des sécheresses précoces suivies par des conditions humides accompagnées de températures fraîches et fluctuantes juste avant la récolte (35).

1-3) Lésions cliniques et pathologiques

Les lésions cliniques et pathologiques ont été largement décrites (12, 22, 29, 32, 33, 36). Précédés parfois par une anorexie intermittente et de la somnolence, les signes cliniques apparaissent habituellement abruptement et la durée de la maladie est courte.

La section coronale du cerveau montre de larges cavités où la matière blanche subcorticale est atteinte de nécroses liquéfactives (photo 2). L'examen microscopique de la zone péricavitaire révèle des raréfactions de la matière blanche, des hémorragies périvasculaires, des œdèmes et des infiltrats cellulaires composés principalement de cellules sanguines, en particulier d'éosinophiles. Le foyer de coloration verte, grossièrement visible dans la matière blanche subcorticale de quelques chevaux, consiste en œdèmes périvasculaires et en accumulations extra et intracellulaires de pigments de type lipofuscine (12).

1-4) Fusariotoxicooses équines expérimentales

La LEM, reproduite expérimentalement par ingestion de cultures pures de *F. moniliforme* chez des équidés, (ânes, chevaux, poneys) (12, 13, 17, 22, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40)(tableau 1), est souvent associée à des lésions du foie. Quelques chevaux traités par de fortes rations sur des périodes relativement courtes manifestèrent seulement les lésions hépatiques (12, 36, 39, 40).

La toxine responsable de la LEM est encore inconnue. La moniliformine, l'acide fusarique et l'acide méthoxy-2 éthyl-4 carbolique ont été testés sur le cheval sans induire cette maladie (22, 35). Les autres mycotoxines fusarine C et fusariocine C, isolées de *F. moniliforme* (41, 42), ne semblent pas non plus être responsables de ces pathologies.

Les lésions induites chez les non équidés, par les souches provoquant la LEM, sont situées sur des organes différents selon les espèces. Les organes cibles principaux sont le cerveau et le foie pour le cheval et l'âne, le foie et le cœur pour les rats (43, 44, 45), le foie et le cœur pour les babouins (46), les poumons pour les porcs, le foie et les reins pour les ovins (39).

2) Autres toxicoses imputées à *F. moniliforme*

2-1) Cancer de l'œsophage humain

En Afrique du Sud, dans la République du Transkei, le taux de cancer de l'œsophage humain est beaucoup plus élevé dans les districts du sud-ouest que dans ceux du nord-est. Dans ces deux régions, le maïs est largement utilisé dans l'alimentation humaine. La différence la plus sensible entre ces deux zones est la

Tableau 1 : Toxicités expérimentales chez les équidés de cultures de *F. moniliforme* sur maïs

ESPECES	AGE, POIDS	EXPERIMENTATIONS	SYMPTOMES	REF
2 ânes	16 ans	5 à 15 kg de maïs lyophilisé contaminé par <i>F. moniliforme</i>	LEM	(13)
âne		"	0	"
âne		25 kg	mort sans observation	"
15 ânes		15 à 20 épis contaminés / jour pendant 9 à 30 jours	12 = LEM; 3 = 0	"
2 ânes		15 kg maïs séché contaminé (<i>F. moniliforme</i>)	0	"
âne mâle	6-7 ans	15 kg maïs lyophilisé sur 12 jours	LEM biochimie : prot. tot. du sérum, urée, tps de prothrombine ALAT, ASAT, ALP, hématologie = 0	"
jument	2 ans, 230 kg	23 kg en 23 j maïs artificiellement contaminé	0	(36)
âne entier	3 ans, 210 kg	7 kg en 10 j, arrêt de 30 j, 16 kg en 37 j	0	"
âne entier	9 ans, 231 kg	13 kg en 15 j puis 1 kg en 6 j	mort au 21ème j; ictère, pétéchies hémorragiques, respiration abdominale rapide, tachycardie, cyanose. biochimie : bilirubinémie (6,9 mg /100 ml, 70 % conj.) autopsie : hémorragies sur cœur, intestin, estomac, atteinte hépatique, aucune lésion sur le système nerveux.	
âne entier	5 ans, 228 kg	1 kg en 6 j, puis intub. stomacal: 1 kg/j pdt 8 j et 1,25 kg/j pdt 6 j - Tot. : 16,5 kg sur 25 j	0	
cheval hongre	10 ans, 300 kg	1 kg/j pdt 3 j, 2 kg/j pdt 3 j, 3 kg/j pdt 2 j et 4 kg/j pdt 4 j - Tot. : 31 kg sur 16 j	trouvé mort; hémorragie cardiaque, pétéchies, ecchymoses, œdèmes, ictère et atteinte hépatique	"
jument	7 ans, 302 kg	2 kg/j pdt 9 j - Tot. : 18 kg en 11 j	somnolence, faiblesse; mort 18 h après les premiers signes mêmes symptômes que le cheval précédent	"

âne		5 kg maïs contaminé sur 12 j	mort au 14ème j, 2 j après être devenu aveugle	(33)
ânesse	16 ans	40 kg de maïs contaminé	LEM	"
2 poneys	jeunes	2 semaines de maïs contaminé	0	"
cheval hongre	7 ans, 449 kg	5 g/kg de poids de corps, intubation stomacal 15 doses en 22 j - Tot. : 33,67 kg	10ème j : ictère, pétéchies hémorragiques, anorexie biochimie : ASAT : 382 bilirubinémie totale : 7,4 mg/100 ml J22: apparition de symptômes nerveux; euthanasie 1,5 h après autopsie : œdème du cerveau et atteinte hépatique (fibrose)	(12)
cheval hongre	20 ans, 443 kg	2,5 g/kg, intub. stom., 3 x /sem., 63,8 kg en 52 doses de 2,5 à 5 g/kg sur 144 j	apparition brutale des symptômes; euthanasie 6,5 h après LEM	"
cheval hongre	13 ans, 350 kg	5 g/kg, intub. stom., 3x/sem., 5 doses = ictère, 12 j d'arrêt puis 28 doses - Tot.: 29,6 kg	biochimie : bilirubinémie : 3,2 mg/100 ml ASAT : 274 90ème j : symptômes nerveux; euthanasie : 3 h après LEM et atteinte hépatique (fibrose)	"
âne	4 ans, 123 kg	7,6 g/kg, intub. stom., 12 doses pdt 27 j Tot. : 11,25 kg puis "per os" maïs 8,6 kg en 13 j	39ème j : irritabilité puis ataxie et mort 5 h après LEM	(22, 38)
âne	4 ans, 105 kg	"per os" 4,7 g/kg pdt 46 j - Tot. : 24,8 kg	euthanasie au 46ème j : 0	"
cheval	8 ans, 245 kg	intub. stom., 2,5 g/kg pdt 5 j et 5 g/kg le 7 ème j Tot. : 4,287 kg	mort le 8ème j; œdème du cerveau, début de LEM atteinte hépatique et rénale	(39)
cheval	5 ans, 254 kg	intub. stom., 2,5 g/kg, 6 doses pdt 11 j. Tot. : 3,81 kg	mort le 14ème j; LEM et atteinte rénale	"

âne		maïs inoculé par <i>F. moniliforme</i>	LEM	(35)
2 ânes		"	atteinte hépatique, anorexie, jaunisse, léthargie, ataxie, coma	"
poney		"	"	"
cheval		moniliformine en "per os" ou en intraveineuse	mort, dégénération myocardiale multifocale, nécrose, œdème et congestion pulmonaire	"
cheval		acide fusarique ou acide méthoxy-2 éthyl-4 carbolique	0	"
poney		maïs inoculé par <i>F. moniliforme</i> 2,5 g/kg pdt 28 j, Tot : 15,04 kg	LEM avec légère atteinte hépatique	(37)
4 poneys		2,5 g/kg pdt 79 j	très légère atteinte hépatique	"
jument	15 ans, 425 kg	intub. stom., 2,5 g/kg pdt 5 j + le 7 ^{ème} j Tot : 6,375 kg	apathie, inappétence, ictère et constipation; euthanasie à J11 <u>biochimie</u> : augmentation de J7 à J11, bilirubine totale : 163 ASAT : 2235, GGT : 64, LDH : 2685 atteinte hépatique sévère, léger œdème du cerveau	(40)
jument	15 ans, 385 kg	intub. stom., 1,25 g/kg pdt 5 j + le 7 ^{ème} j. Tot. : 2,902 kg	euthanasie le 12 ^{ème} j, 1 h après les premiers signes; légère nervosité, parésie de la lèvre inf., locomotion impossible <u>Biochimie</u> : ASAT : 340 de J8 à J12 GGT : 22 de J9 à J12 LDH : 1088 à J10 légère atteinte hépatique, œdème modéré du cerveau	"

ASAT (SGOT) : aspartate aminotransférase (transaminase glutamique oxalacétique) >100,300< UI/L
ALAT (SGPT) : alanine aminotransférase (transaminase glutamique pyruvique) >1,100< UI/L
ALP : Phosphatase alcaline >30,200< UI/L; CPK : créatine phosphokinase >100,200< UI/L
LDH : lactate déshydrogénase >162,412< UI/L; GGT : gamma glutamyltransférase >5,60< UI/L
Bilirubine totale >10,80< µmol/L; Bilirubine conjuguée >1,7< µmol/L

présence de *F. moniliforme* dans la mycoflore des maïs de la région à haut risque (47). Une association fréquente de *F. moniliforme* avec des aliments dans des régions à haut risque de cancer de l'œsophage a également été mentionnée en Chine (48).

Pour vérifier la corrélation : *F. moniliforme* /cancer de l'œsophage, une culture d'une souche isolée de maïs cultivé dans une zone à haut risque a été administrée à des rats. En subchronique, les lésions hépatiques obtenues furent caractérisées comme des cirrhoses et des hyperplasies nodulaires (44). En chronique, des cancers primaires du foie (carcinomes hépatocellulaires et ductulaires) et des hyperplasies cellulaires basales de l'œsophage apparurent (45, 49, 50).

L'hépatocarcinogénicité d'un échantillon de maïs infesté naturellement par *F. moniliforme* et récolté lors d'une épizootie de LEM a été mise en évidence chez des rats. Les lésions du foie observées furent des néoplasies, des adénofibromes et des cholangiocarcinomes (51).

Du fait de son action fortement mutagène sur *Salmonella typhimurium* dans le test d'Ames (52), la fusarine C a été soupçonnée d'être impliquée dans l'étiologie de la LEM, mais elle n'a pas montré d'activité hépatocarcinogénique chez le rat (49, 53).

Quatre nitrosamines ont été détectées dans du pain au maïs inoculé avec des isolats chinois de *F. moniliforme* à la suite d'une nitrosation avec du nitrite de sodium (48, 54). Ces métabolites sont mutagènes pour *Salmonella typhimurium* et peuvent produire des tumeurs de l'œsophage chez les rats. Leur rôle possible dans l'étiologie du cancer de l'œsophage en Chine est envisagé (55).

2-2) Maladie des articulations

L'étude sur l'implication de mycotoxines de *Fusarium* dans l'étiologie de la maladie des articulations de Mséléni n'a pas permis de tirer de conclusion. Cette maladie, localisée uniquement dans une région du nord du Kwazulu, se caractérise par une polyarthrite chronique (56).

3) Fusariotoxicooses expérimentales

Différents animaux de laboratoire ont été utilisés pour sélectionner et étudier les souches toxiques de *Fusarium*.

3-1) Babouin

La culture d'un isolat de *F. moniliforme* donnée en alimentation à des babouins provoqua un infarctus du myocarde ou une cirrhose hépatique selon les doses (39). Un isolat, provenant d'un maïs cultivé dans une région à haut taux de cancer de l'œsophage humain, s'est révélé être fortement toxique pour les singes (*Cercopithecus pygerythrus*) en provoquant des hépatites dont les lésions sont similaires à celles dues aux aflatoxines. Ces hépatites toxiques sont semblables aux hépatites virales humaines (46).

3-2) Canard

L'alimentation "per os" de canards Pékin de 1 jour est un test qui a été largement utilisé, en particulier par les équipes sud africaines, pour étudier le potentiel toxigène de leurs isolats (43, 44, 56, 57, 58, 59, 60).

La toxine T2 administrée à de jeunes canards provoque des lésions du tube digestif (61).

3-3) Cochon d'Inde

Du maïs contaminé par *F. moniliforme* a été incorporé à 50 % dans l'alimentation habituelle de 4 cochons d'Inde sans qu'aucun désordre neurologique n'apparaisse. A l'autopsie, après deux semaines de traitement, deux animaux manifestent des entérites hémorragiques; les deux autres, euthanasiés deux semaines plus tard, ne montrent aucune lésion (13).

Les cochons d'Inde sont également utilisés pour les tests dermonécrosants (62).

3-4) Hamster

Du maïs infecté par *F. moniliforme* a été incorporé à 50 % dans l'alimentation habituelle de 4 hamsters sans apparition de désordres neurologiques. Cette absence de toxicité peut être attribuée à la perte de la toxigénicité du champignon (13, 33).

3-5) Lapin

L'application d'extraits éthérés ou alcooliques de cultures fongiques sur la peau rasée de lapin est un test couramment pratiqué pour déceler des activités dermonécrosantes. Sur 85 isolats de *F. moniliforme* testés en Israël, 74 ont induit une réaction toxique (63). De la même façon, Vesonder a obtenu des résultats positifs avec des isolats associés à des cas de LEM en Caroline du Nord (60).

Des essais d'intoxication de lapins par des cultures de souches provoquant la LEM chez des ânes n'ont pas abouti (13, 33, 38).

3-6) Mouton

Un mouton a présenté des atteintes rénales et hépatiques sévères après administration, par des fistules dans le rumen, d'une culture de *F. moniliforme* (39).

3-7) Oie

Deux oies égyptiennes alimentées avec du maïs contenant *F. moniliforme* et reconnu responsable d'une LEM, n'ont pas manifesté de symptômes neurologiques (13, 33).

3-8) Porc

Un isolat de *F. moniliforme*, responsable d'une LEM, provoqua une toxicité aiguë en alimentation "per os" chez les porcs qui ont développé un sévère œdème pulmonaire (39).

Cet animal est aussi utilisé pour détecter les facteurs de refus (64) ou de rejet (65) de nourriture.

Des cas de paralysie dans des élevages de porcs ont été attribués à *F. moniliforme* (66).

3-9) Rat

Le rat albinos est l'animal de laboratoire qui semble être le plus adapté à l'étude des mycotoxines fusariennes et, en particulier, pour la recherche des toxines responsables de la LEM. Les lésions obtenues sont des cirrhoses, des hyperplasies nodulaires ou nodules néoplasiques hépatiques, des adénofibromes, des cholangiocarcinomes, des thromboses cardiaques intraventriculaires et des atteintes rénales (39, 43, 44, 45, 49, 50, 51, 57, 67).

Des cultures sur riz de *F. moniliforme*, isolé d'épis de maïs du Minnesota, provoquent des hémorragies dans divers organes et une mortalité importante chez les rats (68, 69).

Comme avec le lapin, une action dermonécrosante peut être mise en évidence sur la peau rasée du rat (67, 68, 70).

3-10) Souris

Deux composés cytotoxiques, fusariocine A et C, sont fortement actifs en injection intrapéritonéale chez la souris (42).

L'activité œstrogénique (hypertrophie utérine) de souches de *F. moniliforme* a été recherchée chez des souris sans grand résultat.

Des cultures de souches finlandaises sont toxiques pour les souris. Elles provoquent des hémorragies gastro-intestinales et une légère dégénérescence du foie et du myocarde (7).

Des extraits méthanoliques de maïs inoculé avec des isolats associés à des cas de LEM sont toxiques pour les souris en injection intrapéritonéale (60).

Un essai d'administration par eau de boisson a été effectué avec dix métabolites de *Fusarium* sp (buténolide, diacétoxyscirpénol, équisétine, acide fusarique, acide gibbérellique, moniliformine, NRRL6227 peptide, T2 toxine, vomitoxine et zéaralénone); seuls les trichothécènes ont été refusés (71).

3-11) Vache

Des vaches furent utilisées pour rechercher un facteur de refus de nourriture associé avec *F. moniliforme* dans le maïs (72).

3-12) Volaille

Une expérimentation sur des poussins de 1 jour dont l'alimentation contenait du maïs moisi par *F. moniliforme*, a abouti à une réduction du gain de poids suivie, une dizaine de jours plus tard, par l'apparition d'une sévère déformation des pattes (courbure extérieure), leur donnant une démarche "cow boy". *F. moniliforme* produit une thiaminase, et la déficience en thiamine qui en résulte peut amener des difficultés de locomotion, des polyneuropathies et entraîner la mort (73, 74). Un cas de paralysie dans des élevages de poussins et de poulettes dans le sud-ouest de la France a d'ailleurs été attribué à *F. moniliforme* (66).

L'administration "per os" à de jeunes coqs a été utilisée pour isoler la moniliformine d'une souche de *F. moniliforme* (75).

L'importance de la température d'inoculation des souches de *F. moniliforme* pour leur toxicité a été montrée sur de jeunes coqs. Les souches cultivées à 10 °C s'avèrent peu toxiques alors que celles cultivées à 25 °C sont très toxiques (76).

L'administration à des poussins de 6 jours d'extraits hydrométhanoliques de cultures de souches ayant provoqué la LEM chez des ânes, n'a pas provoqué de symptômes notables (38).

4) Tests biologiques

De nombreux tests de toxicité *in vitro*, ou tout au moins ne nécessitant pas l'emploi de mammifères ou d'animaux trop évolués, ont été essayés pour étudier la toxicité des souches de *Fusarium* et les mycotoxines qu'elles produisent.

4-1) Végétaux

Différentes espèces végétales sont employées :

- Racines de cresson (77).
- Plantules de pois (77).
- Disques de feuilles de fève (77).
- Graines de maïs (78).
- Plantules de tabac et de maïs (75).
- Coléoptiles de blé (75, 79).
- Pollens de tabac (80).
- Protoplastes de mésophyle de tabac (81).

4-2) Oeufs embryonnés de poules

La sensibilité de ce test à différentes mycotoxines a été établie par Lafont et coll. (82).

4-3) Larves de crustacés

Les larves de crustacés *Artemia salina* ont été utilisées par Salleh pour étudier les souches de *Fusarium* associées à des toxicoses humaines et animales dans la Péninsule Malaise (81).

4-4) Embryons et larves de poissons

Le poisson zèbre *Brachydanio rerio* peut constituer un modèle biologique pour l'étude d'activités génotoxiques (83).

4-5) Bactéries

Les tests de cancérogénèse sur l'animal entier sont, parmi les tests toxicologiques, les plus onéreux et les plus longs. Sans véritablement les remplacer, les test *in vitro* comme le test bactérien d'Ames peuvent être utilisés. Ce test recherche une génotoxicité potentielle sur des souches de *Salmonella typhimurium* (55, 84, 85, 86)

4-6) Fibroblastes humains ou animaux

Abbas utilise des cultures de fibroblastes diploïdes de la peau humaine et des fibroblastes de souris pour étudier la cytotoxicité des isolats de *Fusarium* (67, 68).

4-7) Cellules tumorales

Uéno utilise les cultures de cellules HeLa pour mesurer le degré de cytotoxicité des trichothécènes (87).

4-8) Réticulocytes de lapin.

Les trichothécènes ont un effet inhibiteur sur la synthèse protéique dans les réticulocytes de lapin (88).

C) CHIMIE

C) CHIMIE : Mycotoxines isolées de *F. moniliforme*

1) <u>Moniliformine</u>	33
1-1) Structure	33
1-2) Isolement et purification	33
1-3) Détection et dosage	33
1-4) Toxicité	34
1-5) La moniliformine et la LEM	34
2) <u>Fusarines</u>	35
2-1) Structures	35
2-2) Isolement et purification	36
2-3) Détection et dosage	36
2-4) Toxicité	36
3) <u>Fusariocines A et C</u>	36
3-1) Structure	37
3-2) Isolement et purification	37
3-3) Toxicité	37
4) <u>Zéaralénone (F2)</u>	37
4-1) Structure	38
4-2) Production	38
4-3) Isolement et purification	38
4-4) Détection et dosage	38
4-5) Toxicité	38
5) <u>Acide fusarique</u>	39
5-1) Structure	39
5-2) Toxicité	39
6) <u>Nitrosamines</u>	40
6-1 Structures	40
6-2 Toxicité	40

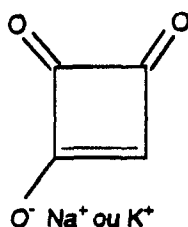
Mycotoxines isolées de *F. moniliforme*

1) Moniliformine

La moniliformine a été isolée initialement par Cole et coll. (75) à partir d'une souche de *F. moniliforme* provenant de grains de maïs des Etats Unis.

1-1) Structure

Cette molécule est un sel de sodium de l'hydroxy-1 cyclobutene-1 dione-3,4 lorsqu'elle est isolée de *F. moniliforme* et un sel de potassium lorsqu'elle est métabolisée par *Gibberella fujikuroi* (89).



Moniliformine $C_4 H_2 O_3$

1-2) Isolement et purification

La moniliformine peut être extraite soit au méthanol (90, 91), soit avec un mélange hydroalcoolique (92), soit à l'eau (93). Elle est purifiée par chromatographie sur plaque préparative, filtration sur charbon actif et cristallisation à l'éther diéthylique (90), ou bien par chromatographie liquide échangeuse d'anion, classique (91) ou à haute performance (93) et colonne de charbon actif (92).

1-3) Détection et dosage

En chromatographie sur couche mince, les révélateurs utilisés sont les rayons UV à 354 nm (90, 94) avec un minimum de détection de 0,15 μg (92); le dinitro-2,4 phénylhydrazine avec chauffage (91, 94) avec un minimum de détection de 0,75 μg (92); une solution de ninhydrine méthanolique à 0,1 % (91) ou la méthyl-3 benzothiazolinone-2 hydrazone (95).

Les taux de production de cette toxine à partir d'un kg de maïs en culture peuvent varier de 200 à 840 mg/kg (92), de 120 à 1170 mg/kg (58), de 60 à 2100 mg/kg (59), de 2 à 16 g/kg (91) ou de 7 à 15 g/kg (90).

Pendant longtemps, la présence de moniliformine a été controversée. Alors que Burmeister et coll. en 1979 (90) ont trouvé un isolat de *F. moniliforme* extrêmement producteur de moniliformine, 7 à 10 g/kg de substrat de culture, Bottalico et coll. (96), en Italie, n'en ont pas décelé dans 13 isolats et en ont trouvé

seulement dans 1 sur 3 de *F. subglutinans*. De même, les sud africains (44, 58), en ont détecté dans 13 isolats toxiques sur 23 de l'espèce *subglutinans*, mais n'en ont pas identifié dans 29 isolats toxiques de *F. moniliforme*.

Depuis, Marasas et coll. (59) ont examiné 149 cultures toxiques d'isolats de *Fusarium* appartenant à la section *Liseola* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum* et *F. succisae*). Excepté *F. succisae* (qui n'avait qu'un seul représentant toxique), tous les autres *taxa* contiennent au moins quelques souches productrices de moniliformine mais diffèrent dans le taux de production. Chez *F. moniliforme*, en particulier, 4 isolats d'un maïs du Mozambique ont une production moyenne de 98 à 200 mg/kg. Un échantillon de maïs américain associé à un cas de LEM, était naturellement contaminé par de la moniliformine à un taux de 2,82 mg/kg (93).

1-4) Toxicité

La moniliformine a un effet phytotoxique et régulateur de croissance sur le blé, le maïs et le tabac (75).

Elle est aussi toxique pour différents mammifères avec une DL 50 de 4 mg/kg pour les jeunes coqs (75), de 2,8 µg/kg pour l'embryon de poule, de 5,4 mg/kg pour les poussins de 1 jour, de 1,38 mg/kg pour des poules de 7 semaines par voie intraveineuse (97), de 29,1 et 20,9 mg/kg respectivement pour les souris mâles et femelles (90), 3,68 mg/kg pour les canetons de 7 jours, enfin 50 et 41,6 mg/kg respectivement pour les rats mâles et femelles (43).

Ces deux dernières espèces montrent après intoxication un affaiblissement musculaire progressif, une insuffisance respiratoire, une cyanose suivie de coma et de la mort. L'autopsie des rats révèle une congestion cardiaque aiguë et les lésions histopathologiques sont caractérisées particulièrement par une dégénérescence et une nécrose myocardique focalisée aiguë, pendant que de sévères nécroses cellulaires isolées apparaissent dans le foie, les reins, le pancréas, les glandes adrénaliques, les glandes à mucus gastrique et les cryptes du petit intestin (43).

A faibles doses de moniliformine, les souris survivent plusieurs semaines. Il semble que les souris soient capables d'excréter rapidement cette mycotoxine ou qu'elles possèdent un mécanisme de détoxification efficace (98).

Pour le cheval, par voie orale ou intraveineuse, la moniliformine est fortement toxique (35). Les signes cliniques incluent une mort rapide sans signe prémonitoire. Les lésions observées sont une dégénérescence myocardique multifocale, des nécroses précoces, un oedème pulmonaire marqué et de la congestion.

Le mécanisme moléculaire majeur de l'action toxique de la moniliformine semble constitué par les effets inhibiteurs des oxydations mitochondriales du pyruvate et de l' α -cétooglutarate qui sont rencontrées dans le métabolisme énergétique (99).

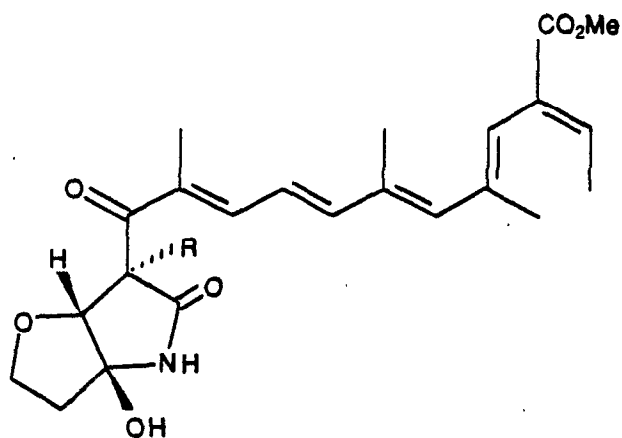
1-5) La moniliformine et la LEM

Il semble que la moniliformine ne soit pas responsable de la LEM; en effet, plusieurs isolats de *Fusarium moniliforme* de maïs moisi qui induisent la LEM chez les chevaux (43) ont été reportés comme n'étant pas producteur de cette toxine (38, 43, 44, 59).

2) Fusarines

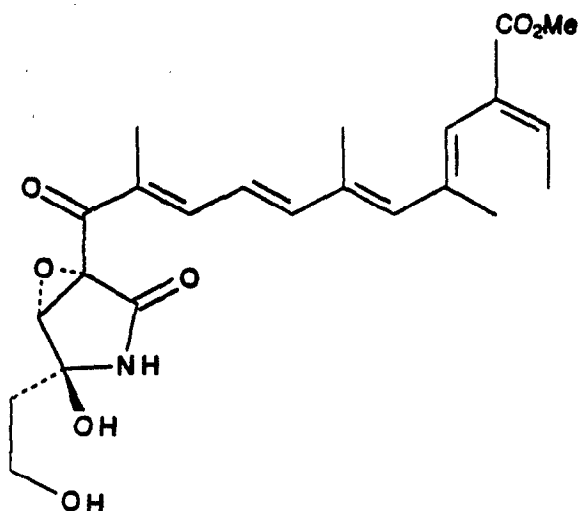
Les fusarines A, B, C et D ont tout d'abord été isolées par Bjeldanes et coll. en 1980 sous la dénomination de fusariogénines, à partir de cultures de *Fusarium moniliforme* sur maïs (41, 86).

2-1) Structures (100)



Fusarine A (R = H) C₂₃ H₂₉ N O₆

Fusarine D (R = OH) C₂₃ H₂₉ N O₇



Fusarine C C₂₃ H₂₉ N O₇

La structure de la fusarine B n'a pas été définie.

2-2) Isolement et purification

La fusarine C est isolée d'une culture sur maïs incubée à l'obscurité pendant 2 semaines à 25°C, 1 semaine à 10°C puis 1 semaine à 25°C. L'extraction se fait avec un mélange de chloroforme et d'isopropanol, et la purification est effectuée par partition de solvants, chromatographie sur silice et sephadex LH 20 (101). Elle peut être aussi extraite avec de l'acétonitrile ou un mélange à parts égales d'acétonitrile et de chlorure de méthylène (95).

2-3) Détection et dosage

Après purification, la fusarine C peut être dosée par chromatographie liquide à haute performance en phase normale ou inverse (52, 93, 95).

Wiebe et coll. (86) ont obtenu approximativement 0,4 g de fusarine C et un peu moins de fusarines A, B et D à partir d'un kg de maïs moisi. Gelderblom (52) montre que toutes les cultures à partir de 20 isolats de *F. moniliforme* contiennent de la fusarine C à des concentrations variant entre 0,6 et 700 mg/kg. Cette molécule est aussi produite par *F. graminearum* (5 isolats sur 5), mais pas par *F. subglutinans*.

La fusarine C existe naturellement dans le maïs contaminé par *F. moniliforme* à des taux de 0,02 à 0,28 mg/kg (52) et 0,39 mg/kg (93).

2-4) Toxicité

La fusarine C est fortement mutagène pour *Salmonella typhimurium* dans le test de Ames (52, 86, 101). Son activité est comparable à celle de l'aflatoxine B1 et de la stérigmatocystine (52).

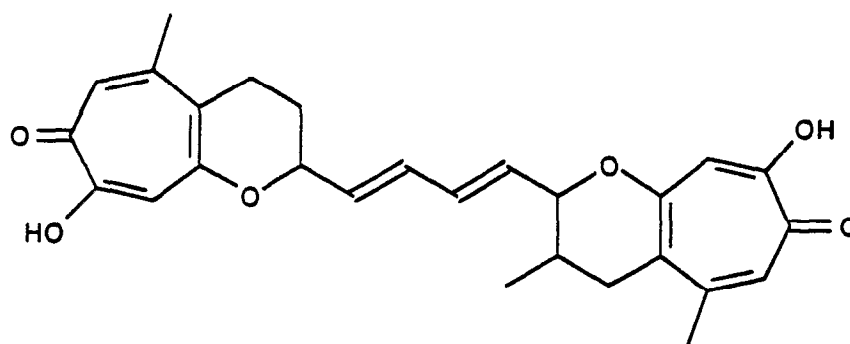
Sa présence a été décelée dans des échantillons de maïs, collectés dans une région de Pennsylvanie sujette à une épidémie de LEM chez les chevaux et ayant provoqué des phénomènes hépatotoxiques et hépatocarcinogéniques chez le rat (93). Son action activatrice de cancer a été recherchée sur le rat et les résultats négatifs indiquent qu'elle n'est pas responsable de l'activité hépatocarcinogénique des isolats de *F. moniliforme* (53).

Il est à noter également que des cultures de maïs contenant ces mutagènes ne produisent pas d'effets toxiques apparents *per os* sur des coqs de 21 jours (41, 86). Ces résultats suggèrent que les fusarines ne sont pas hautement toxiques pour les poussins tout au moins aux taux produits en cultures expérimentales.

3) Fusariocines A et C

Ces deux mycotoxines ont été isolées d'un filtrat de culture de *Fusarium moniliforme* par une équipe japonaise (42, 102).

3-1) Structure



Fusariocine C $C_{27}H_{28}O_6$

Cette structure a été établie par diffraction aux rayons X (103).

La structure de la fusariocine A n'a pas été définie.

3-2) Isolement et purification

L'isolat est cultivé sur milieu de Adye modifié à 27°C pendant 7 jours. Le filtrat de culture est ajusté à pH 2 et extrait à l'acétate d'éthyle, puis au chloroforme. Après chromatographie sur silice, le produit est cristallisé dans la pyridine sous la forme de prismes jaune pâle.

3-3) Toxicité (42)

Sa DL 50 sur souris est de 3,97 mg/kg.

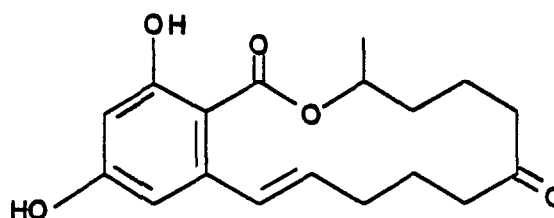
La fusariocine C est cytotoxique pour les cellules HeLa et les cellules leucémiques L1210. Pour les premières, l'effet toxique apparaît à la concentration de 5 µg/ml et pour les secondes, l'effet semble dépendant du temps, le taux d'inhibition étant de 15 % à 1 µg/ml après 24 h et de 85 % à la même dose après 72 h.

In vivo, la fusariocine C montre une légère activité antitumorale sur la forme ascitique du carcinome d'Ehrlich.

4) Zéaralénone (F2)

La zéaralénone est une mycotoxine œstrogénique produite par différentes espèces de *Fusarium* (5, 96, 104, 105).

4-1) Structure



Zéaralénone $C_{18}H_{22}O_5$

4-2) Production

Les conditions de température de culture du champignon sur maïs, préconisées pour une production maximale de zéaralénone, diffèrent selon les auteurs. Mirocha et coll. (106) considèrent que les enzymes responsables de la biosynthèse de la F2 sont activés à basse température (12 °C.) et qu'une meilleure production est ensuite obtenue par incubation à 27 °C. D'autres débutent la culture par une température élevée pour optimiser la croissance du champignon et continuent par une température plus basse (5, 67, 104, 107), alors que Bottalico et coll. (96) montrent que la plupart des souches toxicogéniques en produisent à température constante de 27 °C.

4-3) Isolement et purification

La zéaralénone est extraite à l'éthanol, purifiée par chromatographie et cristallisée sous forme d'aiguilles blanches dans le chloroforme et l'hexane (5, 104).

4-4) Détection et dosage

La méthode la plus couramment employée est la chromatographie sur couche mince avec différents systèmes de solvants (5) et une révélation soit aux rayons UV (67, 104, 108, 109) soit avec divers réactifs (110, 111). Des méthodes plus sensibles comme la chromatographie liquide à haute pression, la chromatographie en phase gazeuse seule ou liée à la spectrométrie de masse peuvent être utilisées (5, 94, 112, 113).

La zéaralénone a été décelée dans *F. moniliforme* par certains auteurs (105, 114), mais, sur 100 isolats testés de cette espèce, seulement 7 se sont révélés producteurs de ce métabolite à des taux très faibles de 1 à 15 ppm (7).

4-5) Toxicité

Ce composé est peu toxique; une seule dose orale de 20 mg/kg ne cause pas la mort de souris ou de rats.

Sa particularité est de provoquer un syndrome œstrogénique chez le porc : développement de l'utérus et des glandes mammaires, atrophie des testicules et prolapsus vaginal, apparition d'une vulve tuméfiée et œdématisée (5, 106). Cette activité œstrogénique peut être décelée sur l'utérus de souris (67, 104, 106).

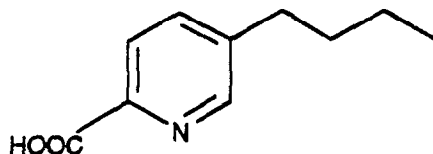
La consommation de zéaralénone par des truies en fin de grossesse provoque la naissance de morts-nés ou de porcelets souffrant d'incoordination des membres arrières avec les pattes tournées vers l'extérieur (107).

La zéaralénone est un léger stimulateur de croissance aussi bien pour les muscles que pour les tissus végétaux (106).

5) Acide fusarique

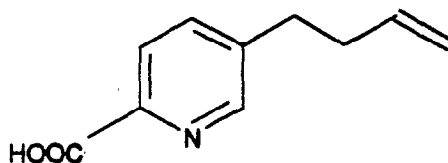
L'acide fusarique est un métabolite de différentes espèces de *Fusarium* dont *F. moniliforme*.

5-1) Structure



Acide fusarique $C_{10}H_{13}NO_2$

L'acide déhydrofusarique a aussi été isolé de *Gibberella fujikuroi*. (115).



Acide déhydrofusarique $C_{10}H_{11}NO_2$

5-2) Toxicité (115)

L'acide fusarique est un inhibiteur de la croissance des plantes.

Il possède des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides (116).

Il montre une action hypotensive chez le lapin, le chien ou le rat à une dose de 20 mg/kg par voie intrapéritonéale et une action émétique sur le chien en *per os*. (117).

Sa DL 50 sur souris est de 100 mg/kg en injection intraveineuse et de 80 mg/kg en injection intrapéritonéale.

Ce composé est aussi un agent chélateur qui est rencontré dans certaines maladies de développement anormal des os chez les animaux (7).

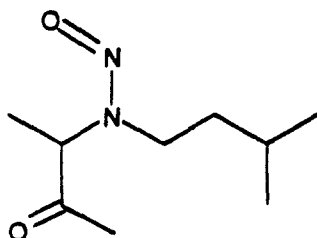
C'est un inhibiteur puissant de la dopamine β -hydroxylase du plasma sanguin, c'est à dire que cliniquement, chez l'homme, il réduit la pression du sang artériel (118, 119).

L'acide fusarique n'est pas toxique pour le cheval (35).

6) Nitrosamines

Quatre nitrosamines, N-diméthylnitrosamine, N-diéthylnitrosamine, N-méthyl-N-benzylnitrosamine (MBNA) (48) et N-3-méthylbutyl-N-1-acétonylnitrosamine (MAMBNA) (54) ont été isolées de pain de maïs inoculé avec des isolats chinois de *F. moniliforme* suivi d'une nitrosation avec du nitrite de sodium.

6-1) Structures



MAMBNA (C₉ H₁₈ N₂ O)

6-2) Toxicité

Ces nitrosamines sont connues pour être carcinogéniques. Elles sont mutagènes pour les souches de *Salmonella typhimurium* (55). Elles peuvent jouer un rôle dans l'étiologie du cancer de l'œsophage en Chine.

Les autres métabolites isolés de *F. moniliforme* ou de *Gibberella fujikuroi*, ainsi que les mycotoxines et métabolites isolés d'autres espèces de *Fusarium* sont décrits en annexe.

RECHERCHES SUR LA LEM EN NOUVELLE CALEDONIE

A) RECHERCHE D'UN TEST BIOLOGIQUE ET D'UNE SOUCHE TOXIQUE

A) RECHERCHE D'UN TEST BIOLOGIQUE ET D'UNE SOUCHE TOXIQUE

1) <u>Tests de phytotoxicité</u>	45
1-1) Méthodologie	45
1-2) Résultats	45
2) <u>Tests d'ichthyotoxicité</u>	46
2-1) Méthodologie	46
2-2) Résultats	46
3) <u>Injection intrapéritonéale chez la souris adulte</u>	46
3-1) Méthodologie	46
3-2) Résultats	47
4) <u>Injection intrapéritonéale chez le rat de 20 jours</u>	47
4-1) Méthodologie	47
4-2) Résultats	47
5) <u>Administration <i>per os</i> chez la souris</u>	48
5-1) Méthodologie	48
5-2) Résultats	49
6) <u>Administration <i>per os</i> chez le rat adulte</u>	49
6-1) méthodologie	49
6-2) Résultats	49
7) <u>Administration <i>per os</i> chez le rat de 20 jours</u>	50
7-1) Méthodologie	50
7-2) Résultats	50
8) <u>Administration <i>per os</i> chez le poussin</u>	52
8-1) Méthodologie	52
8-2) Résultats	53
9) <u>Administration <i>per os</i> chez le caneton de 1 jour</u>	53
9-1) Méthodologie	53
9-2) Résultats	55
10) <u>Injection dans l'oeuf embryonné de poule</u>	57
10-1) Méthodologie	57
10-2) Résultats	57

11) <u>Dépôt cutané sur le rat</u>	59
11-1) Méthodologie	59
11-2) Résultats	59
12) <u>Injections intrastomacales chez le souriceau</u>	59
12-1) Méthodologie	59
12-2) Résultats	59
13) <u>Injections intracérébrales chez le souriceau</u>	60
13-1) Méthodologie	60
13-2) Résultats	60
14) <u>Cultures de cellules</u>	60
15) <u>Conclusion</u>	60

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

Nos premières études 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.

Une soixantaine d'isolats de *F. moniliforme* ont été testés sur plusieurs espèces végétales (blé, pois, fèves, maïs) ou animales (poissons, rats, souris, canetons, poussins, oeufs embryonnés de poule), suivant diverses méthodes d'application (test cutané) ou d'administration (injection intrapéritonéale, intrastomacale ou intracérébrale, sondage œsophagien, *per os*).

Les souches isolées du maïs sont purifiées sur un milieu P.D.A. (Potato, Dextrose, Agar) à fort pouvoir antibiotique (Pénicilline, Colimycine), et conservées en tubes sur 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 afin de travailler avec des clones.

Les isolats sont cultivés sur les substrats suivants :

- Milieux de culture liquides non synthétiques : pomme de terre-dextrose : 125 g de purée "mousseline" et 10 g de glucose dans 1 l d'eau distillée. Ce milieu est stérilisé par autoclavage.

- Milieux de culture semi-synthétiques liquides : milieu de Czapek, milieu de Uéno

*milieu Czapek :	saccharose :	30 g
	peptone :	10 g
	nitrate de sodium	2 g
	phosphate dipotassique	1 g
	sulfate de magnésium (7H ₂ O)	1 g
	chlorure de potassium	0,75 g
	sulfate de fer	0,01 g

pour 1 l d'eau distillée.

*milieu Uéno : identique au milieu Czapek, excepté

sulfate de magnésium	0,5 g
chlorure de potassium	0,5 g

Ces milieux sont stérilisés par autoclavage.

- Substrat 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.

- Substrat riz : 400 g de riz étuvé additionné de 240 ml d'eau sont disposés en Erlenmeyer de 2 l, stérilisés puis ensemencés dans les mêmes conditions que le maïs.

1) Tests de phytotoxicité

1-1) Méthodologie

Les cultures sur milieux liquides czapek ou pomme de terre-dextrose de différentes souches de *Fusarium* sont filtrées sur buchner et verre fritté. Le mycélium essoré est broyé à l'Ultra-Turrax dans 100 ml d'eau distillée.

- Pour le maïs (75), les échantillons auxquels on a ajouté une solution de Tween 80 (1/1000), sont déposés au centre de la gaine de plantules de 7 jours. L'observation dure 2 à 3 semaines.

- Pour les pois (77), les échantillons sont dilués par une solution de Tween et de glycérol, et sont pulvérisés sur les plantules. L'observation dure 2 à 3 semaines.

- Pour le blé (79), des coléoptiles de 5 mm de blé de 6 jours ayant poussé à l'obscurité sont déposés dans des tubes contenant du tampon phosphate citrate, du sucrose et du filtrat de culture. Après 24 h à l'obscurité, les coléoptiles sont mesurés.

- Pour les pois (77), l'accroissement internodale est mesuré sur des fragments déposés dans des tubes contenant du tampon phosphate, de l'acide indolacétique et du filtrat de culture après 24 h.

- Pour les fèves (77), le diamètre de disques de feuilles dans un mélange de sucrose et d'acide indolacétique dans un tampon phosphate est mesuré après 48 h de haute intensité lumineuse.

1-2) Résultats

Le seul test qui donne des résultats significatifs est celui de la phytotoxicité sur maïs. Il sera utilisé dans un premier temps pour sélectionner les souches toxiques et rechercher les meilleures conditions de culture et sera ensuite délaissé au profit des tests sur rats, car aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la phytotoxicité et la toxicité enregistrée sur les rongeurs.

2) Tests d'ichthyotoxicité

2-1) Méthodologie

Ces tests ont été couplés avec ceux de phytotoxicité. Les filtrats de culture et les broyats de mycélium sont déposés dans des petits aquarium de 1 litre contenant 5 tilapias ou 5 guppies (*Gambusia affinis*), ou 10 crevettes d'eau saumâtre. La mortalité est observée durant 48 heures.

2-2) Résultats

La toxicité des cultures n'est pas nettement marquée et la reproductibilité des résultats n'est pas assurée avec ce test.

3) Injection intrapéritonéale chez la souris adulte

3-1) Méthodologie

Les échantillons fusariens sont administrés sous un volume de 0,5 à 1 ml. Le protocole vise à mettre en évidence une intoxication aiguë après l'administration d'une dose, ou chronique après une série d'administrations à dose plus faible.

Ces expériences ont concerné :

- 38 souches différentes,
- 3 substrats de culture (maïs, Czapek, pomme de terre-dextrose),
- 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 administrés (concentrés 10 fois, bruts ou dilués du 1/10 au 1/1000^{ème}) :
 - * filtrats ou surnageants de cultures brutes,
 - * mycéliums bruts ou broyés, puis filtrés,
 - * mycéliums traités à la chaleur ou aux rayons UV,
 - * extraits chlorométhyléniques de filtrats ou de mycéliums,
 - * extraits méthanol-eau de filtrats ou de mycéliums,
 - * extraits à l'acétate d'éthyle de cultures entières,
 - * filtrats de macérations aqueuses de maïs contaminé.

Plus de 250 échantillons différents ont été administrés à environ 1500 souris.

3-2) Résultats

Les symptômes et lésions suivants ont été relevés :

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

Le bilan de cette expérience 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 utilisées, peu d'extraits se sont montrés toxiques. De plus, les résultats obtenus sont peu reproductibles.

4) Injection intrapéritonéale chez le rat de 20 jours.

4-1) Méthodologie

La souche de rats utilisée est une souche albino Sprague Dawley.

Les substances injectées aux rats sont des filtrats de cultures broyées à "l'Ultra Turrax" dans leur milieu. Les broyats bruts ainsi obtenus sont débarrassés 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 μm , permet de recueillir un filtrat stérile qui est alors lyophilisé.

Le lyophilisat est injecté à des lots de rats de 20 jours sous différentes concentrations après avoir été remis en solution dans du sérum physiologique stérile.

Les essais ont été effectués avec des cultures sur milieux riz et Ueno de deux souches faiblement toxigènes et de deux souches fortement toxigènes.

Seule la toxicité aiguë provoquant la mort des animaux a été recherchée.

4-2) Résultats

Dans la majorité des cas, la mort survient dans les trente minutes suivant l'injection.

L'autopsie des rats n'a révélé aucune lésion organique identifiable. Dans un seul cas, celui de l'injection de la culture sur riz d'une des souches toxigènes, un rat a été tué en 5 jours et son autopsie a révélé un ictère important. Ce résultat laisse penser qu'il est peut-être possible d'induire une toxicité chronique entraînant des lésions identifiées.

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

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

5) Administration per os chez la souris

5-1) Méthodologie

Les cultures sont conduites sur maïs ou riz, dans 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. L'aliment est préparé par le mélange de produits de base et de substrats fusariens en poudre. Les formules alimentaires ont été équilibrées en fonction des aliments de base disponibles.

Par exemple :	maïs fusarien sec	500 g
	aliment canin	300 g
dont	protéines	21 %
	lipides	6 %
	matière minérale	7 %
	cellulose	2,5 %
	H.R.	9 %
	avoine	200 g

	TOTAL	1000 g

Les aliments sont distribués sous forme de cubes de 2 cm de coté 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,
- prédécoupage de cubes, à la manière des plaques de chocolat,
- séchage 2 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 d'estimer plus précisément les quantités ingérées par les animaux.

Les souris sont regroupées en lots de 5 à 10 individus, selon les cas. Les poids vifs sont contrôlés chaque semaine, puis au moment de l'euthanasie.

L'observation dure en général une vingtaine de jours. Pour certaines souches, cette période est portée à 3 mois, et même à 6 mois dans un cas. Après autopsie des animaux morts durant la période

d'observation, ou sacrifiés en fin d'expérience, 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.

5-2) Résultats

Le mode de préparation des aliments et l'appétence ne posent pas de problème. Ce test paraît peu sensible sur souris 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, puis 10 jours à 25 °C,
 - * 12 jours à 20 °C et 15 jours à 12 °C,
- observations durant 20 jours pour 18 souches, 3 mois pour 7 souches et 6 mois pour une souche.

Les expériences ont porté sur près de 400 souris. Aucun symptôme n'a été relevé, pas d'anorexie, pas d'abattement, pas d'amaigrissement. Après sacrifice, les lésions rencontrées sont minimales se résumant à quelques pétéchies sur le foie ou le poumon. Les analyses hématologiques ont pu faire penser, en première approche, qu'il y avait leucopénie, avec neutrophilie et lymphocytose; mais, nous avons observé que ces anomalies étaient très inconstantes non seulement 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

6-1) Méthodologie

L'administration s'est faite en incluant les cultures fusariennes à l'aliment, dans les mêmes conditions que celles décrites pour les expériences réalisées sur souris.

La durée d'observation a atteint 6 mois.

6-2) Résultats

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

Cet essai n'a pas été concluant. Aucun symptôme et aucune lésion n'ont été observés pendant les 6 mois de l'expérimentation.

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

7-1) Méthodologie

La souche de rats est la même que dans les cas précédents.

Dans cette expérience, les souches ont été cultivées sur deux substrats (maïs et riz en grains entiers) et sous deux conditions d'incubation (15 jours à 25 °C suivis de 10 jours à 10 °C; 30 jours à 25 °C).

Lorsque les cultures sont incluses dans la ration alimentaire, le mode de préparation est le même que celui décrit pour les souris.

La proportion de culture fusarienne sur riz ou maïs dans l'aliment est en général de 50 %. Dans certaines expériences, l'aliment distribué est constitué par la culture fusarienne pure.

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

Dans chaque série, l'expérimentation s'est déroulée sur 15 jours, terme au-delà duquel les animaux survivants ont été sacrifiés puis autopsiés.

7-2) Résultats

Cette expérimentation s'est révélée très sensible dès les premières séries qui ont donné des résultats reproductibles et constants. L'incorporation du riz ou du maïs 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 est sans influence sur l'expression de la toxicogénie. Les deux conditions de température pour l'incubation donnent des résultats similaires.

49 souches de *Fusarium* dont 48 de l'espèce *F. moniliforme* et une de *F. graminearum* (souche 72), ont donc été cultivées sur riz (substrat plus facile à utiliser que le maïs) dans les conditions d'incubation les plus simples, c'est à dire environ 25 °C, température du laboratoire, pendant 21 jours (120).

Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Plusieurs paramètres ont été évalués :

- la Consommation Moyenne Quotidienne d'aliment contaminé par animal (C. M. Q.),
- le Gain Moyen Quotidien de poids par animal (G. M. Q.),
- le rapport 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.

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

Tableau 2 : 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	Testés	Mortalité 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	0,1	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	-0,1	-0,029	4	0
68 B	2,6	-0,11	-0,042	16	0
106	3,6	-0,2	-0,05	3	0
70	1,8	-0,09	-0,05	3	1
115	4	-0,29	-0,071	3	0
119	2,7	-0,2	-0,074	3	0
24	3,3	-0,26	-0,078	3	0
83	2,1	-0,17	-0,08	3	0
114	2,9	-0,24	-0,08	3	0
112	2,2	-0,3	-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 (4)	1,04	-0,129	-1,24	3	3
91	0,6	-0,8	-1,3	3	3
120	0,4	-0,53	-1,32	3	3
121	0,75	-1	-1,33	3	3
75	0,4	-0,6	-1,5	5	5
68 R	0,65	-1,4	-2,15	25	24
116	0,2	-0,5	-2,5	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) isolat de *F. graminearum*. (4) isolat sud-africain.

Les souches ont été classées en fonction de la valeur du rapport G.M.Q./C.M.Q., par ordre de toxicité croissante. Ce rapport passe de 0,16 pour la souche 13 à -3,5 chez les souches 77 et 85, 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 d'autre part par des taux de mortalité croissant jusqu'à 100 % des animaux intoxiqués.

Il apparaît qu'une forte proportion de souches néocalédoniennes de *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. 14 souches sur les 48 étudiées - soit 29 % - provoquent la mort de 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.

Cette technique présente cependant l'inconvénient d'être lente : 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 et nécessite des quantités importantes de matière toxique.

8) Administration *per os* chez le poussin

8-1) Méthodologie

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 de la manière suivante :

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 observées lors de l'autopsie, sont notés.

Nos expérimentations 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.

8-2) Résultats

Au total, 300 poussins ont été utilisés pour ce test qui s'est révélé totalement négatif. Aucune intoxication identifiable n'a été obtenue.

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 obtenus, par ailleurs, par d'autres équipes (57, 58, 59, 60) chez le caneton Pékin, une expérimentation a été réalisée sur cette espèce animale (121).

9-1) Méthodologie

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 (ration I), soit un mélange dont les proportions des produits de base permettent d'obtenir un aliment final équilibré et correctement supplémenté en vitamines et acides aminés essentiels (ration II). La composition des rations I et II est donnée dans le tableau 3

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 2^{ème} jour de vie sous forme d'une pâtée préparée par l'adjonction de 500 ml d'eau à 1 000 g de farine.

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 d'autopsie sont notés.

Tableau 3 : Composition des deux types d'aliments étudiés

	Ration I		Ration II	
Maïs fusarien	500	g	520	g
Soja	+		310	g
Farine de riz	-		120	g
Blé	150	g	-	
Orge	50	g	-	
Maïs	214	g	-	
Sorgho	+		-	
Son (brisures)	+		-	
Tournesol	+		-	
Farine de viande	84	g	-	
Phosphate bicalcique	-		15	g
Sel	5	g	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	1260000	UI
- Vit. D3	1000	UI	420000	UI
- Vit. E	10	UI	2100	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

9-2) Résultats

Dans un premier temps, 43 souches de *F. moniliforme* isolées en Nouvelle-Calédonie ont été testées après avoir été incorporées à l'aliment équilibré (ration II). 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.

Un essai sur une souche d'origine sud-africaine (souche MRC 826), considérée comme fortement toxicogène pour le caneton (44), a donné un résultat négatif : les canetons ont survécu sans manifester de symptôme d'intoxication.

Cette divergence entre nos résultats et ceux des sud-africains, nous a conduit à reprendre notre expérimentation en incorporant les cultures de *Fusarium*, non plus à un aliment équilibré, mais à un aliment habituel du commerce (ration I), suivant en cela le protocole utilisé par l'équipe sud-africaine.

Les résultats de cette seconde expérimentation figurent dans le tableau 4

Ils mettent en évidence les faits suivants :

- une faible assimilation de l'aliment du commerce (ration I) par rapport à l'aliment équilibré (ration II). A consommation égale, le différentiel de prise de poids est de 50 % chez les canetons nourris avec la ration I;

- l'effet toxique n'apparaît significativement que chez les canetons recevant la ration I. Ainsi la souche 68R, létale pour les rats de 20 jours dans nos expérimentations antérieures (tableau 2), 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 6 jours, ce qui confirme les résultats rapportés par Kriek et coll. (44);

- la souche 68B, non toxique pour le rat, ne provoque pas de toxicité chez le caneton, quelque soit le type d'aliment auquel on l'incorpore;

- ces observations qui mettent en évidence la toxicité de la souche 68R, et l'innocuité de la souche 68B, confirment les résultats obtenus par Marasas et coll. (communication personnelle) sur les mêmes souches;

- lorsque la souche 68R, toxique, est incorporée à la ration I, la consommation de l'aliment est 32 fois plus faible que lorsque cette souche est incorporée à la ration II. La présence de la souche 68R dans l'aliment du commerce induit donc un refus de nourriture très significatif chez les canards, ce phénomène n'étant 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 l'ingestion de l'aliment du commerce (ration I) contaminé par la souche toxique, alors que ces

Tableau 4 : Toxicité de certaines souches suivant la composition de la ration alimentaire

Ration alimentaire	nb de canetons	nb de morts	temps moyen de mortalité	poids moyen de départ (g)	poids moyen final (14 j) (g)	quantité consommée / caneton (g)
Témoin Ration I	13	0	-	46	181	562
Témoin Ration II	18	0	-	49	363	566
68 B Ration I	10	0	-	47	131	240
68 B Ration II	10	0	-	46	335	560
68 R Ration I	20	20	5,2 j	44	40,2	15
68 R Ration II	14	0	-	48	324	486
MRC 826 Ration I	13	10	5,8 j	48	48 (morts) 89 (sacrif.)	32
MRC 826 Ration II	14	0	-	45	300	400

symptômes n'existent pas chez les canards ayant reçu la ration II équilibrée et contaminée par cette même souche.

L'hypothèse qu'un ou plusieurs éléments de la ration II empêche(nt) la toxine de s'exprimer étant envisageable, nous avons abordé cette étude en supprimant dans la ration équilibrée, différents éléments un par un.

Les résultats (tableau 5) montrent que tous les éléments semblent indispensables puisque la suppression d'un seul d'entre eux suffit à rendre l'aliment toxique lorsqu'il est contaminé par la souche 68R.

Le test *per os* sur caneton Pékin de 1 jour est donc efficace si les souches sont incorporées à un aliment déséquilibré qui affaiblit l'animal et permet à la (aux) toxine(s) de s'exprimer. Les résultats que nous avons obtenus dans cette expérimentation sont par ailleurs en accord avec ceux de l'épreuve chez le rat de 20 jours. Il faut toutefois noter que les conditions expérimentales ne sont pas satisfaisantes car le déséquilibre de la ration alimentaire peut entraîner des artefacts de toxicité qui rendent l'utilisation de ce test aléatoire.

10) Injection dans l'oeuf embryonné de poule

10-1) Méthodologie

Les souches de *Fusarium* sont cultivées sur milieu Uéno, Czapek ou sur maïs pendant :

- 21 jours à 20 °C,
- 10 jours à 20 °C et 10 jours à 12 °C.

Plusieurs types d'extraits ont été utilisés :

- mycélium broyé,
- surnageant de culture, bruts, dilués ou concentrés,
- filtrats de maïs fusarien macéré dans l'eau,
- extraits chloroformiques de filtrats de culture ou de broyats mycéliens.

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.

10-2) Résultats

Les essais ont été effectués avec les souches 68R et 110. Les résultats enregistrés sont encourageants et en accord avec ceux des épreuves *per os*. Malheureusement, la présence dans nos

Tableau 5 : Recherche de l'élément indispensable pour annuler la toxicité de l'aliment contaminé

Ration alimentaire	nb de canetons	nb de morts	temps moyen de mortalité	poids moyen de départ (g)	poids moyen final (14 j) (g)	quantité consommée / caneton (g)
68 R Ration II (- prémix)	7	3	5 j	39	123	190
(- vitamines)	7	4	9,1 j	54	140	228
(- Méthionine)	7	6	8,7 j	70	98	177
(- 1/2 soja)	7	7	4,2 j	38	-	10
68 R Ration I (+ 1/2 soja)	7	6	6,9 j	40	67	57

extraits d'une substance inconnue entraînant la "coagulation" épisodique des oeufs, masque la toxicité et rend ce test parfois difficilement interprétable.

11) Dépôt cutané sur le rat

Ce test vise à mettre en évidence l'activité dermonécrosante de trichothécènes éventuellement présents dans l'extrait ou d'autres molécules aux mêmes propriétés.

11-1) Méthodologie

Il 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 Uéno et incubées :

- 21 jours à 20 °C,
- 21 jours à 31 °C,
- 7 jours à 25 °C, 15 jours à 7 °C, puis 15 jours à 25 °C,
- 15 jours à 25 °C et 7 jours à 12 °C,
- 10 jours à 25 °C, 7 jours à 12 °C, puis 10 jours à 25 °C,
- 10 jours à 20 °C et 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 (max. 6 fois). Chaque extrait est testé sur au moins 2 rats.

11-2) Résultats

Aucun résultat positif reproductible n'a été obtenu avec cette méthode; ce qui tend à indiquer que les souches de *F. moniliforme* ainsi cultivées, ne produisent pas de trichothécènes.

12) Injections intrastomacales chez le souriceau

12-1) Méthodologie

Des échantillons de 100 µl à 0,01, 0,1, 1 et 2 mg d'extraits sont injectés directement dans l'estomac de souriceaux de 2 à 3 jours, pesant environ 1,5 g, à l'aide d'une microseringue. La mortalité et les phénomènes d'entérosorption ou d'hémorragies sont recherchés dans les 24 h suivant l'injection.

12-2) Résultats

Les premiers résultats, en particulier avec la phase méthanolique d'une chromatographie sur résine XAD2 (chap B-3-5), ont montré l'apparition d'une action au niveau du cerveau, action

hémorragique avec lyse de la matière cérébrale. Il faut noter 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.

Ces résultats n'ont pu cependant être reproduits avec d'autres extraits ou avec les différentes toxines que nous avons isolées, injectées seule ou en association.

13) Injections intracérébrales chez le souriceau

13-1) Méthodologie

Pour essayer d'atteindre directement l'organe-cible, des échantillons de 10 µl à 1, 10, 100 ou 500 µg sont injectés dans le cerveau de souriceaux de 2 à 3 jours à l'aide d'une microseringue. La mortalité et les effets hémorragiques au niveau du cerveau sont recherchés dans les 24 h suivant l'injection.

13-2) Résultats

Ce test ne peut s'effectuer qu'avec des fractions relativement pures. Les toxines isolées n'ont pas donné de résultats notables.

14) Cultures de cellules

L'effet des extraits fusariens sur les cultures de cellules cancéreuses humaines Kb et cellules Véro, a été étudié. L'absence d'activité sur les premières et la mauvaise corrélation des résultats avec ceux des tests chez le rat pour les secondes n'ont pas permis de retenir ce type de test de toxicité.

15) Conclusion

Il semble donc que, parmi les différents animaux de laboratoire que nous avons essayés, le rat soit le plus sensible aux toxines de *F. moniliforme*. Le test par administration *per os* est facilement réalisable et a permis de sélectionner les souches toxiques, mais, dans l'optique de l'étude des extraits fusariens, et pour une maîtrise plus rigoureuse de la dose administrée, nous avons préféré utiliser une méthode d'administration par sondage œsophagien chez le rat de 20 jours.

B) RECHERCHE DE L'EXTRAIT TOXIQUE

B) RECHERCHE DE L'EXTRAIT TOXIQUE

1) <u>Administration par sondage œsophagien chez le rat de 20 jours</u>	62
1-1) Méthodologie	62
1-2) Résultats	62
2) <u>Administration par sondage naso-œsophagien chez le cheval</u>	64
2-1) Méthodologie	64
2-2) Résultats	65
3) <u>Méthodes de séparation</u>	67
3-1) Solubilisation	67
3-2) Extraction	67
3-3) Précipitation	68
3-3-1) Précipitation à l'acétone	68
3-3-2) Précipitation à l'alcool	68
3-4) Adsorption sur charbon actif	68
3-5) Chromatographie sur résine Amberlite XAD2	68
3-6) Dialyse	68
3-7) Ultrafiltration Amicon	70
3-8) Séphadex	70
3-9) Couplages de plusieurs procédés	70
4) <u>Conclusion</u>	70

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

1-1) Méthodologie

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 se fait pendant 21 jours à température ambiante (25 à 27 °C).

Les premières extractions ont été effectuées avec un mélange hydroalcoolique. La culture fraîche ou lyophilisée est broyée finement, mise en agitation dans l'éthanol à 80 % pendant 12 heures puis filtrée. La phase liquide est évaporée sous pression réduite, reprise dans l'éthanol à 10 % et administrée aux rats à l'aide d'une sonde œsophagienne. La phase solide est séchée puis administrée *en per os*.

Tout extrait est administré sous le volume de 1 ml et à une dose équivalente à 7,6 g de culture fusarienne fraîche (dose moyenne nécessaire pour intoxiquer un rat) à des lots de 4 à 5 rats de la souche albino Sprague Dawley. Cette dose a été mesurée expérimentalement lors des premiers essais d'intoxication *en per os*.

Le gain pondéral et la quantité d'aliments ingérée pour chaque animal, a permis de calculer le rapport MGMQ/MCMQ (rapport de la moyenne des gains moyens quotidiens sur la moyenne des consommations moyennes quotidiennes) pour chaque expérimentation. Ce rapport, associé au taux de mortalité, est un bon indicateur de la toxicité de l'échantillon testé.

La toxicité peut aussi être visualisée en traçant la courbe de l'évolution pondérale des rats. Par exemple, sur la figure 3, la toxicité d'un extrait aqueux d'une souche toxique (68R) est comparée à celle d'un extrait aqueux d'une souche non toxique (68B).

1-2) Résultats

Le test de toxicité par sondage œsophagien chez le rat de 20 jours s'avère en définitive le plus fiable. Les rapports MGMQ/MCMQ enregistrés lors des différentes étapes de la purification sont de l'ordre de 0,3 à 0,9 pour les fractions non toxiques et peuvent varier de -10 à 0 pour les fractions toxiques avec un taux de mortalité de 0 à 100 %.

Après confirmation de sa toxicité, l'extrait hydroalcoolique sec est repris par de l'éthanol, puis par de l'eau distillé; le test sur rat a mis en évidence une fraction aqueuse aussi toxique que l'extrait initial et une fraction alcoolique de toxicité moyenne. Les principes toxiques semblent donc hydrosolubles et de polarité telle que leur solubilité reste importante dans l'éthanol.

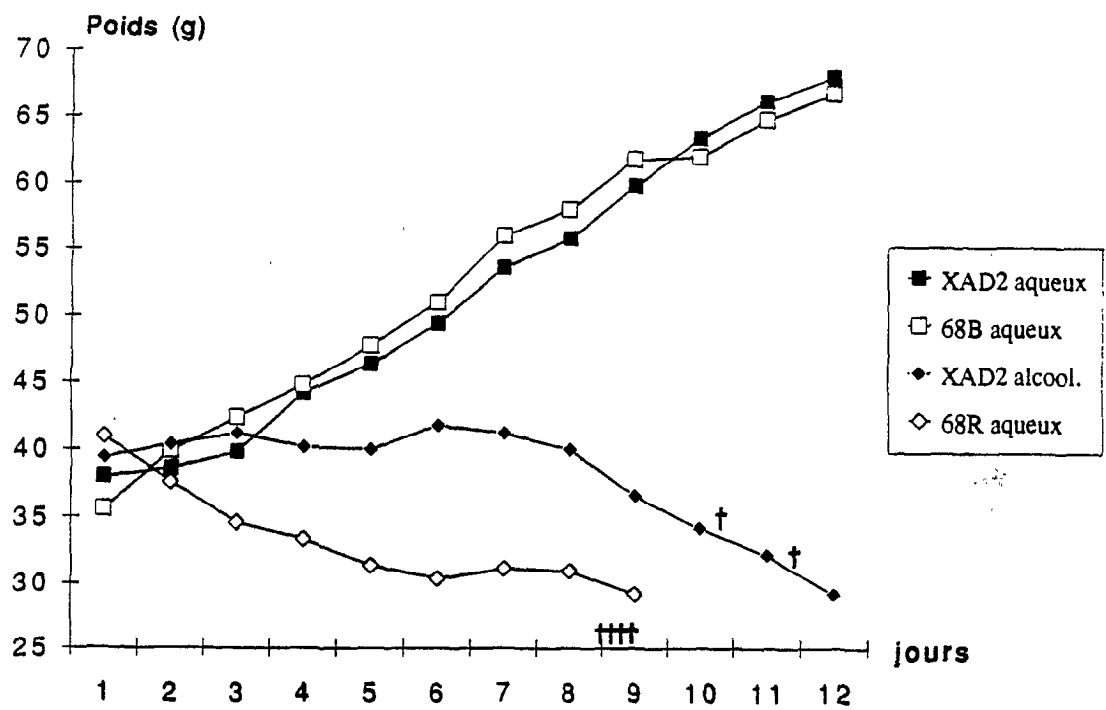


Figure 3 : Toxicité comparée entre deux extraits aqueux et entre les phases aqueuse et méthanolique d'élution d'une résine XAD2

2) Administration par sondage naso-œsophagien chez le cheval

2-1) Méthodologie

Afin de corrélérer la toxicité enregistrée chez le rat à la leucoencéphalomalacie équine, un extrait aqueux toxique a été administré par sondage naso-œsophagien à une jument de 14 ans pesant 320 kg, préalablement vermifugée (122)

Le produit administré est un extrait aqueux obtenu à partir de plusieurs cycles de culture de la souche 68R de *F. moniliforme* sur maïs en grain. L'extrait issu de chaque culture est préalablement testé par sondage œsophagien chez le rat; il doit entraîner la mort des rats en 5 à 7 jours à la dose quotidienne équivalente à 7,6 grammes de maïs par rat.

Les seules LEM expérimentales rapportées chez le cheval ont été conduites avec du maïs en grain artificiellement contaminé (tableau 1). Les doses quotidiennes rapportées vont de 1,25 g de maïs par kg de poids vif (40), ou 2,5 g/kg de poids vif (12, 37, 39), à 5 g/kg de poids vif (12). A cette dernière dose, les symptômes de la LEM sont faibles et accompagnés par un ictère prononcé.

Pour tenir compte des pertes de toxicité inhérentes à l'extraction, le choix s'est porté sur l'administration quotidienne de doses d'extrait aqueux équivalentes à 5 grammes de maïs contaminé par kg de poids vif.

Cette dose initialement prévue peut être diminuée en cours d'expérience en fonction des modifications cliniques et biochimiques constatées, afin d'éviter les troubles hépatiques fatals qui peuvent apparaître avant que les symptômes et les lésions nerveuses pathognomiques ne s'installent.

L'animal est nourri avec de l'aliment complet et du maïs vert fourni à volonté.

Son état de santé est suivi par le contrôle des facteurs suivants :

- consommation quotidienne,
- examen clinique quotidien,
- examen hématologique et biochimique du sang, 3 fois par semaine, puis quotidiennement lorsque des signes cliniques apparaissent,
- examen neurologique complet respectant une procédure méthodique de sorte à mettre en évidence au plus tôt des déficits éventuels des différents segments nerveux.

L'autopsie est conduite de façon systématique et exhaustive selon la technique habituelle respectée pour les grands animaux. Elle débute par l'examen morphologique du cerveau et du cervelet, en raison de leur grande vitesse d'autolyse et de leur importance majeure dans cette étude.

Les prélèvements en vue d'histologie sont réalisés au plus tôt au cours de l'autopsie et placés dans le formol isotonique à 10 %. Les organes suivants sont prélevés :

- cerveau,
- cervelet,
- bulbe rachidien,
- moelle épinière : cervicale, thoracique, lombaire,
- foie et rein,
- rate et pancréas,
- tous segments digestifs,
- coeur, aorte thoracique et abdominale,
- poumons et trachée,
- un muscle squelettique,
- les nerfs sciatiques,

ainsi que tout organe macroscopiquement lésé.

2-2) Résultats

L'examen physique permet de mettre en évidence chronologiquement :

- un épisode fugace de diarrhée à J 5, puis une reprise à J 13,
- un ictère notable cliniquement dès J 11 et qui s'accroît à J 14,
- une tachycardie importante et terminale sans trouble associé du rythme,
- une perte d'appétit totale vers J 12,
- des signes nerveux modérés et terminaux (J 13 - J 14).

Le suivi de la biochimie sanguine et l'hématologie montre que la perturbation des fonctions hépatiques commence à J 7 (augmentation des ALP, des GGT et de la bilirubine totale) et que l'atteinte musculaire ou myocardique (élévation progressive du taux sérique des ASAT et des CPK) ainsi que rénale (fortes valeurs d'urée, de phosphore et de créatinine) ne se fait qu'en phase terminale (tableau 6).

La jument est morte le 15^{ème} jour, après avoir 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).

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

Les lésions macroscopiques de l'encéphale (perte de substance blanche s'étendant en profondeur sur 2 à 3 cm en région craniale dans l'hémisphère cérébral droit et en région temporal basse dans l'hémisphère cérébral gauche) sont en faveur de l'hypothèse de la LEM.

Normes		Unités	J-7	J1	J4	J7	J9	J11	J14
2 - 6	Urée	mmol/l	7,3	5,6	7	6,4	6,8	5,2	19,8
140 - 200	Créatinine	μmol/l	110,4	81,7	86,3	146,1	155,6	125	394
50 - 100	Protéines totales	g/l	80,3	80,6	79,3	86,5	85,7	89,6	93,5
100 - 300	ASAT (SGOT)	UI/l	237	181		250	387,7	482	1847
1 - 100	ALAT (SGPT)	UI/l	10,8	3,7	13	5,6	7,2	9,7	21
30 - 200	ALP (Phos. al.)	UI/l	155	191	164,9	227,9	207,4	250	432
5 - 60	GT (GGT)	UI/l	7	9,2	7,4	12,2	18,1	33,3	60,8
40 - 200	CPK	UI/l	91,9	86,2	89	129,2	202	180	109
10 - 80	Bilirubine tot.	μmol/l	16,5	39,6	18,75	50,2	54,6	66	177
9 - 73	Bilirubine libre	μmol/l	10,34	34,8	8,15	42,7	37,6	50,6	154,2
1 - 7	Bilirubine conj.	μmol/l	6,6	4,76	10,6	7,5	17	15,4	22,8
18 - 40	Albumine	g/l	31,6	32,9	34,7	33,5	33,7	34	
0,6 - 1,6	Phosphore	mmol/l	1,4	0,95	0,65	0,8	0,98	1	3,5
2,8 - 3,4	Calcium	mmol/l	2,7	2,9	2,8	2,7	2,8	2,7	2,7
13 - 108	Ammoniaque	μg/dl		22			9	31	98
3,3 - 4,2	Ornithine C.T.	UI/l	1,2	0,9	3,25	24,6	13,6	19,5	
< 1	SDH	UI/l		0,3		1,8	3,2	3,8	0,3
8 - 11	Temps de Quick	Secondes	13		12	14	16,5	11	13

Tableau 6 : Biochimie sanguine d'un cheval traité par un extrait aqueux de maïs contaminé par *Fusarium moniliforme*

Les études histopathologiques confirment cette hypothèse de LEM et permettent de dégager des lésions graves, pouvant expliquer la mort, :

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

Des symptômes de LEM ont donc été reproduits expérimentalement chez un cheval par administration naso-œsophagienne d'un extrait aqueux (toxique aussi pour les rats) d'une culture sur maïs d'une souche néocalédonienne de *F. moniliforme*.

A la suite de cette confirmation de la toxicité de notre souche de travail chez le cheval, nous avons pu commencer la purification des principes responsables de la LEM

3) Méthodes de séparation

Les différents procédés de partitions chimiques ou physiques suivants ont été essayés.

3-1) Solubilisation

L'extrait aqueux lyophilisé est mis à macérer dans des solvants de polarités différentes (hexane, acétate d'éthyle, chlorure de méthylène, acétone, acétonitrile, butanol, éther, tétrahydrofurane, méthyléthylcétone, méthyl-4 isobutylcétone). La phase soluble est récupérée par filtration et le résidu est repris par de l'eau distillée. Les deux fractions, soluble et insoluble, sont testées par injection intrapéritonéale (i.p.) chez le rat et sur oeufs embryonnés de poule. La toxicité est retrouvée exclusivement dans les phases insolubles.

Ceci nous permet de confirmer que nous ne sommes pas en présence de fusarines ou de fusariocines (molécules solubles dans les solvants peu polaires) dans notre système toxique.

3-2) Extraction

L'extrait aqueux est mis en solution dans l'eau. 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 semblables à ceux obtenus avec le procédé précédent.

3-3) Précipitation

3-3-1) 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 œsophagien chez le rat. La toxicité par i.p. est enregistrée dans la fraction précipitée, alors qu'elle n'est pas retrouvée par sondage. La combinaison des deux fractions, soluble et précipité, permet de régénérer la toxicité par sondage œsophagien (figure 4).

3-3-2) Précipitation à l'alcool

La même expérience avec de l'éthanol à 96° a été effectuée, la toxicité par sondage œsophagien chez le rat étant entièrement retrouvée dans la phase soluble.

3-4) Adsorption sur charbon actif

L'extrait aqueux est mis en solution dans de l'eau distillée à laquelle 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 œsophagien (toxicité retrouvée dans aucune des deux fractions).

3-5) Chromatographie sur résine Amberlite XAD2

L'extrait aqueux lyophilisé est remis en solution dans de l'eau distillée (50 g pour 1 l) et est déposé sur une colonne de résine Amberlite XAD2. Après lavage par plusieurs litres d'eau distillée, la colonne est élue par du méthanol.

Les deux phases ont été testées par i.p., par sondage œsophagien et sur oeufs embryonnés. La toxicité est inexistante dans la phase aqueuse et se retrouve pour une grande part dans l'extrait méthanolique (figure 3). Les rendements chimiques sont très intéressants, 5 % en poids dans l'extrait toxique avec 10 % de perte sur la colonne.

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 : 25 000, 12-14 000, 6-8 000, 3 500, 2 000 et 1 000.

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

Les résultats i.p. sont en faveur d'une toxine de masse supérieure à 3 500 et d'une autre de masse plus faible alors que par sondage œsophagien, il semble que, là encore, la combinaison des 2 fractions soit nécessaire pour que la toxicité soit équivalente à celle de l'extrait total initial (figure 5).

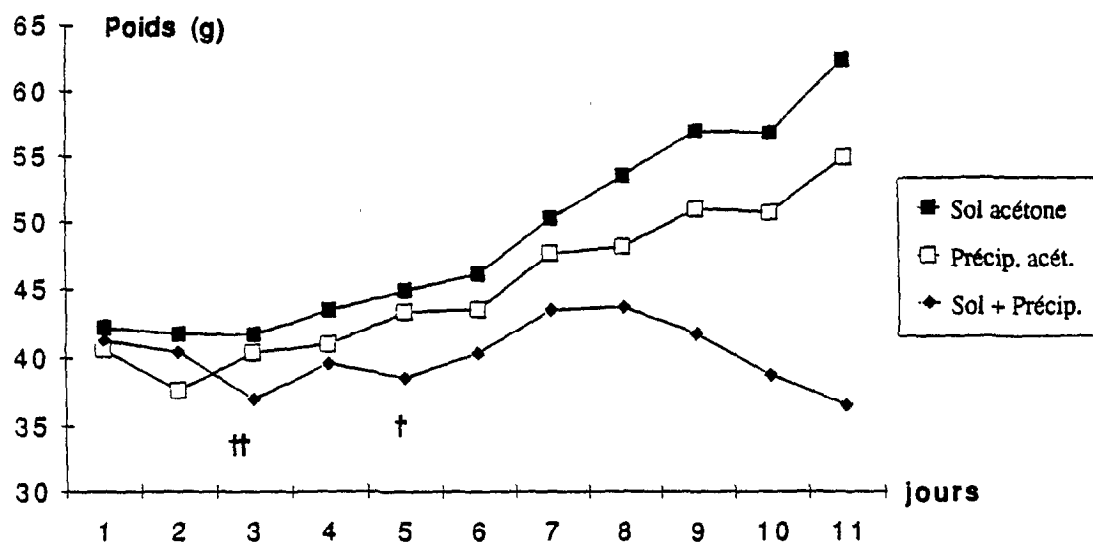


Figure 4 : Toxicité comparée des fractions précipitée et solubilisée par l'acétone et de l'extrait de départ reconstitué

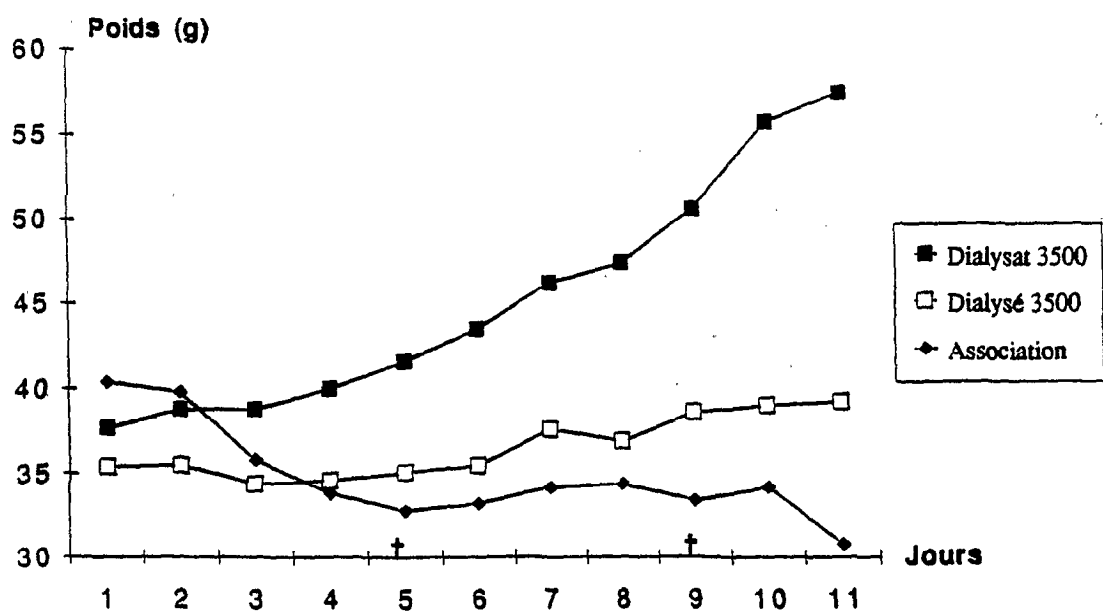


Figure 5 : Toxicité comparée de fractions de dialyse

3-7) Ultrafiltration Amicon

Ce procédé permet aussi un fractionnement suivant le poids moléculaire avec l'avantage d'être plus rapide et plus complet que le précédent. L'extrait aqueux étant très complexe, un colmatage de la membrane était à craindre, aussi, nous avons utilisé comme échantillon de départ, l'extrait méthanolique de la XAD2. Les membranes de fractionnement 50 000, 25 000, 5 000 et 500 ont été utilisées; la toxicité sur rats par sondage œsophagien a été enregistrée dans la fraction de poids moléculaire entre 500 et 5 000 (figure 6).

3-8) Séphadex

Un séphadex G25 médium qui sépare les molécules de poids compris entre 1 000 et 5 000 a été utilisé. La toxicité a été mise en évidence par sondage œsophagien dans le premier volume d'élution qui correspond aux molécules de poids voisin ou supérieur à 5 000 (figure 7).

3-9) Couplage de plusieurs procédés

Plusieurs schémas de fractionnement associant ces divers procédés ont été essayé (figure 8).

4) Conclusion

Des symptômes de LEM ont été reproduits expérimentalement chez un cheval par administration naso-œsophagienne d'un extrait aqueux d'une culture sur maïs d'une souche néocalédonienne de *F. moniliforme*.

Le test de toxicité par sondage œsophagien chez le rat de 20 jours s'avère en définitive le plus fiable pour suivre le fractionnement chimique. Les rapports MGMQ/MCMQ enregistrés lors des différentes étapes de la purification sont de l'ordre de 0,3 à 0,9 pour les fractions non toxiques et peuvent varier de -10 à 0 pour les fractions toxiques avec un taux de mortalité de 0 à 100 %.

Les résultats sont en faveur de la présence de deux toxines de poids moléculaire supérieure à 3 500 pour l'une et inférieure à 1 000 pour l'autre. La synergie des deux est, semble-t-il, importante pour que la toxicité s'exprime totalement dans nos tests biologiques.

Le schéma de purification que nous avons retenu à ce stade est le suivant :

- extraction aqueuse de la culture lyophilisée
- précipitation à l'éthanol à 96°
- chromatographie sur résine XAD2 de la partie soluble
- puis, successivement, ultrafiltration 50 000, 5 000 et 500 de la phase méthanolique; les composés toxiques n'étant pas filtrés à 500.

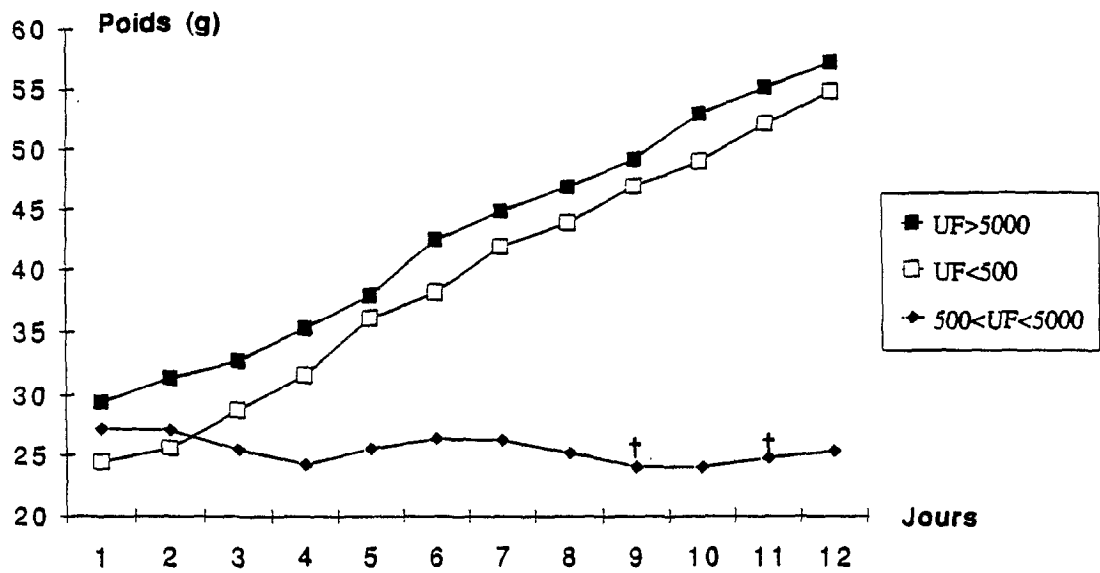


Figure 6 : Toxicité comparée de fractions d'ultrafiltration

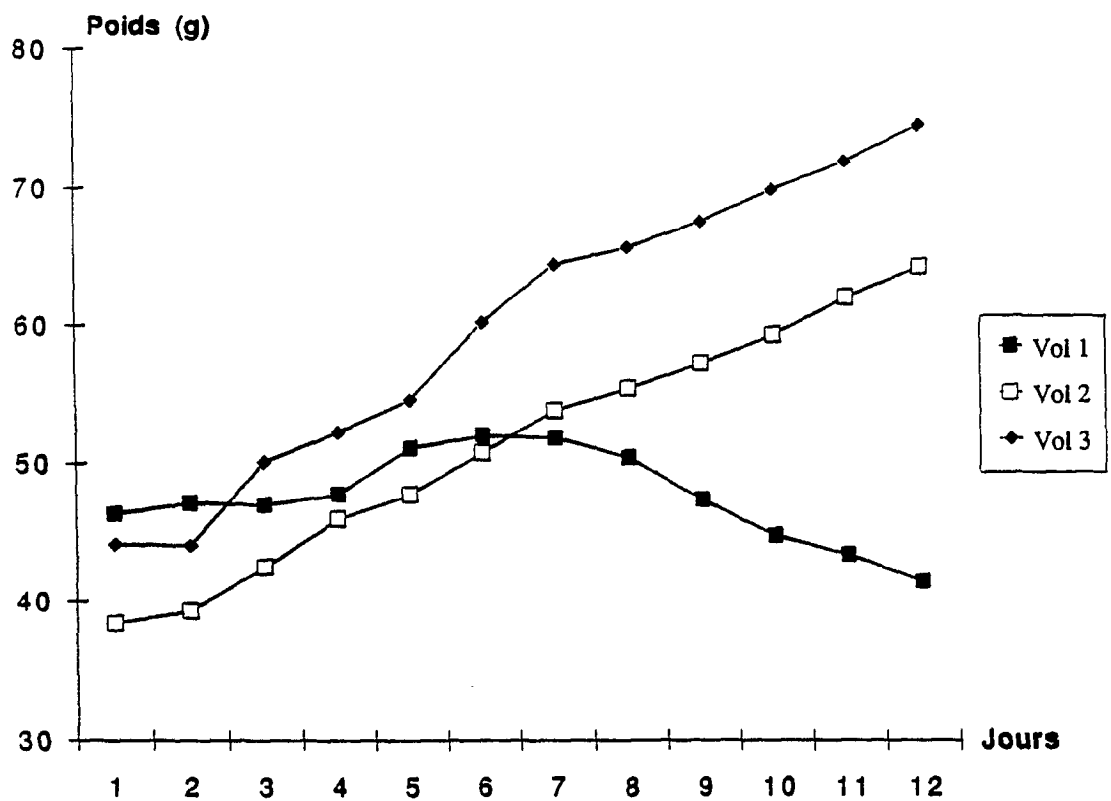


Figure 7 : Toxicité comparée entre les fractions d'élution d'une colonne de Sephadex G25

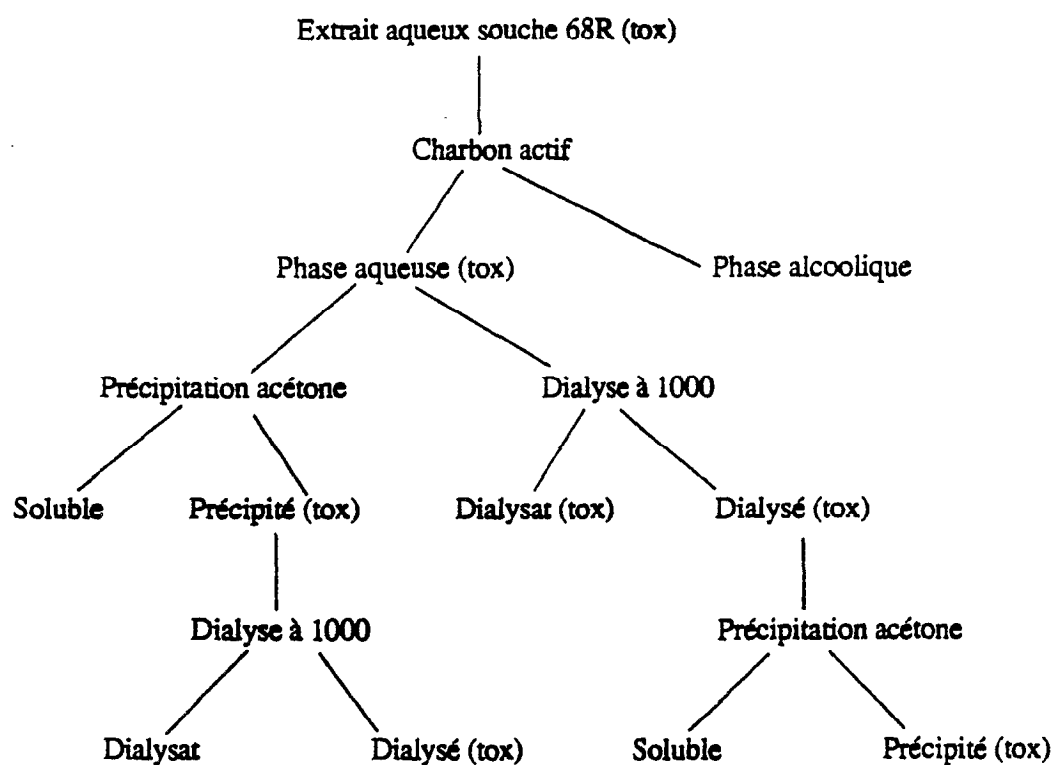
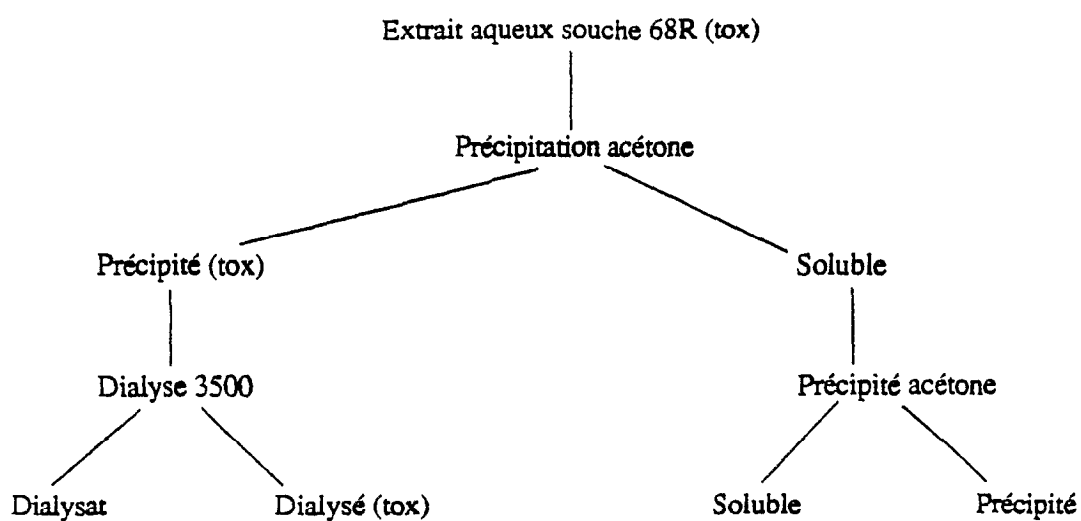


Figure 8 : Exemples de couplages de plusieurs procédés de fractionnement

C) TOXICOGENESE

C) TOXICOGENESE

1) <u>Clonage de la souche</u>	74
2) <u>Technique de production d'un mycélium à microconidies</u>	74
3) <u>Technique de production d'un mycélium à macroconidies</u>	75
4) <u>Résultats</u>	75
5) <u>Stabilité de la toxine</u>	77
6) <u>Conclusion</u>	77

La perte de toxicité, après un certain temps de conservation, des souches de champignons toxicogènes est un phénomène bien connu, souvent constatée dans les mycothèques des laboratoires travaillant sur les mycotoxines, et qui ne nous a pas épargné.

Sous peine d'être bloqué dans l'avancement de nos travaux, il devint alors impératif d'appréhender l'origine de cette perte de toxicité (123).

1) Clonage de la souche

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

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

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

- Un thalle de type "1", aérien, floconneux, blanc à revers crème, produisant exclusivement des microconidies en chaînettes.

- Un thalle de type "2", ras, humide, en plaque grumeleuse de couleur rose-saumon et produisant un très fort pourcentage de macroconidies (thalle pionnotal).

Les spores, issues de ces deux morphotypes servent d'inoculum afin d'ensemencer les grains de maïs selon les protocoles suivants :

2) Technique de production d'un mycélium à microconidies

Le thalle de type "1" est cultivé sur P.D.A. Après 7 à 8 jours de croissance, la gélose est découpée et les morceaux sont placés dans une fiole d'eau stérile. Après agitation, la suspension de microconidies sert à ensemencer les grains humidifiés à 80 % (400 ml d'H₂O pour 500 g) et stérilisés une heure à 120 °C. La culture est maintenue durant 20 jours à 25 °C (photo 3).

Cette méthode de culture est celle qui avait été utilisée jusqu'à la constatation de la perte de toxicité des souches de référence.

3) Technique de production d'un mycélium à macroconidies

Le thalle de type "2" est cultivé sur P.D.A.

Après 3 à 4 jours, 20 ml de la gelée de macroconidies sont mises en suspension et servent d'inoculum liquide pour ensemer 300 g de grains de maïs humidifiés avec 80 ml d'eau et stérilisés pendant 1 h 30 à 120 °C dans des Erlenmeyers de 2 l. L'inoculum est dispersé en secouant les grains. Les cultures sont maintenues durant 4 à 5 jours dans les Erlenmeyers inclinés. Les grains enrobés de mycélium sont ensuite étalés dans de grandes boîtes de Pétri où les thalles se développeront durant une quinzaine de jours.

Le maïs est remué quotidiennement et les couvercles sont essuyés avec des tampons de papier stérilisés au four Pasteur, afin d'abaisser progressivement l'humidité ambiante. Ces opérations s'effectuent de manière stérile. Les sporodochies envahissent progressivement la culture jusqu'à couverture quasi complète des grains (photo 4).

4) Résultats

Les tests de toxicité font apparaître que les cultures privilégiant la formation de microconidies ne sont pas toxicogènes. En revanche, l'extrait de cultures sur maïs d'un thalle à macroconidies est fortement toxicogène (figure 9).

Quelques hypothèses peuvent être émises :

- L'atotoxicité ou l'anatotoxicité pourraient avoir comme origine l'absence, ou la perte de capacité d'une souche, à induire la formation des organes de production des macroconidies. Le morphotype à macroconidies serait toxicogène grâce à un métabolisme différent du type à microconidies.
- La perte de la toxicité s'expliquerait par le fait que, sur un milieu artificiel et au cours du temps, le mycélium à microconidies majoritaires prédomine; ceci semble correspondre à 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. On constate en effet que, contrairement au thalle de type "1" qui se développe dans une ambiance de forte humidité, le morphotype "2" demande une atmosphère plus sèche, assez proche de celle de la conservation des grains chez certains éleveurs producteurs de leur provende.
- Ayant réussi à induire de la toxicité chez une souche atoxique, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que pratiquement tous les isolats de *F. moniliforme*, qui produisent en conditions favorables des sporodochies en nombre suffisant, ont un potentiel toxicogène.

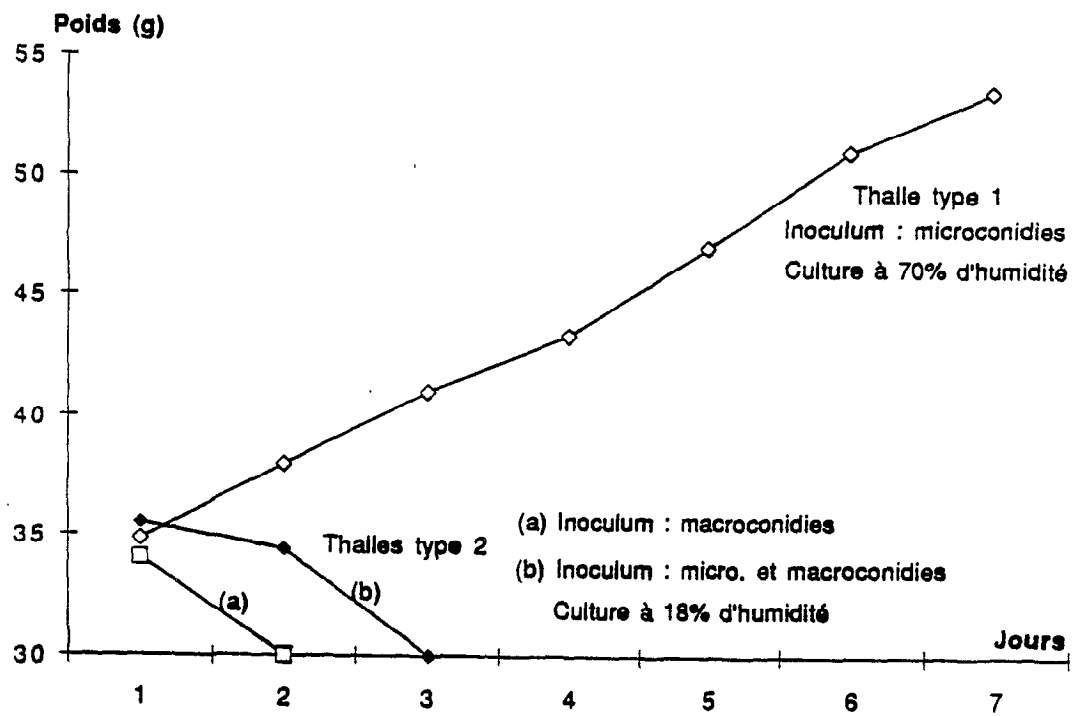


Figure 9 : Différence de toxicogénie entre deux types de thalles de *F. moniliforme*

5) Stabilité de la toxine

La stabilité de la toxine est étudiée en mettant en contact un extrait toxique, soit avec de l'acide chlorhydrique 1N pendant 2 h, soit avec de la soude 1N pendant 2 h ou en chauffant l'extrait à 100°C pendant 1 h. La toxicité mesurée par sondage œsophagien chez le rat n'a pas été modifiée par ces opérations. Ceci est en contradiction avec les résultats de Marasas et coll. (50) qui enregistre une destruction partielle des métabolites responsables de la toxicité chez le rat en *per os* à la suite d'un séchage en étuve du matériel de culture à 45-50 °C pendant 24 h.

6) Conclusion

Les tests de toxicité font apparaître que les cultures privilégiant la formation de microconidies ne sont pas toxicogènes. En revanche, l'extrait de cultures sur maïs d'un thalle à macroconidies est fortement toxicogène.

Ces études sur la toxicogénèse nous ont donc permis d'établir un protocole précis pour obtenir de façon constante des cultures riches en toxine.

D) PURIFICATION DES TOXINES

D) PURIFICATION DES TOXINES

1) <u>Recherche de moniliformine</u>	79
2) <u>Purification des produits isolés de cultures macroconidiales</u>	79
2-1) Purification de la macrofusine	81
3) <u>Purification des produits isolés de cultures microconidiales</u>	81
3-1) Purification de la microfusine	81
3-2) Purification de la micromoniline	83
4) <u>Conclusion</u>	83

1) Recherche de moniliformine

A la suite du traitement d'un cheval par un extrait aqueux d'une culture sur maïs de *F. moniliforme* (chap B-2), nous avons enregistré, à l'autopsie, des symptômes d'œdème pulmonaire comme ceux rencontrés par Haliburton et coll. (35) après administration de moniliformine par voie orale ou intraveineuse à un cheval.

Il nous a donc semblé important de rechercher cette mycotoxine dans nos extraits, d'autant plus que sa présence dans les espèces de *Fusarium* appartenant à la section LISEOLA a été très controversée (Chap. Trav. Ant. C-1-1-1).

Selon la méthode de Burmeister et coll. (90), l'extrait toxique et le témoin moniliformine ont été chromatographiés sur plaque de silice Merck 60F254 avec le système éluant toluène/acétone/méthanol 5:3:2. Le Rf du témoin se situant entre 0,25 et 0,3, aucun spot n'est visible à cet emplacement pour l'extrait toxique.

La non responsabilité de la moniliformine dans la toxicité enregistrée sur les rats, et par la suite sur les autres chevaux, sera d'ailleurs vérifiée rapidement puisque, après partition sur résine Amberlite XAD2, la toxine sera décelée essentiellement dans la phase méthanolique alors que la moniliformine ne se fixe pas sur ce support et passe directement avec la phase aqueuse.

2) Purification des produits isolés de cultures macroconidiales (124)

La différence de toxicité par sondage œsophagien chez le rat entre les extraits des cultures microconidiales et macroconidiales sur maïs d'un même isolat de *F. moniliforme* nous a conduit à tenter de visualiser la (ou les) toxines par comparaison de leurs chromatographies sur couche mince.

De nombreux systèmes chromatographiques ont été essayés avec des supports comme la cellulose ou la silice (60F254, RP-8 F254) et des mélanges éluants très polaires.

Dans un premier temps, les seules différences que nous avons observées étaient la présence de produits supplémentaires dans l'extrait de la culture microconidiale, alors que nous cherchions à déceler le phénomène inverse.

Par la suite, en essayant un mélange éluant très polaire à la limite de l'utilisation des plaques de gel de silice en phase inverse, c'est à dire MeOH/H₂O (5:5) (5 à 6 h pour 5 cm de migration), une légère différence de Rf a pu être observée pour un produit qui jusqu'alors semblait commun aux deux extraits (figure 10).

Ces deux produits que nous avons cherchés à isoler ont été nommés macrofusine (culture macroconidiale) et microfusine (culture microconidiale).

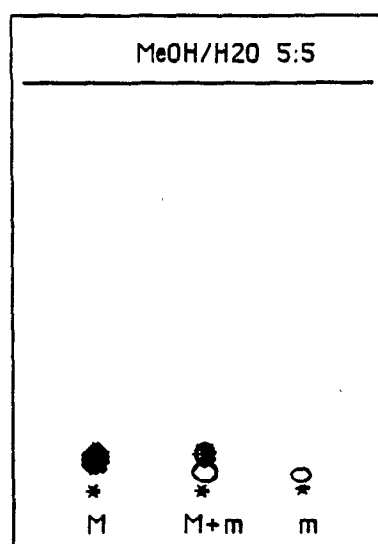


Figure 10 : Chromatographie sur plaque de gel de silice en phase inverse RP8 de la macrofusine (M) et de la microfusine (m); solvant d'élution : MeOH/H₂O 5:5.

2-1) Purification de la macrofusine

Les cultures sont préparées selon la méthode décrite chapitre C-3.

La culture macroconidiale est extraite à l'eau distillée (1 l/200 g) par broyage puis macération sous agitation pendant 5 h. Après centrifugation à 1500 rpm, le surnageant est concentré sous pression réduite puis précipité à l'éthanol à 95°. Le précipité est éliminé par centrifugation à 2000 rpm pendant 30 mn. Le surnageant est lyophilisé après élimination de l'alcool sous vide. L'extrait est alors dissout dans l'eau distillée puis déposé sur une colonne de résine Amberlite XAD 2. La fraction toxique est éluée au méthanol qui est évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu est repris par l'éthanol absolu pour fournir une fraction enrichie en toxine.

Des chromatographies successives sur colonne de silice Lichroprep RP-8 (Merck) avec des mélanges éluants MeOH/H₂O 50:50 puis 70:30 permettent d'isoler la toxine (figure 11).

La pureté des produits est vérifiée par chromatographies sur couches minces de silice HPTLC RP-8 F₂₅₄ (Merck) dans le mélange de solvants MeOH/H₂O 70:30 et révélation par pulvérisation d'acide sulfurique - vanilline 2%, puis chauffage à 100°C.

Cette molécule, très polaire, est soluble dans l'eau et le méthanol. En chromatographie sur couche mince sur silice RP-8, son R_f est respectivement de 0,8 - 0,38 - 0,13 dans les mélanges de solvants MeOH/H₂O 90:10, 70:30 et 50:50, et sur silice 60F₂₅₄, de 0,11 avec le mélange CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 67:28:5.

Suivant la qualité de la culture (colonisation plus ou moins complète du substrat), la macrofusine est isolée avec un rendement de 0,4 à 0,8 % par rapport à l'extrait aqueux soit 0,025 à 0,05 % par rapport au poids de maïs frais mis en culture.

3) Purification des produits isolés de cultures microconidiales

3-1) Purification de la microfusine

Les cultures sont préparées selon la méthode décrite Chapitre C-2.

La microfusine est isolée et purifiée en suivant le même protocole que pour la macrofusine (figure 11).

Son R_f est identique à celui de la macrofusine pour les mélanges de solvants essayés, excepté sur silice RP-8 avec le mélange éluant CH₂Cl₂/MeOH 50:50 où il est de 0,05 au lieu de 0,13.

La microfusine a un rendement nettement plus faible que celui de la macrofusine; il peut être estimé à 0,003 % du poids de maïs frais mis en culture.

Culture de maïs contaminé par des macroconidies ou des microconidies de *F. moniliforme*

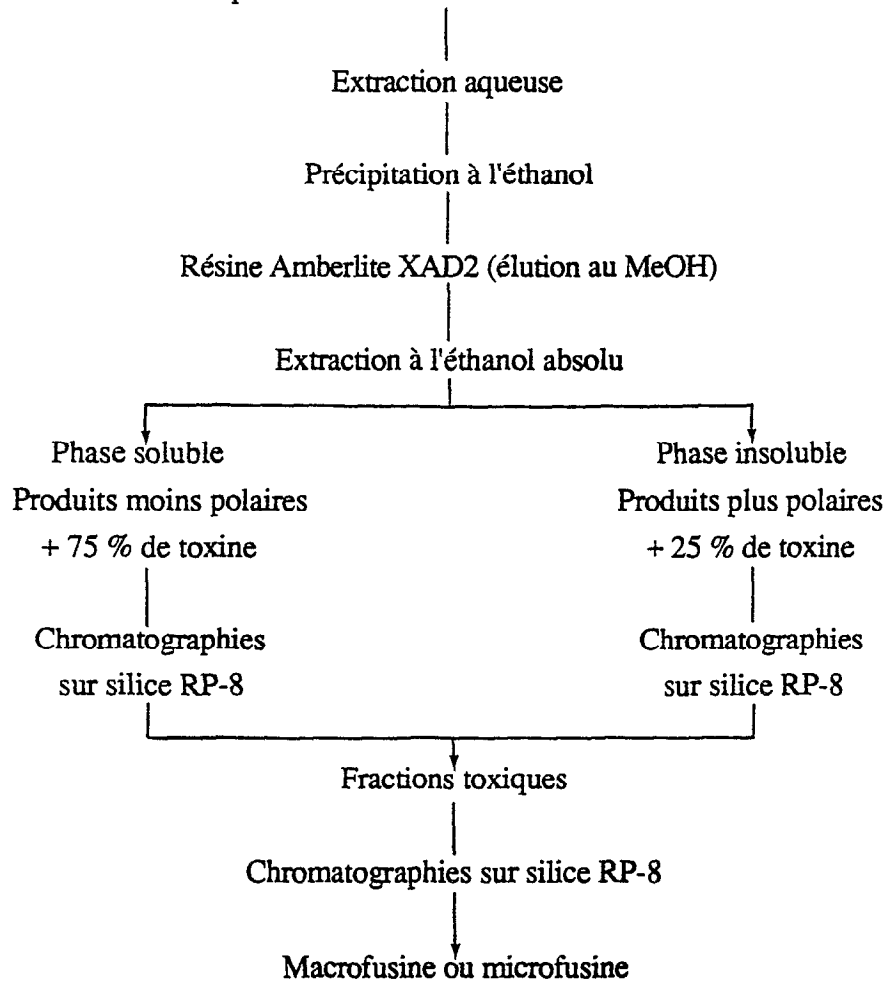


Figure 11 : Schéma de purification de la macrofusine ou de la microfusine

3-2) Purification de la micromoniline (124)

Lors de la comparaison des extraits de culture par chromatographie sur couche mince, nous avons mis en évidence la production d'un métabolite (que nous avons appelé micromoniline) uniquement dans les cultures de la forme physiologique microconidiale.

Les étapes d'extraction aqueuse, de précipitation à l'éthanol et de filtration sur résine Amberlite sont identiques à celles pratiquées pour l'obtention de la macrofusine. La phase méthanolique évaporée est extraite par de l'eau distillée. L'insoluble est chromatographié sur colonne de silice 60 H (Merck) éluée par le solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5. Les fractions contenant la micromoniline sont réunies et chromatographiées sur colonne de silice RP-8 (Merck) par le solvant d'élution $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20 (figure 12).

La pureté du produit est vérifiée par chromatographies sur couches minces de silice 60 F254 (Merck) ou de silice HPTLC RP-8 F254 (Merck). La révélation s'effectue par pulvérisation d'acide sulfurique - vanilline 2 %, suivie de chauffage à 100 °C.

Moins polaire que la macrofusine et la microfusine, la micromoniline est soluble dans le méthanol et les solvants chlorés. Ses R_f , dans les solvants $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 et $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:20 sont respectivement de 0,3 et 0,45. Elle se révèle de couleur mauve au contact du révélateur acide sulfurique-vanilline 2% avant chauffage.

La micromoniline est isolée avec un rendement inférieur à celui de la macrofusine; il est de l'ordre de 0,1 % de l'extrait aqueux, soit 0,005 % par rapport au poids de maïs frais.

4) Conclusion

Trois métabolites ont été isolés des cultures sur maïs de souches de *F. moniliforme*. Deux d'entre eux, la macrofusine et la microfusine semblent proches au vu de leur R_f et de leur aspect après révélation en chromatographie sur couche mince.

La biosynthèse de ces produits dépend de la forme physiologique du champignon, qui, elle même, dépend de l'humidité du substrat.

Lorsque l'humidité est importante, le mycélium se développe de façon aérienne en produisant préférentiellement des microconidies : sous cette forme physiologique, il métabolise de la microfusine et de la micromoniline.

En revanche, lorsque l'humidité est plus faible, la forme physiologique à sporodochies prédomine produisant alors préférentiellement des macroconidies. Dans ces conditions, la macrofusine est biosynthétisée en forte quantité.

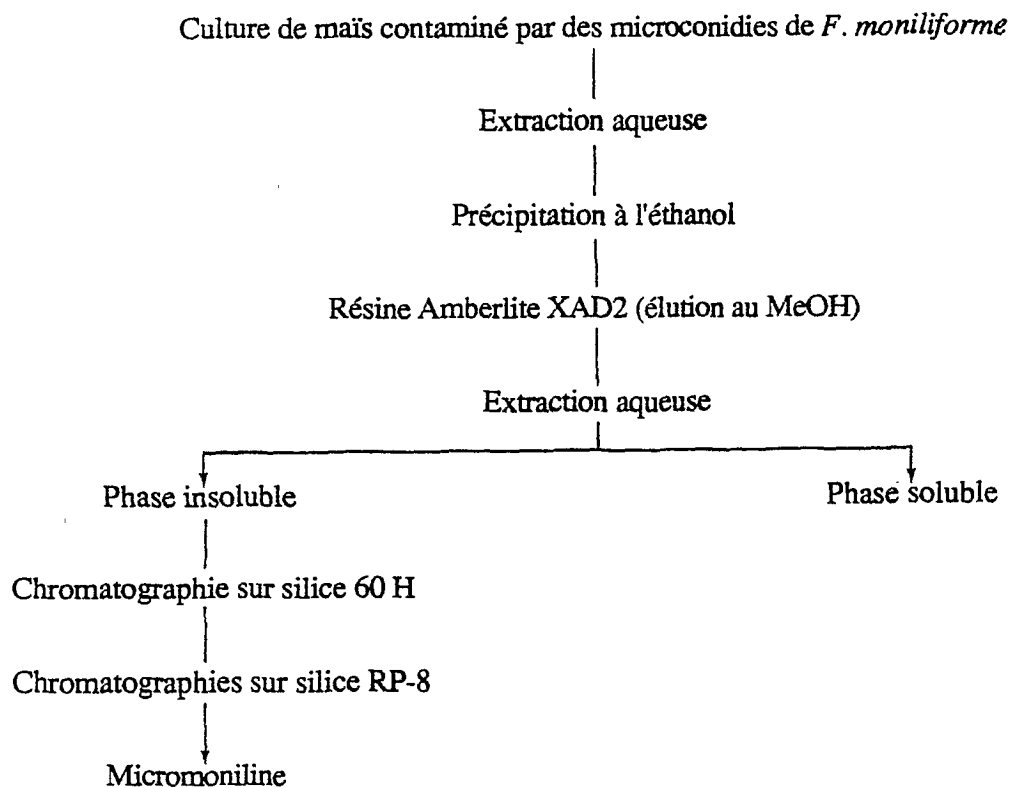


Figure 12 : Schéma de purification de la micromoniline.

E) ETUDES TOXICOLOGIQUES

E) ETUDES TOXICOLOGIQUES

E1) EXTRAIT ET FRACTIONS TOXIQUES : <u>Etudes électrophysiologiques</u>	87
1) <u>Rappel</u>	87
1-1) Théorie ionique de l'excitation	87
1-2) Concept de canal ionique	88
1-3) Technique de la partition de saccharose	88
2) <u>Méthodologie</u>	90
3) <u>Résultats</u>	90
3-1) Effet sur le potentiel de membrane au repos	90
3-2) Effet sur les courants transmembranaires	92
E2) PRODUITS ISOLÉS DE CULTURES MACROCONIDIALES :	
<u>Toxicologie de la macrofusine</u>	95
1) <u>Etudes toxicologiques chez le rat</u>	95
2) <u>Etudes histo-pathologiques chez le rat</u>	95
3) <u>Toxicité sur oeufs embryonnés de poules</u>	97
4) <u>Toxicité sur oeufs fertilisés d'oursins</u>	97
5) <u>Toxicité sur bactéries</u>	97
6) <u>Toxicité sur cellules cancéreuses Kb</u>	97
7) <u>Toxicité par injection intrastomacale chez le souriceau</u>	98
8) <u>Toxicité par injection intracérébrale chez le souriceau</u>	98
9) <u>Etudes électrophysiologiques</u>	98
E3) PRODUITS ISOLÉS DE CULTURES MICROCONIDIALES	98
1) <u>Toxicologie de la microfusine</u>	98
2) <u>Toxicologie de la micromoniline</u>	98
2-1) Etudes toxicologiques chez le rat	98

2-2) Toxicité sur cellules cancéreuses Kb	99
2-3) Toxicité par injection intrastomacale chez le souriceau	99
2-4) Etudes électrophysiologiques	99
E4) CONCLUSION	99

E1) EXTRAIT ET FRACTIONS TOXIQUES

Les différentes lésions observées à la suite d'une intoxication sont de types nécrotiques et hémorragiques. Il nous a donc semblé que les toxines impliquées pouvaient être mises en évidence par leurs effets sur les cellules et sur les conductances membranaires.

Pour ce faire, une étude électrophysiologique des différents extraits et fractions obtenus au cours de ce travail a été effectuée.

Etudes électrophysiologiques

1) Rappel

1-1) Théorie ionique de l'excitation

En utilisant la technique du "voltage clamp" dans leurs premières expériences, Hodgkin et Katz (125) ont mesuré le courant ionique global de l'axone de calmar en fonction du potentiel et du temps. Le courant a ensuite été divisé en courant sodium et courant potassium (I_{Na} et I_K) (126), puis les conductances ioniques (g_{Na} et g_K) ont été obtenues en divisant les courants par la "driving force", différence entre le potentiel de membrane (E_m) et le potentiel d'équilibre pour chaque ion (E_{Na} et E_K) déterminé par l'équation de Nernst :

$$E_x = \frac{RT}{ZF} \lg \frac{[X]_e}{[X]_i}$$

R = Constante de gaz partant

$[X]_e$ = Concentration extracellulaire de l'ion X

T = Température absolue (°C)

$[X]_i$ = Concentration intracellulaire de l'ion X

Z = Valence

F = Faraday

$$g_{Na} = I_{Na} / (E_m - E_{Na})$$

$$g_K = I_K / (E_m - E_K)$$

Ces auteurs ont réalisé une analyse qualitative et quantitative des conductances ioniques qui a conduit Hodgkin et Huxley à formuler une théorie ionique de l'excitation, sur la base d'un modèle mathématique rendant parfaitement compte des faits expérimentaux observés. Dans cette théorie, le milieu intracellulaire (riche en ions potassium et pauvre en ions sodium) est séparé du milieu extracellulaire (riche en ions sodium et pauvre en ions potassium) par une membrane sélectivement perméable à certains ions et à l'eau.

Au repos, la membrane est relativement perméable aux ions potassium et faiblement perméable aux ions sodium. Le potentiel de membrane de repos est donc voisin du potentiel d'équilibre

thermodynamique des ions potassium (EK). Lors de l'excitation, la membrane cellulaire devient temporairement très perméable aux ions sodium; son potentiel de membrane tend alors momentanément vers le potentiel d'équilibre pour ces ions (ENa). Le potentiel de membrane revient ensuite à sa valeur de repos du fait d'une diminution de la conductance aux ions sodium (inactivation sodium) et d'un accroissement simultané de la conductance aux ions potassium. Dans la théorie ionique, les conductances membranaires sont dépendantes du potentiel et du temps. Cette théorie rend compte de l'existence des courants traversant passivement la membrane; leur grandeur et leur sens dépendent de la conductance membranaire vis-à-vis de l'espèce ionique considérée d'une part, et du signe de la "driving force" d'autre part.

1-2) Concept de canal ionique

Le modèle de Hodgkin-Huxley (126) propose l'existence de canaux ioniques dont l'ouverture et la fermeture seraient contrôlées par des systèmes de portes. Dans le cas particulier du canal sodium, les portes m règlent l'activation et les portes h l'inactivation du canal (figure 13A); au repos, les portes m sont fermées, les portes h sont ouvertes (figure 13Aa).

Lorsqu'une dépolarisation est appliquée à la membrane, les portes m s'ouvrent plus rapidement que les portes h ne se ferment. Cette phase est appelée l'activation. Ainsi durant 1 ms environ, les portes m et h sont en position ouverte et permettent le passage des ions Na suivant leur gradient de concentration (figure 13Ab). La fermeture des portes h arrête le passage des ions (figure 13Ac); ce processus est appelé inactivation. Lorsque la dépolarisation est terminée, les portes m se referment; ce processus est appelé désactivation (figure 13Ad). Puis les portes h reviennent plus lentement en position ouverte et la cellule devient à nouveau excitable (figure 13Ad); ce processus est désigné sous le nom de récupération ou de suppression de l'inactivation.

Le canal sodium est constitué d'un filtre de sélectivité situé à la face externe de la membrane qui détermine la spécificité du canal pour une espèce ionique déterminée et de mécanismes de portes qui dépendent du potentiel et du temps et sont responsables de l'ouverture et de la fermeture du canal (figure 13B).

1-3) Technique de la partition de saccharose

La technique de la double partition de saccharose "sucrose-gap" (dérivée de celle de "l'air-gap") a été proposée par Stampfli (127). Dans cette méthode, la résistance de membrane extracellulaire est augmentée en lavant un segment de la préparation de façon continue à l'aide d'une solution de saccharose. Le saccharose possédant une résistance spécifique très élevée ($10^5 \Omega\text{cm}$), il est ainsi possible d'obtenir une résistance extracellulaire de valeur dix à cent fois plus élevée que celle du milieu intracellulaire. La réalisation d'un double dispositif de "sucrose-gap" permet d'isoler électriquement une faible surface de membrane.

Ce dispositif permet d'effectuer deux types de mesure sur chaque préparation :

- des mesures du potentiel de membrane en courant imposé ou "current-clamp" (C.C.);

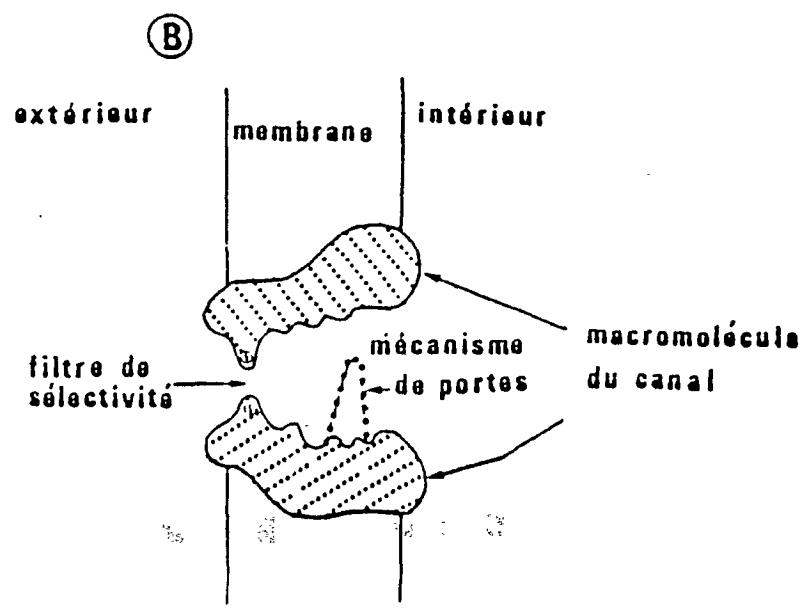
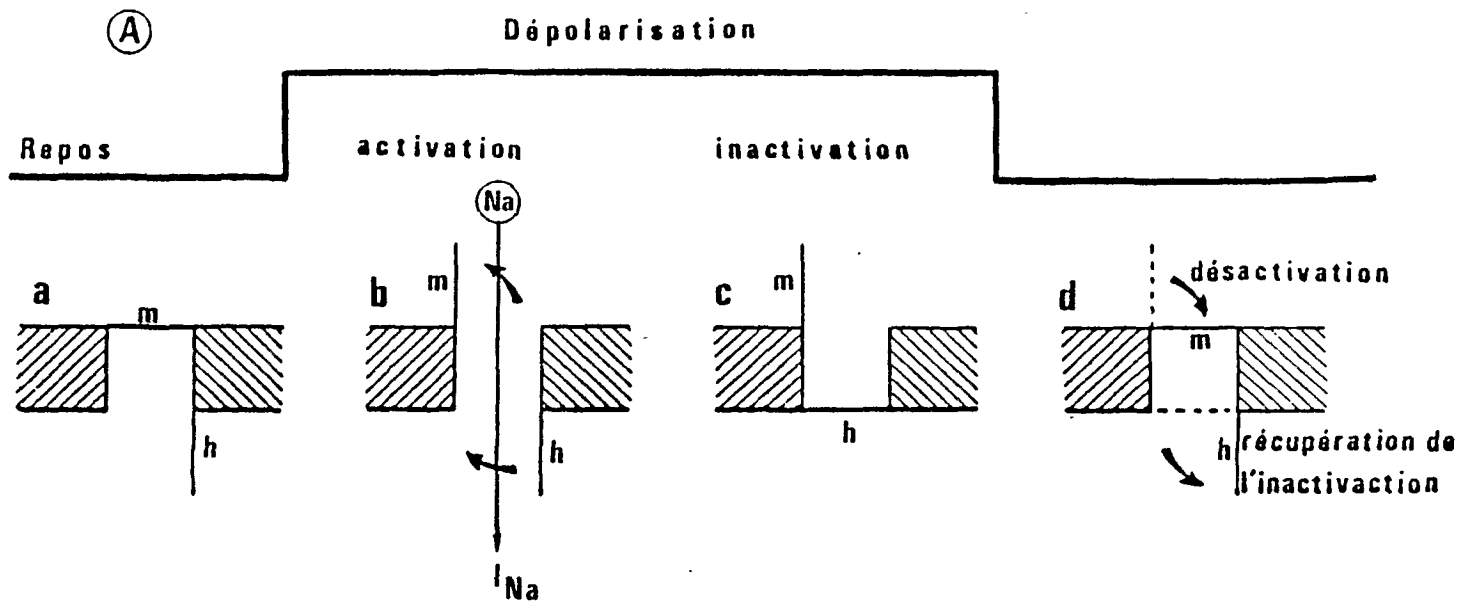


Figure 13 : Canal membranaire aux ions sodium

A) Schéma illustrant les mécanismes d'ouverture et de fermeture du système de portes sous l'effet d'une impulsion dépolarisante

B) Schéma du canal membranaire

- des mesures des courants transmembranaires en potentiel imposé ou "voltage-clamp"(V.C.).

2) **Méthodologie**

Les expériences ont été réalisées :

- a) sur le muscle Couturier entier isolé de la patte de la grenouille *Rana esculenta* en ce qui concerne la mesure des potentiels de membrane à l'aide de la technique de microélectrodes intracellulaires (résistance : 15 - 20 M Ω ; potentiel de pointe $\leq \pm 3$ mv);
- b) sur les fibres musculaires squelettiques coupées isolées du muscle Couturier de la grenouille placées dans des conditions de potentiel imposé à l'aide de la technique de la double partition de saccharose (128) en ce qui concerne la mesure des courants transmembranaires;
- c) sur les fibres isolées de la région sino-auriculaire du coeur de grenouille.

Dans les expériences de potentiel imposé, le potentiel de membrane est maintenu à -80 mV, les courants sont déclenchés par des impulsions rectangulaires à la fréquence de 0,2 Hz. Les courants de membrane sont enregistrés 5 minutes après application de la toxine.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'amplitude du courant mesuré dans la solution de contrôle dépourvue de toxine. Les valeurs moyennes sont données $\pm$ sem, n représente le nombre d'expériences réalisées.

La composition du milieu de Ringer utilisé est la suivante :

NaCl :	110,5
KCl :	2,5
CaCl ₂ :	2
tampon HEPES :	5
pH	7,3.

Les extraits ou fractions, provenant de cultures sur maïs de macroconidies de la souche 68R de *F. moniliforme* , sont mis en solution aqueuse à la concentration de 1 mg/ml et 10 mg/ml et conservés à 4 °C.

3) **Résultats**

3-1) Effet sur le potentiel de membrane au repos

Les trois extrait (brut, XAD2 aqueux et XAD2 méthanolique) étudiés dans la gamme de concentration 1 à 10 μ g/ml, n'entraînent pas de modification notable du potentiel de repos des fibres musculaires squelettiques (tableau 7)

Ces observations suggèrent que les toxines contenues dans les différents extraits testés ne modifient pas la conductance de repos.

Tableau 7 : Effet des extraits de *Fusarium moniliforme* (10 µg/ml) sur le potentiel de repos des fibres musculaires squelettiques de grenouille.

contrôle	extrait brut	extrait XAD2 aqueux	extrait XAD2 méthanolique
90,7 ± 1,2	92,6 ± 0,9	-	-
91 ± 0,8	-	92,1 ± 0,9	-
92,5 ± 0,9	-	-	94,7 ± 0,7

Potentiel de repos (mV), valeurs moyennes ± sem de 12 empacements réalisés sur deux muscles différents

3-2) Effet sur les courants transmembranaires

Les courants entrants d'ion Na et sortant d'ions K qui se développent sous l'effet de dépolarisation de 80 mS d'amplitude appliquée à partir d'un potentiel maintenu de - 80 mS ont été étudiés pour différents extraits et fractions de purification (figure 14).

Les extraits ou fractions testés n'altèrent pas le courant de repos enregistré en l'absence de stimulation.

- Extrait brut : à 1 $\mu\text{g/ml}$, il diminue l'amplitude du pic de courant entrant $53,3 \pm 6,5 \%$ (n=6) ainsi que celle du courant sortant $67,5 \pm 3,4 \%$ (n=6).

- Extrait XAD2 aqueux : en présence de cet extrait (1 $\mu\text{g/ml}$) dans le milieu de Ringer, l'amplitude du pic du courant Na et celle du courant sortant sont respectivement de $55,5 \pm 5,8 \%$ (n=6) et de $68,6 \pm 4,0 \%$ (n=6) de l'amplitude des courants mesurés en absence de la substance.

- Extrait XAD2 méthanolique : en présence de cet extrait (1 $\mu\text{g/ml}$) dans le milieu de contrôle, l'amplitude du pic du courant Na est de $57,2 \pm 4,7 \%$ (n=6) et celle du courant sortant de $78,7 \pm 7,4 \%$ (n=6) de celle mesurée en absence de l'extrait dans le milieu de contrôle.

- Extrait XAD2 méthanolique (UF 500/5000) : à la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$, cet extrait réduit l'amplitude du pic de courant Na ($59,7 \pm 7 \%$, n=6) et demeure sans action notable sur le courant sortant.

L'histogramme de la figure 14A résume l'ensemble de ces observations et montre que le canal Na apparait être la cible privilégiée des constituants de ces différents extraits. En ce qui concerne le courant sortant (figure 14B), l'extrait XAD2 méthanolique et celui qui en résulte (XAD2 méthanolique, UF 500/5000) possèdent une action inhibitrice sur ce courant qui est moins marquée que celle de l'extrait brut et de l'extrait XAD2 aqueux.

Par la suite, l'étude de fractions obtenues par ultrafiltration à partir d'un extrait brut (UF 0/500, UF 500/1 000, UF 1 000/5 000, UF 5 000/10 000, UF 10 000/100 000, UF >100 000), ainsi que l'extrait de maïs sain a montré qu'à la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$, les substances qu'elles contiennent ne présentent pas d'action sur le courant sodium. A la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$, seule la fraction UF 500/1 000 s'avère efficace pour inhiber le courant Na (figure 15). A cette concentration, les autres fractions n'inhibent le courant Na que d'une dizaine de %.

Cette différence d'activité sur le courant sodium entre la fraction XAD2 méthanolique UF 500/5 000 et les fraction similaires de cette dernière expérience est due aux différentes méthodes

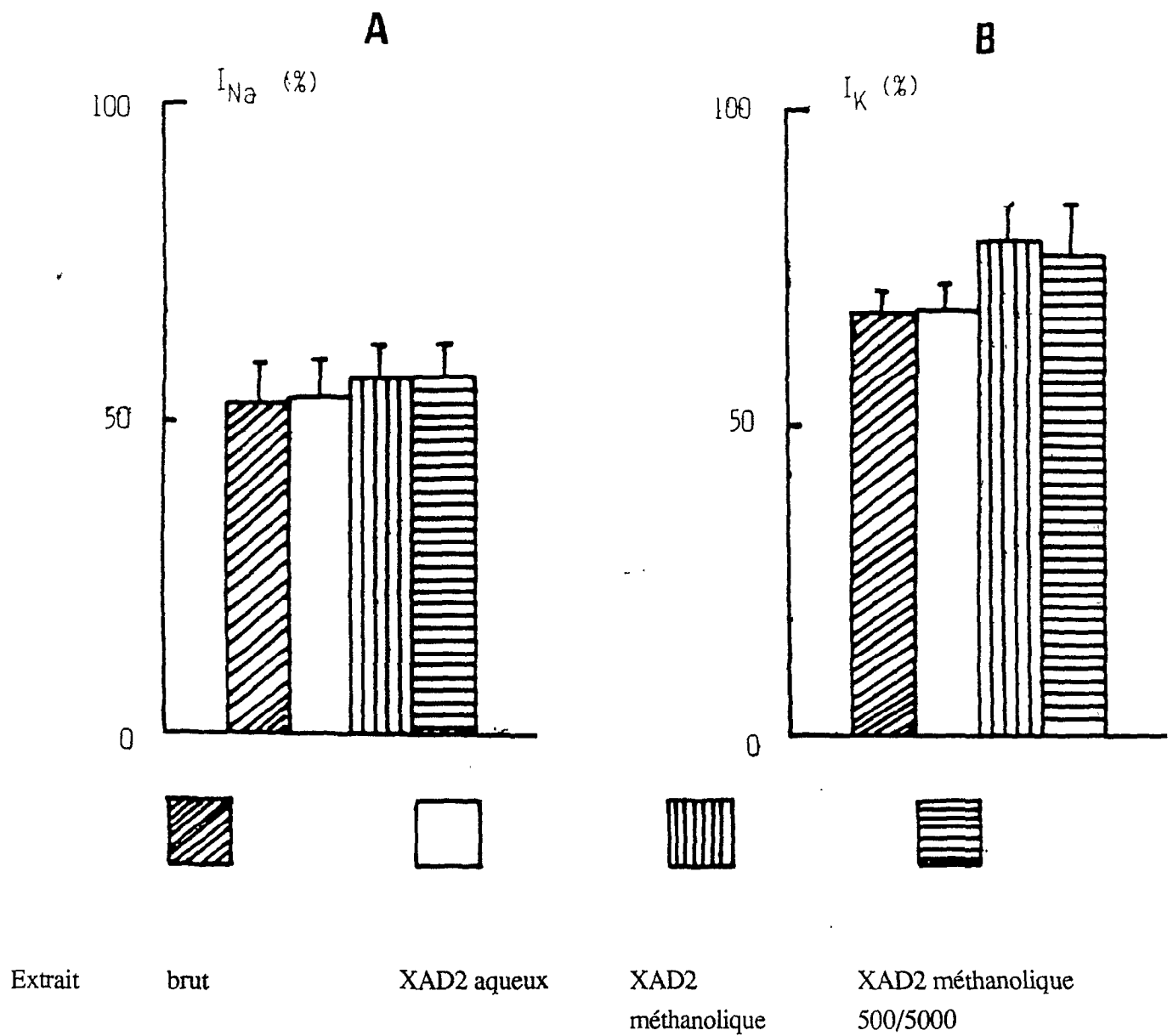


Figure 14 : Réduction de l'amplitude du courant entrant Na (A) et du courant sortant K (B) par les extraits de *Fusarium moniliforme* (1 μ g/ml). Valeurs moyennes de 6 fibres $\pm$ S.e.

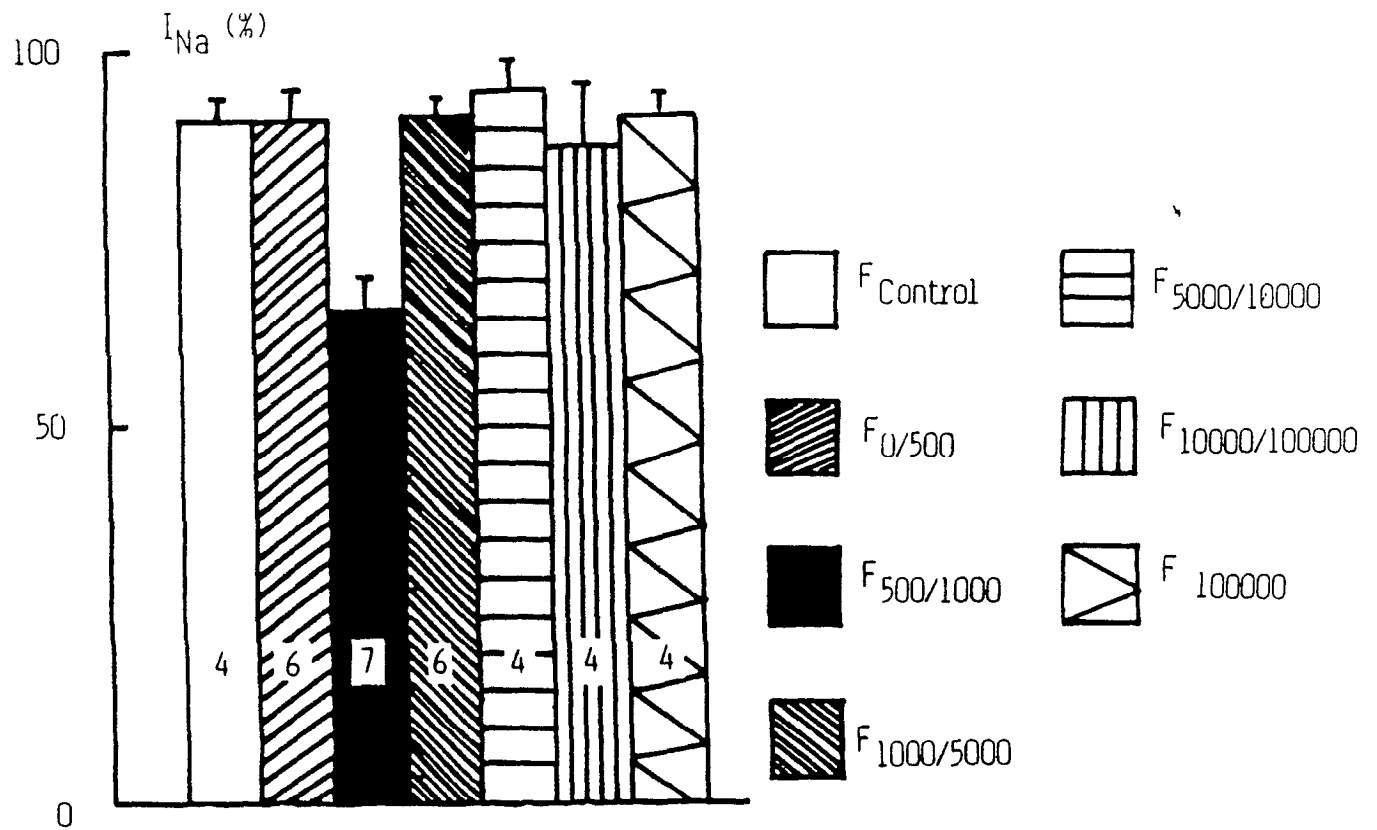


Figure 15 : Réduction de l'amplitude du courant Na par les extraits de *Fusarium moniliforme* (200 $\mu\text{g/ml}$). Les chiffres associés à chaque graphique correspondent au nombre de fibres testées.

de culture utilisées. En effet, la perte de toxicité de nos cultures a été expliquée dans l'intervalle entre ces deux expériences et la culture macroconidiale a été appliquée par la suite pour rechercher le principe toxique chez les rats. Cette méthode de culture a donc favorisée la production de macrofusine et empêchée celle de micromoniline, mycotoxine qui s'est avérée être responsable de l'activité sur le courant sodium. (chap. E-2-4)

Le courant sortant K n'est pas notablement modifié par l'ensemble des fractions testées.

E2) PRODUITS ISOLES DE CULTURES MACROCONIDIALES :

Toxicologie de la macrofusine

1) Etudes toxicologiques chez le rat (124)

La mycotoxine est administrée par sondage œsophagien à des lots de 4 rats selon une gamme de ration journalière de 0,5 à 50 mg pendant 12 jours. L'évolution pondérale des animaux est suivie quotidiennement avant l'administration des doses. Les résultats sont exprimés par les courbes des gains moyens quotidiens de poids (figure 16).

Des doses journalières de toxines de 0,5 et 1 mg ne modifient pas notablement la cinétique de la courbe de croissance qui demeure parallèle à celle des animaux témoins. Les animaux traités accusent cependant une diminution de poids par rapport aux témoins respectivement de l'ordre de 12 et 20% au bout de 8 jours suivant la dose appliquée.

A la dose journalière de 5 mg, le poids des rats reste stationnaire durant 4 jours pour croître ensuite selon un rythme proche de celui des témoins. Le poids des rats traités ne représente cependant que 57% du poids des animaux témoins après 8 jours de traitement.

L'administration de deux doses de 50 mg (soit environ 1,5 g/kg) ou de 4 à 5 doses de 10 mg (soit environ 0,3 g/kg) est nécessaire pour provoquer la mort ce qui indique que la macrofusine possède une toxicité faible. L'autopsie de rats traités par les fortes doses montrent la présence d'un ictère très marqué; les oreilles et la face interne de la peau sont d'un jaune prononcé.

La faiblesse de l'action toxique de la macrofusine est compensée par une très grande production de ce métabolite par *F. moniliforme* dans les conditions de culture favorisant la production de macroconidies.

2) Etudes histo-pathologiques chez le rat

Une première expérimentation est effectuée sur cinq lots de 4 rats de poids moyen de 30 g avec des administrations quotidiennes de 0,1, 0,5, 1 et 5 mg par rat de macrofusine; le 5ème lot est un lot témoin. Les rats sont nourris *ad libitum* avec de l'aliment complet pour chien. Les organes

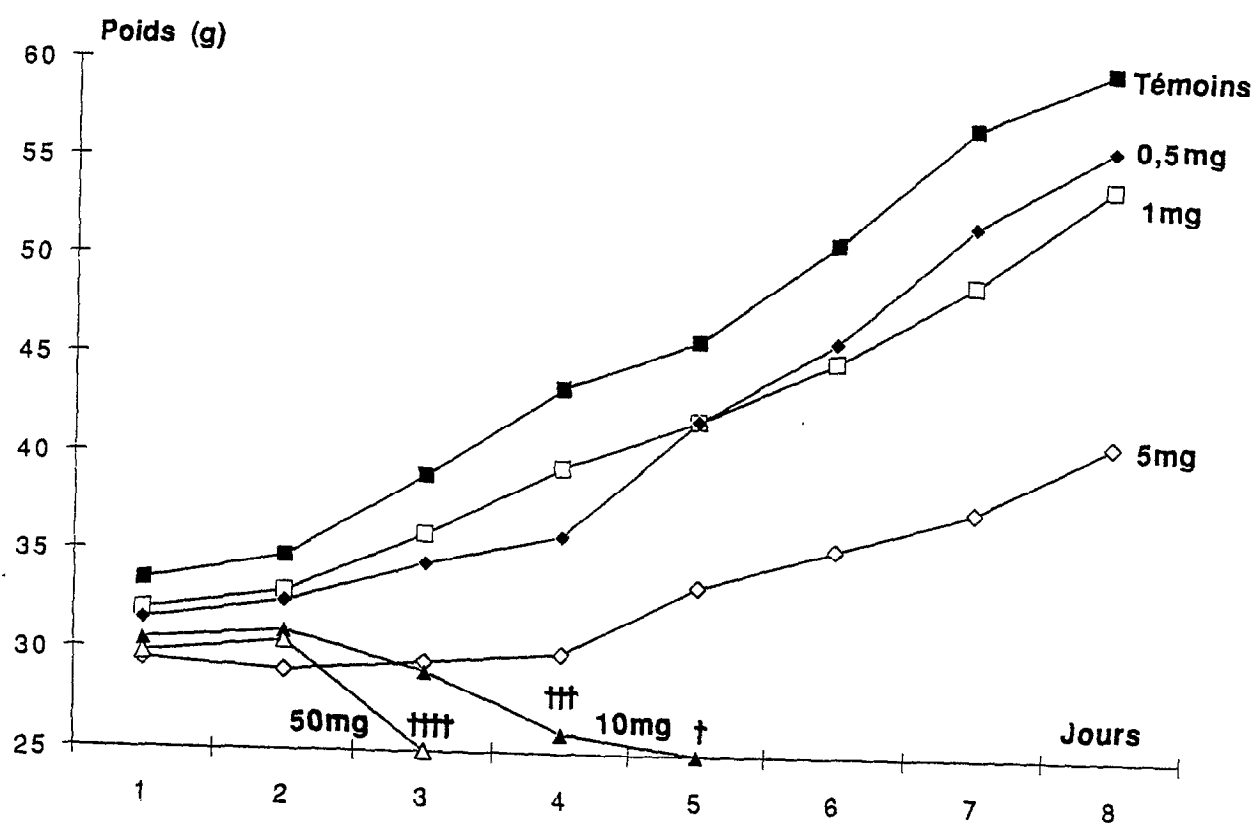


Figure 16 : Toxicité de la macrofusine chez le rat pour 5 doses : 0,5, 1, 5, 10 et 50 mg par individu

(rein, foie, rate, estomac, intestin, coeur et thymus) sont prélevés sur les animaux sacrifiés à 68 h, 96 h et 19 jours et fixés au formaldéhyde pour une étude histo-pathologique.

Une deuxième expérimentation est pratiquée sur des lots semblables avec une administration modulée suivant l'évolution du poids des rats; les doses employées sont de 5 et 10 mg/jour de toxine (soit 167 et 334 mg/kg de poids vif). Les organes prélevés au 10^{ème}, 15^{ème} et 18^{ème} jour sont examinés comme ci-dessus.

Le lot de macrofusine utilisé dans ces deux expériences provoque la mort des rats après administration de 3 doses successives de 12 mg (400 mg/kg de poids vif).

Les études anatomo-pathologiques et histologiques montrent l'existence de stéatose et de nécrose hépatique ainsi que de la congestion; des microhémorragies spléniques sont également observées. Ces lésions, peu marquées et non spécifiques, apparaissent quelquefois chez les témoins. Elles peuvent être imputées à l'alimentation et n'expliquent pas de manière satisfaisante la toxicité aiguë et la forte différence de poids observées chez les animaux traités par rapport aux témoins.

3) Toxicité sur oeufs embryonnés de poules

La DL50 sur oeufs embryonnés de poule est estimée à 0,1 mg/oeuf. A titre de comparaison, l'ochratoxine a une DL50 de 1,1 µg/oeuf, la toxine T2 de 0,055 µg/oeuf et l'aflatoxine B1 de 0,022 µg/oeuf.

4) Toxicité sur oeufs fertilisés d'oursins

Ce test peut mettre en évidence une action antimittotique du produit étudié.

Aucun effet remarquable n'est visible à 1, 5 ou 10 γ

5) Toxicité sur bactéries

Aucune activité antibactérienne n'est décelée à 100 γ sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

6) Toxicité sur cellules cancéreuses Kb

Aucune cytotoxicité n'a été enregistrée à 1 et 10 γ.

7) Toxicité par injection intrastomacale chez le souriceau

Un effet au niveau du cerveau, hémorragie avec lyse de la matière cérébrale (chap.A-12) n'a pu être reproduit aux doses de 0,01, 0,1, 1 ou 2 mg de macrofusine par souriceau. La DL50 pour ce test est de l'ordre de 1 mg/souriceau.

8) Toxicité par injection intracérébrale chez le souriceau

Aucun symptôme (chap. A-13) autre que la mortalité aiguë n'a été observé.

9) Etudes électrophysiologiques

A la concentration de 1,4 μM , la macrofusine n'altère pas le courant Na ni le courant K des fibres musculaires squelettiques. Pour une concentration de 280 μM , l'amplitude du courant Na atteint $44 \pm 5 \%$ ($n = 4$) et celle du courant sortant $70 \pm 10 \%$ de celle du courant mesuré dans le milieu de Ringer.

Des expériences portant sur l'étude de la conductance aux ions Ca et sur l'activité mécanique des fibres cardiaques de grenouille, placées dans les conditions de potentiel imposé, ont montré que la macrofusine s'avère capable de réduire l'amplitude du courant Ca ainsi que celle de la tension de 50 % environ à la concentration de 100 μM (129).

Ces observations suggèrent que le canal Ca est la cible privilégiée de la macrofusine.

E3) PRODUITS ISOLÉS DE CULTURES MICROCONIDIALES

1) Toxicologie de la microfusine

Les effets toxiques de la microfusine sont semblables à ceux de la macrofusine dans les différents tests pratiqués.

2) Toxicologie de la micromoniline

2-1) Etudes toxicologiques chez le rat

L'administration de micromoniline par sondage oesophagien chez le rat ne semble pas provoquer d'action sur le poids des animaux à la dose journalière de 50 mg (soit environ 1,5 mg/kg) sur 12 jours.

2-2) Toxicité sur cellules cancéreuses Kb

Aucune action cytotoxique n'est observée à 10 γ ; très faible action à 100 γ (71 % de cellules vivantes).

2-3) Toxicité par injection intrastomacale chez le souriceau

A la dose de 2 mg de micromoniline/souriceau, une mortalité importante est enregistrée sans qu'aucun symptôme cérébral ne soit observé.

L'association de la macrofusine et de la micromoniline à la même dose ne donne pas plus de résultat.

2-4) Etudes électrophysiologiques

La micromoniline diminue le pic de courant entrant Na. La réduction dépend de la concentration appliquée. En présence de 5 et 10 μ M de micromoniline dans le milieu de Ringer, l'amplitude du courant Na n'atteint que respectivement $81,8 \pm 3,4$ % (n = 6) et 63 ± 7 % (n = 3) de la valeur mesurée dans la solution de contrôle.

E4) CONCLUSION

L'existence de deux types de mycotoxines a été mise en évidence :

- la macrofusine, caractérisée par une faible toxicité sur les rats, compensée par un très grand taux de production des cultures de grains de maïsensemencés avec des inoculats de macroconidies de *F. moniliforme* ; la microfusine qui possède la même toxicité mais dont le taux de production par des cultures inoculées avec des microconidies est beaucoup plus faible. La macrofusine présente aussi une action inhibitrice sur le courant calcium et la tension du muscle cardiaque.

- la micromoniline qui est inactive sur les rats mais qui inhibe le courant sodium responsable de la phase de dépolarisation initiale du potentiel d'action cardiaque ou nerveux.

Si l'on replace les deux types de toxicité, à savoir : a) l'action hépatotoxique de la macrofusine chez le rat, b) l'action inhibitrice du courant sodium de la micromoniline, dans le contexte des symptômes enregistrés chez le cheval intoxiqué par du maïs contaminé par *F. moniliforme*, l'hypothèse selon laquelle la macrofusine serait responsable des symptômes hépatiques et la micromoniline des symptômes nerveux, peut être avancée. Cependant, une synergie entre les deux molécules doit aussi être envisagée.

L'action éventuel d'un métabolite agissant sur le canal potassium ne doit pas non plus être négligée.

F) ANALYSES STRUCTURALES

F) ANALYSES STRUCTURALES

F1) PRODUITS ISOLÉS DE CULTURES MACROCONIDIALES	102
1) <u>Analyse structurale de la macrofusine</u>	102
1-1) Premières données spectrales	102
1-1-1) Spectres de masse	102
1-1-2) Spectres ultra-violet	102
1-1-3) Spectre infra-rouge	102
1-2) Résonance magnétique nucléaire	102
1-2-1) RMN à une dimension	103
1-2-1-1) RMN ^{13}C	103
1-2-1-2) RMN ^1H	109
1-2-2) RMN à deux dimensions	115
1-2-2-1) RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^1\text{H}$	115
1-2-2-2) RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^{13}\text{C}$ INADEQUATE	115
1-2-2-3) RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$	118
avec relais de magnétisation	118
1-2-2-4) RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^1\text{H}$	118
- RMN 2D COSY 45°	118
- RMN 2D COSY RCT	122
- RMN 2D HOHAHA	122
1-2-3) Etat d'ionisation de la molécule en solution	126
1-2-4) Phénomènes dynamiques	126
1-2-5) Complexation de cations métalliques	128
2) <u>Analyses structurales des dérivés de la macrofusine</u>	129

F2) PRODUITS ISOLÉS DE CULTURES MICROCONIDIALES	129
1) <u>Analyse structurale de la micromoniline</u>	129
1-1) RMN à une dimension	130
1-1-1) RMN ^1H	130
1-1-2) RMN ^{13}C	130
1-2) RMN à deux dimensions	134
1-2-1) RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^{13}\text{C}$ (INADEQUATE)	134
1-2-2) RMN 2D de corrélation hétéronucléaire $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$	134
2) <u>Analyse structurale des microfusines</u>	138
F3) CONCLUSION	142

F1) PRODUITS ISOLÉS DE CULTURES MACROCONIDIALES

1) Analyse structurale de la macrofusine

1-1) Premières données spectrales

1-1-1) Spectres de masse

Les spectres de masse de la macrofusine ont été réalisés au centre de spectrométrie de masse de Lyon selon plusieurs techniques, par introduction directe

- Impact électronique avec un spectromètre de masse magnétique à double focalisation VG 70 70E.

- Ionisation chimique avec ammoniac, méthane et isobutane à l'aide d'un spectromètre de masse magnétique à simple focalisation VG 305.

- Fast Atomic Bombardment positif avec un spectromètre de masse magnétique à triple secteur ZAB 2-SEQ.

Les résultats obtenus sont limités; la macrofusine possède une masse de 721 et doit répondre à la formule brute $C_{34}H_{59}NO_{15}$.

1-1-2) Spectre ultra-violet

Le spectre enregistré dans l'éthanol sur un spectrophotomètre Beckman 26 a montré deux épaulements très légers à 291 et 330 nm.

1-1-3) Spectre infra-rouge

Le spectre IR réalisé en micropastilles de KBr sur un spectrophotomètre Perkin Elmer 297 présente des bandes d'absorptions caractérisant certaines fonctions :

- fonction alcool ou amine : 3400
- fonction ester : 1735

1-2) Résonance magnétique nucléaire

La structure de la macrofusine a été élucidée grâce aux diverses techniques de la RMN 1H ou ^{13}C à une et deux dimensions (130). Outre la toxine elle-même, ont été examinés les dérivés acétylé et méthoxylé, les sels d'ammonium et de sodium.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C ont été réalisés sur un spectrophotomètre Bruker AM 500 au laboratoire de Chimie Organique Structurale (UA 455) de l'Université Pierre et Marie Curie.

Fortement polaire, la macrofusine est totalement insoluble dans les solvants apolaires. Le méthanol CD_3OD a été choisi comme solvant principal, d'une part parce que la toxine et ses dérivés

sont très solubles dans ce solvant et d'autre part parce que les signaux du méthanol n'occultent aucun signal RMN ^1H et ^{13}C .

Les spectres RMN 1D ^{13}C et ^1H présentent un aspect relativement inhabituel dû à la présence d'un certain nombre de signaux fortement élargis. La largeur de ces raies varie en fonction de la concentration. Ces observations montrent que la structure de la toxine doit permettre l'établissement de nombreuses liaisons hydrogènes inter et/ou intramoléculaires. Le manque de résolution en RMN ^1H et la rapidité de la relaxation transversale en RMN ^{13}C , associés aux phénomènes dynamiques, ont constitué les difficultés majeures rencontrées lors de l'élucidation de la structure. Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones ^{13}C puis les attributions des signaux obtenues au cours de l'étude par RMN à une et deux dimensions sont regroupées dans le tableau 8.

1-2-1) RMN à une dimension

1-2-1-1) RMN ^{13}C

L'examen du spectre (figure 17a) ne montre aucun signal qui puisse être associé à des groupements insaturés (éthyléniques ou aromatiques) à l'exception de six signaux correspondant à des carbonyles d'ester (2 carbones) Q₁, Q₂ et d'acide (4 carbones) Q₃ à Q₆. Tous les autres carbones sont aliphatiques. La classe de ces carbones a été établie à partir de spectres J modulés (figure 17b) et d'un spectre enregistré sans découplage des protons : 4 carbones primaires P₁ à P₄, 14 carbones secondaires S₁ à S₁₄ et 10 carbones tertiaires T₁ à T₁₀, dont deux sont équivalents (T₃ et T₄). Pour chaque classe, cette numérotation provisoire suit l'ordre des déplacements chimiques.

L'examen des déplacements chimiques des carbones tertiaires montre que deux d'entre eux (T₉, T₁₀) sont susceptibles d'être liés à l'oxygène d'un groupe ester, trois à des groupes hydroxyles (T₆, T₇, T₈), un sixième, un peu moins déblindé, (T₅) à un groupe amine, tandis que les quatre derniers ne peuvent être liés directement à des hétéroatomes. Les carbones secondaires et primaires ne peuvent, eux non plus, être liés à des hétéroatomes.

Dans le spectre du dérivé méthoxylé, préparé par action du diazométhane sur la macrofusine, apparaissent entre 52 et 53 ppm de nouveaux signaux correspondant à quatre groupes méthoxyles (figure 18). Les signaux des carbones insaturés Q₃ à Q₆ sont affinés et moins déblindés que dans la toxine. La présence des quatre groupes carboxyliques est donc confirmée.

Par rapport au spectre de la toxine, les signaux des deux carbones tertiaires T₃ et T₄, et ceux de quatre carbones secondaires S₇ à S₁₀ sont modérément déplacés (-1,2 à -1,9 ppm). Il est vraisemblable que ces carbones soient proches des groupes carboxyliques à partir desquels ont été formés les esters méthyliques

Dans le dérivé acétylé, préparé par action de l'anhydride acétique sur la macrofusine dans la pyridine, la présence de nouveaux signaux correspondant à quatre carbones primaires (entre 20 et 23

Tableau 8 : Déplacements chimiques des protons et des carbones ^{13}C de la macrofusine et de ses dérivés acétylé et méthoxylé dans CD_3OD (δ ppm par rapport au TMS).

		Macrofusine		Macrofusine acétylée		Macrofusine méthoxylée		sel d'ammonium
		^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
P1	C20	14,4	0,89	14,4	0,89	14,4	0,89	14,89
P2	C22	15,9	0,94	16,03	0,94	15,64	0,94	16,45
P3	C1	15,98	1,28	17,44	1,08	-	-	19,61
P4	C21	20,75	0,96	20,81	0,92	20,62	0,96	21,25
S1	C19	23,80	<1,27>	(a) 23,88	1,30	23,75	1,32 1,26	24,22
S2	C7,C8	26,60	1,42	25,95	1,28	26,59	1,4	27,26
S3		26,76	1,4	26,18	1,27	26,77	1,4	27,37
T1	C12	26,84	1,81	27,03	1,56	26,88	1,81	27,13
S4	C18	29,53	1,33	29,70	1,36	29,36	1,32	30,16
			1,18		1,12		1,17	
S5	C17	32,94	1,44	32,91	1,48	32,98	1,40	33,40
			1,07		1,08		1,05	
T2	C16	34,76	1,69	34,86	1,72	34,66	1,69	35,35
S6	C13	36,58	1,66	36,69	1,62	36,29	1,64	37,41
			1,48		1,49		1,48	
S7	C24	36,90	2,78-2,59	36,16		35,71		38,36
S8	C30	37,14	2,70-2,43	36,24	2,50-2,80	35,74	2,48-2,80	38,36
S9	C26	37,69	2,70-2,49	36,41		36,02		42,57
S10	C32	37,93	2,65-2,49	36,46		36,06		42,57
S11	C6,C9	38,96	1,43	35,68	1,54	39,03	1,46	39,74
S12		39,12	1,45	35,95		39,32	1,44	39,89
T3	C25,31	39,67	3,14	38,48	3,17	38,24	3,21	43,78
T4		39,67	3,14	38,68	3,20	38,42	3,23	43,78

S13	C4	41,73	1,55	36,76	1,78	41,7		42,57
S14	C11	44,4	1,47 1,12	41,58	1,66 1,20	44,56	1,46 1,11	45,18
T5	C2	53,7	3,14	48,95	4,14	(b) -	-	53,35
T6	C5	68,36	3,85	71,19	4,88	68,4	-	68,96
T7	C10	69,78	3,63	73,06	4,98	69,50	3,61	69,91
T8	C3	70,26	3,77	73,20	5,00	71,2	-	73,92
T9	C14	72,80	5,14	72,77	5,14	73,03	5,14	72,47
T10	C15	79,58	4,95	78,78	4,95	78,57	4,93	78,64
Q1		173,3		c {		d {		173,3
	C23,29				172,42		172,43	
					172,73		172,51	
Q2		173,5			172,86		173,15	173,5
					172,9x2		173,30	
					173,0		174,74	
							175,09	
Q3		177,0			175,14			
Q4	C27,28	177,4			175,20			180,66
Q5	C33,34	178,5			176,72			180,94
Q6		179,0			176,78			182,95 (x2)

a) carbones des groupes $\text{CH}_3\text{-CO}$: 20,87- 21,15- 21,23- 22,56

b) carbones des groupes O-CH_3 : 52,63(2C)- 52,26- 52,21

c) Q1, Q2, et les carbones des quatre groupes $\text{CH}_3\text{-CO}$

d) Q1 à Q6

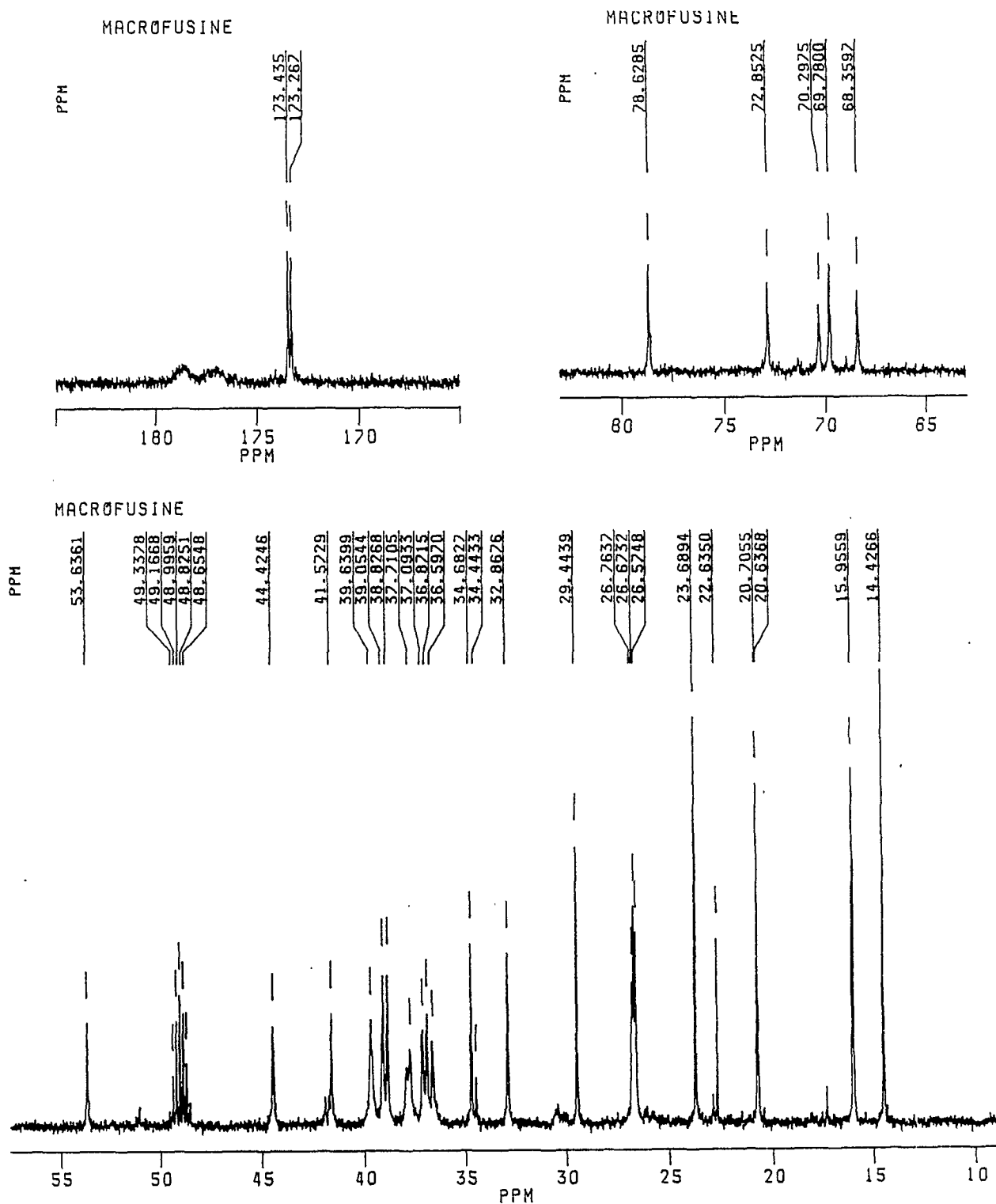


Figure 17 a : Spectre RMN ^{13}C de la macrofusine en solution $\approx 0,2$ M dans CD_3OD
(impulsion 40° , résolution 1,79 Hz/pt, 506 acquisitions)

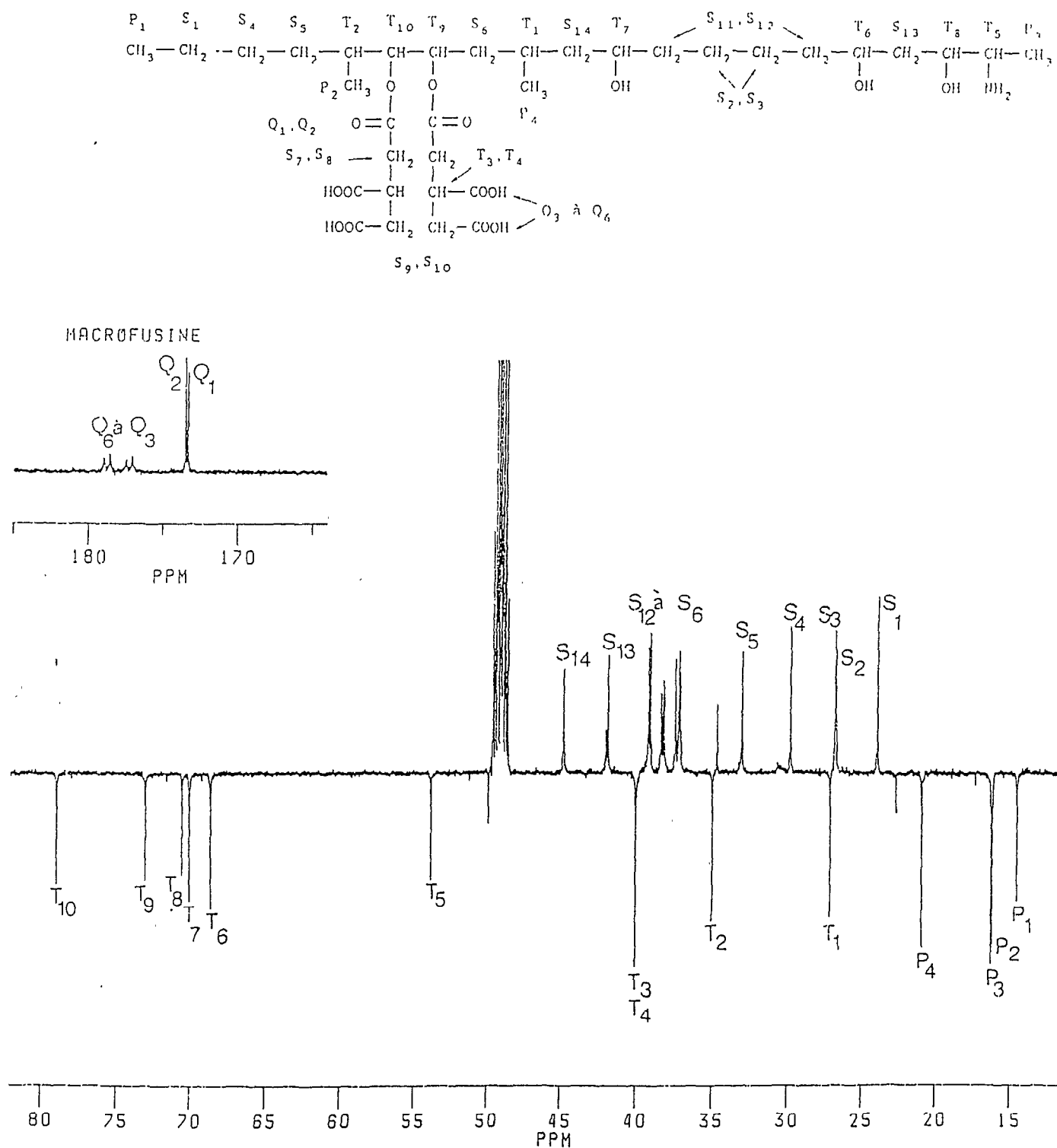


Figure 17 b : Spectre RMN ¹³C de la macrofusine en solution ≈ 0,04 M dans CD₃OD enregistré avec J modulation des signaux (délai de modulation 0,008 s, résolution 1,69 Hz/pt, 10400 acquisitions)

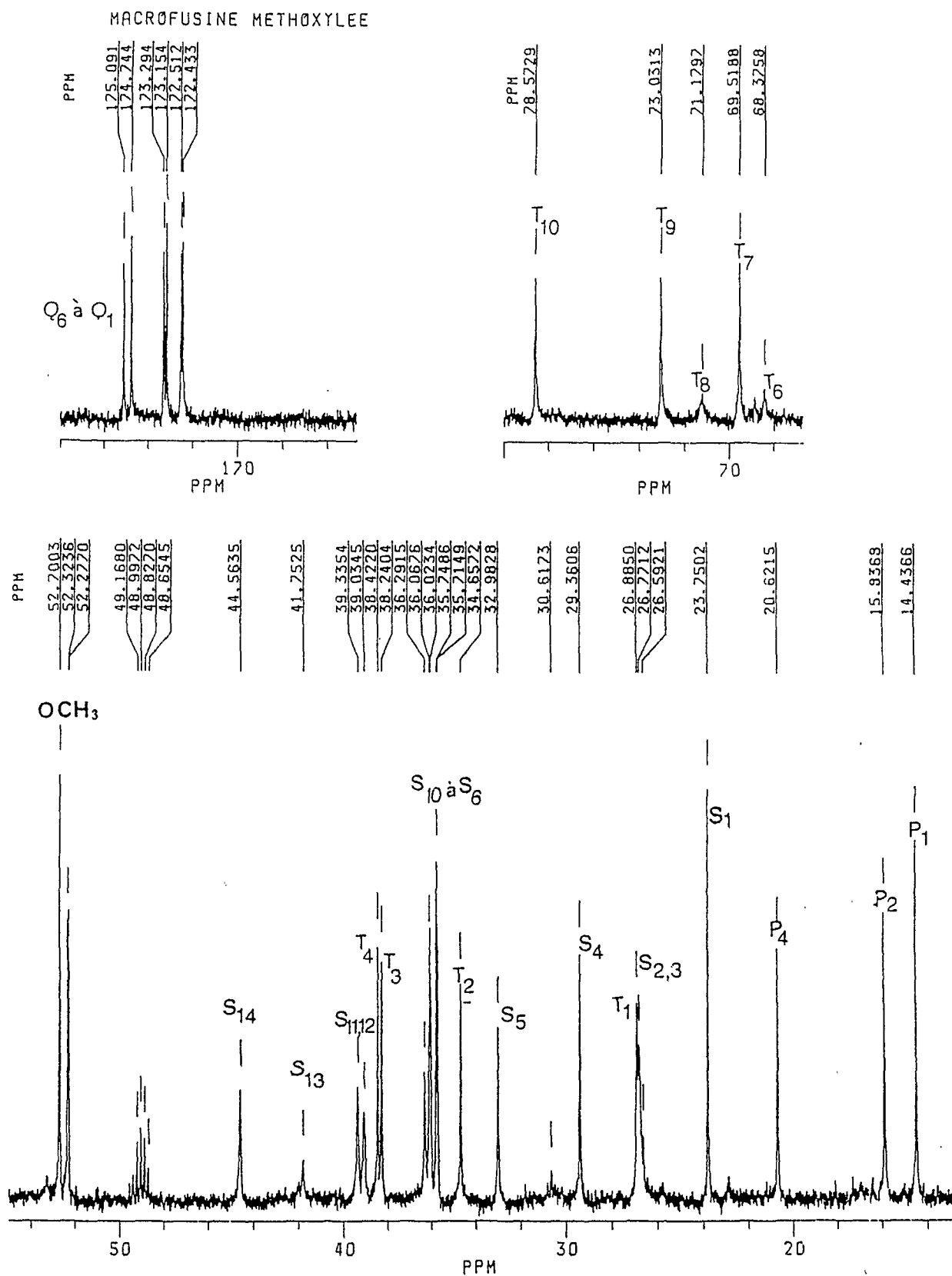


Figure 18 : Spectre RMN ^{13}C de la macrofusine méthoxylée en solution $\approx 0,2$ M dans CD_3OD (impulsion 40° , résolution 0,76 Hz/pt, 100 acquisitions)

ppm) et quatre carbonyles (entre 172 et 173 ppm) montre que quatre groupes fonctionnels ont réagi. Les signaux des carbones tertiaires fonctionnalisés sont nettement déplacés, T₆ à T₈ ($\Delta \delta \approx +3$ ppm) T₅ ($\Delta \delta \approx -4,7$ ppm) ce qui correspond aux effets attendus de l'acétylation de groupes hydroxyyles et de la formation d'un acétamide (131).

Huit carbones secondaires résonnent dans une gamme étroite de 1 ppm autour de 36 ppm. Sans qu'il soit possible de les individualiser à ce stade de l'étude, cette observation implique des variations de déplacement chimique notables des carbones S₁₃ ($\Delta \delta \approx -5,5$ ppm) S₁₁ et S₁₂ ($\Delta \delta \approx -3$ ppm). Le même effet est observé pour S₁₄ ($\Delta \delta \approx -3$ ppm). Ces quatre carbones doivent se trouver au voisinage immédiat des sites fonctionnels modifiés par l'acétylation.

Le sel d'ammonium a été préparé *in situ* par barbotage de gaz NH₃ dans la solution de macrofusine dans CD₃OD. La majorité des signaux sont faiblement déplacés ($\Delta \delta \approx +0,5$ ppm). L'ionisation provoque cependant des déblindages plus importants pour les carbonyles d'acide, pour les deux carbones tertiaires T₃ et T₄ ($\Delta \delta \approx +4,1$ ppm) et deux carbones secondaires S₉ et S₁₀ ($\Delta \delta \approx +4,8$ ppm) ce qui montre que ces carbones portent les groupes carboxyliques.

1-2-1-2) RMN ¹H

L'examen du spectre RMN ¹H (figure 19) de la macrofusine confirme un certain nombre des hypothèses formulées ci dessus.

Deux protons résonnent au voisinage de 5 ppm (T₉, T₁₀), trois protons entre 3,6 et 3,9 ppm (T₆ à T₈).

En dehors d'un massif important et peu résolu de protons aliphatiques, les signaux les plus significatifs correspondent :

- aux groupes méthyles, un triplet (donc un enchaînement CH₂-CH₃) et trois doublets (dont trois enchaînements CH-CH₃). Il faut noter que le doublet le plus déblindé n'est résolu et identifié qu'en solution très diluée ou en utilisant le diméthylsulfoxyde deutérié ou D₂O comme solvant;
- à un groupe de trois protons relativement déblindés (3,14 ppm). Leur position permet d'envisager de les attribuer aux sites T₃, T₄ et T₅;
- à un ensemble de huit protons qui résonnent entre 2,4 et 2,8 ppm et sont donc susceptibles d'être portés par des carbones voisins des carbonyles d'acide et d'ester.

L'utilisation de D₂O comme solvant permet de lever l'équivalence fortuite des trois protons tertiaires T₃, T₄ et T₅. Le signal qui est alors plus déblindé (3,29 ppm) est un quintuplet : par irradiation sélective de ce proton, sont découplés les protons d'un groupe méthyle (1,33 ppm) et un proton résonant à 3,83 ppm donc géminé à un hydroxyle. Ce dernier proton et celui qui résonne à 3,89 ppm (donc également géminé à un hydroxyle) sont en outre tous deux couplés à deux protons géminés auxquels correspond un ensemble de 16 raies entre 1,58 ppm et 1,70 ppm.

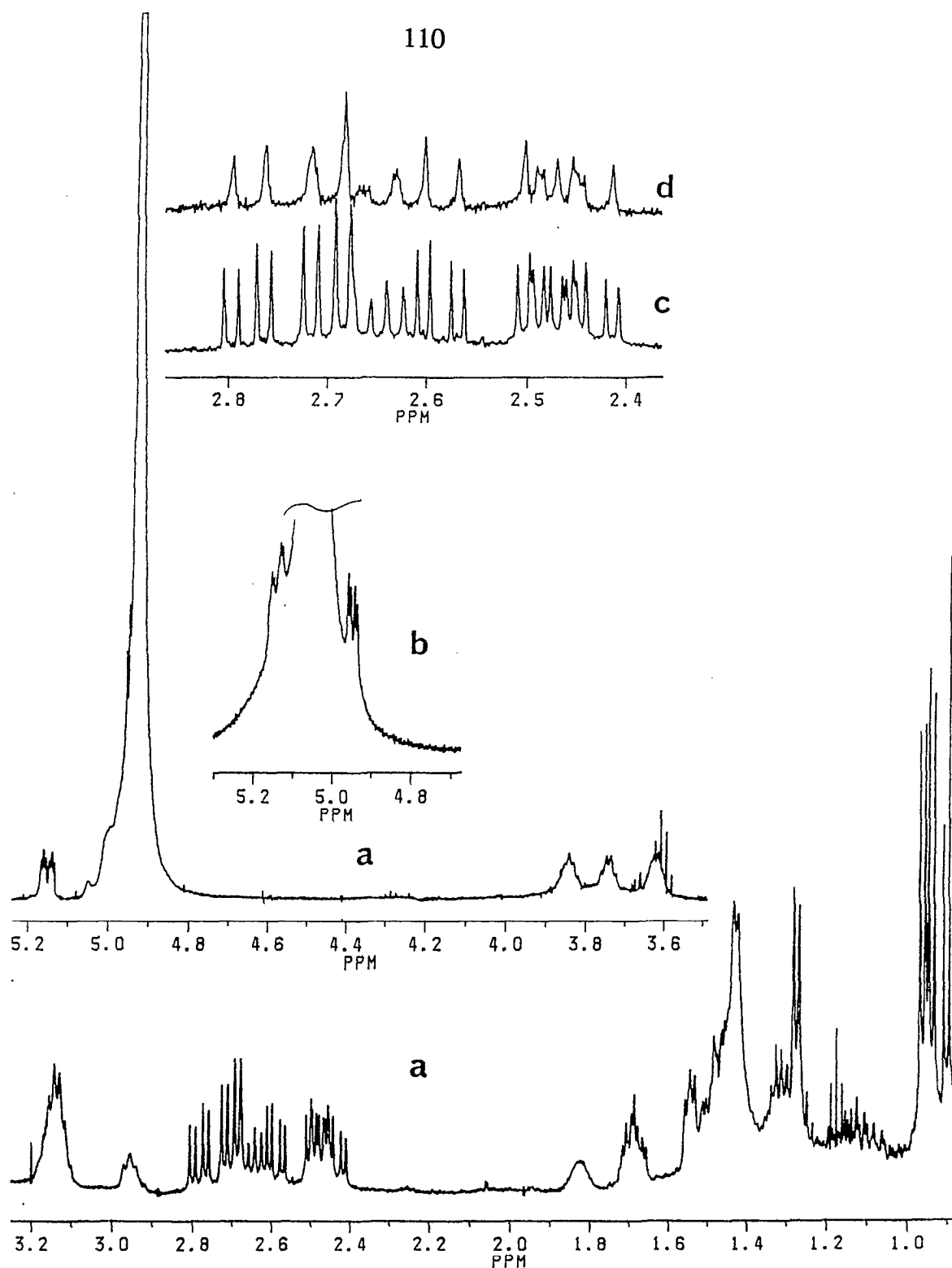


Figure 19 : Spectre RMN ^1H de la macrofusine en solution 10^{-3} M dans CD_3OD (impulsion 25° , résolution 0,27 Hz/pt, 255 acquisitions, transformation gaussienne)

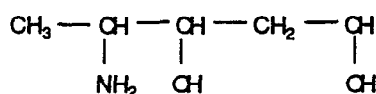
a) spectre complet

b) observation des protons au voisinage de 5 ppm par légère élévation de température

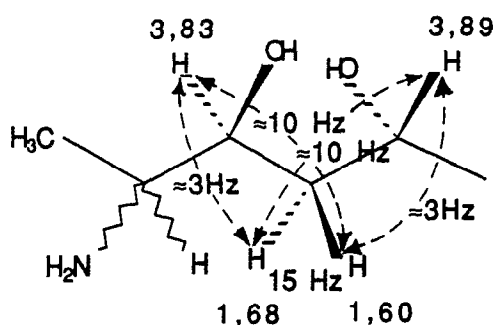
c) expansion des signaux entre 2,4 et 2,8 ppm

d) simplification du spectre c par irradiation à 3,14 ppm

Ces résultats, présentés sur la figure 20, établissent l'existence de l'enchaînement :



Pour les protons de ce fragment, de nombreux couplages vicinaux sont significativement différents de 6 Hz, ce qui indique l'existence d'une conformation privilégiée de la chaîne dans D₂O. Elle peut être schématisée avec des configurations relatives opposées des carbones qui portent les hydroxyles.



L'irradiation des deux signaux sans structure fine à 3,24 et 3,18 ppm simplifie le massif de huit protons résonnant entre 2,4 et 2,8 ppm.

L'analyse des signaux de ces huit protons est plus facile en utilisant la solution dans CD₃OD dans la mesure ou l'irradiation simultanée des deux protons tertiaires à 3,14 ppm transforme les multiplets complexes situés entre 2,4 et 2,8 ppm en quatre sous systèmes AB. La valeur élevée des seuls couplages subsistant alors (16-17 Hz) montre que chaque sous système AB correspond aux deux protons géminés d'un méthylène. Avec les deux protons tertiaires, l'ensemble des dix protons correspond donc à deux systèmes AB M CD isolés et très peu différenciés et dont les déplacements chimiques se justifient par le voisinage immédiat des 6 carbonyles. Il a été montré que les groupes carboxyliques sont portés par deux carbones tertiaires et deux carbones secondaires. Les deux carbonyles d'ester doivent être directement liés aux deux derniers méthylènes. L'ensemble des résultats précédents montre que les fonctions esters présentes dans la macrofusine résultent de la réaction de deux molécules d'acide 1,2,3 propane tricarboxylique sur deux fonctions alcools tertiaires, le groupe acide impliqué étant à chaque fois le groupe terminal.

Enfin les deux protons tertiaires géminés aux fonctions esters sont couplés entre eux. Les deux carbones qui portent les fonctions esters sont donc vicinaux. Par traitement du signal de précession libre (transformation gaussienne), il est possible d'augmenter la résolution donc de mesurer les constantes de couplage. L'un des signaux est un doublet de doublet (J : 3,4 Hz et 8 Hz), l'autre un doublet de triplet (J : 3,4 Hz, 3,4 Hz et 8 Hz). Ces signaux ne sont modifiés par

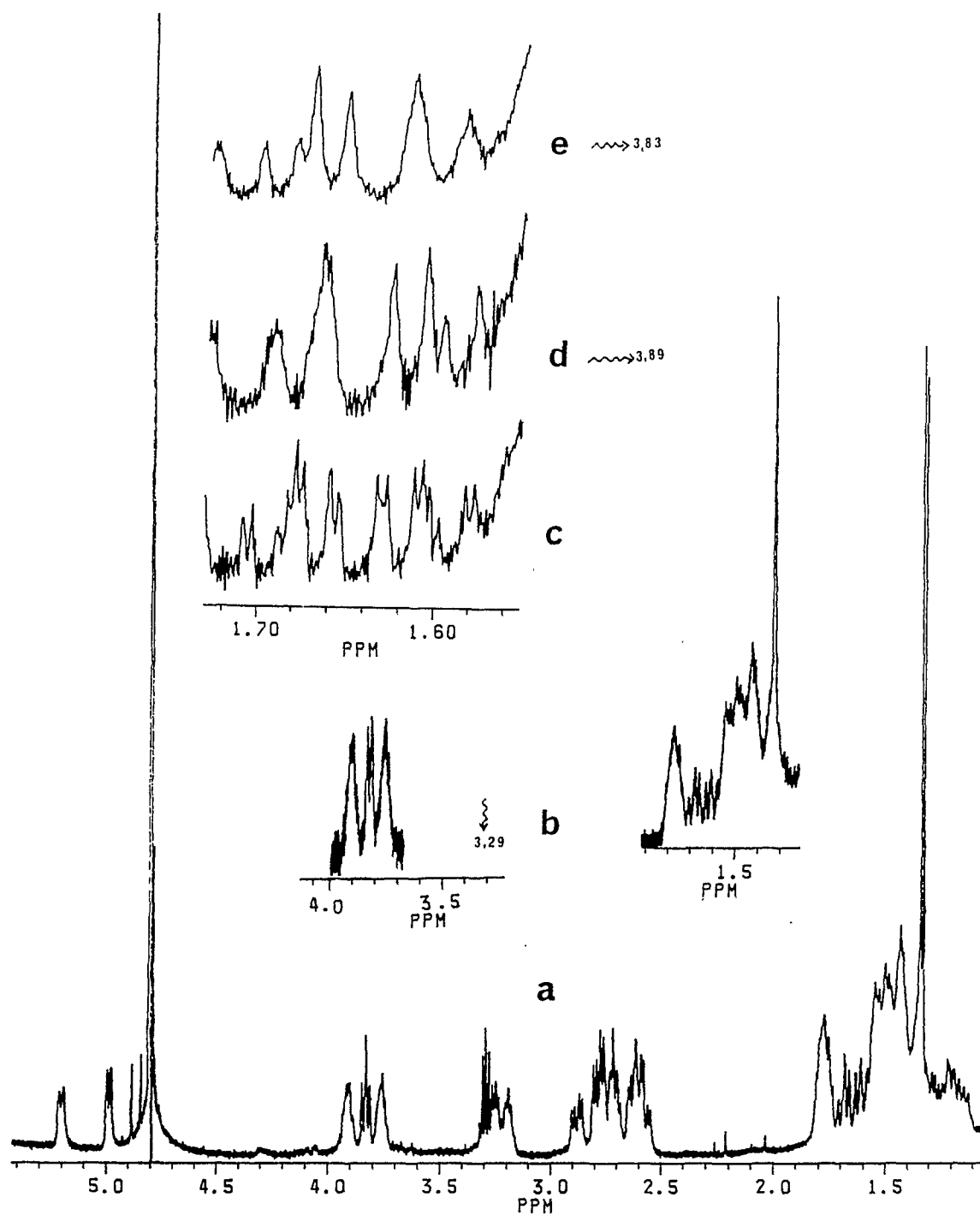
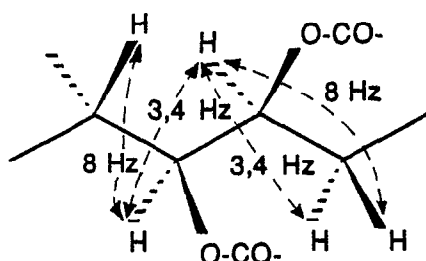


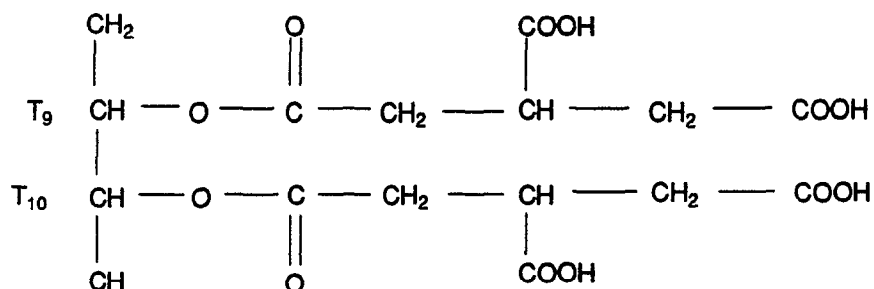
Figure 20 : Spectre RMN ^1H de la macrofusine en solution dans D_2O (impulsion 30° , résolution 0,27 Hz/pt, 192 acquisitions)

- a) spectre complet
- b) modifications du spectre par irradiation à 3,29 ppm
- c) expansion du multiplet situé entre 1,58 et 1,72 ppm
- d et e) modifications de ce multiplet par irradiations à 3,89 et 3,83 ppm

l'irradiation d'aucun proton géminé à un groupe fonctionnel. La faible valeur de la constante de couplage entre les protons des sites T₉ et T₁₀ (3,4 Hz) implique l'existence d'une conformation privilégiée de la molécule dans laquelle ces deux protons sont en interaction gauche. Cette conformation privilégiée peut être schématisée avec des configurations relatives identiques des deux carbones qui portent les groupes esters.



Le bloc suivant doit donc s'insérer dans la chaîne principale :



Dans le dérivé acétylé (figure 21), cinq protons résonnent au voisinage de 5 ppm ce qui confirme la formation des trois nouvelles fonctions esters et donc de la présence de trois fonctions alcool dans la macrofusine.

L'un des protons qui résonnait à 3,14 ppm donne un signal isolé à 4,14 ppm en bon accord avec la formation de l'amide. Ce proton est couplé aux protons d'un groupe méthyle (1,08 ppm) et à un proton fortement déblindé (5,00 ppm) avec des constantes de couplage respectives de 7 et 4 Hz. L'enchaînement proposé ci-dessus (p 112) est totalement confirmé.

Finalement les résultats obtenus par mise en oeuvre des techniques de la R.M.N. à une dimension conduisent à envisager comme structure de base de la toxine une chaîne aliphatique (20 carbones) polyfonctionnalisée. Deux ramifications sont constituées par deux groupes méthyles. La chaîne porte trois fonctions alcools tertiaires et une fonction amine primaire. Enfin deux fonctions esters résultent de la réaction de deux molécules d'acide propane tricarboxylique sur deux groupes alcools tertiaires géminés.

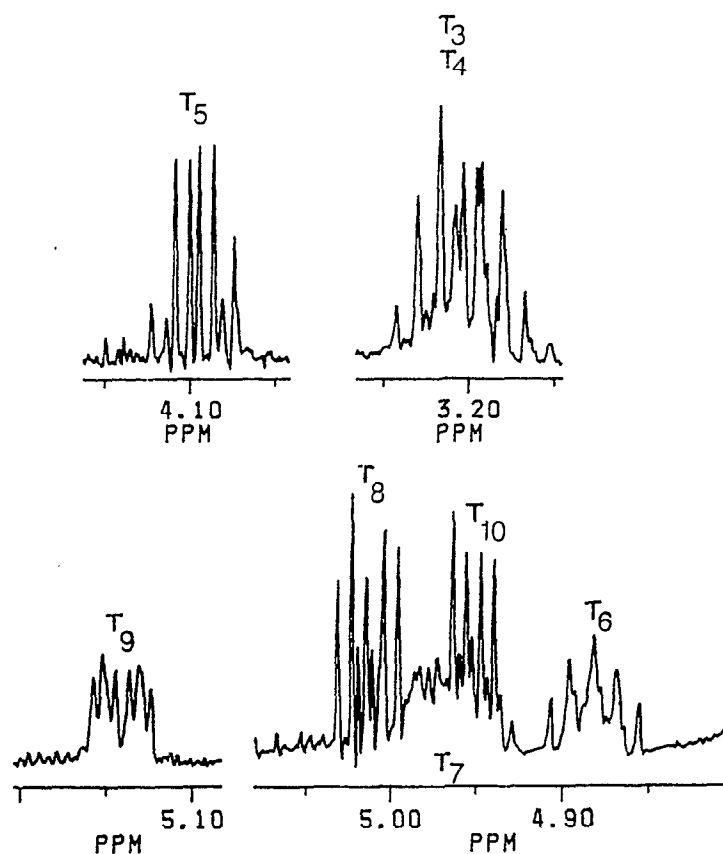
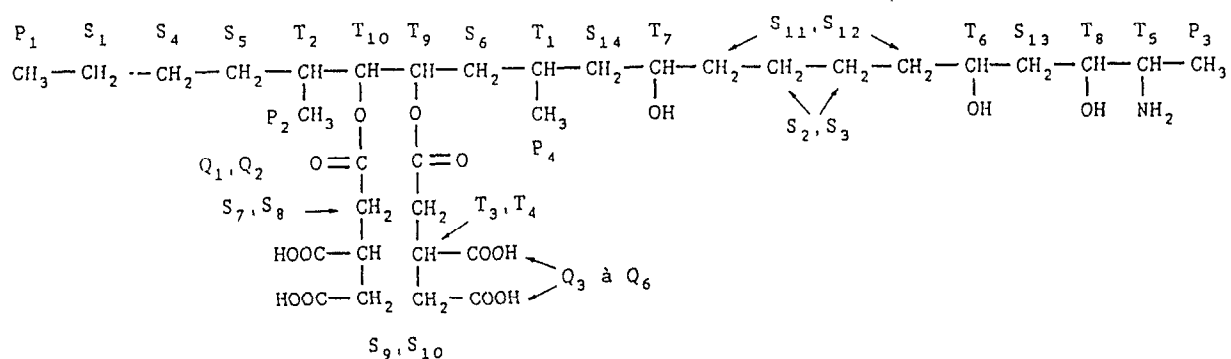


Figure 21 : Spectre RMN ¹H du dérivé acétylé de la macrofusine dans CD₃OD (impulsion 45°, résolution 0,24 Hz/pt, 272 acquisitions, transformation gaussienne) : expansion des signaux des protons tertiaires liés aux carbones fonctionnalisés

1-2-2) RMN à deux dimensions

Pour conforter cette analyse, préciser l'enchaînement des carbones de la chaîne principale et attribuer précisément tous les signaux RMN ^1H et ^{13}C , il est indispensable de recourir aux techniques de la RMN à deux dimensions.

1-2-2-1) RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^1\text{H}$

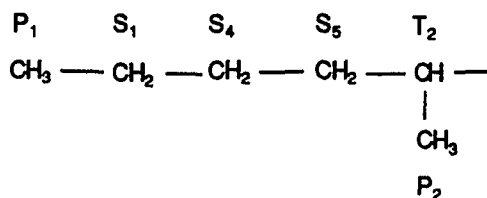
Dans un premier temps, tous les couples ^{13}C et ^1H directement liés ont été identifiés, en totalité pour la toxine elle-même et en grande partie pour les dérivés acétylé et méthoxylé, par RMN 2D de corrélation hétéronucléaire $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^1\text{H}$ (132). La numérotation provisoire attribuée précédemment à chaque carbone sera utilisée également pour le ou les protons qui lui sont liés. A titre d'exemple, la figure 22 présente la carte de corrélation hétéronucléaire obtenue pour la macrofusine. Les données obtenues permettent ensuite d'effectuer automatiquement l'attribution des signaux des protons à partir de celle des carbones ou inversement.

Elles sont précieuses en particulier pour repérer les signaux des protons liés aux carbones non fonctionnalisés, alors qu'ils sont en grande partie indiscernables dans les spectres RMN 1D. Il faut noter également que la non équivalence des protons géminés sur les sites S4 à S10 et S14 est mise en évidence dans la carte 2D par l'existence de deux taches de corrélation pour chacun des carbones concernés.

1-2-2-2) RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^{13}\text{C}$ INADEQUATE

Pour établir l'enchaînement des atomes de carbone, la méthode de choix est la RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^{13}\text{C}$ (INADEQUATE) (133). Cette technique nécessite cependant l'utilisation d'une solution concentrée de produit ($\approx 0,5$ M) puisque seules sont exploitées les molécules possédant deux carbones ^{13}C consécutifs. Malheureusement, dans le cas particulier des composés examinés, cette méthode s'est révélée décevante dans la mesure où les phénomènes dynamiques confèrent à la majorité des carbones des vitesses élevées de relaxation transversale.

Toutefois, pour le composé méthoxylé, des corrélations ont pu être clairement établies entre les carbones de la partie terminale de la chaîne principale. La figure 23 montre un extrait de la carte 2D sur lequel apparaissent les corrélations entre les signaux des paires de carbones directement couplés. La structure est donc :



Tous ces carbones donnent lieu à des signaux fins et ont même déplacement chimique dans la toxine et ses dérivés.

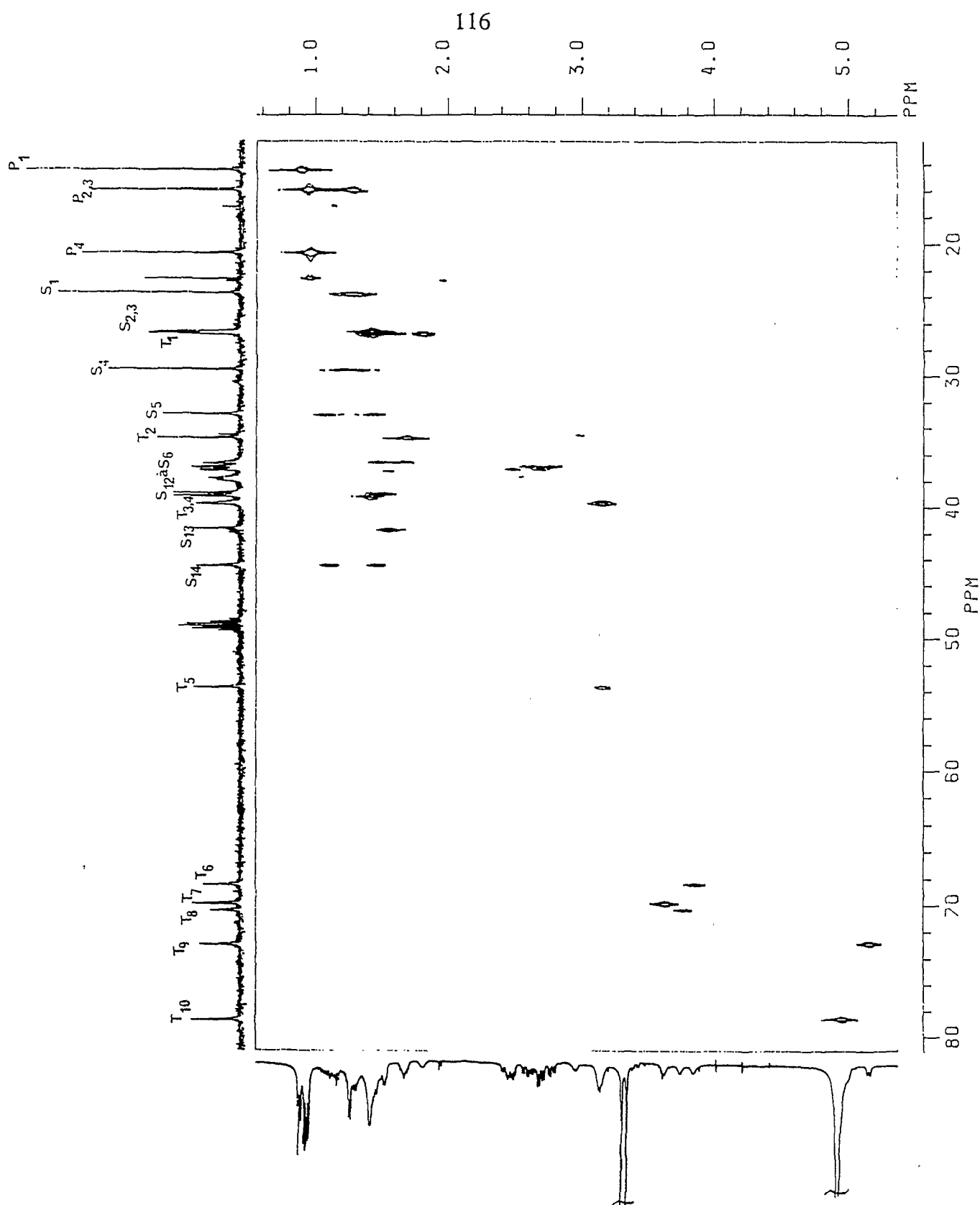


Figure 22 : RMN 2D de corrélation hétéronucléaire $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$ obtenue pour la macrofusine dans CD_3OD (impulsion ^1H $11\mu\text{s}$ ^{13}C $4,5\mu\text{s}$, 256 acquisitions, 256 expériences, résolution ^1H $5,0\text{ Hz/pt}$, ^{13}C $9,9\text{ Hz/pt}$)

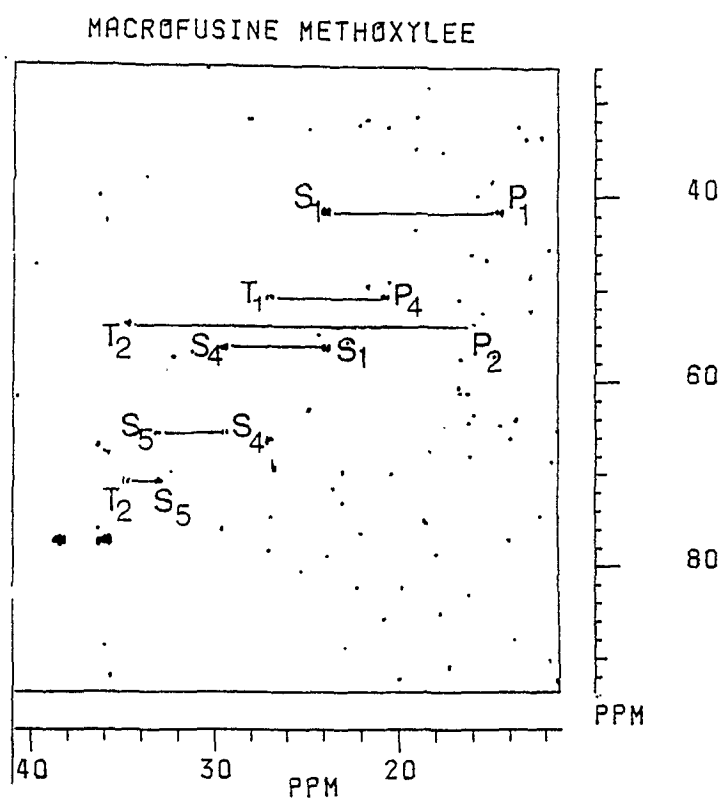
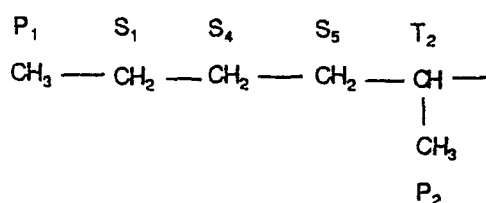


Figure 23 : RMN 2D INADEQUATE de la macrofusine méthoxylée en solution $\approx 0,5$ M dans CD_3OD (impulsions ^{13}C 90° ($6 \mu s$) 180° et 125° délai $1/4J = 0,007$ s, 256 acquisitions, 256 expériences) : carte partielle concernant les carbones de l'extrémité non fonctionnalisée de la chaîne

1-2-2-3) RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$ avec relais de magnétisation

La RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$ avec relais de magnétisation par l'intermédiaire des protons couplés (134) qui normalement permet d'identifier les carbones protonés vicinaux, ne peut être utilisée dans le cas présent d'une part à cause des vitesses trop élevées de relaxation des carbones et d'autre part à cause des nombreuses superpositions des signaux dans le spectre proton.

1-2-2-4) RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^1\text{H}$

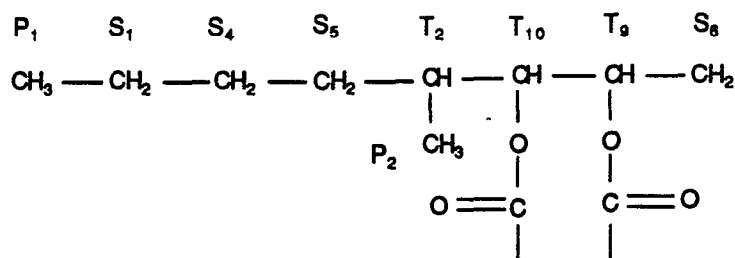
L'analyse a donc été poursuivie par les techniques de RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^1\text{H}$. Les apports des différentes méthodes et leurs limites seront examinés.

- RMN 2D COSY 45°

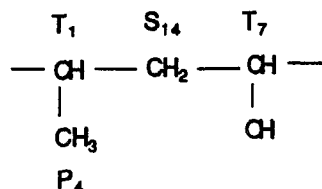
La RMN 2D COSY 45° (135) (figures 24 a, b, c) permet non seulement de détecter les couplages significatifs ($J > 1$ Hz) mais aussi d'identifier par l'orientation des signaux de corrélation les couples de protons géminés.

Pour la chaîne principale, la RMN 2D COSY 45° confirme les positions vicinales de T₉ et T₁₀ par une corrélation entre les protons qui résonnent à 4,95 et 5,14 ppm. En outre le proton T₁₀ (4,95 ppm) est corrélé au proton tertiaire T₂ (1,69 ppm) tandis que le proton T₉ (5,14 ppm) est corrélé aux protons géminés du site S₆ (1,66 et 1,48 ppm).

Ces résultats permettent de compléter l'enchaînement décelé par RMN INADEQUATE de la manière suivante :



Par ailleurs, les protons géminés du méthylène S₁₄ (1,47 et 1,12 ppm) sont couplés à chacun des protons tertiaires T₇ et T₁, ce dernier étant également couplé aux protons du groupe méthyle P₄, ce qui implique l'enchaînement :



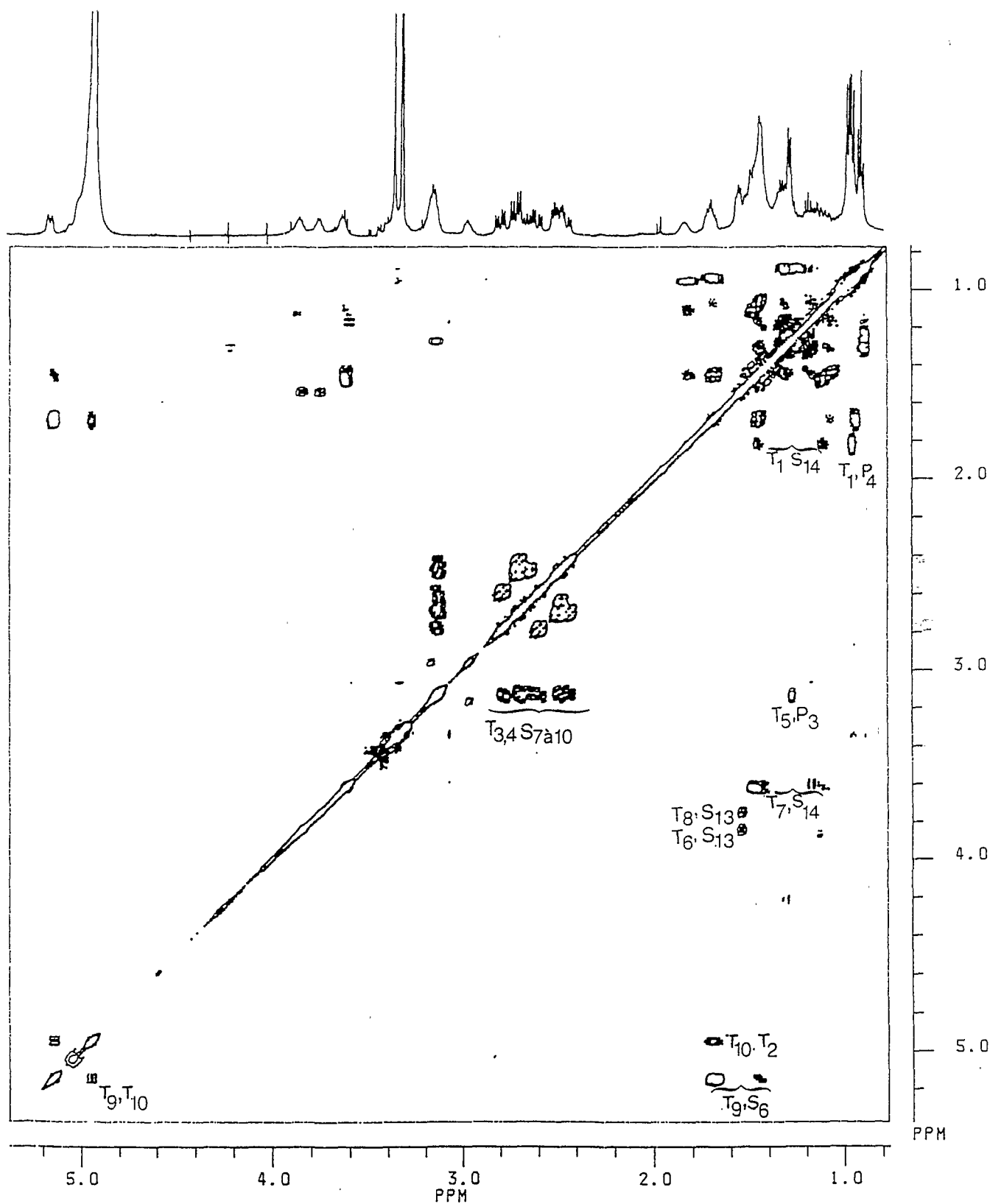


Figure 24 a : RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H} \delta^1\text{H}$ (COSY 45) de la macrofusine en solution dans CD_3OD (impulsions ^1H 90° (11 μs) et 45° , 16 acquisitions, 256 expériences, résolution 2,25 Hz/pt) : carte complète. Les corrélations observées pour les protons tertiaires sont signalées

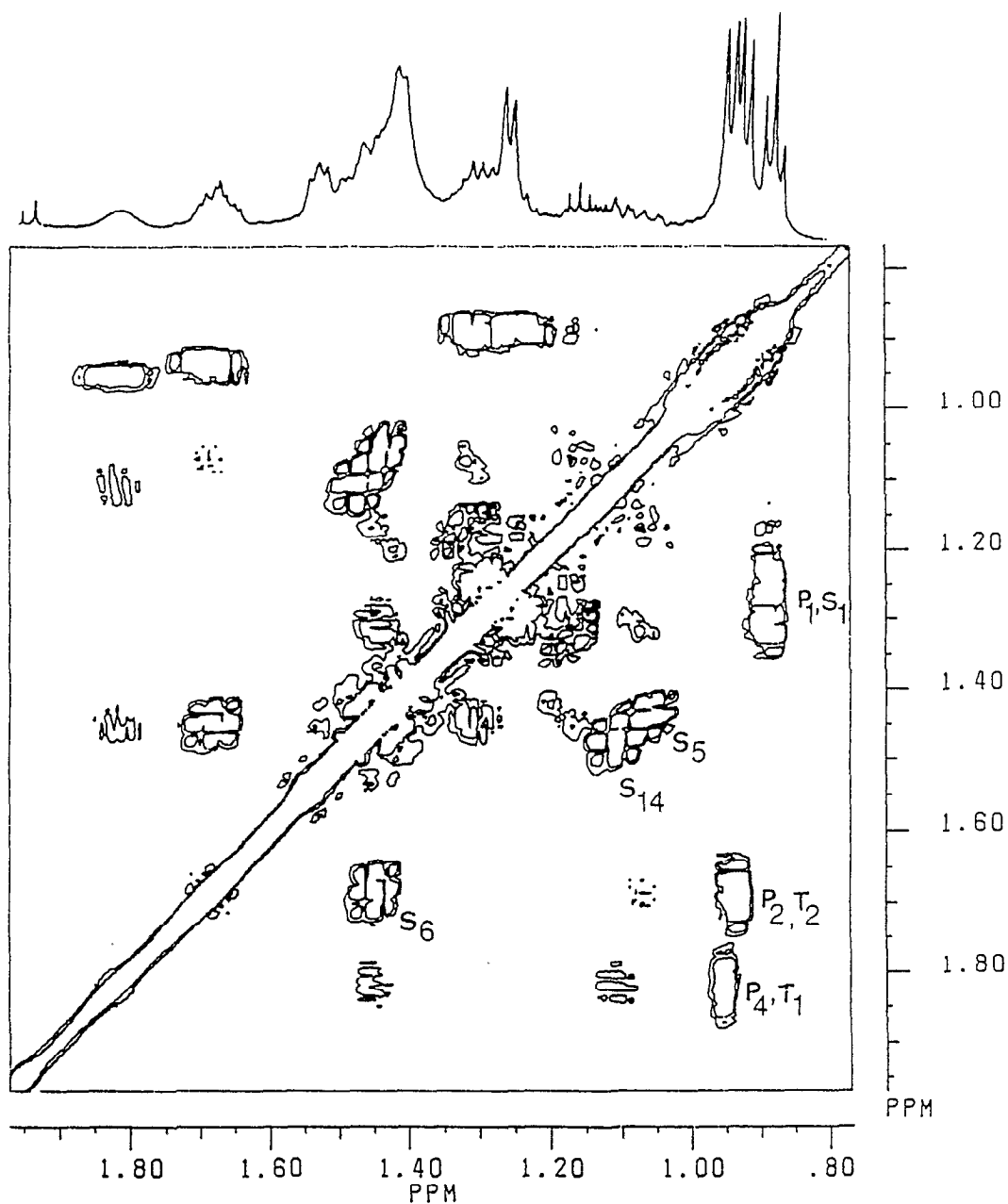


Figure 24 b : Expansion de la carte 24a dans la région des protons des zones non fonctionnalisées. Sont signalées les corrélations entre protons géminés et celles impliquant les protons des groupes méthyles

Figure 24 c : Expansion de la carte 24a dans la région des protons des acides propanetricarboxyliques

Malheureusement ni le proton T₁ ni le proton T₇ ne montre d'autres corrélations qui permettraient de situer ce fragment dans la chaîne.

Pour les résidus des acides 1,2,3 propane tricarboxyliques, la RMN 2D COSY permet l'identification des protons géminés mais l'équivalence des deux protons tertiaires (3,14 ppm) empêche de préciser quelles sont les paires de groupes méthylènes appartenant à un même résidu acide.

- RMN 2D COSY RCT

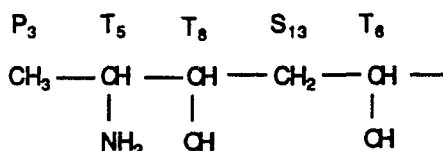
La RMN COSY RCT (136) permet de lever cet obstacle en utilisant le proton tertiaire comme relais pour transférer la magnétisation d'un méthylène à l'autre, à l'intérieur de chaque unité (figure 25). Les carbones 13 sont ensuite identifiés par la corrélation $\delta^1\text{H} \delta^{13}\text{C}$.

Pour chaque reste acide, les différences de déplacement chimique entre les noyaux ^1H et ^{13}C des méthylènes liés aux carbonyles d'ester et aux carbonyles d'acide restent trop faibles pour permettre une attribution univoque. Les attributions proposées ont été effectuées en admettant que les raies les plus larges sont observées tant dans le spectre ^1H que dans le spectre ^{13}C pour les noyaux des méthylènes directement liés aux groupes carboxyliques libres

- RMN 2D HOHAHA

Eu égard à la largeur de nombreux signaux, les corrélations n'apparaissent pas systématiquement dans les cartes COSY et COSY RCT. La RMN 2D HOHAHA (137) a été utilisée pour résoudre ce problème. En effet cette technique permet d'observer les corrélations même si les signaux des protons concernés sont peu résolus. Par ailleurs, elle met en jeu comme les COSY RCT des transferts successifs de magnétisation de sorte que des signaux de moindre intensité permettent de corréler des protons non vicinaux. Par rapport à la carte COSY, la carte 2D HOHAHA (figure 26) montre des corrélations supplémentaires.

Dans la partie initiale de la chaîne, le couplage entre les protons T₅ (3,15 ppm) et T₈ (3,77 ppm) est observé malgré la largeur des signaux. Le proton T₈ est corrélié à distance au méthyle P₃ (1,28 ppm) et au proton tertiaire T₆ (3,85 ppm), ce qui permet de compléter les attributions.



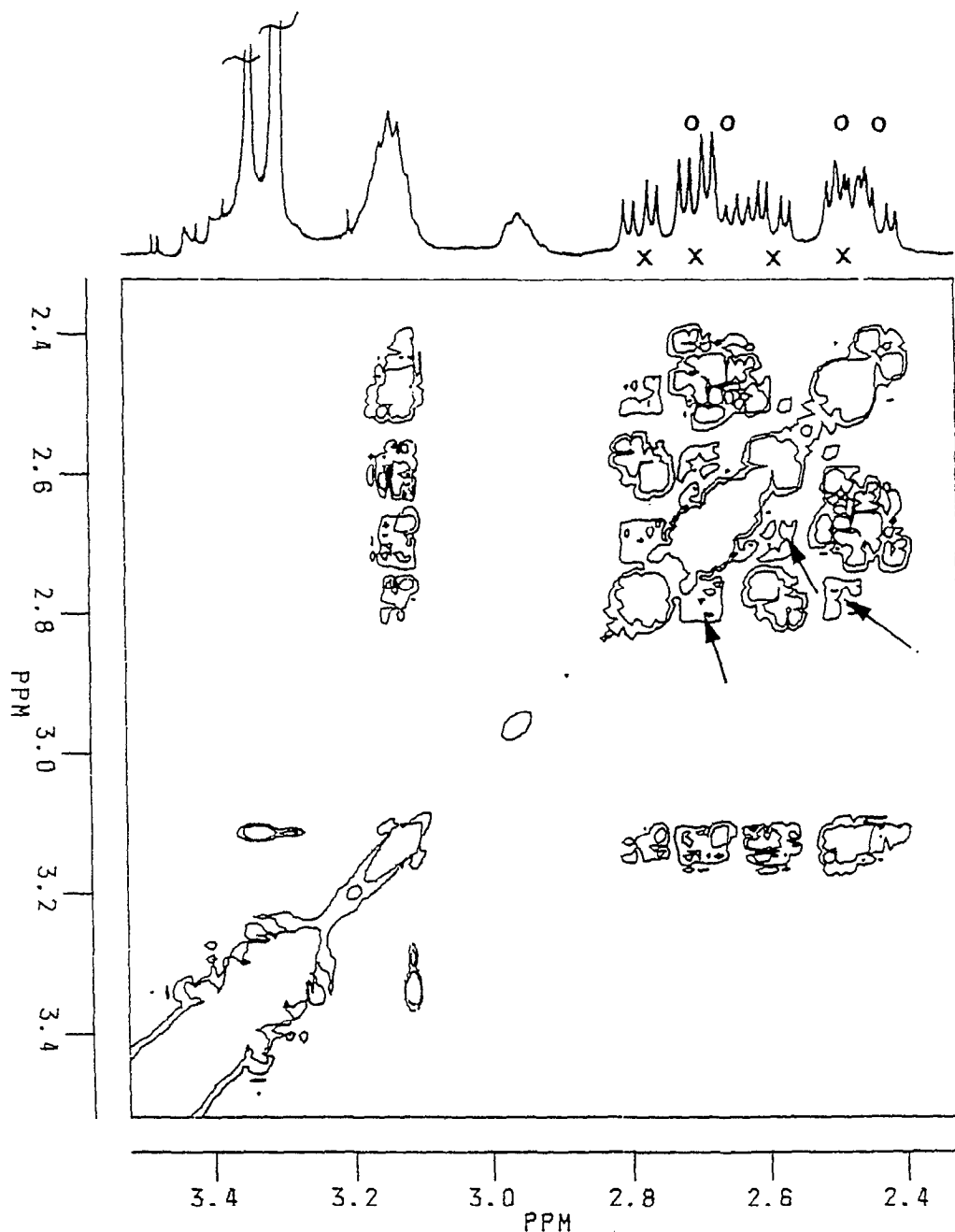


Figure 25 : RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^1\text{H}$ (COSY RCT) de la macrofusine en solution dans CD_3OD (conditions semblables à celles du COSY 45; toutes les impulsions sont de 90° (11 μs) et 180° pour la refocalisation. Le délai permettant le relais de magnétisation est de 30 ms) : expansion de la région des protons des acides propanetricarboxyliques. Les flèches soulignent les corrélations permettant d'identifier les protons d'un même acide. Les signaux correspondants sont identifiés par le signe X, l'autre série de protons par le signe O.

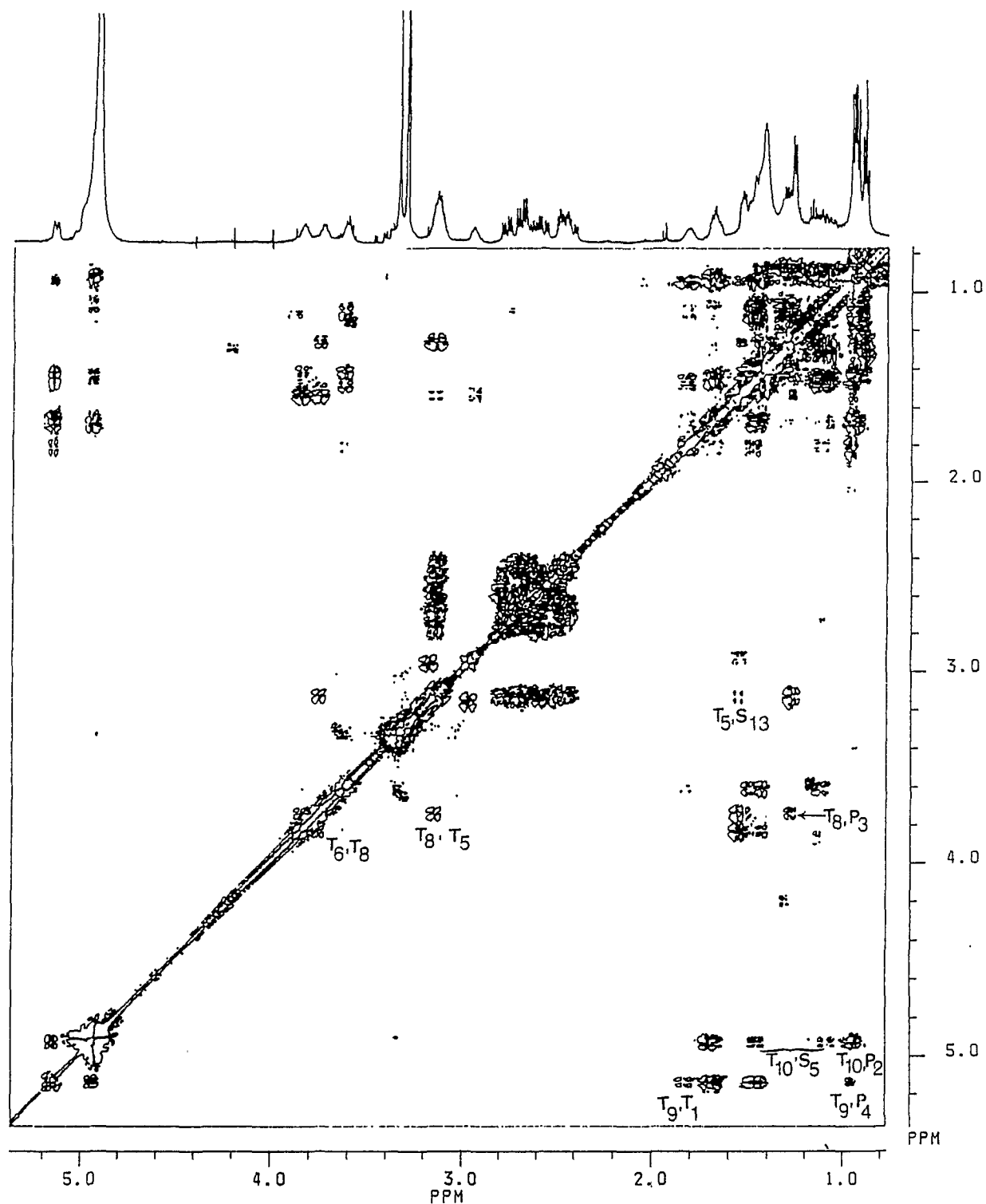


Figure 26 : RMN 2D de corrélation HOHAHA de la macrofusine en solution dans CD_3OD (impulsions ^1H 90° 33,5 μs , temps de transfert 66 ms, 32 acquisitions, résolution 4,4 Hz/pt). Sont repérées les corrélations des protons tertiaires qui n'étaient pas observées dans la carte COSY

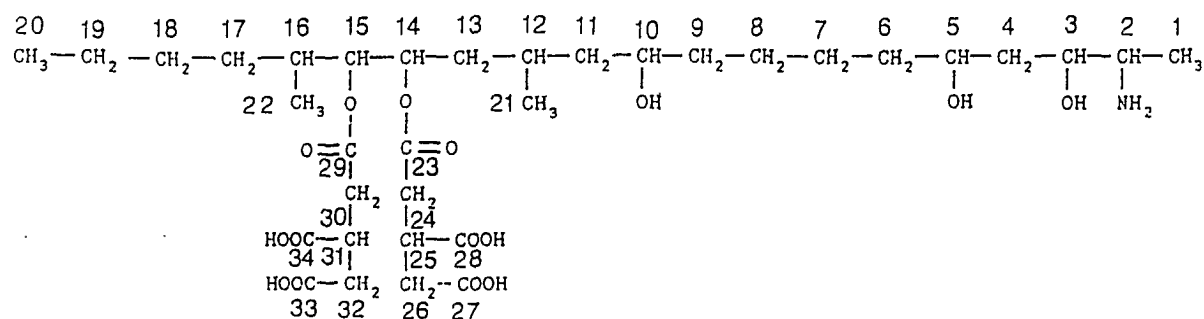
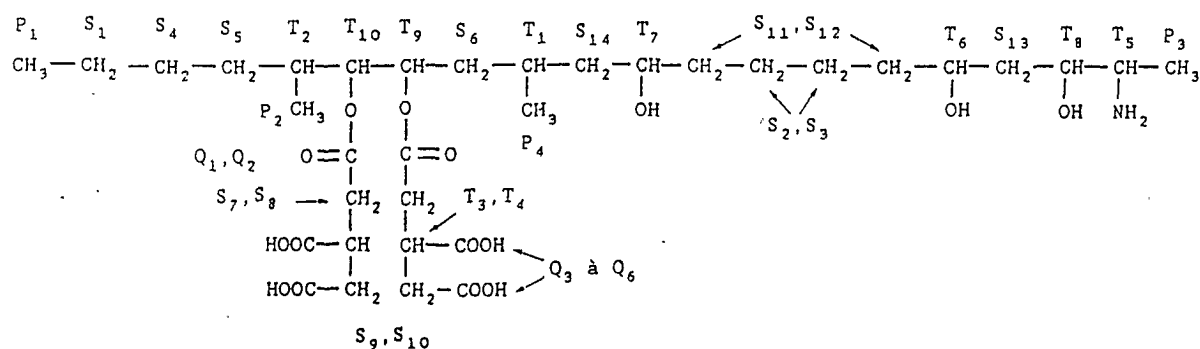
Avec un relais, sont observées les corrélations du proton T₁₀ (4,95 ppm) avec les protons du méthylène S₅ (1,44 et 1,07 ppm) et avec ceux du groupe méthyle P₂ (0,94 ppm) et symétriquement celles du proton T₉ (5,14 ppm) avec le proton tertiaire T₁ (1,81 ppm) et avec les protons du groupe méthyle P₄ (0,96 ppm).

Ainsi est confirmé le rattachement du site T₁₀ à la partie terminale purement hydrocarbure de la chaîne tandis que la jonction du fragment T₁-S₁₄-T₇ au site S₆ est établie.

Il reste alors uniquement quatre groupes méthylènes à situer. Ils doivent nécessairement occuper les positions 6 à 9 entre T₆ et T₇. La symétrie de l'environnement de ces sites se reflète dans les déplacements chimiques des carbones correspondants : les deux signaux les plus déblindés ont été attribués de manière non univoque à C₆ et C₉, les deux autres signaux à C₇ et C₈.

Les attributions des signaux des dérivés acétylés et méthoxylés ont été obtenus de manière similaire. Les résultats confirment totalement l'étude menée sur la macrofusine.

Les schémas suivants présentent la structure complète de la molécule, le premier reprenant la désignation provisoire des carbones et le second la numérotation classique :



La structure ainsi établie pour la macrofusine montre que cette molécule est identique à la fumonisine B₁ isolée en Afrique du Sud (138). Les données publiées pour cette dernière sont les déplacements chimiques des carbones 13 mesurés dans le DMSO. Les valeurs sont en bon accord avec celles de la présente étude à l'exception de la valeur proposée pour le carbone n° 13 (68,42 ppm au lieu de 36,58 ppm), probablement par suite d'une erreur matérielle.

1-2-3) Etat d'ionisation de la molécule en solution

Compte tenu de la présence des fonctions acides et de la fonction amine, il importait de préciser si la macrofusine existait dans les différents solvants sous forme non ionique ou sous forme zwitterion.

Dans un premier temps, les valeurs mesurées des déplacements chimiques des carbones 13 ont été comparées aux valeurs calculées en utilisant les incréments classiques pour les carbones d'une chaîne aliphatique (139) et pour les substituants (131). Les valeurs sont reportées dans le tableau 9. L'accord est excellent pour les carbones non fonctionnalisés et pour le carbone isolé C10 mais médiocre pour les carbones fonctionnalisés groupés. Ces écarts indiquent de nombreuses interactions intramoléculaires qui ne sont évidemment pas prises en compte dans la valeur des incréments.

Il n'est dans ces conditions pas possible de tirer une conclusion en ce qui concerne l'état d'ionisation éventuel de la molécule.

Par contre, l'examen des déplacements chimiques relevés pour les carbones 13 du sel d'ammonium montre que, si les signaux de la majorité des carbones de la chaîne subissent un faible déblindage (0,5 à 0,7 ppm), ceux des carbones C1 et C3 sont fortement déblindés (≈ 4 ppm).

Cette observation montre sans ambiguïté que l'on passe d'une forme NH_3^+ dans la macrofusine à la forme non chargée NH_2 dans le sel d'ammonium. La toxine existe donc dans le méthanol sous forme zwitterion. Il a été vérifié d'une manière similaire que cette forme est également présente dans l'eau.

L'élargissement des signaux des carbones des groupes carboxyliques est certainement en partie du à l'équilibre de protonation/déprotonation de ces groupes.

Dans le spectre des sels, cet élargissement n'est plus observé.

1-2-4) Phénomènes dynamiques

En dehors des interactions électrostatiques liées à la nature zwitterion de la molécule, la structure établie justifie la formation de liaisons hydrogènes intra et/ou intermoléculaires et les phénomènes dynamiques qui y sont associés. Les signaux particulièrement élargis sont ceux des carbonyles d'acide mais aussi, à un degré moindre, ceux des carbones en α des groupes carboxyliques C25, C26, C31 et C32 et ceux des carbones C2, C3, C5 et C10. L'acétylation, en faisant disparaître les protons mobiles et susceptibles de s'engager dans les liaisons hydrogène, permet

Tableau 9 : Etude de la macrofusine dans CD₃OD. Comparaison des valeurs mesurées et calculées des déplacements chimiques en RMN ¹³C. Mesure des temps de relaxation T1 (s).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
mesuré	15,98	53,7	70,26	41,73	68,36	39,12	26,60	26,76	38,96	69,78
calculé	13,86 (a)	54,65 (a)	73,40 (a)	41,46 (a)	64,96	37,96	23,96	23,96	38,21	68,27
T1 (s)	-	0,27	0,33	0,20	0,32	0,19	0,28	0,30	0,23	0,31
	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20
mesuré	44,40	26,84	36,58	72,80	78,58	34,76	32,94	29,53	23,80	14,4
calculé	44,91	22,62	37,91	74,58	87,16	33,52	32,66	29,71	22,90	13,86
T1 (s)	0,18	0,31	0,18	0,33	0,34	0,35	0,25	0,41	0,77	0,89
	C21	C22	C24,C30		C25,C31		C26,C32			
mesuré	20,75	15,90	36,90 37,14		39,67		37,69 37,93			
calculé	19,63	15,63	37,86 (b)		35,84 (b)		35,36 (b)			
T1 (s)	0,47	-	0,27		0,18		0,16			

a) Les valeurs sont calculées pour la forme NH₃⁺. Pour la forme NH₂, calculé : C1 17,86 C3 77,40

b) Les valeurs sont calculées pour la forme COOH. L'ionisation des quatre fonctions acides doit entraîner un déblindage de 1,5 ppm pour C24, C30 et 5,5 ppm pour C25, 31 et C26, 32. Statistiquement, l'ionisation d'un seul groupe acide doit entraîner un déblindage de ≈ 0,4 ppm pour C24, 30 et de ≈ 1,4 ppm pour C25, 31 et C26, 32.

l'obtention de spectres beaucoup mieux résolus. En revanche, la transformation des groupes carboxyliques en esters méthyliques semble favoriser les phénomènes dynamiques dans la partie initiale très fonctionnalisée de la molécule au point de rendre indiscernables un certains nombre de signaux (cf tableau 8 et figure 18).

Pour examiner plus finement ces phénomènes, les temps de relaxation longitudinale T_1 ont été mesurés pour les carbones protonés de la toxine par la méthode d'inversion retour. Dans leur ensemble, les valeurs mesurées sont faibles pour une molécule de cette dimension. Elles sont reportées dans le tableau 9.

Dans la partie fonctionnalisée de la molécule, y compris dans les résidus acides, tous les carbones secondaires d'une part, tous les carbones tertiaires d'autre part ont sensiblement les mêmes vitesses de relaxation longitudinale, les T_1 du second groupe étant comme attendu supérieurs aux T_1 du premier groupe. Cette homogénéité de valeurs caractérise habituellement des molécules dont le squelette rigide autorise une réorientation isotrope en solution. Dans le cas de la toxine, il est vraisemblable que les liaisons hydrogène et l'attraction électrostatique entre les groupes COO^- et NH_3^+ confèrent à cette partie de la molécule une forme moyenne relativement globulaire qui permet sa réorientation sensiblement isotrope. En ce qui concerne les carbones de la partie terminale de la chaîne, tout au contraire, le produit NT_1 (N nombre de protons liés à chaque carbone) augmente systématiquement et très notablement de C16 à C20. Cette augmentation montre l'existence de réorientations séquentielles de plus en plus rapides vers l'extrémité de la chaîne (140).

1-2-5) Complexation de cations métalliques

Les acides carboxyliques en solution dans les solvants polaires forment habituellement avec les sels de terres rares, praséodyme ou europium, des associations qui induisent des déplacements sélectifs des signaux RMN ^1H respectivement vers les bas champs et les hauts champs (141).

L'addition d'une solution de perchlorate de praséodyme à une solution de la toxine dans le méthanol provoque l'apparition d'un gel qui ne peut être étudié par RMN ^1H mais dont la formation est un bon accord avec les hypothèses formulées sur la forme de la molécule qui doit permettre des liaisons très fortes avec le cation métallique.

Si la toxine est mise en solution dans D_2O , l'addition du perchlorate d'euprium ne provoque pas la précipitation mais induit des déplacements significatifs pour les signaux des protons des résidus acides uniquement. La perte de résolution est assez importante sur l'ensemble du spectre.

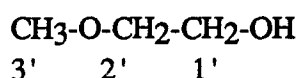
2) Analyse structurale des dérivés de la macrofusine

Deux dérivés de la macrofusine sont présents dans les cultures ensemencées par les macroconidies :

- le dérivé N acétylé est systématiquement présent en faible quantité à coté de la macrofusine. L'étude structurale de ce composé sera présentée chapitre H-1-1.

- un autre dérivé de la macrofusine a été obtenu à partir de l'une des cultures effectuées.

La seule modification correspond à la formation d'un ester à partir d'une des fonctions acides (C25 ou 31) avec l'alcool :



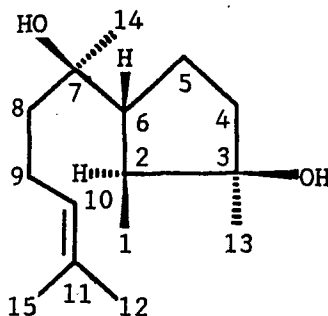
Les signaux caractéristiques des nouveaux sites 1', 2' et 3' apparaissent respectivement en RMN ^{13}C à 74,87 - 61,80 et 58,99 ppm et en RMN ^1H à 3,64 - 3,46 et 3,35 ppm.

Les déplacements chimiques dans la chaîne carbonée ne sont pas modifiés. L'élargissement des signaux des carbones porteurs des hydroxyles libres est important. Ce phénomène, encore plus accentué, avait été noté dans le cas de la macrofusine méthoxylée. Les signaux des carbones liés aux groupes carboxyliques sont également larges.

F2) PRODUITS ISOLES DE CULTURES MICROCONIDIALES

1) Analyse structurale de la micromoniline (142)

L'étude de ce composé par Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du carbone à une et deux dimensions nous a conduit à l'identifier au cyclonérodiol (143, 144, 145, 146, 147) précédemment isolé de *Gibberella fujikuroi*.



Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisés sur les spectromètres Bruker WM250 et AM 500 au laboratoire de Chimie Organique Structurale (UA 455) de l' Université Pierre et Marie Curie.

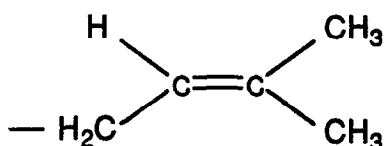
Ils ont été enregistrés en utilisant une solution dans le méthanol deutérié CD_3OD . Les déplacements chimiques et les attributions effectuées sont relevés dans le tableau 10.

1-1) RMN à une dimension

1-1-1) RMN ^1H

Le spectre RMN ^1H est présenté sur la figure 27.

Un multiplet isolé à 5,12 ppm est attribué à un proton éthylénique. La structure fine montre qu'il est couplé aux deux protons d'un groupe méthylène ($J : 7 \text{ Hz}$) et, en outre, aux protons de deux groupes méthyles ($J \approx 1 \text{ Hz}$) dont les signaux apparaissent faiblement dédoublés à 1,61 et 1,67 ppm. Ces observations, qui ont été confirmées par des irradiations sélectives, établissent la présence d'un groupe :



Le spectre comporte en outre deux singulets et un doublet correspondant à des groupes méthyles portés par des carbones quaternaires et un carbone tertiaire.

Les autres signaux, qui se recouvrent fortement, ne peuvent être directement analysés.

Si le spectre est enregistré en utilisant le diméthylsulfoxyde deutérié comme solvant, deux signaux singulets apparaissent à 3,80 et 3,85 ppm. Les protons correspondants sont échangeables avec D_2O . Ils doivent donc appartenir à deux groupes hydroxyles portés par des carbones quaternaires.

1-1-2) RMN ^{13}C

Les spectres RMN ^{13}C présentés sur la figure 28, le second étant enregistré avec J modulation des signaux, confirment l'existence :

- de la double liaison éthylénique trisubstituée (deux carbones éthyléniques dont un CH)
- de cinq groupes méthyles
- de deux carbones quaternaires aliphatiques dont les forts déplacements chimiques sont en accord avec le fait qu'ils portent les groupes hydroxyles.

Apparaissent en outre les signaux de six carbones aliphatiques dont quatre correspondent à des groupes méthylènes et deux à des carbones tertiaires.

Tableau 10 : Données de RMN ^1H et ^{13}C pour la micromoniline dans CD_3OD . $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^1\text{H}$ ppm par rapport au TMS; valeurs $\Delta \delta$ des déplacements induits par $\text{Eu}(\text{fod})_3$

Atome de carbone	$\delta^{13}\text{C}$	$T1_s$	$\delta^1\text{H}$	$\Delta \delta^1\text{H}(\text{a})$
1	15,45	0,6	1,01	0,78
2	45,11	0,23	1,59	0,92
3	81,82	2,3	-	-
4(e)	41,26	0,15	1,64(b)	1,0(b)
			1,49	0,75
5	25,01	0,14	1,78	0,83
			1,60(c)	0,82(c)
6	55,11	0,22	1,82	1,0
7	75,33	1,9	-	-
8(e)	41,88	0,14	1,43	0,67(d)
9	23,58	0,18	2,02	0,45(d)
10	125,82	0,55	5,12	-
11	131,64	4,0	-	-
12	26,06	0,8	1,67	-
13(f)	26,25	0,33	1,21	0,83
14(f)	24,79	0,27	1,12	0,67
15	17,87	2,5	1,61	-

(a) Déplacements induits mesurés dans CDCl_3 après addition de $\text{Eu}(\text{fod})_3$ normalisés par rapport à celui de H_6

(b) Syn OH

(c) Syn C7

(d) valeur moyenne : les protons géminés ne sont pas strictement équivalents

(e), (f) les attributions sont inverses de celle de Evans (146)

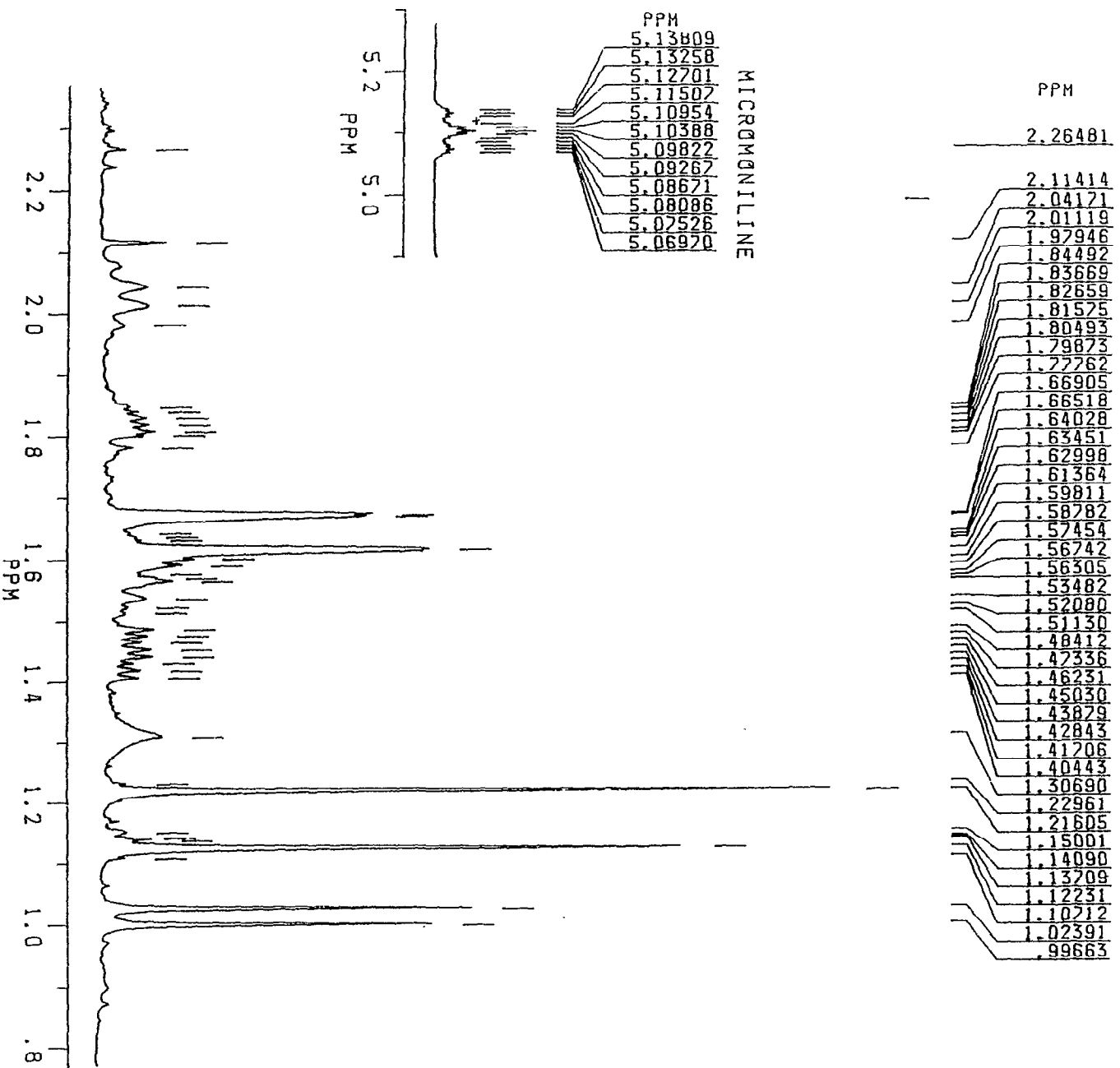


Figure 27 : Spectre RMN ^1H (250,13 MHz) de la micromoniline en solution dans CD_3OD (impulsion 30°, résolution 0,24 Hz/pt, 248 acquisitions)

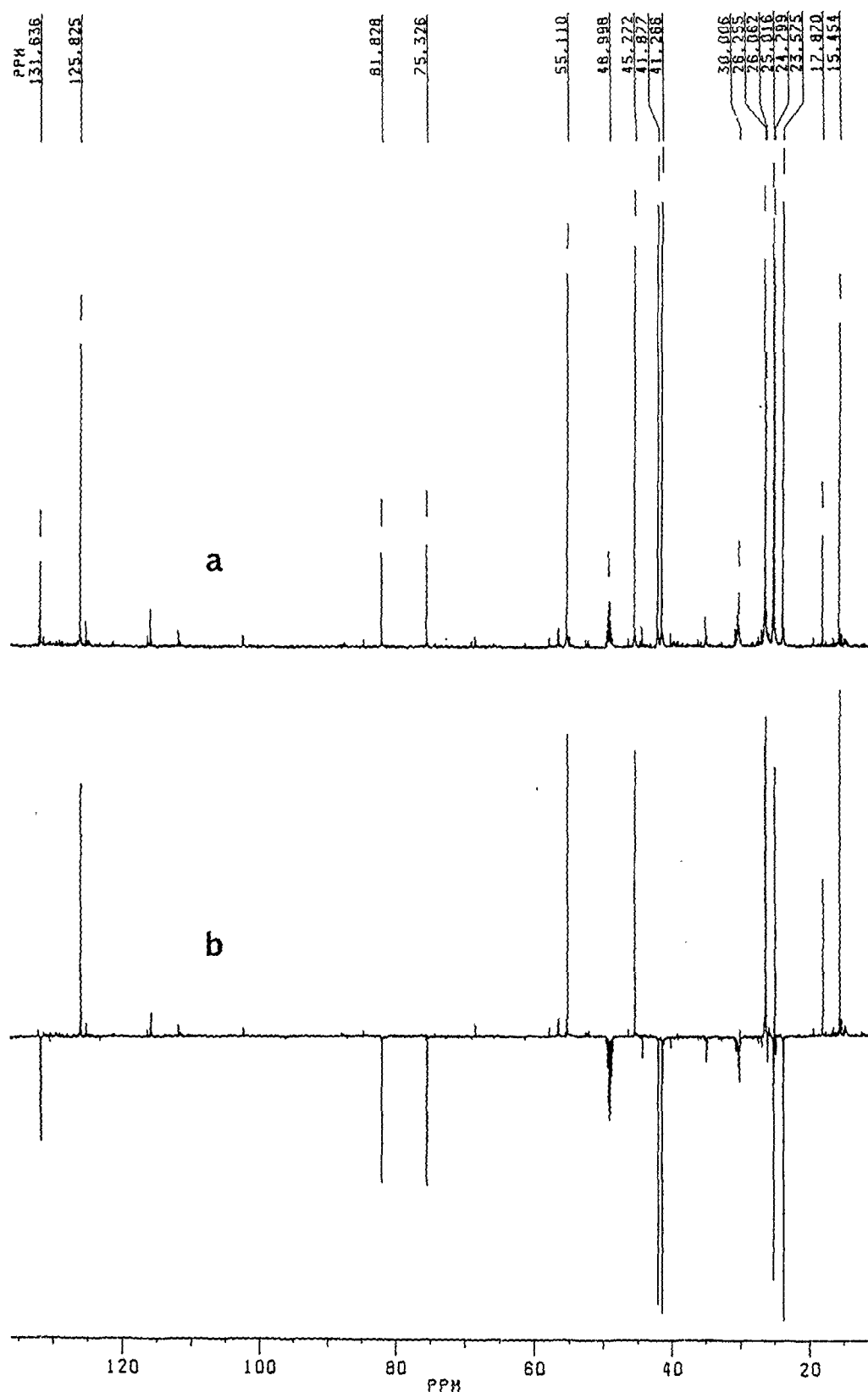


Figure 28 : Spectre RMN ^{13}C (125,76 Mhz) de la micromoniline en solution dans CD_3OD (résolution 1,79 Hz/pt, 324 acquisitions)

a) découplage total des protons

b) J modulation (0,0081) et découplage des protons CH_3 , $\text{CH} > 0$ CH_2 , $\text{Cq} < 0$

(impulsion 90° (4,5 μs), résolution 1,79 Hz/pt, 392 acquisitions)

1-2) RMN à deux dimensions

1-2-1) RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^{13}\text{C}$ (INADEQUATE)

La structure du squelette carboné a pu être établie par une expérience RMN 2D de corrélation $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^{13}\text{C}$ (INADEQUATE).

La figure 29 montre la carte obtenue en excluant les carbones éthyléniques (pour restreindre la gamme spectrale ce qui permet d'améliorer la résolution).

Compte tenu de la proximité des signaux de certains carbones, il a été systématiquement vérifié que les milieux des segments liant les signaux de chaque paire de carbones couplés ont des coordonnées satisfaisant à la relation $2F_2 = F_1$. Pour les paires C2, C6 et C7, C14 les fréquences double quantum coïncident fortuitement sans qu'aucune ambiguïté ne soit introduite. Partant du carbone le plus blindé, précédemment identifié comme un carbone primaire C1, l'enchaînement est établi de manière univoque de proche en proche. Les carbones C2 à C6 constituent un cycle à cinq chaînons avec les substitutions suivantes :

- des groupes méthyles en C2 et C3 (respectivement C1 et C13)
- un hydroxyle en C3 (ce carbone quaternaire est fortement déblindé et ne montre que trois connexions à des carbones)
- un substituant en C6 dont l'enchaînement peut être suivi de C7 à C9.

Ce dernier carbone, qui est un méthylène, est nécessairement lié au carbone éthylénique protoné.

Le carbone C7, quaternaire, porte un hydroxyle et un groupe méthyle (C14).

Il reste uniquement à attribuer de façon univoque les signaux des carbones des groupes méthyles 12 et 15. Sur la base des déplacements chimiques, le plus blindé doit être attribué au méthyle situé en position syn par rapport au méthylène (effet stérique). Cette attribution est confirmée par la mesure des temps de relaxation T1. Ce groupe méthyle qui ne peut avoir une conformation privilégiée de basse énergie se réoriente très rapidement autour de son axe et le temps de relaxation T1 du carbone est donc particulièrement long.

1-2-2) RMN 2D de corrélation hétéronucléaire $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$

Une expérience de corrélation hétéronucléaire $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$ présentée sur la figure 30 permet ensuite d'identifier les résonances des protons liés à chaque carbone.

Les positions relatives des groupes méthyles sur le cycle sont déduites d'expérience de NOE différence présentées sur la figure 31.

Les spectres étant enregistrés à partir d'une solution soigneusement dégazée dans le diméthylsulfoxyde, un effet Overhauser positif est observé sur le proton hydroxylique le plus blindé aussi bien lors de l'irradiation des protons du groupe méthyle 13 porté par le même carbone que le groupe hydroxyle, que lors de l'irradiation des protons du groupe méthyle 1. Le méthyle 1 et l'hydroxyle en 3 sont donc sur une même face du cycle.

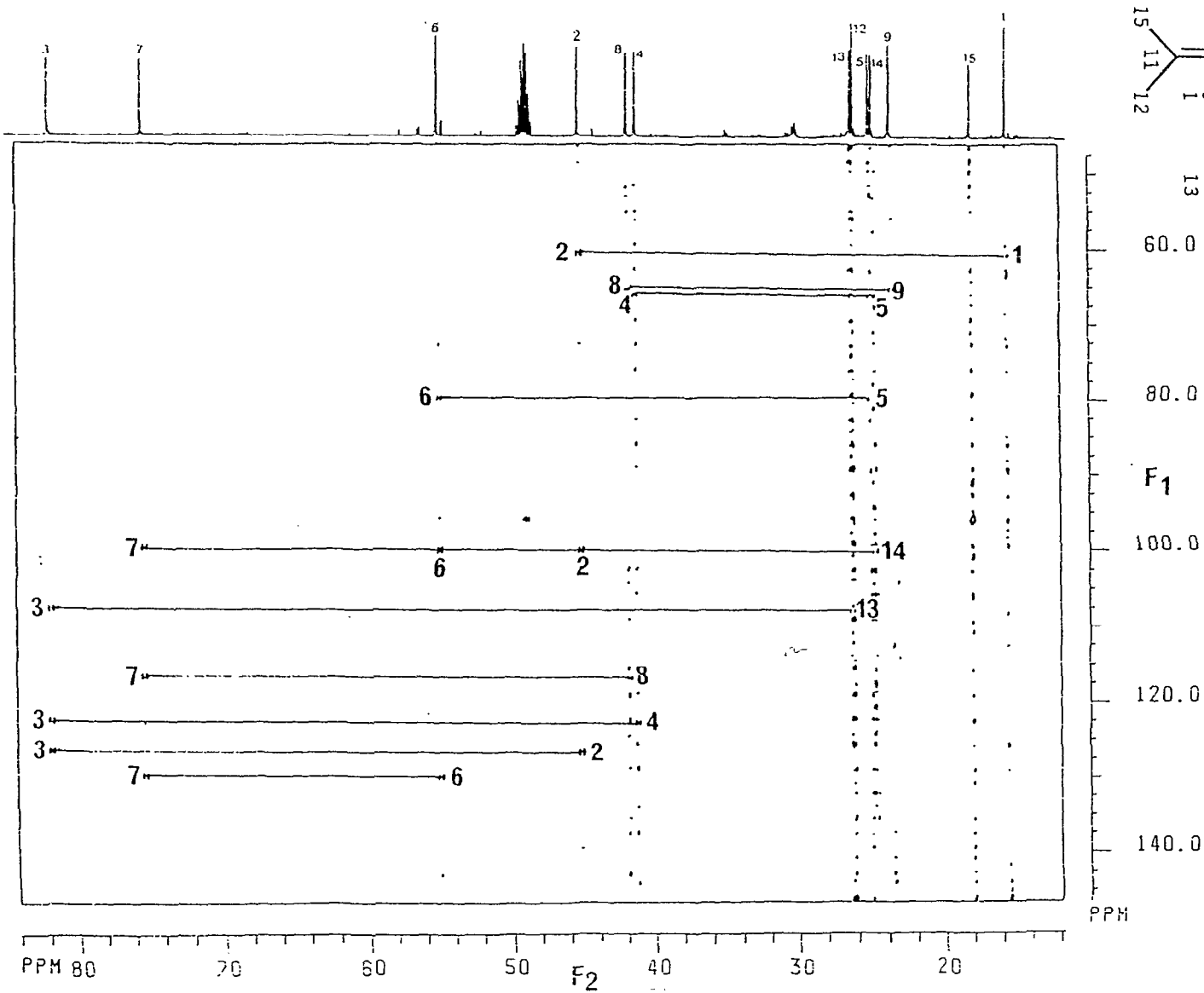


Figure 29 : RMN 2D INADEQUATE (125,76 MHz) de la micromoniline en solution dans CD₃OD (impulsion 90° (4,5 µs) et 125°, résolution 4,4 Hz/pt, 192 acquisitions, 256 expériences)

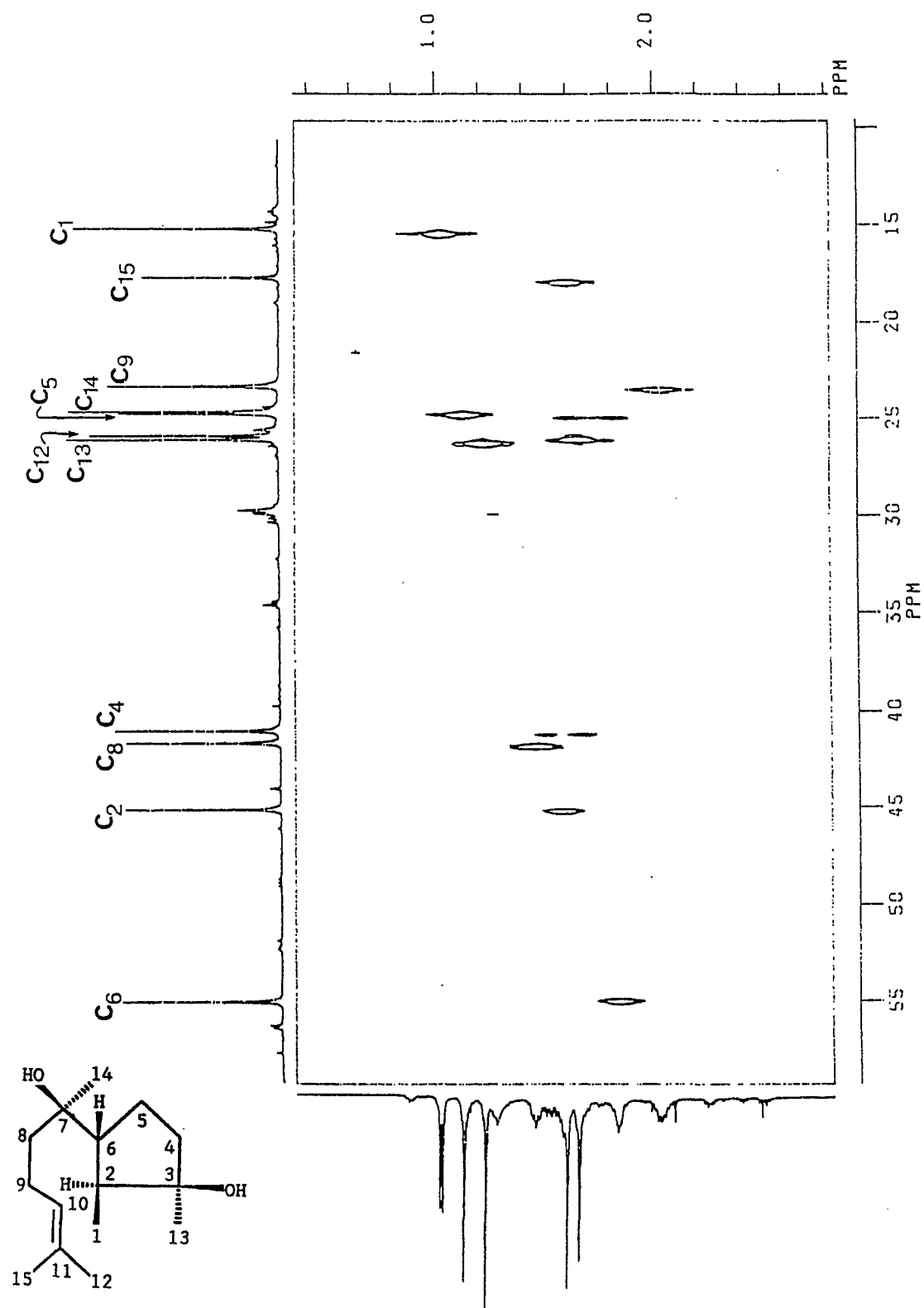


Figure 30 : RMN 2D de corrélation $\delta^1\text{H}$ $\delta^{13}\text{C}$ de la micromoniline en solution dans CD_3OD (impulsion 90° (^1H : 10,5 μs , ^{13}C : 4,1 μs), 180 acquisitions, 400 expériences, résolution ^1H : 4,9 Hz/pt ^{13}C : 12 Hz/pt)

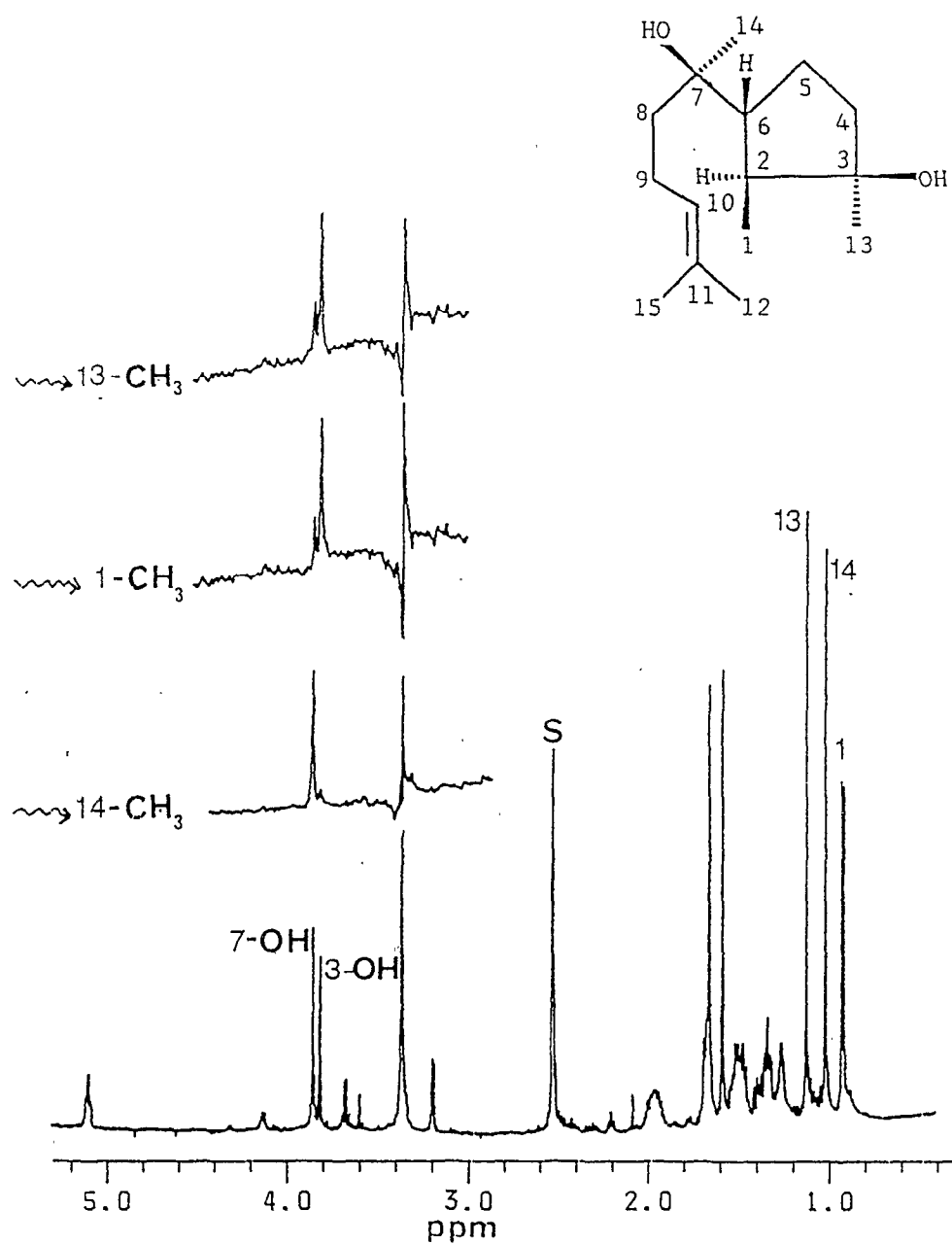


Figure 31 : Spectre RMN ^1H (500,13 MHz) de la micromoniline en solution dans le diméthylsulfoxyde deutérié (S = solvant). Effets Overhauser observés par différence lors de l'irradiation des groupes méthyles 1, 13, 14

Il a été vérifié qu'un effet Overhauser positif est observé sur le proton hydroxylique le plus déblindé lors de l'irradiation du méthyle 14.

En ce qui concerne la position de la chaîne latérale en C6, la valeur de la constante de couplage $J_{H2,H6}$ de 8 Hz, mesurée après avoir déplacé les signaux à l'aide d'un réactif de déplacement chimique $\text{Eu}(\text{fod})_3$, ne permet pas une conclusion sans équivoque. Par contre, l'analyse des valeurs relatives des déplacements induits sur chaque proton par le réactif $\text{Eu}(\text{fod})_3$ montre :

- d'une part une capacité de complexation similaire des deux hydroxyles,
- d'autre part des effets semblables sur les protons situés de chaque côté du cycle en particulier en C5.

Il est possible d'en conclure que les deux groupes complexant doivent être situés de part et d'autre du cycle.

Finalement, les signaux des protons géminés ont été attribués de la manière suivante :

- en position 4, le signal le plus déblindé qui est aussi le plus déplacé par le réactif $\text{Eu}(\text{fod})_3$ est attribué au proton syn par rapport à l'hydroxyle situé sur C3. Cette attribution est en bon accord avec les valeurs relatives des effets d'un groupe hydroxyle et d'un groupe méthyle sur les protons vicinaux dans un cycle à cinq chaînons (148),

- en position 5, la règle "du proton syn à haut champ" (148) a été utilisée pour attribuer la résonance de plus faible fréquence au proton syn par rapport à la chaîne latérale. Cette dernière attribution est compatible avec l'observation d'un signal intense à 1,8 ppm (H5 et H6) dans un spectre de NOE différence lors de l'irradiation du groupe méthyle 1.

Le pouvoir rotatoire de la toxine a été mesuré dans CDCl_3 ($c = 1,04$) : $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -21^\circ$.

L'ensemble des résultats montre que la toxine isolée de *F. moniliforme* Sheld. est identique au cyclonérodol.

Les techniques modernes de la RMN utilisées dans la présente étude ont permis de corriger certaines attributions dans le spectre de RMN ^{13}C et de présenter une analyse complète du spectre de RMN ^1H .

2) Analyse structurale des microfusines

Les espèces déjà identifiées dans les cultures ensemencées par les macroconidies sont retrouvées en faible quantité dans les cultures ensemencées par les microconidies.

D'autres composés très proches de la macrofusine sont également métabolisés. Ils possèdent systématiquement la même chaîne linéaire que la macrofusine avec tous ses groupes fonctionnels. Les

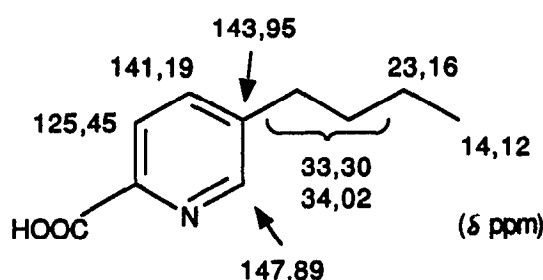
déplacements chimiques des carbones de la chaîne ne sont pas significativement modifiés par rapport à la macrofusine.

Le dérivé le plus abondant semble être un sel dans lequel la fonction amine est protonée par un acide inorganique (probablement l'acide nitrique). Les acides propanetricarboxyliques qui estérifient toujours les fonctions alcool en C14 et C15 ne participent plus à la réaction de protonation de la fonction amine ainsi que le montrent les observations suivantes :

- les signaux des carbones de ces acides et, en particulier, ceux des carbones des groupes carboxyliques sont très affinés (figure 32);
- les déplacements chimiques sont plus faibles que dans le cas de la macrofusine : C24,30 $\approx$ - 0,2 ppm; C25,31 $\approx$ - 0,4 ppm; C26,32 $\approx$ - 0,6 ppm; C27,28,33,34 $\approx$ - 0,8 à - 1 ppm;
- en RMN ^1H (figure 33), les signaux des protons de ces acides sont également légèrement déplacés par rapport à ceux de la macrofusine.

Les autres métabolites, toujours obtenus en mélange et en faibles quantités, diffèrent de la macrofusine par les acides qui estérifient les fonctions hydroxyles en C14 et C15. A coté des signaux correspondant aux carbones des acides propanetricarboxyliques, qui sont d'intensité relative faible par rapport aux carbones de la chaîne principale, de nouveaux signaux apparaissent entre 30 et 31,6 ppm (série de CH_2), à 40,2 ppm (CH) et même dans la région des carbones éthyléniques ($=\text{CH}_2$ à 116,6 ppm, CH au voisinage de 130 ppm, C quaternaire au voisinage de 142 ppm). Les signaux des carbones des groupes carboxyliques, toujours larges, apparaissent entre 170 et 177 ppm.

Dans l'une des cultures effectuées, l'acide fusarique était présent à coté de la macrofusine.



Le groupe amine de la macrofusine est alors aussi bien en interaction intermoléculaire avec le groupe carboxylique de l'acide fusarique qu'en interaction intramoléculaire avec les acides propanetricarboxyliques de la macrofusine ce qui conduit à des phénomènes d'échange intéressant les carbones des deux types d'acide.

Pour observer les signaux des carbones des acides propanetricarboxyliques, il est nécessaire de protoner le groupe amine par un acide fort DCl. Les cinq carbones du cycle pyridinique de l'acide fusarique sont alors observés.

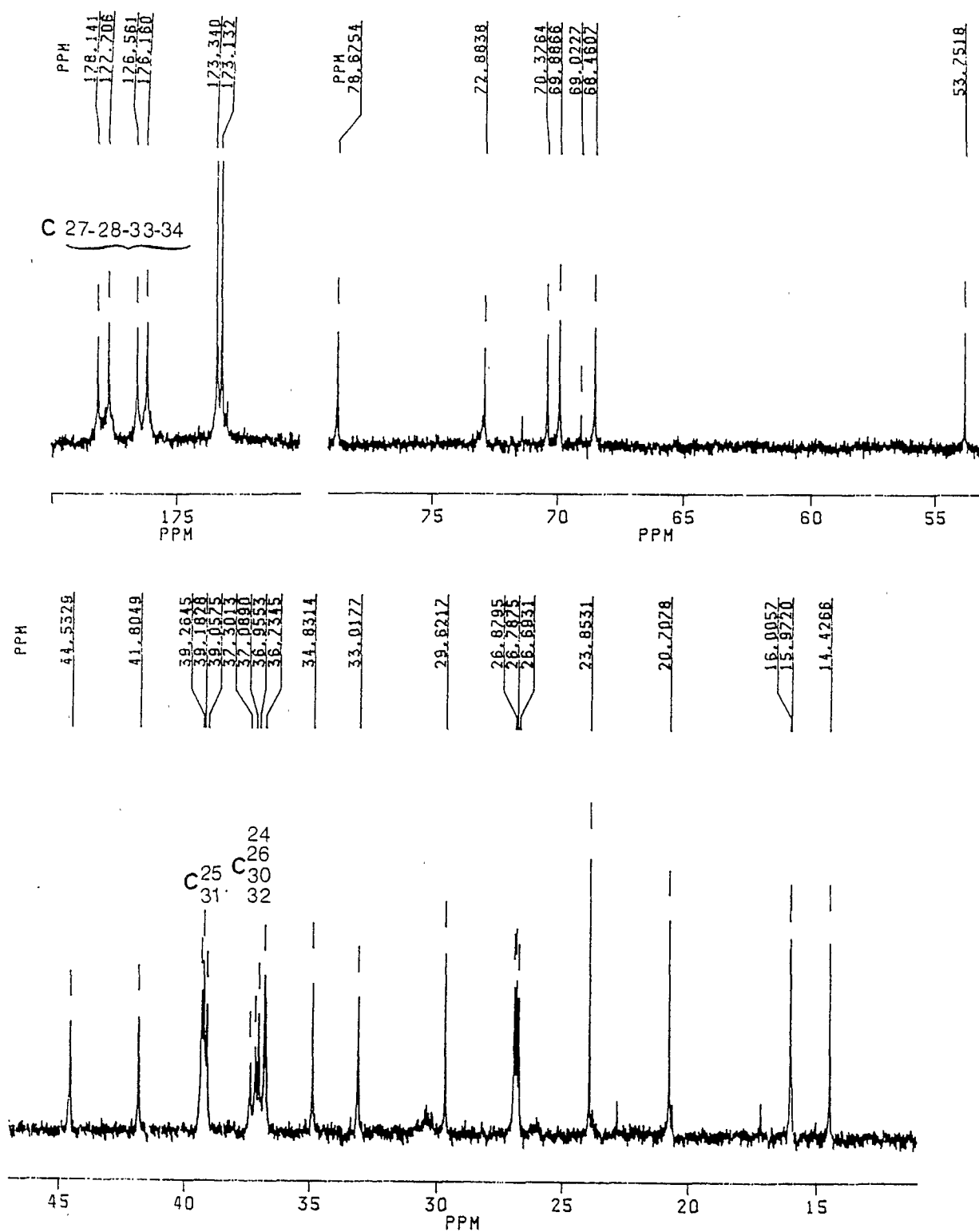


Figure 32 : Spectre RMN ^{13}C de la microfusine, sel minérale de la macrofusine. Les signaux des carbones notablement déplacés par rapport à la macrofusine sont indiqués

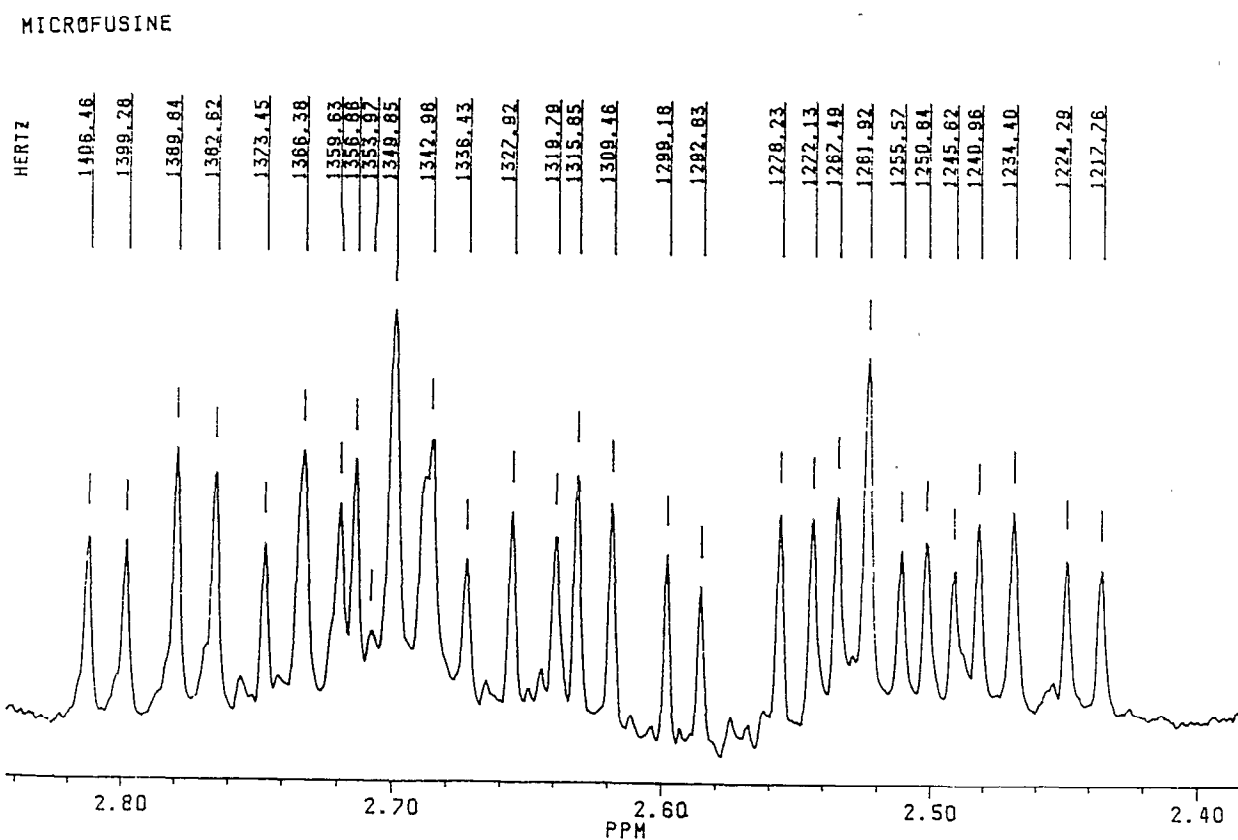
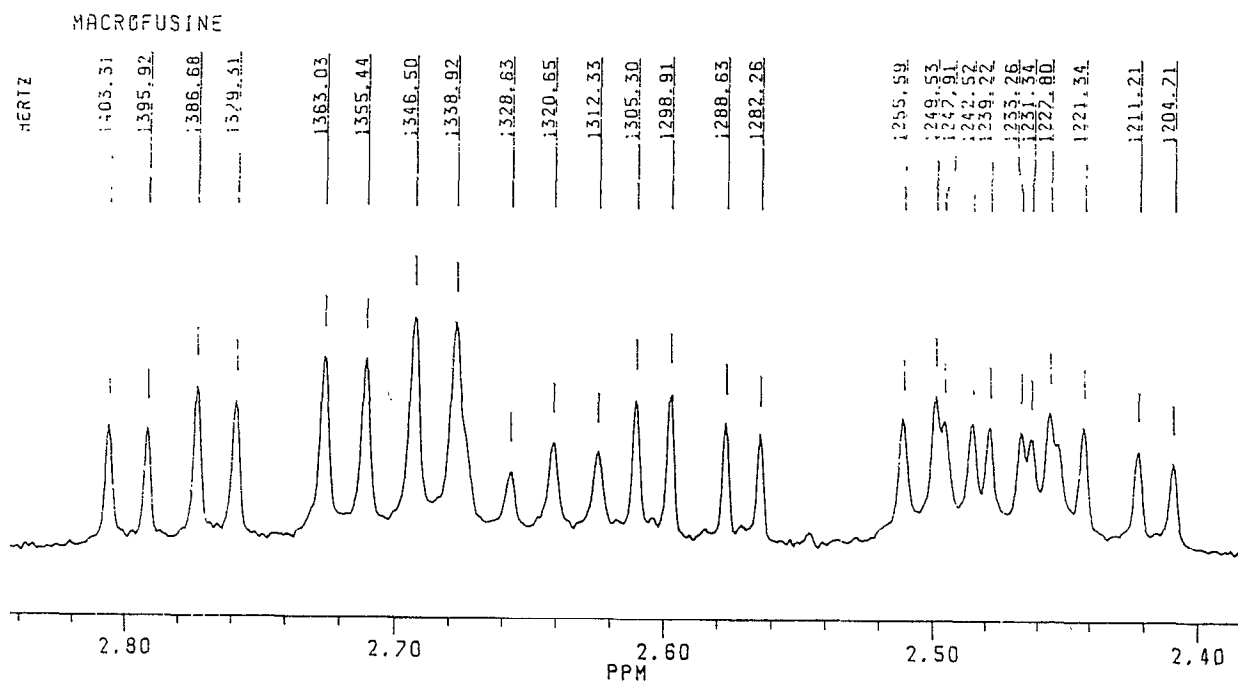


Figure 33 : Spectre RMN ^1H ; comparaison de la macrofusine et de la microfusine, sel minéral de la macrofusine. Expansion des signaux des protons des acides tricarboxyliques

F3) CONCLUSION

Les mycotoxines caractérisées dans la présente étude sont respectivement :

- pour les culturesensemencées avec des macroconidies, la **macrofusine** identifiée à la **fumonisine B₁**, le **dérivé N acétylé de la macrofusine** et un **ester dérivé de la macrofusine**;

- pour les culturesensemencées avec des microconidies, le **cyclonérodol** et des **substances très proches de la macrofusine**, les différences portant uniquement sur les acides qui estérifient les deux fonctions hydroxyles en C14 et C15 de la chaîne principale.

G) LA FUMONISINE B₁ (macrofusine) DANS LA PATHOGENIE DE LA LEM

G) LA FUMONISINE B₁ (macrofusine) DANS LA PATHOGENIE DE LA LEM

1) <u>Matériel et méthodes</u>	144
1-1) Cultures de <i>F. moniliforme</i>	144
1-2) Isolement de la fumonisine B ₁	144
1-3) Toxicologie chez le cheval	144
1-3-1) Administration par voie orale	144
1-3-2) Administration par voie intraveineuse	144
2) <u>Résultats</u>	145
2-1) Expérimentations rats	145
2-2) Expérimentation équine par voie orale	145
2-3) Expérimentation équine par voie intraveineuse	145
2-3-1) Observations cliniques	145
2-3-2) Pathologie chimique	145
2-3-3) Examen macroscopique	147
2-3-4) Etudes histo-pathologiques	147
3) <u>Discussion</u>	147
4) <u>Conclusion</u>	148

L'implication de la fumonisine B₁ dans la pathogénie de la LEM a été recherchée (149).

1) Matériel et méthodes

1-1) Cultures de *F. moniliforme*.

La souche 68R de *F. moniliforme*, dont l'extrait aqueux a induit la LEM chez un cheval, est utilisée dans toutes les expérimentations. Le maïs artificiellement contaminé par des macroconidies de cette souche est cultivée selon la méthode précédemment décrite (chap. C-3).

1-2) Isolement de la fumonisine B₁.

La fumonisine B₁ est purifiée à partir d'un extrait aqueux d'une culture sur maïs de *F. moniliforme* (chap. D-2-1). Le degré de pureté de la toxine est estimé par chromatographies sur couche mince et spectres de Résonance Magnétique Nucléaire proton et carbone et par sa toxicité sur rats.

1-3) Toxicologie chez le cheval.

1-3-1) Administration par voie orale

Une jument de 11 ans, pesant 340 kg est vermifugée, installée dans un box et nourrie quotidiennement avec du fourrage vert complété par 1 kg d'aliments complets pour chevaux. La fumonisine B₁, lyophilisée, est dissoute dans de l'eau distillée et administrée par voie orale à l'aide d'une seringue. Des doses journalières de 0,88 mg de toxine/kg de poids vif sont utilisées pendant 17 jours puis de 1,76 mg/kg pendant 8 jours et enfin de 3,5 mg/kg pour le dernier jour (26^{ème} jour). Un suivi clinique est effectué quotidiennement. Les paramètres hématologiques classiques et biochimiques sériques (urée, créatinine, protéines totales, aspartate amino-transférase (ASAT), alanine amino-transférase (ALAT), phosphatases alcalines (ALP), glutamyl-transférase (GGT), créatine phosphokinase (CPK), bilirubine totale, libre et conjuguée, temps de Quick) sont mesurés 3 fois par semaine.

1-3-2) Administration par voie intraveineuse

Après un repos de 6 mois, la même jument reçoit quotidiennement par voie intraveineuse 0,1 mg de fumonisine B₁/kg de poids vif, soit des doses de 34 mg de toxine dissoutes dans 10 ml de sérum physiologique, stérilisées sur filtre Millipore 0,22 µm. Un suivi clinique est effectué 3 fois par jour, des prélèvements sanguins sont pratiqués quotidiennement pour les analyses hématologiques et biochimiques. L'animal est autopsié immédiatement après son euthanasie par administration de pentobarbital sodique (Doléthel ND) par voie intraveineuse. Les différents organes sont prélevés et fixés pour une étude histopathologique. Huit coupes sont pratiquées sur le cerveau et deux sur le cervelet pour rechercher des signes macroscopiques et microscopiques de LEM.

2) Résultats

2-1) Expérimentation rats

Le lot de fumonisine B₁ utilisé dans les différentes expériences provoque la mort des rats après administration de 3 doses successives de 12 mg (400 mg/kg de poids vif).

2-2) Expérimentation équine par voie orale

Cette expérimentation a été arrêtée après 26 jours de traitement. Un total de 11,1 g de fumonisine B₁ a été administré à la jument ce qui correspond, selon les rendements que nous avons pu constater, à 22,2 kg de maïs fusarien. Les observations cliniques et les résultats des analyses sanguines ne révèlent aucune modification notable.

2-3) Expérimentation équine par voie intraveineuse.

Cette seconde expérimentation sur le même cheval s'est poursuivie jusqu'à l'euthanasie au 18^{ème} jour. La fumonisine B₁ a été administrée à raison de 16 doses de 0,1 mg/kg et de 2 doubles doses les deux derniers jours, soit un total de 680 mg équivalent à 1,36 kg de maïs artificiellement contaminé.

2-3-1) Observations cliniques

Sur le plan clinique, nous avons pu noter des signes de subictère dès J5 qui restèrent ensuite stationnaires. Une fonte musculaire notable au niveau des régions crurales s'observe bilatéralement dès J12 puis s'amplifie jusqu'au sacrifice. Une raideur de l'arrière-train provoque rapidement une démarche particulière (extra-déviations des postérieurs). A J14, la jument refuse d'avancer, et montre des signes d'agressivité. Les trois derniers jours, la parésie des postérieurs augmente; l'animal devient apathique, se tient la tête basse avec les postérieurs campés sous le corps, en se balançant lentement latéralement. A J17, la jument est trouvée couchée, son extrême faiblesse ne lui permettant pas de se redresser; l'animal est euthanasié puis autopsié.

2-3-2) Pathologie chimique

Les résultats des analyses biochimiques sériques et de l'hématologie sont répertoriés dans le tableau 11. Ils sont en accord avec ceux décrits par d'autres auteurs (36, 40). Les cinétiques ascendantes, observées jusqu'à J12 pour les paramètres sériques ASAT, ALAT et Bilirubine totale, sont suivies d'une décroissance progressive et sont le reflet d'une affection hépatique modérée (les valeurs des ALAT restant dans les limites de la normale), compensée progressivement.

Les ALP, présentes principalement dans les cellules osseuses et musculaires, ainsi que les gamma GT, localisées essentiellement dans les cellules hépatiques et musculaires, montrent une augmentation régulière jusqu'au sacrifice. Le parallélisme existant entre ces deux cinétiques, ainsi que

Normes		Unités	J0	J1	J2	J3	J4	J6	J8	J9	J10
2 - 6	Urée	mmol/l	7,4		7,6		5,3	4,5		4,5	4,3
140 - 200	Créatinine	μmol/l	111,3		114		115,2	110,2		156,2	127,8
50 - 100	Protéines tot.	g/l	69,7				72	80,8		89,3	
100 - 300	ASAT (SGOT)	UI/l	155		177	177	179	258	403	930	1535
1 - 100	ALAT (SGPT)	UI/l	6	5	9	5	6	7	12	26	33
30 - 200	ALP (Phos. al.)	UI/l	115		122	121	127	166	200	262	363
5 - 60	GT (GGT)	UI/l	9		10	9	11	13	17	24	40
40 - 200	CPK	UI/l	75	146	153		162	147		159	
10 - 80	Bilirubine tot.	μmol/l	12,7		17,3	19,4	19,6	41,6	47,4	80,9	98,2
9 - 73	Bilirubine libre	μmol/l	7,7		12,4	13,8	13,7	29,4	31,6	47,4	70,7
1 - 7	Bilirubine conj.	μmol/l	5		4,9	5,6	5,9	12,2	15,8	33,5	27,5
18 - 40	Albumine	g/l	28				29	31		30	
0,6 - 1,6	Phosphore	mmol/l	1,23				1,61	1,43		0,96	
2,8 - 3,4	Calcium	mmol/l	2,9				2,9	2,4		2,4	

Normes		Unités	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18
2 - 6	Urée	mmol/l								4,3
140 - 200	Créatinine	μmol/l	117,8	130,6	110,1	143,1	125,3			116
50 - 100	Protéines tot.	g/l		81,8						80
100 - 300	ASAT (SGOT)	UI/l	1770	1990	1835	1635	1430	1265	1100	1010
1 - 100	ALAT (SGPT)	UI/l	39	35	27	21	22	19	14	12
30 - 200	ALP (Phos. al.)	UI/l		567		615	558	614	582	550
5 - 60	GT (GGT)	UI/l		45		45				50
40 - 200	CPK	UI/l		153		113	101	113	88	150
10 - 80	Bilirubine tot.	μmol/l	128,7	137,7		124,1		89,2	95,6	103
9 - 73	Bilirubine libre	μmol/l	98,9	109,3		98,9		64	78	80,6
1 - 7	Bilirubine conj.	μmol/l	29,8	28,4		25,2		25,2	17,6	22,4
18 - 40	Albumine	g/l		29						27
0,6 - 1,6	Phosphore	mmol/l		0,85						1,12
2,8 - 3,4	Calcium	mmol/l		2,6						2,5

Tableau 11 : Biochimie sanguine d'un cheval traité par injection intraveineuse de fumonisine B1

l'élévation extrêmement forte des ALP semblent mettre en évidence une cytolysé des fibres musculaires. Ces résultats sont à corrélés avec la perte de poids observée au cours de l'expérimentation (60 kg soit 17% du poids vif) et la fonte musculaire particulièrement marquée au niveau des cuisses.

2-3-3) Examen macroscopique

L'examen macroscopique, au cours de l'autopsie, n'a permis d'observer que des lésions bénignes sur les principaux organes, hormis dans le système nerveux central. Le foie a une coloration brun verdâtre; de petits foyers de fibroses et de périhépatite sont visibles. Les méninges cérébrales sont entourées d'un liquide clair qui dénote la présence d'un œdème. Les coupes transversales de l'encéphale montrent des plages de coloration jaune distribuées de façon irrégulière et bilatérale, des amincissements du cortex cérébral ainsi que de petites hémorragies dans la substance grise. Le cervelet et le bulbe rachidien ne montre pas de lésion tandis que la moelle épinière est ponctuée de microhémorragies sur les sections transversales pratiquées (1ère cervicale, 1ère thoracique, 1ère lombaire).

2-3-4) Etudes histo-pathologiques

L'étude histopathologique du foie montre des lésions d'hépatite subaigüe discrète associée à une stase vasculaire. Au niveau du cerveau et de la moelle épinière, les lésions prédominantes observées comportent des plages d'œdème, des hémorragies périvasculaires, des foyers de gliose astrocytaire diffuse, disséminés et associés à des atypies des cellules gliales et à des foyers de spongieuse non systématisés. Ces lésions et la présence de microgranules éosinophiles sont compatibles avec un processus de démyélinisation comme le suggèrent Marasas et coll. (40), mais on ne peut l'affirmer formellement dans notre cas, d'autant plus qu'aucun corps granulo-graisseux (fractions lipidiques intramacrophagiques PAS+, secondaires à la dégradation de la myéline) n'a été observé. Ces lésions peuvent être soit la traduction morphologique d'une action directe de la toxine sur le tissu nerveux soit celle de troubles vasculaires.

3) Discussion

Cette expérimentation met en évidence trois atteintes principales : hépatique, musculaire et nerveuse.

Aux doses administrées, la fumonisine B₁ entraîne une hépatotoxicité modérée et réversible, phénomène également observé lors des expérimentations sur rats.

La fonte musculaire, qui n'a jamais été signalée dans la littérature, ne doit pas être un symptôme spécifique de cette toxicose bien qu'un tel phénomène ait été aussi mis en évidence chez les rats. Il est vraisemblable qu'elle est secondaire aux atteintes du système nerveux central constatées.

Les résultats de ces deux expérimentations sont réunis dans les tableaux 12 et 13 avec les données de nos expériences précédentes et celles effectuées par Marasas et coll. (40).

Dans notre expérimentation, la quantité de toxine extraite d'une culture de maïs est deux fois plus faible que celle donnée par Marasas et coll.. Cette différence d'un facteur 2 se retrouve au niveau de deux expérimentations ayant induit des symptômes nerveux et hépatiques : d'une part l'administration par intubation stomacale de 6,3 kg de maïs fusarien par Marasas et coll. d'autre part l'administration d'un extrait aqueux équivalent à 14,7 kg de maïs fusarien par notre équipe.

La quantité de maïs équivalente qui a été nécessaire pour obtenir une LEM aiguë est, chez Marasas et coll. de 2,9 kg par voie orale et de 0,276 kg par injection intraveineuse de fumonisine B₁.

De notre côté, les expérimentations sur un même cheval (ce qui élimine la variabilité individuelle qui est toujours possible dans de telles études), ne nous ont pas permis d'induire la LEM, ni d'obtenir de symptômes hépatiques, en administrant par voie orale une quantité totale de toxine pure 16 fois supérieure à celle qui a été suffisante pour obtenir, par voie intraveineuse, une affection mortelle.

4) Conclusion

Dans les deux reproductions expérimentales de la LEM obtenues en Nouvelle-Calédonie, avec la même souche fusarienne, aucun des deux chevaux (l'un mort spontanément, l'autre euthanasié) n'a révélé de lésion de nécrose de la substance blanche. Ce fait peut être imputé aux doses administrées, à la sensibilité individuelle des deux sujets d'expérience ou au délai écoulé entre l'atteinte nerveuse centrale et la mort des animaux. Les lésions microscopiques du système nerveux central observées dans les deux cas sont cependant comparables.

Les différents résultats mettent en évidence que la fumonisine B₁ joue un rôle dans la pathogénie de la leucoencéphalomalacie équine, en particulier par son action hépatotoxique à fortes doses sur une courte période et par son action sur le système nerveux à des doses plus faibles mais plus nombreuses. Ils montrent aussi que la fumonisine B₁ ne peut être tenue comme seule molécule responsable de cette toxicose et qu'elle doit être nécessairement associée à un (ou plusieurs) autre(s) facteur(s) existant dans l'extrait aqueux d'une culture de maïs contaminé par *Fusarium moniliforme* et permettant, par exemple, son assimilation par les voies digestives.

Cette hypothèse peut être rapprochée de celle que nous avons formulée précédemment, soit la présence de deux complexes toxiques de différents poids moléculaires.

La micromoniline, par son action sur le canal sodium, ou le composé agissant sur le canal potassium sont peut être aussi impliqués dans cette toxicose.

Tableau 12 : Toxicité chez le cheval de cultures de *F. moniliforme* sur maïs.

AGE, POIDS SEXE	EXPERIMENTATIONS	SYMPTOMES	REF
15 ans, 425 kg jument	intub. stom., 2,5 g/kg pdt 5 j + le 7 èmej Tot : 6,375 kg de maïs artificiellement contaminé par <i>F. moniliforme</i>	euth. 11ème j, apathie, inappétence, ictère et constipation <u>bioch.</u> : augmentation de J7 à J11, bilirubine totale : 163 ASAT : 2235 , GGT : 64 , LDH : 2685 atteinte hépatique sévère, léger œdème du cerveau	(40)
15 ans, 385 kg jument	intub. stom., 1,25 g/kg pdt 5 j + le 7 ème j. Tot. : 2,902 kg de maïs artificiellement contaminé par <i>F. moniliforme</i>	euth. le 12ème j., 1 h après les premiers signes, légère nervosité, parésie de la lèvre inf., ataxie locomotrice <u>Bioch.</u> : ASAT : 340 de J8 à J12; GGT : 22 de J9 à J12; LDH : 1088 à J10 légère atteinte hépatique, œdème modéré du cerveau	"
14 ans, 320 kg jument	intub. stom., extrait aqueux de maïs artificiellement contaminé 4 doses équiv. 1,5 kg, 2 à 1 kg et 9 à 0,75 kg Tot. : 14,75 kg	ictère au 11ème j., tachycardie et légers signes nerveux au 13ème j. Trouvée morte au 15ème j <u>bioch.</u> : augmentation CPK : 394 ; ASAT : 1847; ALP : 432; GGT : 60,8; bilirubine tot : 177, conj. : 22,8 atteintes rénale, hépatique, cardiaque et digestive, diagnostic LEM	(122)

ASAT (SGOT) : aspartate amino-transférase (transaminase glutamique oxalo-acétique), > 100-300 < UI/L
 ALP : Phosphatases alcalines > 30-200 < UI/L; CPK : créatine phosphokinase > 100-200 < UI/L
 LDH : lactate déshydrogénase > 162-412 < UI/L; GGT : gamma glutamyltransférase > 5-60 < UI/L
 Bilirubine totale > 10-80 < mol/L; Bilirubine conjuguée > 1-7 < mol/L

Tableau 13 : Toxicité chez le cheval de la fumonisine B₁

AGE, POIDS SEXE	EXPERIMENTATIONS	SYMPTOMES	REF
15 ans, 315 kg jument	injection intraveineuse de fumonisine B ₁ 0,125 mg/kg pv pdt 5 j + le 7 ^{ème} + le 9 ^{ème} j Tot. : 276 mg équivalent à 0,276 kg rendement fumonisine B ₁ estimé à 1 g/kg	nervosité suivie d'apathie, refus marcher, incoordination, parésie de la lèvre inf. et de la langue, dyspnée; euth. le 10 ^{ème} j, 2,25 j après l'apparition des symptômes; <u>bioch.</u> : légère augmentation ASAT (229) et GGT (22); lésions du SNC bilatérales, LEM au stade initial	(40)
11 ans, 340 kg jument	administration par voie orale de fumonisine B ₁ 0,88 mg/kg pv pdt 17 j, 1,76/kg pv pdt 8 j et 3,52 mg/kg pv pdt 1 j Tot. : 11,1 g équivalent à 22,2 kg injection intraveineuse de fumonisine B ₁ 0,1 mg/kg pv pdt 17 j et 0,2 mg/kg pv pdt 2 j Tot. : 680 mg équivalent à 1,36 kg rendement fumonisine B ₁ estimé à 0,5 g/kg	0 <u>bioch.</u> : très légère augmentation des CPK fonte musculaire au niveau des cuisses, parésie postérieure; Julie tombe le 18 ^{ème} j, euth. 3 h après; <u>bioch.</u> : ASAT : J0 : 155; J12 : 1990; J17 : 1015; ALAT : J0 : 6, J12 : 39, J17 : 14; bilirubine tot. : J0 : 12,7; J12 : 137,7; J17 : 103; ALP augm. jusqu'à 615, GGT augm. jusqu'à 50; œdème du cerveau, LEM au stade initial	(149) (149)

ASAT (SGOT) : aspartate amino-transférase (transaminase glutamique oxalo-acétique), > 100,300 < UI/L

ALP : Phosphatases alcalines > 30-200 < UI/L; Bilirubine totale > 10-80 < mol/L

GGT : gamma glutamyl-transférase > 5-60 < UI/L;

ALAT (SGPT) : alanine amino-transférase (transaminase glutamique pyruvique) > 1-100 < UI/L

H) LA FUMONISINE A₁ DANS LA PATHOGENIE DE LA LEM

H) LA FUMONISINE A₁ DANS LA PATHOGENIE DE LA LEM

1) <u>Matériel et méthodes</u>	152
1-1) Transformation de la fumonisine B ₁ en fumonisine A ₁	152
1-1-1) Essais d'acétylation sélective de l'amine	152
1-1-2) Préparation de la toxine	153
1-2) Expérimentation équine	153
1-3) Pathologie chimique	153
2) <u>Résultats et discussion</u>	153
3) <u>Conclusion</u>	156

Parmi les hypothèses susceptibles d'expliquer l'innocuité de la fumonisine B₁ administrée par voie orale, nous avons envisagé le fait que cette molécule existe en milieu aqueux sous forme zwitterion et se trouve certainement sous forme ionisée NH₃⁺ au pH acide de l'estomac. Une diffusion difficile à travers les membranes cellulaires empêcherait son assimilation.

Le dérivé N acétylé (fumonisine A₁) qui est toujours présent (aussi bien dans les cultures microconidiales que macroconidiales) et qui a aussi été isolé par les sud africains (138) pourrait être l'agent responsable de la LEM. Avec sa fonction amide, cette molécule serait moins polaire dans l'estomac du cheval et le caractère liposoluble lui permettrait de diffuser à travers les parois stomacales. Une fois dans le sang, les amidases solubles dans le plasma ou dans le foie peuvent retransformer la fumonisine A₁ en fumonisine B₁.

Pour vérifier cette hypothèse, la fumonisine A₁ a été administrée par voie orale à un cheval (150). Afin d'éviter de mener cette expérience à un terme fatal pour l'animal, nous avons seulement cherché à déceler la présence de la toxine dans le sang en suivant les paramètres enzymatiques. En effet, un métabolite absorbé par le tractus digestif emprunte la veine porte et passe par le foie (phénomène dit de premier passage hépatique); son action sur les cellules de cet organe doit donc pouvoir être enregistrée.

1) Matériel et méthodes

Les quantités de fumonisine A₁ présentes dans les cultures effectuées étant trop faibles pour une expérimentation, nous avons du préparer la fumonisine A₁ à partir de la fumonisine B₁.

1-1) Transformation de la fumonisine B₁ en fumonisine A₁

1-1-1) Essais d'acétylation sélective de l'amine

***avec un thioester**

La fumonisine B₁ est mélangée mole à mole avec du méthylthioacétate dans l'alcool. Le mélange réactionnel est maintenu pendant 24 h à froid, à 40 °C puis en chauffant à reflux et est suivie par chromatographie sur couche mince. Aucune modification n'est enregistrée.

***par l'anhydride acétique dans le méthanol**

On obtient l'amide sans toucher aux hydroxyles mais les acides sont transformés en esters méthyliques.

Le spectre de RMN ¹³C n'est pas significativement différent de celui de la fumonisine A₁ sauf en ce qui concerne les carbones des acides propanetricarboxyliques dont les signaux apparaissent aux mêmes fréquences que dans la fumonisine B₁ méthoxylée.

***par l'anhydride acétique en milieu basique**

A environ 10 °C, 95 mg de fumonisine B₁ sont dissous dans 1,5 ml d'H₂O auxquels sont ajoutés 26,3 mg de NaOH solide. Après agitation, la solution devient limpide. On ajoute ensuite 32 mg d'anhydride acétique. La solution est maintenue 1 heure au froid et la réaction est stoppée par adjonction de 0,038 ml d'acide acétique. La solution qui a un pH voisin de 3, est évaporée sous pression réduite.

En chromatographie de phase inverse sur couche mince, avec le mélange éluant MeOH/H₂O 7:3, le produit obtenu à un R_f de 0,6 et le produit de départ de 0,4.

La structure de la fumonisine A₁ est vérifiée par RMN ¹H et ¹³C dans CD₃OD. Le spectre RMN ¹³C est présenté sur la figure 34.

1-1-2) Préparation de la toxine

5,3 g de fumonisine B₁ sont isolés, purifiés par les méthodes habituelles et transformés en fumonisine A₁ comme décrit ci-dessus. La fraction toxique est reprise par de l'eau distillée et répartie en 17 doses égales contenant 330 mg de fumonisine A₁ et 175 mg d'acétate de sodium.

La fumonisine A₁ n'a pas été purifiée pour éviter une perte éventuelle de toxine. Le pH de 4,1 d'une dose toxique n'a pu modifier notablement celui du contenu stomacal du cheval.

1-2) Expérimentation équine

Une jument de 15 ans pesant 332 kg, préalablement vermifugée, est traitée chaque matin pendant 17 jours par administration d'une dose de toxine par voie orale. L'animal est nourri *ad libitum* avec du fourrage vert et reçoit quotidiennement 1 kg de complément en granulés.

A la suite de l'expérimentation, l'animal a été gardé en observation durant un mois.

1-3) Pathologie chimique

Pendant toute la durée de l'expérimentation, une prise de sang a été effectuée tous les jours afin de suivre l'évolution de certains paramètres hématologiques et enzymatiques : aspartate aminotransférase (ASAT), phosphatase alcaline (ALP) et bilirubine totale (TBr). Par la suite, et durant un mois, les dosages ont été effectués de façon hebdomadaire.

2) Résultats et discussion

Lors des trois précédentes expérimentations équines [administration par voie orale d'un extrait aqueux (expérience A) (chap B-2), administration de la fumonisine B₁ par voie orale (expérience B) puis ultérieurement par voie intraveineuse à la même jument (expérience C) (chap G)], la LEM a été reproduite expérimentalement lors des expériences A et C; dans les deux cas, elle a été précédée par des symptômes hépatiques décelés par les analyses biochimiques du sérum (tableau 14).

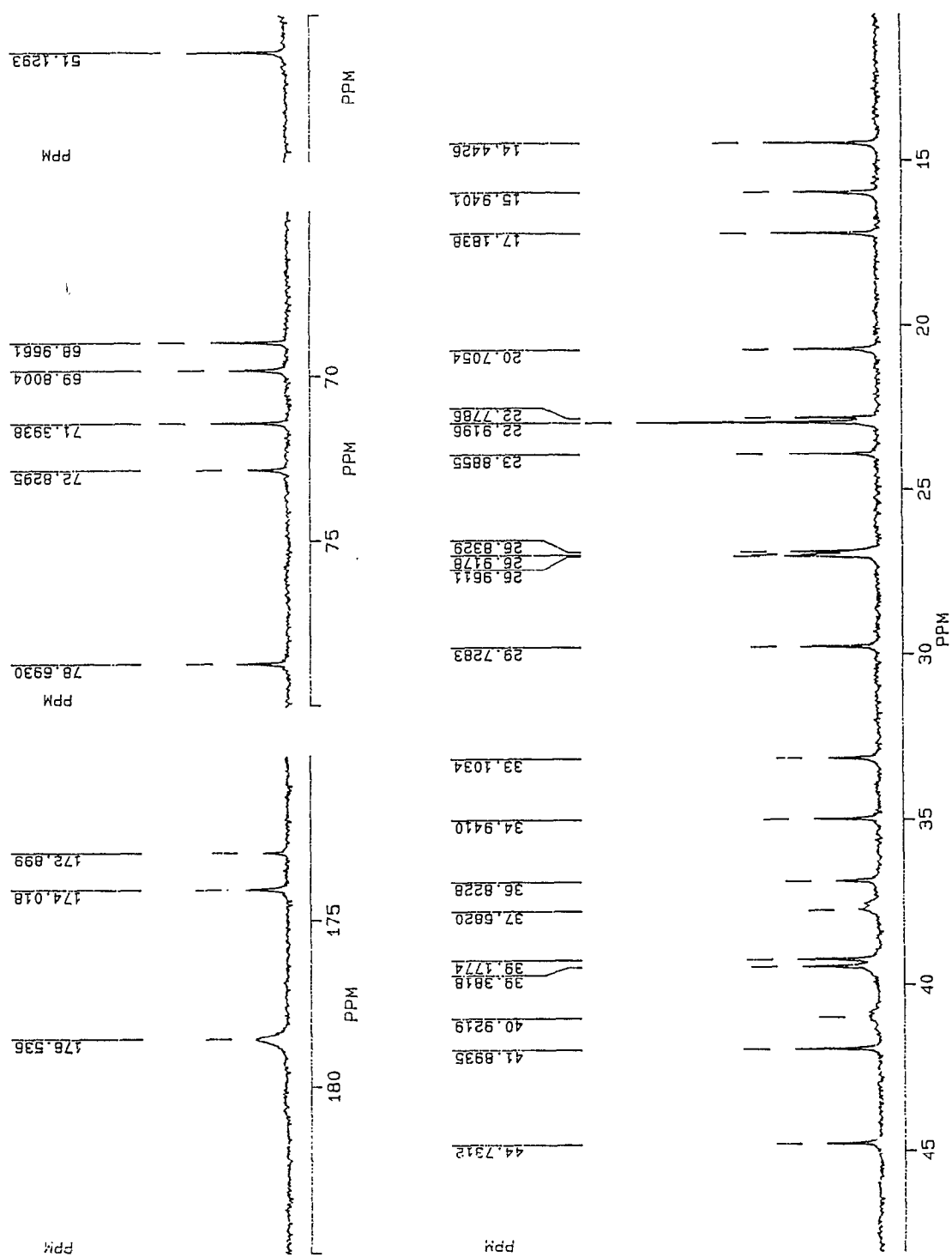


Figure 34 : Spectre RMN ^{13}C (125,76 MHz) de la fumonisine A₁ synthétisée, en solution dans CD₃OD (résolution 1,79 Hz/pt, 292 acquisitions)

Tableau 14 : Expérimentations équines

Expérimentations	Résultats	Réf.
Expérience A : Jument 14 ans, 320 kg; intubation stomacale d'un extrait aqueux de maïs artificiellement contaminé par <i>F. moniliforme</i> . L'équivalent de 14,75 kg de maïs moisi a été distribué sur 14 jours.	Ictère à J.11, tachycardie et légers signes nerveux à J.13, morte à J.15. Biochimie : ASAT = max 1847; ALP = max 432; TBr = max 177 Atteintes rénales, hépatiques, cardiaques, digestives et système nerveux central : diagnostic LEM.	(122)
Marasas : Jument 15 ans, 315 kg; injection intraveineuse de fumonisine B1 Doses de 0,125 mg/kg de poids vif, total administré = 276 mg	Nervosité suivie d'apathie, refus de marcher, parésie de la lèvre inférieure et de la langue, dyspnée. Euthanasie J.9 Biochimie : ASAT = max 229. Lésions du système nerveux central bilatéral, LEM au stade initial.	(40)
Expérience B : Jument 11 ans, 340 kg; administration par voie orale de fumonisine B1. Doses de 1,24 mg/kg de poids vif, total administré = 11,1 g	Aucun symptôme Biochimie : néant	(149)
Expérience C : même jument que pour l'expérience B un an plus tard, administration par voie intraveineuse de fumonisine B1. Doses de 0,105 mg/kg de poids vif, total administré = 680 mg	Fonte musculaire au niveau des cuisses, parésie postérieure, chute à J.18, euthanasie. Biochimie : ASAT = max 1990 à J.12; ALP = max 615 à J.15; TBr = max 137,7 à J.13. Oedème du cerveau, diagnostic de LEM	(149)
Expérience D : Jument 15 ans, 332 kg; administration par voie orale de fumonisine A1. Doses de 1 mg/kg de poids vif, total administré = 5,61 g	Aucun symptôme Biochimie : néant	(150)

La présente expérimentation visait à détecter, en suivant les cinétiques de certains paramètres biochimiques, le passage dans le sang de la toxine administrée par voie orale (expérience D).

Trois marqueurs ont été analysés quotidiennement; les ASAT (figure 35) et la bilirubine totale (figure 36) qui signalent des affections hépatiques et dont les cinétiques étaient ascendantes pour les expériences A et C; les ALP (figure 37), dont les taux avaient aussi augmenté pour les deux juments ce qui semblait être le signe d'une cytolysé des fibres musculaires.

Les doses journalières de fumonisine A₁ utilisées (330 mg) sont proches de celles de fumonisine B₁ (300 mg) administrées également par voie orale lors de l'expérience B et 10 fois supérieures à celles de fumonisine B₁ (34 mg) injectées par voie intraveineuse à la même jument (expérience C). Les doses exprimées ici pour les expériences B et C ne tiennent pas compte d'un éventuel effet cumulatif car elles furent réalisées à un an d'intervalle.

Aucun symptôme nerveux ou hépatique n'a été observé après administration de 5,6 g de fumonisine A₁ à la jument traitée (expérience D). Les paramètres hématologiques et enzymatiques n'ont pas variés de façon notable tout au long de l'expérimentation (figures 35, 36 et 37).

Notons que, par voie intraveineuse, un total de 306 mg de fumonisine B₁ ont suffi pour déclencher l'accroissement des enzymes hépatiques et qu'il a fallu au total 680 mg pour obtenir des symptômes nerveux et la mort de la jument de l'expérience C; Marasas et coll. (40) de leur côté ont reproduit la LEM associée à une très légère atteinte hépatique, par injection intraveineuse de 276 mg de fumonisine B₁.

L'administration par voie orale d'une dose globale de fumonisine A₁ 18 fois supérieure à la dose de fumonisine B₁ administrée par voie intraveineuse n'a donc pas permis d'induire une réaction biochimique notable.

Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu avec la jument (expérience B) qui a ingéré 11,1 g de fumonisine B₁ (soit 36 fois la dose intraveineuse nécessaire à l'obtention des signes hépatiques) sans résultat.

Cette expérience a été menée sur un seul individu et sa sensibilité à la LEM n'a pas été vérifiée, comme cela fut le cas pour l'administration par voie orale puis par voie intraveineuse de la fumonisine B₁ à la même jument (expérience B et C) (chap. G)

3) **Conclusion**

L'hypothèse selon laquelle la fumonisine A₁ plutôt que la fumonisine B₁ serait naturellement impliquée dans la pathogénie de la leucoencéphalomalacie équine ne semble pas pouvoir être retenue.

La théorie avancée au chapitre précédent (l'existence d'un autre facteur nécessaire à l'expression de la toxicité de la fumonisine) reste donc envisageable.

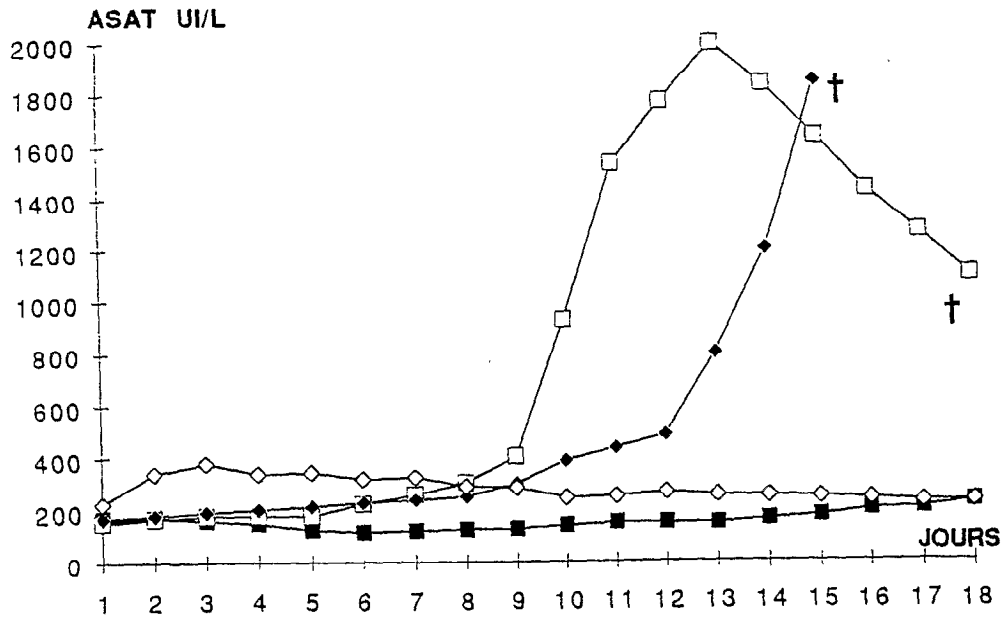


Figure 35 : Cinétiques des aspartates aminotransférases (ASAT) pour les 4 expérimentations équinées;
 ◆ Expérience A, ■ Expérience B, □ Expérience C, ◇ Expérience D, † Mort de l'animal.
 Valeurs limites : $> 100 - 300 < \text{UI/L}$

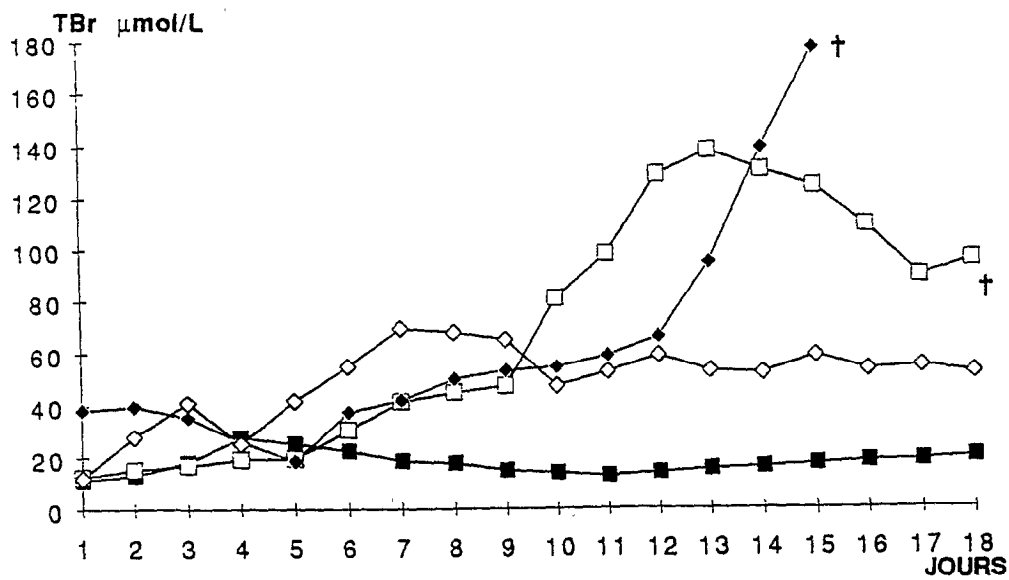


Figure 36 : Cinétiques de la bilirubine totale (TBr) pour les 4 expérimentations équinées;
 ◆ Expérience A, ■ Expérience B, □ Expérience C, ◇ Expérience D, † Mort de l'animal.
 Valeurs limites : $> 10 - 80 < \mu\text{mol/L}$

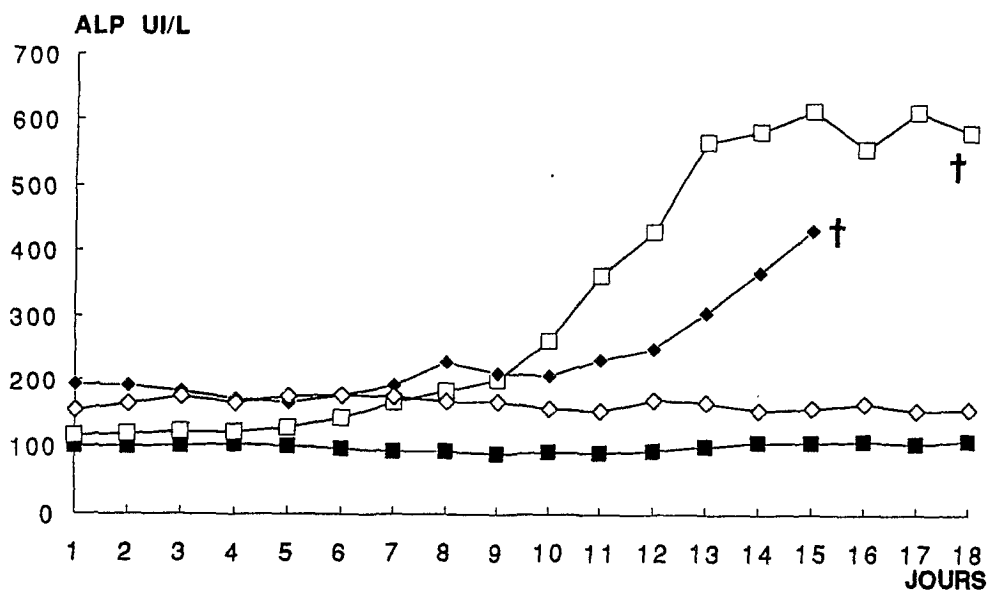


Figure 37 : Cinétiques des phosphatases alcalines (ALP) pour les 4 expérimentations équine;
 ◆ Expérience A, ■ Expérience B, □ Expérience C, ◇ Expérience D, † Mort de l'animal.
 Valeurs limites : > 30 - 200 < UI/L

I) CONCLUSION

I) CONCLUSION

De nouvelles mycotoxines, les fumonisines (ou macrofusines) ont été isolées à partir de cultures sur maïs de souches de *Fusarium moniliforme*.

Leur biosynthèse dépend de la forme physiologique du champignon (macroconidiale ou microconidiale) qui, elle même, est dépendante du taux d'humidité du substrat.

La Résonance Magnétique Nucléaire a permis d'établir la structure de ces composés.

Leur responsabilité dans la pathogénie de la leucoencéphalomalacie équine a été confirmée expérimentalement.

Ces résultats, ainsi que ceux obtenus parallèlement par les sud africains, sont à l'origine d'un regain d'intérêt par les américains pour les mycotoxines de *F. moniliforme*, en particulier pour les fumonisines. De nombreuses équipes se mobilisent pour cerner rapidement toutes leurs actions nocives sur les plantes, les animaux et les hommes. D'ores et déjà, il est prouvé qu'elles sont impliquées dans la LEM, les œdèmes pulmonaires aiguës chez les porcs ainsi que dans des toxicoses chez le poussin; elles semblent également avoir des propriétés carcinogéniques.

Des études préliminaires ont montré la présence de ces mycotoxines dans le maïs américain.

L'USDA (United States Department of Agriculture) organise des symposiums pour alerter les céréaliers mais aussi pour acquérir un "leadership" sur les futures recherches.

Beaucoup de domaines restent à explorer, qui concernent en particulier :

- le potentiel toxique des fumonisines;
- le mode d'action de la fumonisine B₁ dans la pathogénie de la LEM. D'autres facteurs sont sans doute nécessaires à l'expression de sa toxicité, le cyclonérodol (ou micromoniline) qui a une action sur le canal sodium, y joue peut-être un rôle;
- l'étiologie du développement des formes physiologiques toxiques, en particulier l'existence éventuelle d'un déterminisme génétique contrôlant leur évolution;
- la relation entre le niveau de contamination au champ par *F. moniliforme* et le taux de fumonisine B₁ dans les échantillons de nourriture ainsi que celui produit par les isolats;
- la mise au point d'un système de détection simple et rapide de la mycotoxine;
- la recherche d'un système de détoxification ou de résistances génétiques à *Fusarium moniliforme* chez le végétal.

GLOSSAIRE

Adénofibrome ou fibrome : tumeur développée aux dépens des éléments d'une glande, le tissu conjonctif évoluant suivant le type fibreux.

ALAT : Alanine amino-transférase, aussi dénommée SGPT, transaminase glutamique pyruvique; enzyme sous l'influence de laquelle s'effectue les transaminations. Elle se trouve dans le foie et les muscles squelettiques.

ALP : Phosphatase alcaline; enzyme libérant les phosphates inorganiques insolubles par hydrolyse des phosphates organiques. Son taux sanguin est plus élevé pendant la croissance, et au cours de certaines maladies osseuses et hépatiques.

Anorexie : perte ou diminution de l'appétit.

Arthrite : inflammation aiguë ou chronique des articulations.

ASAT : Aspartate amino-transférase, aussi dénommée SGOT, transaminase glutamique oxalo-acétique; enzyme sous l'influence de laquelle s'effectue les transaminations. Elle se trouve surtout dans le myocarde et aussi dans les muscles squelettiques, le cerveau, le foie et le rein.

Bilirubine : pigment biliaire provenant du catabolisme de l'hémoglobine, elle existe sous forme conjuguée et non conjuguée. L'augmentation de leur taux est signe d'affections hémolytiques ou intra-hépatiques.

Carcinome hépatocellulaire : cancer primaire au niveau des cellules du foie, tumeur épithéliale maligne.

Carcinome ductulaire : cancer primaire au niveau des petits canaux biliaires, tumeur épithéliale maligne.

Caryorrhéxie : éclatement du noyau de la cellule en débris basophiles; stade de mort du noyau succédant à la pycnose.

Cholangiocarcinome : tumeur des voies biliaires extrahépatiques (canal cystique).

Cirrhose : nom donné à plusieurs affections hépatiques ayant toutes pour caractère commun "la prolifération du stroma conjonctif suivant un certain type anatomique et physiologique". Cette prolifération conjonctive peut s'accompagner de différentes modifications des cellules.

CPK : Créatine phosphokinase; enzyme dont le taux dans le sérum sanguin s'élève dans tous les cas d'atteinte musculaire.; cependant les lésions du système nerveux central sont parfois reconnues à l'augmentation de leur taux.

Crypte : cavité de forme irrégulière à la surface d'un organe.

Démýélinisation : disparition de la gaine de myéline qui entoure le cylindraxe d'une fibre nerveuse.

Entérite : inflammation de la muqueuse intestinale.

Eosinophile : variété de leucocytes remarquables par leur gros noyau polylobé et leurs grosses granulations faciles à colorer avec l'éosine. On les rencontre dans le sang, dans l'expectoration des asthmatiques et dans différentes sécrétions pathologiques. Signe d'hypersensibilité immédiate, allergie.

Fibroblaste : cellule fusiforme provenant des cellules conjonctives en voie de prolifération.

Fibrose : transformation fibreuse de certaines formations pathologiques et en particulier des cavernes pulmonaires.

GGT : Gamma glutamyltransférase; enzyme présente principalement dans les cellules hépatiques et musculaires.

Gliose : prolifération du réseau névroglie.

Hyperplasie nodulaire : formation d'un tissu pathologique aux dépens d'un tissu sain; développement localisé du foie (stade précancéreux).

Hyperplasie cellulaire basale : concerne la muqueuse de l'œsophage, couche la plus profonde de l'épithélium (stade précancéreux).

Ictère : coloration jaune de la peau et des muqueuses, qui révèle la présence de pigments biliaires dans les tissus.

Infarctus du myocarde : nécrose d'une partie du muscle cardiaque privée d'apport sanguin, presque toujours à la suite de la thrombose d'une artère coronaire.

Leucopénie : diminution du nombre de globules blancs (leucocytes) contenus dans le sang.

LEM : leucoencéphalomalacie.

Lymphocytose : présence de lymphocytes dans un liquide de l'organisme.

Nécrose : mortification des os et des cartilages. On étend parfois cette dénomination à la mortification des autres tissus.

Néoplasie : formation d'un tissu nouveau dont les éléments se substitueraient à ceux d'un tissu antérieur sans rien leur emprunter. Terme général pour cancer, lésion maligne.

Neutrophilie : les neutrophiles jouent un rôle dans l'inflammation en phagocytant les matières étrangères et en détruisant les bactéries. Les causes de neutrophilie comprennent l'exercice, les infections localisées et généralisées, le stress, les intoxications par les métaux lourds et l'administration de corticostéroïdes.

œdème : infiltration séreuse de divers tissus et en particulier du tissu conjonctif du revêtement cutané ou muqueux.

Pancytopénie : diminution du nombre de tous les éléments figurés du sang (globules rouges, globules blancs, plaquettes).

Pétéchies : petites taches rouges dues à des microhémorragies.

Protéinurie : présence de protéine dans l'urine provenant du sérum sanguin (albumine, globuline), des voies excrétrices urinaires ou des tissus (histurie).

Pycnose : altération du noyau de la cellule qui se présente sous la forme d'une masse condensée homogène.

Réticulocyte : hématie granuleuse.

Radiomimétique : se dit d'une substance dont l'action est identique à celle des rayons.

Splénique : qui a rapport avec la rate.

Stase : arrêt ou ralentissement considérable de la circulation ou de l'écoulement d'un liquide de l'économie.

Stéatose : lésion consistant dans l'envahissement des éléments anatomiques d'un tissu par des graisses neutres (triglycérides : esters d'acides gras et de glycérol).

Tachycardie : accélération du rythme des battements cardiaques.

Thrombose : formation d'un caillot dans un vaisseau sanguin ou dans une des cavités du coeur.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BUGNICOURT F. - Sur une maladie du maïs. Publication de l'Institut Français d'Océanie, ORSTOM, 1958.
- 2 - DOMENECH J., BOCCAS B., PELLEGRIN F., LAURENT D., KOHLER F., MAGNOL J., LAMBERT C. - Etude de la fusariose du maïs à *Fusarium moniliforme* en Nouvelle - Calédonie et de la pathologie équine associée à la leucoencéphalomalacie toxique. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 1984, 37 (3) : 253 - 259.
- 3 - DOMENECH J., BOCCAS B., PELLEGRIN F., LAURENT D., KOHLER F., MAGNOL J., LAMBERT C. - Equine leucoencephalomalacia in New Caledonia. Aust. J. Vet. 1985, 62 (12) : 422 - 423.
- 4 - NELSON P. E., TOUSSOUN T. A., COOK R. J. - *Fusarium* . Diseases, Biology and Taxonomy. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 1981.
- 5 - BETINA V. - Mycotoxins. Production, isolation, separation and purification. Developments in food science 8. Elsevier science publishers B. V., Amsterdam 1984.
- 6 - KURATA H., UENO Y. - Toxigenic fungi - Their toxins and health hazard. Developments in food science 7. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 1984.
- 7 - MARASAS W. F. O., NELSON P. E., TOUSSOUN T. A. - Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 1984.
- 8 - MARASAS W. F. O. - *Fusarium moniliforme* : a mycotoxicological miasma. Dans Mycotoxins and Phycotoxins de STEYN P. S. et VLEGGAAR R. 1986, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam : 19 - 28.
- 9 - COLE R. J. - Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins. Academic Press, Inc., 1986.
- 10 - STEYN P. S., VLEGGAAR R. - Bioactives molecules 1 - Mycotoxins and phycotoxins. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1986.
- 11 - NELSON P. E., TOUSSOUN T. A., MARASAS W. F. O. - *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 1983.

- 12 - MARASAS W. F. O., KELLERMAN T. S., PIENAAR J. G., NAUDE T. W. - Leucoencephalomalacia : a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. Onderstepoort J. Vet. Res. 1976, 43 (3) : 113 - 122.
- 13 - WILSON B. J., MARONPOT R. R. - Causative fungus agent of leucoencephalomalacia in equine animals. Vet. Rec. 1971, 88 : 484 - 486.
- 14 - BIESTER H. E., SCHWARTE L. H. - Moldy corn poisoning (Leucoencephalomalacia) in horses with history of previous attack as well as recovery from virus encephalomyelitis. North Amer. Vet. 1939, 20 : 17 - 19.
- 15 - BIESTER H. E., SCHWARTE L. H., REDDY C. H. - Further studies on moldy corn poisoning (Leucoencephalomalacia) in horses. Vet. Med. 1940, 35 : 636 - 639.
- 16 - BUCKLEY S. S., Mac CALLUM W. G. - Acute haemorrhagic encephalitis prevalent among horses in Maryland. Amer. Vet. Rev. 1901, 25 : 99 - 101.
- 17 - BUTLER T. - Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive results. Amer. Vet. Rev. 1902, 26 : 748 - 751.
- 18 - GRAHAM R. - Toxic encephalitis and non-virus encephalomyelitis of horses. Vet. Med. 1936, 31 : 46 - 50.
- 19 - SCHWARTE L. H., BIESTER H. E., MURRAY C. - A disease of horses caused by feeding moldy corn. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1937, 90 : 76 - 85.
- 20 - SCHWARTE L. H. - Moldy corn poisoning in horses. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 1937, 92 : 152 - 158.
- 21 - LOCK T. F. - Leukoencephalomalacia in two quarter horses. Mod. Vet. Pract. 1974, 55 : 464.
- 22 - BUCK W. B., HALIBURTON J. C., THILSTED J. P., LOCK T. F., VESONDER R. F. - Equine leucoencephalomalacia : comparative pathology of naturally occurring and experimental cases. Am. Ass. Vet. Lab. Diagn. 1979, 22 nd Ann. Proc. : 239 - 258.
- 23 - NYACK B., PADMORE C. L. - Suspected equine leucoencephalomalacia. Equine Practice 1983, 5 (2) : 33 - 34.

- 24 - WILSON T. M., NELSON P. E., RYAN T. B., ROUSE C. D., PITTMAN C. W., NEAL T. P., PORTERFIELD M. L., SAUNDERS G. K. - Linking leukoencephalomalacia to commercial horse rations. Vet. Med. 1985, Nov. : 63 - 69.
- 25 - BEAN G. A., LA GRENADE C. - Equine leukoencephalomalacia in Maryland horses associated with contaminated corn consumption. Phytopathology (abst.) 1987, 77 (12) : 1698.
- 26 - MONINA M.I., MOSCOTENA E.A., RUAGAR J., IDIART J.R., REINOSO E.H., MURO A., NOSETTO E.O., PONS E.R. - Leucoencefalomalacia equina. Casos registrados en el pais. Revista Militar de Veterinaria 1981, 28 : 13 - 17.
- 27 - RODRIGUEZ J. A. - Diferenciacion entre las enfermedades de los rastrojos y la meningo encefalomieltis infeccion de los equinos. An. Soc. Rur. Arg. 1945, 69 : 305 - 307.
- 28 - BASTISTA BRITO L. A., NOGUEIRA R. H. G., PEREIRA J. J., CHQUILOFF M. A. G., BIONDINI J. - Leucoencefalomalacia em equinos associada a ingestao de Milho Mofado. Arq. Esc. Vet. UFMG, Bel Horizonte 1982, 34 (1) : 49 - 53.
- 29 - RIET-CORREA F., MEIRELLES M. A., SOARES J. M., MACHADO J. J., ZAMBRANO A. F. - Leucoencefalomalacia em equinos associada a ingestao de Milho Mofado . Pesq. Vet. Bras. 1982, 2 (1) : 27 - 30.
- 30 - IWANOFF X., CHANG - KUO Y., SHIH - CHIEN F. - Uber die toxishe encephalomalazie (moldy corn poisoning) der einhofer in China. Arch. Exp. Vet. Med. 1957, 11 : 1033 - 1056.
- 31 - BADIALI C., MANDOU H. A-Y., RADWAN A. I., HAMOY F. M., HELDEBRANDT P. K. - Moldy corn poisoning as the major cause of an encephalomalacia syndrome in egyptian equidae. Amer. J. Vet. Res. 1968, 29(10) : 2029 - 2035.
- 32 - PIENNAAR J. G., KELLERMAN T. S., MARASAS W. F. O. - Field outbreaks of leukoencephalomalacia in horses consuming maize infected by *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) in South Africa. J. South African Vet. Assoc. 1981, 52 (1) : 21 - 24.
- 33 - WILSON B. J., MARONPOT R. R., HILDEBRANDT P. K. - Equine leukoencephalomalacia. J. A. V. M. A. 1973, 163 (11) : 1293 - 1295.
- 34 - MAGNOL J. P., LE BARS J., QUERE J. P. - Leucoencephalomalacie (LEM) toxique chez le cheval. Un cas très probable en territoire métropolitain. Rev. Med. Vet. 1983, 134 (5) : 297 - 299.

- 35 - HALIBURTON J. C. - Preliminary investigations into the etiology and pathogenesis of equine leucoencephalomalacia. Diss. Abstr. Intern. 1983, 43 (9) : 2822.
- 36 - KELLERMAN T. S., MARASAS W. F. O., PIENAAR J. C., NAUDE T. W. - A mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon, a preliminary communication. Onderstepoort J. Vet. Res. 1972, 39 (4) : 205 - 208.
- 37 - BROWNIE C.F., CULLEN J. - Characterization of experimentally induced equine leucoencephalomalacia (ELEM) in ponies (*Equus caballus*) : preliminary report. Vet. Human Toxicol. 1987, 29 : 34 - 38.
- 38 - HALIBURTON J. C., VESONDER R. F., LOCK R. F., BUCK W. B. - Equine leucoencephalomalacia (ELEM) : a study of *Fusarium moniliforme* as an etiologic agent. Vet. Human. Toxicol. 1979, 21 : 348 - 351.
- 39 - 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.
- 40 - MARASAS W. F. O., KELLERMAN T. S., GELDERBLOM W. C. A., COETZER W. C. A., THIEL P. G., Van Der LUGT J. J. - Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J. Vet. Res. 1988, 55 : 197 - 203.
- 41 - BJELDANES L. F., WIEB L. A. - Mutagenic mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. Environ. Mut. 1980, 2 : 240 - 241.
- 42 - ITO T. - Fusariocin C, a new cytotoxic substance produced by *Fusarium moniliforme*. Agric. Biol. Chem. 1979, 43 (6) : 1237 - 1242.
- 43 - 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. Fd. Cosmet. Toxicol. 1977, 15 : 579 - 587.
- 44 - KRIEK N. P. J., MARASAS W. F. O., THIEL P. G. - Hepato and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) isolates from southern African maize. Fd. Cosmet. Toxicol. 1981, 19 : 447 - 456.

- 45 - KRIEK N. P. J., MARASAS W. F. O., Van RENSBURG S. J., FINCHAM J. E., YAGEN B., JOFFE A. Z. - Chronic pathologic effects of some fusarial toxins. Dans *Mycotoxins and Phycotoxins* de STEYN P. S. et VLEGGAR R. 1986, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam : 525 - 534.
- 46 - JASKIEWICZ K., MARASAS W. F. O., TALJAARD J. J. F. - Hepatitis in vervet monkeys caused by *Fusarium moniliforme* . J. Comp. Pathol. 1987, 97 : 281 - 291.
- 47 - MARASAS W. F. O., WEHNER F. C., Van RENSBURG S. J., Van SCHALKWYK D. J. - Mycoflora of corn produced in human oesophageal cancer areas in Transkei, Southern Africa. *Postharvest Pathology and Mycotoxins* 1981, 71 (8) : 792 - 795.
- 48 - LI M. H., LU S. H., JI C., WANG M. Y., CHENG S. J., JIN C. L. - Formation of carcinogenic N-nitroso compounds in corn-bread inoculated with fungi. *Sci. Sin.* 1979, 22 : 471 - 477.
- 49 - JASKIEWICZ K., Van RENSBURG S. J., MARASAS W. F. O., GELDERBLOM W. C. - Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats. *J. N. C. I.* 1987, 78 (2) : 321 - 325.
- 50 - MARASAS W. F. O., KRIEK N. P. J., FINCHAM J. E., Van RENSBURG S. J. - Primary liver cancer and oesophageal basal cells hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme* . *Int. J. Cancer* 1984, 34 : 383 - 387.
- 51 - WILSON T. M., NELSON P. E., KNEPP C. R. - Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis, and cholangiocarcinomas in male Fisher 344 rats fed corn naturally contaminated with *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis* 1985, 6 (8) : 1155 - 1160
- 52 - GELDERBLOM W. C. A., THIEL P. G., MARASAS W. F. O., Van Der MERWE K. J. - Natural occurrence of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32 : 1064 - 1067.
- 53 - GELDERBLOM W. C. A., THIEL P. G., JASKIEWICZ K., MARASAS W. F. O. - Investigations on the carcinogenicity of fusarin C, a mutagenic metabolite of *Fusarium moniliforme* . *Carcinogenesis* 1986, 7 (11) : 1899 - 1901.
- 54 - LU S. H., LI M. H., JI C., WANG M. Y., WANG Y. L., HUANG L. - A new N-nitroso compound, N-3-methylbutyl-N-methylacetonitrosamine, in corn-bread inoculated with fungi. *Sci. Sin.* 1979, 22 : 601 - 608.

- 55 - LU S. H., CAMUS A. M., JI C., WANG Y. L., WANG M. Y., BARTSCH H. - Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of N-3-methylbutyl-N-1-methyl-acetonyl-nitrosamine and N-methyl-N-benzyl nitrosamine, N-nitrosation products isolated from corn-bread contaminated with commonly occurring moulds in Linshien county, a high incidence area for oesophageal cancer in Northern China. *Carcinogenesis* 1980, 1 (10) : 867 - 870.
- 56 - MARASAS W. F. O., Van RENSBURG S. J. - Mycotoxicological investigations on maize and groundnuts from the endemic area of Mseleni joint disease in Kwazulu. *S A Med. J.* 1986c, 69 : 369 - 374.
- 57 - MARASAS W. F. O., KRIEK N. P. J., STEYN M., Van RENSBURG S. J., Van SCHALKWYK D. J. - Mycotoxicological investigations on Zambian maize. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 1978, 16 : 39 - 45.
- 58 - 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. *Postharvest Pathology and Mycotoxins* 1979, 69 (11) : 1181 - 1185.
- 59 - MARASAS W. F. O., THIEL P. G., RABIE C. J., NELSON P. E., TOUSSOUN T. A. - Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 1986, 78 (2) : 242 - 247.
- 60 - VESONDER R., HALIBURTON J., GOLINSKI P. - Toxicity of field samples and *Fusarium moniliforme* from feed associated with equine leucoencephalomalacia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1989, 18 : 439 - 442.
- 61 - HAYES M. A., WOBESER G. A. - Subacute toxic effects of dietary T2 toxin in young Mallard ducks. *Can. J. Comp. Med.* 1983, 47 : 180 - 187.
- 62 - BHAVANISHANKAR T. N., RAMESH H. P., SHANTHA T. - Dermal toxicity of *Fusarium* toxins in combinations. *Arch. Toxicol.* 1988, 61 : 241 - 244.
- 63 - JOFFE A. Z., PALTI J., ARBEL-SHERMAN R. - *Fusarium moniliforme* Sheldon in Israël (*Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wollenw.). *Mycopathologia and Mycologia Applicata* 1973, 50 (2) : 85 - 107.
- 64 - VESONDER R. F., ELLIS J. J., ROHWEDDER W. K. - Swine refusal factors elaborated by *Fusarium* strains and identified as trichothecenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41 (1) : 323 - 324.

65 - TRENHOLM H. L., COCHRANE W. P., COHEN H., ELLIOT J. I., FARNWORTH E. R., FRIEND D. W., HAMILTON R. M. G., STANDISH J. F., THOMPSON B. K. - Survey of vomitoxin contamination of 1980 Ontario white winter wheat crop : results of survey and feeding trials. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983, 66 (1) : 92 - 97.

66 - MOREAU C. - Trois cas de paralysie chez des porcs et des volailles vraisemblablement liés à une action toxique de *Fusarium moniliforme* Sheld. Bull. Soc. Mycol. France 1974, 90 : 201 - 208.

67 - ABBAS H. K., MIROCHA C. J., SHIER W. T. - Mycotoxins produced from fungi isolated from foodstuffs and soil : comparison of toxicity in fibroblasts and rat feeding tests. Appl. Environ. Microbiol. 1984, 48 (3) : 654 - 661.

68 - ABBAS H. K., MIROCHA C. J., MERONUCK R. A., POKORNY J. D., GOULD S. L., KOMMEDAHL T. - Mycotoxins and *Fusarium* spp. associated with infected ears of corn in Minnesota. Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54 (8) : 1930 - 1933.

69 - ABBAS H. K., MIROCHA C. J., KOMMEDAHL T., BURNES P. M., MERONUCK R. A., GUNTHER R. - Toxigenicity of *Fusarium proliferatum* and other *Fusarium* species isolated from corn ears in Minnesota. Phytopathology 1988, 78 (8) : 1258 - 1259.

70 - RU-DONG WEI, SMALLEY E. B., STRONG F. M. - Improved skin test for detection of T2 toxin. Appl. Microbiol. 1972, 23 (5) : 1029 - 1030.

71 - BURMEISTER H. R., VESONDER R. F., KWOLEK W. F. - Mouse bioassay for *Fusarium* metabolites : rejection or acceptance when dissolved in drinking waters. Appl. Environ. Microbiol. 1980, 39 (5) : 957 - 961.

72 - BEASLEY V. R., BUCK W. B., VESONDER R. F., ELLIS J. J. - Feed refusal in cattle associated with *Fusarium moniliforme* in corn. Vet. Rec. 1982, 111 : 393 - 394.

73 - FRITZ J. C., MISLIVEC P. B., PLA G. W., HARRISON B. N., WEEKS C. E., DANTZMAN J. G. - Toxicogenicity of moldy feed for young chicks. Poult. Sci. 1973, 52 : 1523 - 1530.

74 - SHARBY T. F., TEMPLETON G. E., BEASLEY J. N., STEPHENSON E. L. - Toxicity resulting from feeding experimentally molded corn to broiler chicks. Poult. Sci. 1972, 52 : 1007 - 1014.

75 - COLE R. J., KIRKSEY 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.

- 76 - MARASAS W. F. O., SMALLEY E. B. - Mycoflora, toxicity and nutritive value of mouldy maize. Onderstepoort J. Vet Res. 1972, 39: 1 - 10.
- 77 - BRIAN P. W., DAWKINS A. W., GROVE J. F., HEMMING H. G., LOWE D., NORRIS G. L. F. - Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti* . J. Exp. Bot. 1961, 12 (34) : 1 - 12.
- 78 - SCOTT G. E., FUTRELL M. C. - Response of maize seedlings to *Fusarium moniliforme* and a toxic material extracted from this fungus. Plant Disease Reporter 1970, 54 (6) : 483 - 486.
- 79 - COLE R. J., DORNER J. W., COX R. H., CUNFER B. M., CUTLER H. G., STUART B. P. - The isolation and identification of several trichothecenes mycotoxins from *Fusarium heterosporum* . J. Nat. Prod. 1981, 44 (3) : 324 - 330.
- 80 - SIRIWARDANA T. M. G., LAFONT P. - New sensitive biological assay for 12,13-epoxytrichothecenes. Appl. Environ. Microbiol. 1978, 35 (1) : 206 - 207.
- 81 - SALLEH B., STRANGE R. N. - Toxigenicity of some Fusaria associated with plant and human diseases in the Malaysian peninsula. J. Gen. Microbiol. 1988, 134 : 841 - 847.
- 82 - LAFONT J., LAFONT P., GAILLARDIN M. - Sensibilité de l'embryon de poulet à des mycotoxines. Bull. Acad. Vét de France 1979, 52 : 119 - 124.
- 83 - DEBEAUPUIS J. P., LAFONT P. - Effets de quelques mycotoxines et substances génotoxiques de synthèse sur le développement de l'embryon et la larve de *Brachydanio rerio*. C. R. Acad. Sc. Paris 1985, Série III, 5 : 167 - 170.
- 84 - BJELDANES L. F., CHANG G. W., THOMPSON S. W. - Detection of mutagens produced by fungi with the *Salmonella typhimurium* assay. Appl. Environ. Microbiol. 1978, 35 : 1150 - 1154.
- 85 - BJELDANES L. F., THOMPSON S. V. - Mutagenic activity of *Fusarium moniliforme* isolates in the *Salmonella typhimurium* assay. Appl. Environ. Microbiol. 1979, 37 : 1118 - 1121.
- 86 - WIEBE L. A., BJELDANES L. F. - Fusarin C, a mutagen from *Fusarium moniliforme* grown on corn. J. Food Sci. 1981, 46 : 1424 - 1426.

- 87 - UENO Y., ISHIKAWA Y., NAKAJIMA M., SAKAI K., ISHII K., TSUNODA H., SAITO M., ENOMOTO M., OHTSUBO K., UMEDA M. - Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria* 1 Screening of toxic strains. Jap. J. Exp. Med. 1971, 41 (6) : 257 - 272.
- 88 - UENO Y., HOSOYA M., ISHIKAWA Y. - Inhibitory effects of mycotoxin on the protein synthesis in rabbit reticulocytes. J. Biochem (Tokyo) 1969, 66 : 419 - 422.
- 89 - SPRINGER J. P., CLARDY J., COLE R. J., KIRKSEY J. W., HILL R. K., CARLSON R. M., ISIDOR J. L. - Structure and synthesis of moniliformin, a novel cyclobutan microbial toxin. J. Amer. Chem. Soc. 1974, 96 (7) : 2267 - 2268.
- 90 - BURMEISTER H. R., CIEGLER A., VESONDER R. F. - Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRRL6322 : purification and toxicity. Appl. Environ. Microbiol. 1979, 37 (1) : 11 - 13.
- 91 - STEYN M., THIEL P. G., Van SCHALKWYK G. C. - Isolation and purification of moniliformin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1978, 61 (3) : 578 - 580.
- 92 - RABIE C. J., LUBBEN A., LOUW A. I., RATHBONE E. B., STEYN P. S., VLEGGAAR R. - Moniliformin, a mycotoxin from *Fusarium fusarioides*. J. Agric. Food Chem. 1978, 26 (2) : 375 - 379.
- 93 - THIEL P. G., GELDERBLOM W. C. A., MARASAS W. F. O., NELSON P. E., WILSON T. M. - Natural occurrence of moniliformin and fusarin C in corn screenings known to be hepatocarcinogenic in rats. J. Agric. Food Chem. 1986, 34 (5) : 773 - 775.
- 94 - KAMIMURA H., NISHIJIMA M., YASUDA K., SAITO K., IBE A., NAGAYAMA T., USHIYAMA H., NAOI Y. - Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains, and foodstuffs. J. Ass. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (5) : 1067 - 1073.
- 95 - SCOTT P. M., LAWRENCE G. A., MATULA T. I. - Analysis of toxins of *Fusarium moniliforme* . Dans Mycotoxins and Phycotoxins de STEYN P. S. et VLEGGAAR R. 1986, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam : 305 - 316.
- 96 - BOTTALICO A., LERARIO P., VISCONTI A. - Production of zearalenone, trichothecenes and moniliformin by *Fusarium* species from cereals in Italy. Dans Toxigenic fungi - their toxins and health hazard de KURATA H. et UENO Y. 1984. Developments in food science 7, Elsevier : 199 - 207.
- 97 - ALLEN N. K., BURMEISTER H. R., WEAVER G. A., MIROCHA C. J. - Toxicity of dietary and intravenously administered moniliformin to broiler chickens. Poult. Sci. 1981, 60 : 1415 - 1417.

- 98 - BURMEISTER H. R., GROVE M. D., KWOLEK W. F. - Moniliformin and butenolide : effect on mice of high-level long term oral intake. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, 40 : 1142 - 1144.
- 99 - THIEL P. G. - A molecular mechanism for the toxic action of moniliformin, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* . *Biochem. Pharmacol.* 1978, 27 : 483 - 486.
- 100 - GELDERBLOM W. C. A., MARASAS W. F. O., STEYN P. S., THIEL P. G., Van Der MERWE K. J., Van ROOYEN P. H., VLEGGAAR R., WESSELS P. L. - Structure elucidation of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme* . *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 122 - 124.
- 101 - GELDERBLOM W. C. A., THIEL P. G., Van Der MERWE K. S., MARASAS W. F. O., SPIES H. S. C. - A mutagen producer by *Fusarium moniliforme* . *Toxicon* 1983, 21 (4) : 467 - 473.
- 102 - ARAI T., ITO T. - Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy. Univ. of Tokyo Press 1970, 1 : 87.
- 103 - ITO T., ARAI T., OHASHI Y., SASADA Y. - Structure of fusariocin C, a cytotoxic metabolite from *Fusarium moniliforme*.. *Agric. Biol. Chem.* 1981, 45 (7) : 1689 - 1692.
- 104 - CALDWELL R. W., TUIITE J., STOB M., BALDWIN R. - Zearalenone production by *Fusarium* species. *Appl. Microbiol.* 1970, 20(1) : 31 - 36.
- 105 - MIROCHA C. J., CHRISTENSEN C.M., NELSON G.H. - Biosynthesis of the fungal estrogen F-2 and a naturally occurring derivative (F-3) by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Microbiol.* 1969, 17 : 482 - 483.
- 106 - MIROCHA C. J., CHRISTENSEN C. M., NELSON G. H. - Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. *Biotechn. Bioeng.* 1968, 10 : 469 - 482.
- 107 - 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.
- 108 - STOLOFF L., NEISHEIM S., YIN L., RODRICKS J. V., STACK M., CAMPBELL A. D. - A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin, and patulin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1971, 54 (1) : 91 - 97.

- 109 - SZATHMARY C. I., MIROCHA C. J., PALYUSIK M., PATHRE S. V. - Identification of mycotoxins produced by species of *Fusarium* and *Stachybotrys* obtained from Eastern Europe. Appl. Environ. Microbiol. 1976, 32 (4) : 579 - 584.
- 110 - LAFONT P., LAFONT J. - Contamination du maïs par des mycotoxins. Bull. Acad. Vét. de France 1980, 53 : 533 - 538.
- 111 - SCOTT P. M., LAWRENCE J. W., Van WALBEECK W. - Detection of mycotoxins by thin layer chromatography : application to screening of fungal extracts. Appl. Microbiol. 1970, 20 (5) : 839 - 842.
- 112 - SCOTT P. M., PANALAKS T., KANHERE S., MILES W. F. - Determination of zearalenone in cornflakes and other corn based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography, and gas liquid chromatography / high resolution mass spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1978, 61 (3) : 593 - 600.
- 113 - THOUVENOT D. R., MORFIN R. F. - Quantification of zearalenone by gas-liquid chromatography on capillary glass columns. J. Chromatogr. 1979, 170 : 165 - 173
- 114 - GHOSAL S., BISWAS K., SRIVASTAVA R. S., CHAKRABARTI D. K., BASU-CHAUDHARY K. C. - Toxic substances produced by *Fusarium* . V : Occurrence of zearalenone, diacetoxyscirpenol and T2 toxin in moldy corn infected with *Fusarium moniliforme* Sheld. J. Pharm. Sci. 1978, 67 : 1768 - 1769.
- 115 - VESONDER R. F., HESSELTIN C. W. - Metabolites of *Fusarium*. Dans *Fusarium*, diseases, biology and taxonomy de NELSON P. E., TOUSSOUN T. A. et COOK R. J. 1981, The Pennsylvania State University Press : 350 - 364.
- 116 - CLAYDON N., GROVE J. F., POPLE M. - Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Fusarium solani* . J. Invertebr. Pathol. 1977, 30 : 216 - 223.
- 117 - HIDAKA H., NAGATSU T., TAKEYA K., TAHEUCHI T., SUDA H., KOJIRI K., MATSUZAKI M., UMEZAWA H. - Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi. J. Antibiot. 1969, 22 : 228 - 230.
- 118 - HIDAKA H. - Fusaric (5-Butylpicolinic) acid, an inhibitor of dopamine b-hydroxylase, affects serotonin and noradrenalin. Nature 1971, 231 : 54 - 55.
- 119 - MATTA R. J., WOOTEN G. F. - Pharmacology of fusaric acid in man. Clin. Pharmacol. Therap. 1973, 14 (4) : 541 - 546.

- 120 - PELLEGRIN F., LAURENT D., KOHLER F., HAMEURT J., BOCCAS B. - Potentiel toxigène des souches de *Fusarium moniliforme* parasitant le maïs en Nouvelle-Calédonie. Microbiol. Alim. Nut. 1986, 4 : 157 - 161.
- 121 - LAURENT D., PELLEGRIN F., KOHLER F., LAMBERT C., HAMEURT J., BOCCAS B., DOMENECH J. - Toxicité aiguë sur canetons Pékin de souches de *Fusarium moniliforme* isolées du maïs en Nouvelle-Calédonie. Microbiol. Alim. Nut. 1986, 5 : 11 - 15.
- 122 - LAURENT D., PELLEGRIN F., KOHLER F., FOUQUET L., LAMBERT C., BOCCAS B. - *Fusarium moniliforme* du maïs en Nouvelle-Calédonie : toxicologie animale. Microbiol. Alim. Nut. 1988, 6 : 159 - 164..
- 123 - KOHLER F., PELLEGRIN F., LAURENT D. - La toxicogénèse chez *Fusarium moniliforme* : nouvelles observations. Microbiol. Alim. Nut. 1988, 6 (2) : 165 - 169.
- 124 - LAURENT D., PLATZER N., KOHLER F., SAUVIAT M. P., PELLEGRIN F. - Macrofusine et micromoniline : deux nouvelles mycotoxines isolées de maïs infesté par *Fusarium moniliforme* Sheld. Microbiol. Alim. Nut. 1989, 7 : 9 - 16.
- 125 - HODGKIN A. L., KATZ B. - The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. 1949, 108 : 37 - 77.
- 126 - HODGKIN A. L., HUXLEY A. F. - Current carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. 1952, 116 : 449 - 472.
- 127 - STAMPFLI R. - A new method for measuring membrane potentials with external electrodes. Experientia 1954, 10 : 508 - 509.
- 128 - PATER C., SAUVIAT M. P. - Voltage clamp of cut-end skeletal muscle fibre : a diffusion experiment. Gen. Physiol. Biophys. 1987, 6 : 305 - 319.
- 129 - ECAULT E., KOHLER F., LAURENT D., PLATZER N., PELLEGRIN F., SAUVIAT M. P. - Inhibition by macrofusin of the calcium current and the mechanical activity in frog heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 1990, 22 : S21.
- 130 - LAURENT D., LANSON M., GOASDOUE N., KOHLER F., PELLEGRIN F., PLATZER N. - Etude en R.M.N. ¹H et ¹³C de la macrofusine, toxine isolée de maïs infesté par *Fusarium moniliforme* Sheld. Analusis, 1990, 18 (1) : i72 - i79.

131 - BREITMAIER E., VOELTER W. - Carbon-13 NMR Spectroscopy High-Resolution Methods and applications in Organic Chemistry and Biochemistry. VCH Publishers 1987.

132 - BAX A., MORRIS G. - An improved method for heteronuclear chemical shift correlation by two dimensional NMR. J. Magn. Reson. 1981, 42 : 501 - 505.

133 - MARECI T. H., FREEMAN R. - Echoes and antiechoes in coherence transfer NMR : determining the signs of double-quantum frequencies. J. Magn. Reson. 1982, 48 : 158 - 163.

134 - BAX A. - Two dimensional heteronuclear relayed coherence transfer spectroscopy. J. Magn. Reson. 1983, 53 : 149 - 153.

135 - BAX A., FREEMAN R. - Investigation of complex networks of spin-spin coupling by two dimensional NMR. J. Magn. Reson. 1981, 44 : 542 - 561.

136 - WAGNER G. - Two dimensional relayed coherence transfer spectroscopy of a protein. J. Magn. Reson. 1983, 55 : 151 - 156.

137 - BAX A., DAVIS D. G. - MLEV-17-based two dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. J. Magn. Reson. 1985, 65 : 355 - 360.

138 - BEZUIDENHOUT S. C., GELDERBLOM W. C. A., GORST-ALLMAN G. P., HORAK R. M., MARASAS W. F. O., SPITELLER G., VLEGGAR R. - Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme* . J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1988, 743 - 745.

139 - LINDEMAN L. P., ADAMS J. A. - Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectrometry. Chemical shifts for the paraffins through C₉. Anal. Chem. 1971, 43 : 1245.

140 - WOESSNER D. E., SNOWDEN B. S., MEYER G. H. - Nuclear spin-lattice relaxation in axially symmetric ellipsoids with internal motion. J. Chem. Phys. 1969, 50 : 719.

141 - HART F. A., MOSS G. P., STANFORTH M. L. - Lanthanide-induced differential shift in N. M. R. spectra of aqueous solutions. Tetrahedron letters 1971, 37 : 3389 - 3392.

142 - LAURENT D., GOASDOUE N., KOHLER F., PELLEGRIN F., PLATZER N. - Carcterisation of cyclonerodiol from corn infested by *Fusarium moniliforme* Sheld. : one and two dimensional ¹H et ¹³C N.M.R. study. Magn. Reson. Chem. 1990, 28 : 662.

143 - NOZOE S., GOI M., MORISAKI N. - Structure of cyclonerodiol. Tetrahedron Letters 1970, 15 : 1293 - 1296.

144 - NOZOE S., GOI M., MORISAKI N. - Synthesis and stereochemistry of cyclonerodiol. Tetrahedron Letters 1971, 40 : 3701 - 3702.

145 - CROSS B. E., MARKWELL R. E., STEWARD J. C. - New metabolites of *Gibberella fujikuroi* - XVI Cyclonerodiol. Tetrahedron 1971, 27 : 1663 - 1667.

146 - EVANS R., HANSON J.R., NYFELER R. - Studies in terpenoid biosynthesis. Part XVII. Biosynthesis of the sesquiterpenoids cyclonerodiol and cyclonerotriol. J. Chem. Soc. Perkin Trans 1 1976, 1214. - 1217

147 - FUJITA T., TAKAISHI Y., TAKEDA Y., FUJIYAMA T., NISHI T. - Fungal metabolites. II Structural elucidation of minor metabolites, valinotricin, cyclonerodiol oxide, and epicyclonerodiol oxide, from *Trichoderma polysporum*. Chem. Pharm. Bull. 1984, 32 (11) : 4419 - 4425.

148 - ANTEUNIS M., DANNEELS D. - Stereochemical aspects of proton chemical shifts III Configurational assignments in pentacyclic systems without recourse to a Karplus equation. O. M. R. 1975, 7 : 345.

149 - LAURENT D., PELLEGRIN F., KOHLER F., COSTA R., THEVENON J., LAMBERT C., HUERRE M. - Fumonisine B₁ dans la pathogénie de la leucoencéphalomalacie équine. Microbiol. Alim. Nut. 1990, 7(3) : 285 - 291..

150 - LAURENT D., PELLEGRIN F., KOHLER F., COSTA R., THEVENON J., DEMERSEMAN P., GUILLAUMEL J., PLATZER N. - Fumonisins A₁ and B₁, and equine leukoencephalomalacia. Appl. Environ. Microbiol. 1990. Soumis à publication.

151 - SEREBRYAKOV E. P., SIMOLIN A. V., KUCHEROV V. F., ROSYNOV B. V. - New metabolites of *Fusarium moniliforme* Sheldon. Tetrahedron 1970, 26 : 5215 - 5223.

152 - OLIVAS E. E., CASAS-CAMPILLO C. - Composicion quimica de *Fusarium moniliforme*. Rev. Soc. Chim. Mex. 1972, 16 (4) : 141 - 144.

153 - STEYN P. S., WESSELS P. L., MARASAS W. F. O. - Pigments from *Fusarium moniliforme* Sheldon. Structure and ¹³C nuclear magnetic resonance assignments of an azaanthraquinone and three naphthoquinones. Tetrahedron 1979, 35 : 1551 - 1555.

- 154 - VISCONTI A., SURICO G., IACOBELLIS N. S., BOTTALICO A. - Produzione di pigmenti da parte di isolati di *Fusarium moniliforme* Sheld. da cereali in Italia e loro attivita antibatterica. *Phytopath. Medit.* 1983, 22 : 152 - 156.
- 155 - JARVIS B. B. - Trichothecenes mycotoxins from the higher plant *Baccharis megapotamica* . Dans *Toxigenic fungi - Their toxins and health hazard* de KURATA H. et UENO Y. 1984, *Development in food science*, Elsevier : 312 - 321.
- 156 - TAMM C., TORI H. - Trichothecenes. Dans *Mycotoxins - Production, isolation, separation and purification* de BETINA V. 1984, *Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam* : 131 - 182.
- 157 - BAMBURG J. R., RIGGS N. V., STRONG F. M. - The structures of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*. *Tetrahedron* 1968, 24 : 3329 - 3336.
- 158 - BAMBURG J. R., MARASAS W. F. O., RIGGS N. V., SMALLEY E. B., STRONG F. M. - Toxic spiro-epoxy compounds from *Fusaria* and other Hyphomycetes. *Biotechnol. Bioeng.* 1968, 10 : 445 - 455.
- 159 - TSUNG-CHE TSENG - Occurence of *Fusarium* mycotoxins in food and feed. *Phytopathologist and Entomologist NTU* 1979 : 10 - 15.
- 160 - UENO Y., SATO N., ISHII K., SAKAI K., TSUNODA H., ENOMOTO M. - Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species. *Appl. Microbiol.* 1973, 25 (4) : 699 - 704.
- 161 - GREENHALGH R., BLACKWELL B. A., PARE J. R. J., MILLER J. D., LEVANDIER D., MEIER R. M., TAYLOR A., APSIMON J. W. - Isolation and characterization by mass spectrometry and NMR spectroscopy of secondary metabolites of some *Fusarium* species. Dans *Mycotoxins and Phycotoxins* de STEYN P. S. et VLEGGAAR R. 1986, *Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam* : 137 - 152.
- 162 - SHOTWELL O. L. - Chemical survey methods for mycotoxins. Dans *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins* de COLE R. J. 1986, *Academic Press Inc.* : 52 - 94.
- 163 - UENO Y., UENO I., AMAKAI K., ISHIKAWA Y., TSUNODA H., OKUBO K., SAITO M., ENOMOTO M. - Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria* II Isolation of fusarenone X from the culture filtrate of *Fusarium nivale* FN 2B. *Jap. J. Exp. Med.* 1971, 41 (6) : 507 - 519.

- 164 - POHLAND A., THORPE C., SPHON J. - The analytical chemistry of deoxynivalenol. Dans *Toxigenic fungi - Their toxins and health hazard* de KURATA H. et UENO Y. 1984, *Development in Food Science* 7, Elsevier : 217 - 230.
- 165 - TAKITANI S., ASABE Y., KATO T., SUZUKI M., UENO Y. - Spectrodensitometric determination of trichothecenes mycotoxins with 4(p-nitrobenzyl)pyridine on silica gel thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.* 1979, 172 : 335 - 342.
- 166 - SCHMIDT R., ZIEGENHAGEN E., DOSE K. - High performance liquid chromatography of trichothecenes. *J. Chromatogr.* 1981, 212 : 370 - 373.
- 167 - MARASAS W. F. O., YAGEN B., SYDENHAM E., COMBRINCK S., THIEL P. G. - Comparative yields of T2 toxin and related trichothecenes from five toxicologically important strains of *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53 (4) : 693 - 696.
- 168 - MIROCHA C. J., PATHRE S. V., PAWLOSKY R. J., HEWETSON D. W. - Mass spectra of selected trichothecenes. Dans *Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins* de COLE R. J. 1986, Academic Press Inc. : 354 - 399.
- 169 - JOFFE A. Z., YAGEN B. - Comparative study of the yield of T2 toxin produced by *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium sporotrichioides* var. *tricinctum* strains from different sources. *Mycopathologia* 1977, 60 (2) : 93 - 97.
- 170 - SUNGSOO LEE, FUN S CHU - Radioimmunoassay of T2 toxin in corn and wheat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1981, 64 (1) : 156 - 161.
- 171 - APSIMON J. W., BLACKWELL B. A., GREENHALG R., MEIER R. M., MILLER D., PARE J. R. J., TAYLOR A. - Secondary metabolites produced by some *Fusarium* species dans *Mycotoxins and Phycotoxins* de STEYN P. S. et VLEGGAAR R. 1986. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam : 125 - 136.
- 172 - TUTELYAN V. A., KRAVCHENKO L. V., ELLER K. I. - Mycotoxins from *Fusarium sporotrichiella* : isolation, structure and some biochemical effects. Dans *Toxigenic fungi - Their toxins and health hazard* de KURATA H. et UENO Y. 1984, *Developments in Food Science*, Elsevier : 282 - 291.
- 173 - UENO Y. - The toxicology of mycotoxins. *CRC critical reviews in toxicology* 1985, 14 (2) : 99 - 132.

- 174 - VESONDER R. F., HALIBURTON J. J. E., BUCK W. B., TUIITE J. F. - Occurrence of *Fusarium moniliforme* on corn associated with equine leucoencephalomalacia. *Phytopathology* (abstr.) 1984, 74 (7) : 879.
- 175 - UENO Y. - Mode of action of trichothecenes. *Ann. Nutr. Alim.* 1977, 31 : 885 - 900.
- 176 - OBARA T., MASUDA E., TAKEMOTO T., TATSUNO T. - Immunosuppressive effect of a trichothecene mycotoxin, fusarenone X, FSN. Dans *Toxigenic fungi - Their toxins and health hazard* de KURATA H. et UENO Y. 1984, *Developments in Food Science*, Elsevier : 301 - 311.
- 177 - SCHOENTAL R. - Relationships of *Fusarium* toxins to tumours and other disorders in livestock. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1981, 4 : 1 - 6.
- 178 - SMALLEY E. B. - T2 toxin. *J. A. V. M. A.* 1973, 163 (11) : 1278 - 1281.
- 179 - SCHOENTAL R. - The role of *Fusarium* mycotoxins in the aetiology of tumours of the digestive tract and of certain other organs in man and animals. *Front Gastrointest. Res.* 1979, 4 : 17 - 24.
- 180 - IH - CHANG HSU, SMALLEY E. B., STRONG F. M., RIBELIN W. E. - Identification of T2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* 1972, 24 (4) : 684 - 690.
- 181 - VESONDER R. F., CIEGLER A., JENSEN A. H. - Isolation of the emetic principle from *Fusarium* infected corn. *Appl. Microbiol.* 1973, 26 (6) : 1008 - 1010.
- 182 - MIROCHA C. J., PATHRE S. - Identification of the toxic principle in a sample of poaeufusarin. *Appl. Microbiol.* 1973, 26 (5) : 719 - 724.
- 183 - MIROCHA C. J. - Hazards of scientific investigation : analysis of samples implicated in biological warfare. *J. Toxicol - Toxin reviews* 1982, 1 (1) : 199- 203.
- 184 - MIROCHA C. J., PAWLOSKY R. A., CHATTERJEE K., WATSON S., HAYES W. - Analysis for *Fusarium* toxins in various samples implicated in biological warfare in Southeast Asia. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1983, 66 (6) : 1485 - 1499.
- 185 - ABBAS H. K., MIROCHA C. J. - Isolation and purification of a hemorrhagic factor (wortmannin) from *Fusarium oxysporum* (N17B). *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54 (5) : 1268 - 1274.

- 186 - WHITE E. P. - Isolation of ($\pm$)-2-acetamido-2,5-dihydro-5-oxofuran from *Fusarium equiseti* . J. Chem. Soc. (C) 1967, 1967 : 346 - 347.
- 187 - YATES S. G., TOOKEY H. L., ELLIS J. J., BURKHARDT H. J. - Mycotoxins produced by *Fusarium nivale* isolated from tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Phytochem. 1968, 7 : 139 - 146.
- 188 - PATHRE S. V., GLEASON W. B., LEE Y., MIROCHA C. - The structure of fusarochromanone : new mycotoxin from *Fusarium roseum* " *graminearum* " . Can J. Chem. 1986, 64 : 1308 - 1311.
- 189 - WEIPING XIE, MIROCHA C. J. - Method of analysis for fusarochromanone in corn and chicken feed and screening *Fusarium* isolates for this toxin. Phytopathology (abst.) 1987, 77 (12) : 1698.
- 190 - YAGEN B., HORN P., JOFFE A. Z., COX R. H. - Isolation and structural elucidation of a novel sterol metabolite of *Fusarium sporotrichioides* 921. J. Chem. Soc. Perkin 1 1980, 1980 : 2914 - 2917.
- 191 - MUNOZ L., CASTRO J. L., CARDELLE M., CASTEDO L., RIGUERA R. - Isolation of three new acetylated mycotoxins from *F. graminearum* cultured on corn. Phytochemistry 1989, 28 (1) : 83 - 85.
- 192 - BURMEISTER H. R., BENNET G. A., VESONDER R. F., HESSELTINE C. W. - Antibiotic produced by *Fusarium equiseti* NRRL5537. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1974, 5 : 634 - 639.
- 193 - BURMEISTER H. R. - Enniantin production by *Fusarium tricinctum* . Phytopathology (abst.) 1986, 76 (10) : 1143.
- 194 - VESONDER R. F., TJARKS L. W., ROHWEDDER W. K., BURMEISTER H. R., LAUGAL J. A. - Equisetin, an antibiotic from *Fusarium equiseti* NRRL5537, identified as a derivative of N-methyl-2,4-pyrrolidone. J. Antibiot. 1979, 32 : 759 - 761.
- 195 - TAKEUCHI M., NAKALIMA M., OGITA T., INUKAI M., KODAMA K., FURUYA K., NAGAKI H., HANEISHI T. - Fosfonochlorin, a new antibiotic with spheroplast forming activity. J. Antibiot. 1989, 62 (2) : 198 - 205.
- 196 - AMMAR M. S., GERBER N. N., Mc DANIEL L. E. - New antibiotic pigments related to fusarubin from *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 1 Fermentation, isolation, and antimicrobial activities. J. Antibiot. 1979, 32 : 679 - 684.
- 197 - CLAYDON N., GROVE J. F., POPLER M. - Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Fusarium larvarum* . J. Invertebr. Pathol. 1979, 33 : 364 - 367.

ANNEXES

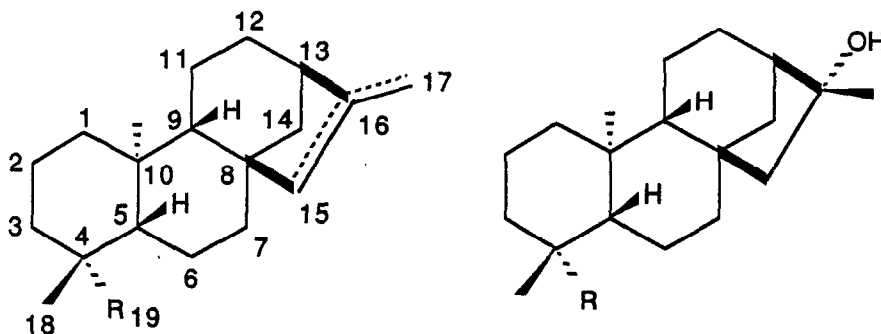
ANNEXES

1) <u>Métabolites secondaires isolés de <i>F. moniliforme</i> ou de <i>Gibberella fujikuroi</i></u>	187
1-1) Diterpénoïdes du groupe (-)-kaurane	187
1-2) N-jasmanoylisoleucine et N-dihydrojasmanoylisoleucine	188
1-3) Cyclonérodol	189
1-4) Acide hydroxy-10 fusarique	189
1-5) Acide hydroxyméthyl-5 furanne carboxylique-2	189
1-6) Stérols	189
1-7) Acides gras	190
1-8) Pigments	191
2) <u>Mycotoxines isolées d'autres espèces de <i>Fusarium</i></u>	192
2-1) Trichothécènes	192
2-1-1) Structures	192
2-1-2) Isolement et purification	193
2-1-3) Détection	193
2-1-4) Toxicité	194
2-2) Wortmannine	196
2-3) Buténolide	196
2-4) Poaéfusarine et sporofusarine	197
2-5) Ipoméanol-4	197
2-6) Fusarochromanone	198
3) <u>Métabolites isolés d'autres espèces de <i>Fusarium</i></u>	198
3-1) Stérols	198
3-2) Dérivés de la zéaralénone	198
3-3) Apotrichothécènes	200
3-4) Culmorine et son dérivé acétonique	200
3-5) Antibiotiques	200
3-6) Acide acétamido-4 butène-2 oïque	202
3-7) Acétyl-2 quinozalinone-4	203
3-8) Cyclonérotiol	203
3-9) Hydroxy-4 myoporone	203
3-10) Dérivés des phytoalexines	203
3-11) Fusamarine	204
3-12) Isocoumarines	204

1) Métabolites secondaires isolés de *F. moniliforme* ou de *Gibberella fujikuroi*

1-1) Diterpénoïdes du groupe (-)-kaurane

Ce sont des intermédiaires biosynthétiques des gibbérellines. A partir de cultures liquides, ils ont été isolés soit des cellules du mycélium, soit du filtrat de culture (115, 151).



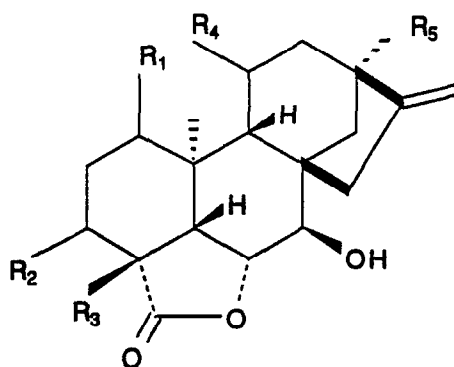
R=Me Δ^{16} : (-)-kaurène-16

R=Me Δ^{15} : (-)-isokaurène-15

R=Me : hydroxy-16 kaurane

R=CHO : hydroxy-16 (-)-kauranecarbaldehyde-4

R=COOH : acide hydroxy-16 (-)-kauranecarboxylique-4



$R_1=R_2=H$, $R_3=Me$, $R_4=R_5=H$: hydroxy-7 kaurénolide

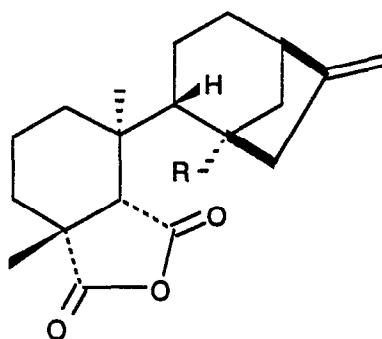
$R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=Me$, $R_4=R_5=H$: dihydroxy-1,7 kaurénolide

$R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=Me$, $R_4=R_5=H$: dihydroxy-3,7 kaurénolide

$R_1=R_2=H$, $R_3=Me$, $R_4=OH$, $R_5=H$: dihydroxy-7,11 kaurénolide

$R_1=R_2=H$, $R_3=CH_2OH$, $R_4=R_5=H$: dihydroxy-7,18 kaurénolide

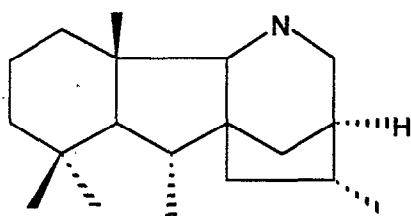
$R_1=R_2=H$, $R_3=Me$, $R_4=H$, $R_5=OH$: dihydroxy-7,13 kaurénolide



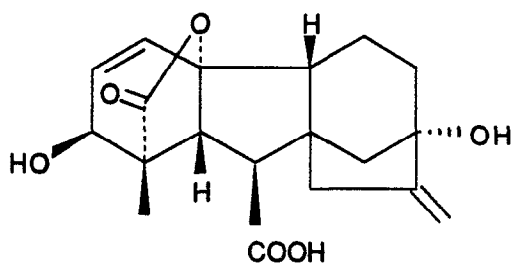
R=CHO : fujénal

R=COOH : acide fujénique

Les gibbérellines, hormones de croissance des plantes isolées de *G. fujikuroi*, sont des acides diterpéniques avec le squelette gibbérellane.



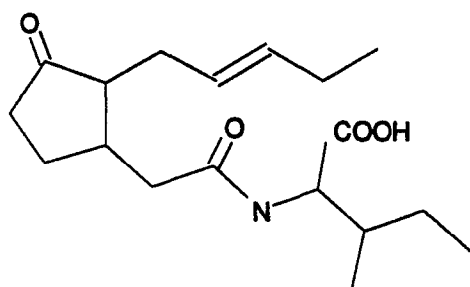
squelette gibbérellane



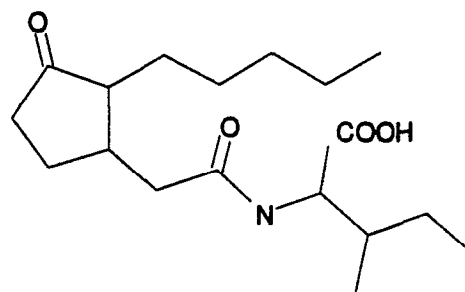
acide gibbérellique : gibbérelline A3

1-2) N-jasmanoylisoleucine et N-dihydrojasmanoylisoleucine.

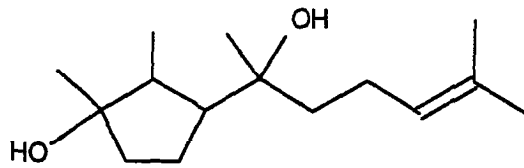
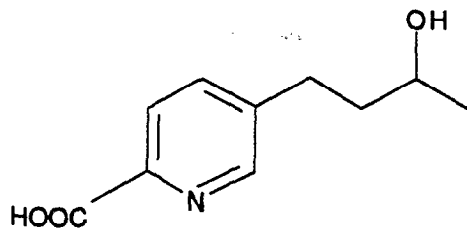
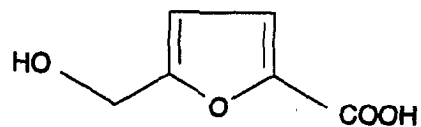
De *G. fujikuroi* (115)



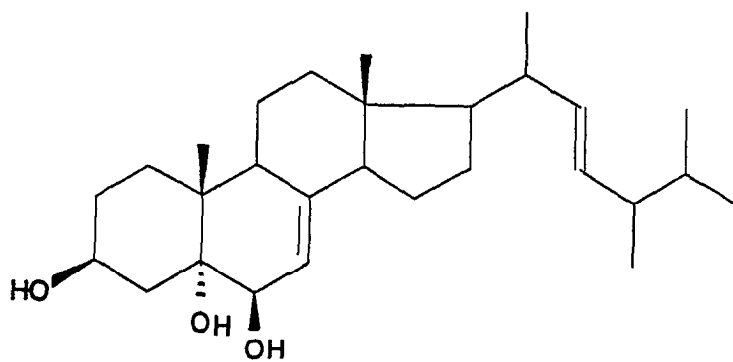
N-jasmanoylisoleucine

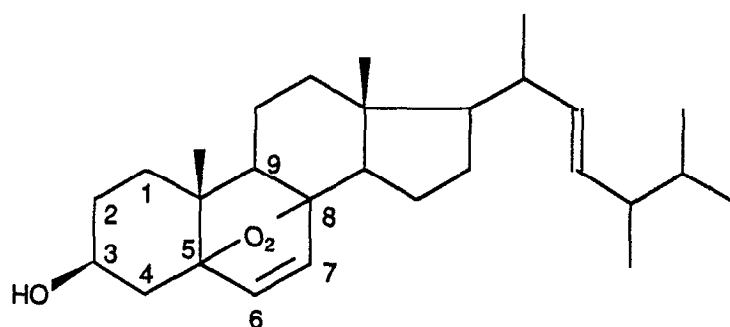
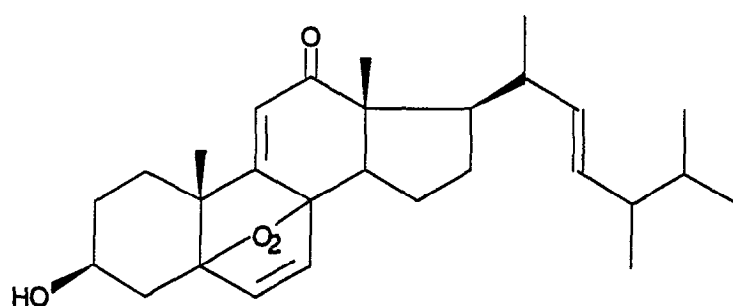
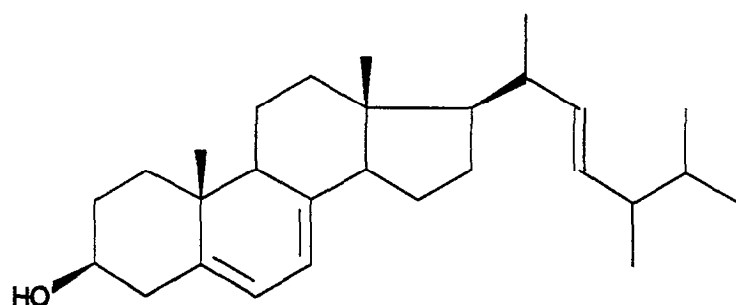


N-dihydrojasmanoylisoleucine

1-3) Cyclonérodol*De G. fujikuroi* (145)**1-4) Acide hydroxy-10 fusarique (ou acide fusarinolique)***De G. fujikuroi* (115)**1-5) Acide hydroxyméthyl-5 furanne carboxylique-2***De G. fujikuroi* (115)**1-6) Stérols**

Trois C28 stérols ont été isolés (151) ainsi que l'ergostérol (152).

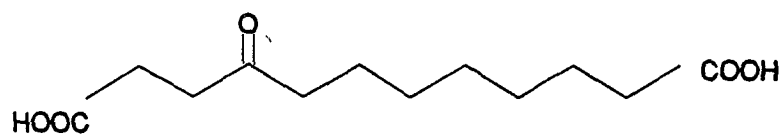
**Cérévistérol**

épidioxy 5 α ,8 α ergostérolépidioxy-5 α ,8 α ergosta triene-6,9(11),22 ol-3 β one-12

Ergostérol

1-7) Acides gras

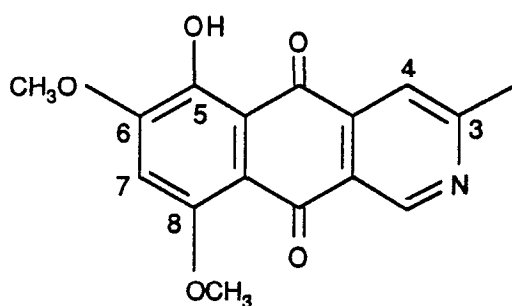
Les acides laurique, myristique, oléique, asélaïque, subérique (151), palmitique, stéarique, linoléique (151, 152), caprique (152) ont été isolés ainsi qu'un nouvel acide, l'acide oxo-4 dodécanedioïque (151)



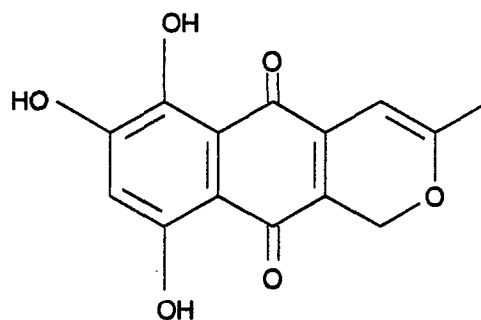
acide oxo-4 dodécanedioïque

1-8) Pigments

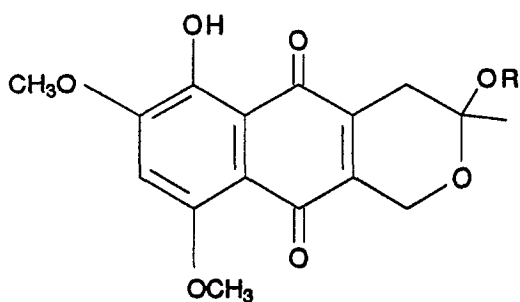
Des pigments rouges de type naphthoquinonique et anthraquinonique ont été isolés (115, 153, 154). La O méthyl-8 bostrycoïdine (diméthoxy-6,8 hydroxy-5 méthyl-3 aza-2 anthraquinone) étant le principal pigment des cultures de *F. moniliforme* (153).



O méthyl-8 bostrycoïdine

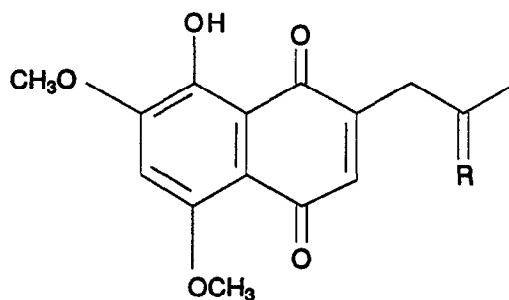


O déméthyl deshydro-3,4 fusarubine



R=H : O méthyl-8 fusarubine

R=Me : O,O diméthyl-3,8 fusarubine

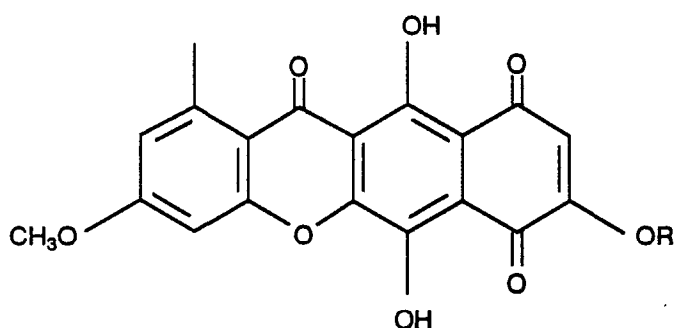


R=O : O méthyl-8 javacine

R=H, OH : O méthyl-8 solaniol

Les pigments de type naphthazarine ont un effet antibactérien sur les gram+ (154). Ils ont aussi des propriétés antifongiques, insecticides et phytotoxiques. Leur pouvoir chélatant des métaux entraîne l'inhibition de certaines réactions enzymatiques (116).

La bikavérine (C₂₀ H₁₄ O₈) a été isolé de maïs inoculé avec des isolats de *F. moniliforme* impliqués dans des cas de LEM (60)



R = Me : bikaverine, lycopersine, passiflorine ou mycogénine

R = H : norbikaverine

2) Mycotoxines isolées d'autres espèces de *Fusarium*.

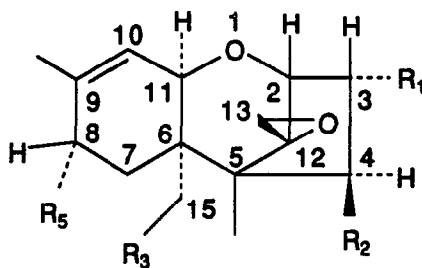
2-1) Trichothécènes

Les trichothécènes appartiennent à une classe de métabolites secondaires ayant une structure bien définie. Ils ont été isolés principalement de cultures de différents genres de champignons (*Trichothecium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon*, *Verticillium*...) et dans quelques cas, de plantes supérieures (*Baccharis*) (155, 156).

2-1-1) Structures

Ce sont des sesquiterpènes avec un squelette tétracyclique époxy-12,13 trichothécène-9. Le cycle époxyde est la partie structurale la plus spécifique de ce groupe de mycotoxines (157, 158).

Suivant les auteurs, ils peuvent être séparés selon les deux groupes suivants (158, 159, 160) :

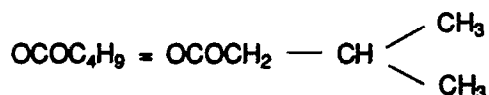


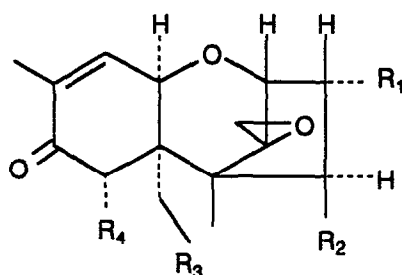
R₁=OH, R₂=OAc, R₃=OAc, R₅=H : diacétoxyscirpénol

R₁=OH, R₂=OAc, R₃=OAc, R₅=OCOC₄H₉ : T₂ toxine (fusariotoxine T2)

R₁=OH, R₂=OAc, R₃=OAc, R₅=OH : néosolaniol

R₁=OH, R₂=OH, R₃=OAc, R₅=OCOC₄H₉ : HT₂ toxine





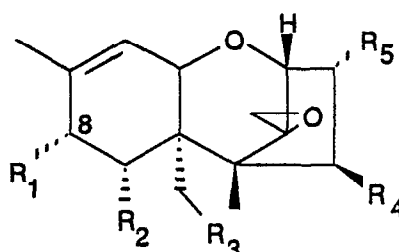
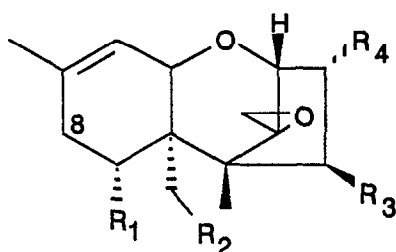
$R_1=OH, R_2=OH, R_3=OH, R_4=OH$: nivalénol

$R_1=OH, R_2=OAc, R_3=OH, R_4=OH$: fusarénone-X

$R_1=OH, R_2=OAc, R_3=OAc, R_4=OH$: diacétoxy-4,15 nivalénol

$R_1=OH, R_2=H, R_3=OH, R_4=OH$: déoxy-4 nivalénol

ou selon la présence ou l'absence d'une fonction oxygénée en position 8 (156) :



	R1	R2	R3	R4		R1	R2	R3	R4	R5
diacétoxyscirpénol	H	OAc	OAc	OH	T ₂ tétraol	OH	H	OH	OH	OH
trichodemmine	H	H	OAc	H	néosolaniol	OH	H	OAc	OAc	OH
scirpentriol	H	OH	OH	OH	T ₂ toxine	OCOC ₄ H ₉	H	OAc	OAc	OH
					HT ₂ toxine	"	H	OAc	OH	OH

2-1-2) Isolement et purification

Divers solvants d'extraction et différents systèmes de fractionnement sont employés eu égard à la diversité de polarité de ces molécules (161, 162, 163).

2-1-3) Détection

Elle peut être soit chimique (94, 114, 164), soit biologique.

Chimiquement, ces principes toxiques sont décelés par chromatographie sur couche mince avec plusieurs systèmes de solvants et visualisés sous lumière visible ou UV à 360 nm, après pulvérisation avec 20 % d'acide sulfurique et chauffage à 100°C pendant 10 à 20 min (110, 111, 160), par détermination

spectrodensimétrique (165), par chromatographie liquide à haute performance (166), ou par chromatographie en phase gazeuse (167) éventuellement associée à la spectrométrie de masse (168).

Biologiquement, leur présence peut être mise en évidence par test dermonécrosant sur la peau de rats ou de lapins (62, 70, 169), par test d'inhibition de la germination du pollen du tabac (80), par l'examen de l'effet inhibiteur sur la synthèse protéique des réticulocytes de lapin (87, 160), par la détection histologique d'effets radiomimétiques chez la souris (160) ou le singe (45) ou bien par radioimmunoessais avec un anticorps spécifique pour la T2 toxine (170).

Les espèces de *Fusarium* connues pour produire un ou plusieurs trichothécènes, ou dérivés, sont *F. tricinctum*, *F. solani*, *F. roseum*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. lateritium*, *F. rigidiusculum*, *F. episphaeria*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. heterosporum*, *F. culmorum*, *F. scirpi*, *F. diversisporum*, *F. sambucinum*, *F. anguioides* (65, 68, 79, 156, 159, 160, 169, 171, 172, 173) et *F. moniliforme* (114). La production de ces métabolites par cette dernière espèce est incertaine; en effet, un seul rapport de Ghosal et coll. mentionne la production de diacétoxyscirpénol et de T2 toxine par un isolat indien, mais il n'a pas été confirmé, alors que d'autres auteurs n'en ont pas décelé dans leurs isolats (7, 93, 96, 160, 174). On peut cependant mentionner les effets toxiques obtenus par Joffe et coll. dans le test de dermonécrose sur peaux de lapin avec 74 sur 85 isolats israéliens (63) et ceux obtenus par Vesonder et coll. avec des isolats de *F. moniliforme* associés à des cas de LEM de Caroline du Nord (la T2 toxine et la vomitoxine n'y furent pas décelées) (60).

2-1-4) Toxicité

Les trichothécènes sont les plus puissantes "petites" molécules parmi les produits naturels qui inhibent la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes (88, 168, 160, 175). La cytotoxicité de la fusarénone X sur les cellules HeLa est de 0,32 µg/kg (163).

Ils peuvent aussi avoir un effet immunosuppresseur (176, 177).

La plupart de ces composés possède une activité antifongique. Par exemple, la trichothécine (isolée de *Trichothecium sp*) est utilisée dans le traitement des graines de coton (158).

La toxicité des trichothécènes sur les réticulocytes de lapins et les souris est représenté dans le tableau suivant :

	DI50 dans les réticulocytes µg/ml	DL50 sur souris mâles mg/kg
Type A		
T2 toxine	0,03	5,2
DAS	0,03	23
néosolaniol	0,3	14,5
HT2 toxine	0,03	9

Type B

nivalénol	3	4,1
fusarénone X	0,3	3,3 (163)
diacétoxy-nivalénol	0,1	9,6

Pour la T2 toxine, la DL50 est de 4 mg/kg chez le rat et la truie (178) et de 1,75 mg/kg chez le poussin de 1 jour (79); pour la diacétoxy-scirpénol, elle est de 0,75 mg/kg chez le rat par voie intrapéritonéale et de 7,3 mg/kg par voie orale (77); l'HT2 toxine enregistre une DL50 de 6,25 mg/kg chez le poussin de 1 jour (79).

L'effet dermonécrosant sur peau de lapin est très important. La T2 toxine a une dose efficace moyenne inférieure à 0,16 µg et celle de la HT2 toxine est comprise entre 0,16 et 0,32 µg. (79).

Les trichothécènes sont aussi fortement phytotoxiques (77, 75, 79).

Les effets induits expérimentalement par la T2 toxine chez les animaux, en aiguë ou en chronique sont locaux et systémiques. Parmi les effets aigus, les problèmes hémorragiques et gastro-intestinaux prédominent. Les rongeurs qui survivent au traitement plusieurs mois développent des lésions cardiovasculaires et des tumeurs (bénignes ou malignes) de l'estomac, du duodénum, du pancréas et du cerveau (166). Sur le singe, en administration chronique de T2 toxine, des effets radiomimétiques sont enregistrés avec une pancytopenie progressive et fatale (45). Chez la souris de tels effets (dégénérescence cellulaire et caryorrhexie des cellules en division) sont visibles sur le thymus, la moelle épinière, le petit intestin, les testicules et les ovaires (160). Les caractéristiques biochimiques d'un empoisonnement par la T2 toxine sont une baisse des protéines du sérum, du foie et du thymus, une réduction de l'activité de quelques enzymes hépatiques et du sérum, et une activation des enzymes du thymus (172).

Le groupe estérifié en C8 de la T2 toxine peut être essentiel dans l'action carcinogénique, en analogie avec les alcaloïdes pyrrolizidine hépatocarcinogéniques (179).

En 1972, aux Etats Unis, il a été montré que l'empoisonnement d'un troupeau de bétail laitier était associé à l'ingestion par les animaux de maïs contaminé par la T2 toxine au taux de 2 mg/kg. Les lésions observées comprenaient des plages hémorragiques et des nécroses des muqueuses (178, 180).

La vomitoxine (déoxy-4 nivalénol) provoque un refus de nourriture et des vomissements chez les porcs, entraînant une baisse de poids importante de l'animal (64, 65, 181).

Une souche de *F. sporotrichioides*, isolée d'un millet associé à une aleucie toxique alimentaire (ATA) humaine en Russie, a été reconnue comme extrêmement productrice de trichothécènes (T2 toxine : 1,3 g/kg de maïs en culture) et surtout beaucoup plus productrice que d'autres isolats de *F. poae* ou de *F. sporotrichioides*.

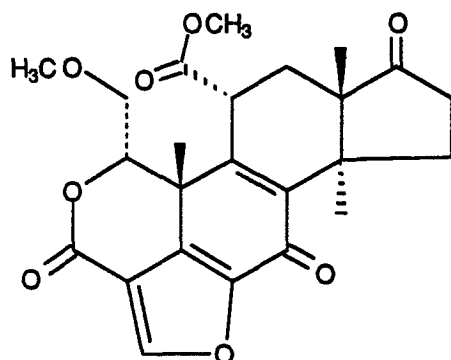
de Russie et de *F. sporotrichioides* var. *poae* des U. S. A. Il est donc possible que la T2 toxine soit responsable de cette maladie qui, entre 1942 et 1947, provoqua la mort dans certaines collectivités russes de plus de 10 % de la population (109, 160, 167, 169, 182).

Les trichothécènes sont impliqués dans la mycotoxicose des animaux de ferme, mais aussi des humains, à tel point qu'ils ont été utilisés comme arme chimique en Asie du Sud-Est (183, 184).

Par contre, l'absence de production de T2 toxine, de diacétoxyscirpénol et de vomitoxine par des isolats de *F. moniliforme* provoquant la leucoencéphalomalacie équine (60) et des phénomènes d'hépatocarcinogénicité chez le rat montre que les trichothécènes ne sont pas responsables des pathologies provoquées par ce champignon (93).

2-2) Wortmannine

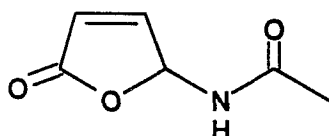
Isolé de *F. oxysporum* et *F. sambucinum* (185).



Cette toxine (déjà isolée de *Penicillium wortmannii* et *Myrothécium roridum*) provoque des effets toxiques chez le rat comme le refus de nourriture, la perte de poids, des hémorragies dans l'estomac, les intestins, le cœur et le thymus, pour aboutir à la mort.

2-3) Buténolide (acétamido-2 dihydro-2,5 oxo-5 furanne ou acide acétamido-4 hydroxy-4 buténoïque-2 c-lactone)

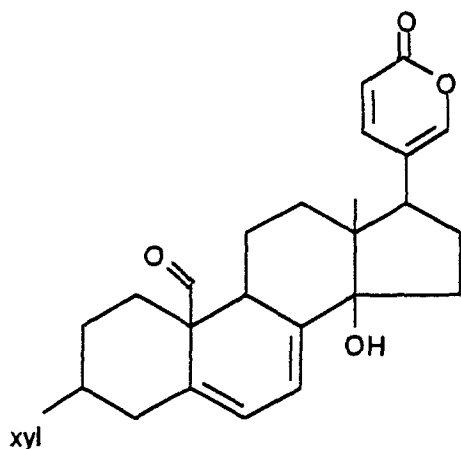
Isolé de *F. equiseti* (186) et de *F. nivale* (187)



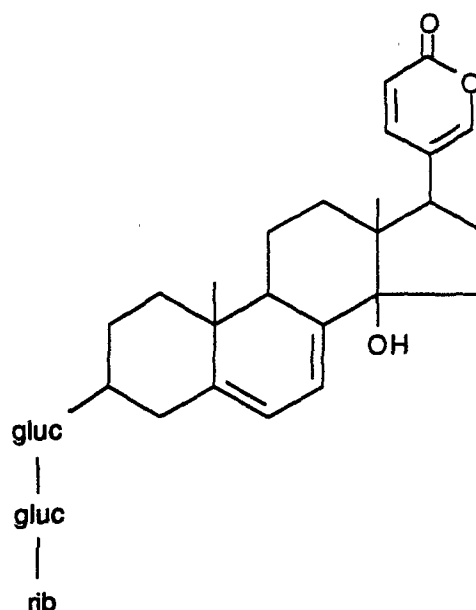
Ce composé a une DL50 (souris) de 43 mg/kg en intrapéritonéale et de 275 mg/kg en *per os*. Il provoque un effet dermonécrosant sur la peau de lapin ou de souris. En chronique, les souris développent des pétéchies hémorragiques, des inflammations gastriques, des ulcères gastriques et œsophagiques (98).

2-4) Poaéfusarine et sporofusarine

Isolés de *F. poae* et *F. sporotrichioides* (115, 182)



poaefusarine (xyl : xylose)

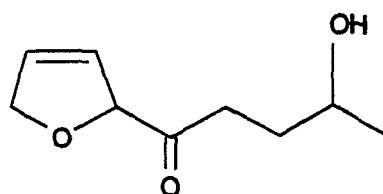


sporofusarine (gluc : glucose; rib : ribose)

Ces métabolites ont été incriminés dans l'aleucie toxique alimentaire en URSS, mais ces résultats ont été remis en question (109).

2-5) Ipoméanol-4

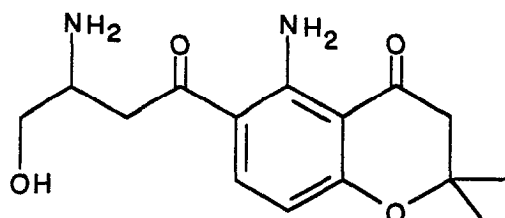
de *F. javanicum* (115).



Cette mycotoxine provoque des œdèmes et des effusions pleurales chez la souris.

2-6) Fusarochromanone

De *F. roseum* (188).

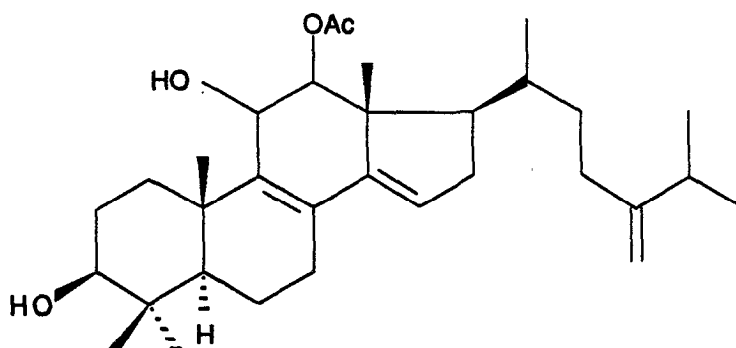


Elle provoque une dyschondroplasie chez la poule et réduit le pouvoir d'éclosion des oeufs fécondés (188, 189).

3) Métabolites isolés d'autres espèces de *Fusarium*.

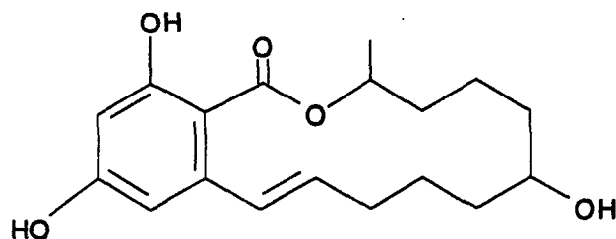
3-1) Stérols

Outre des stérols comme le β sitostérol, le camphestérol, le stigmastérol et l'ergostérol, il a été isolé un nouveau stérol de *F. sporotrichioides* 921, qui avait été associé à une aleucie toxique alimentaire (190).

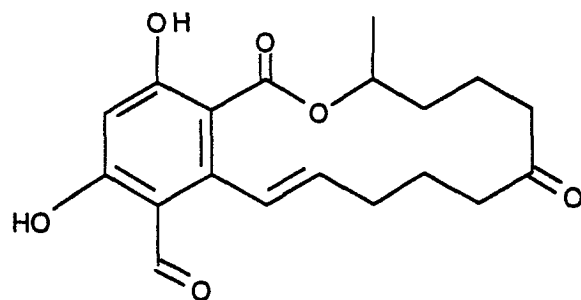


3-2) Dérivés de la zéaralénone

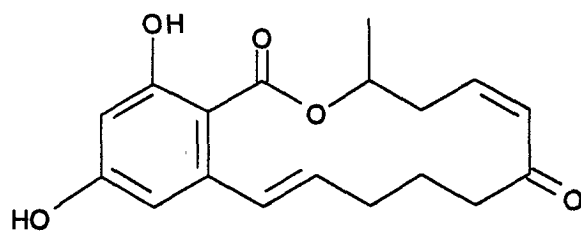
De *Gibberella zeae* (115)



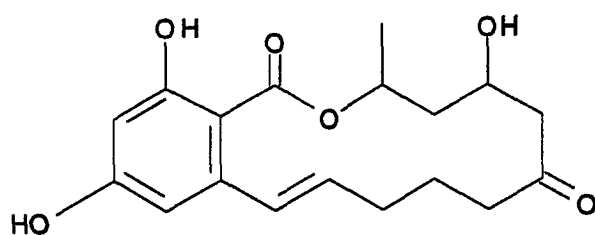
zéaralénol



formyl-5 zéaralénone

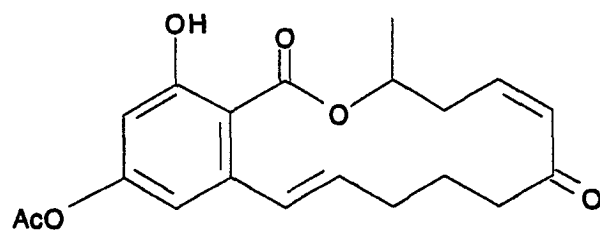


déhydro-7',8' zéaralénone



hydroxy-8' zéaralénone

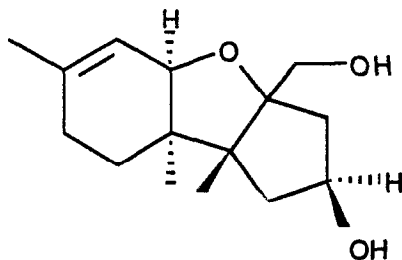
De *F. graminearum* (191)



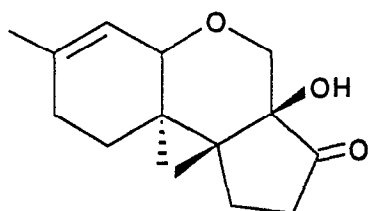
zéaralénone monoacétate-4

3-3) Apotrichothécènes (dihydroxy-3 α ,13 apotrichothécène-9)

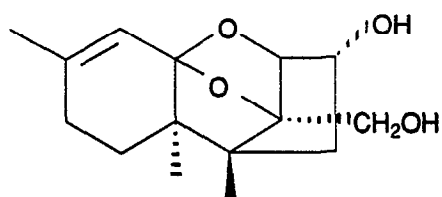
De *F. roseum* (171)



dihydroxy-3 α ,13 apotrichothécène



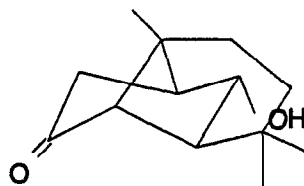
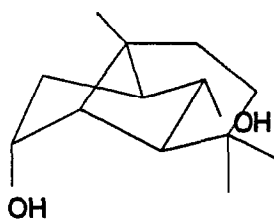
sambucoine



sambucinol

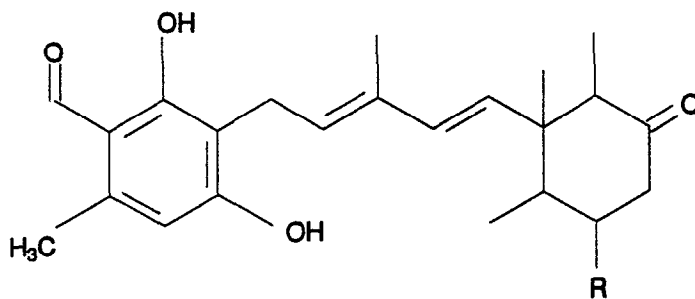
3-4) Culmorine et son dérivé cétonique.

De *F. roseum* (171)

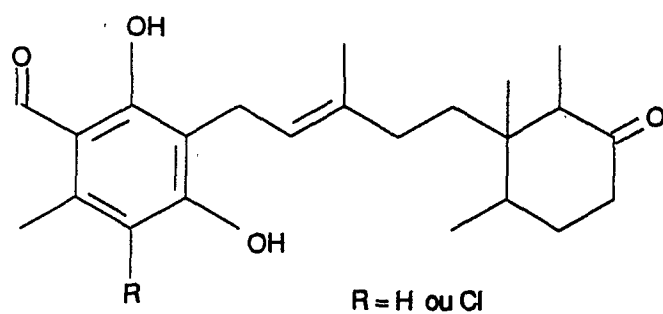
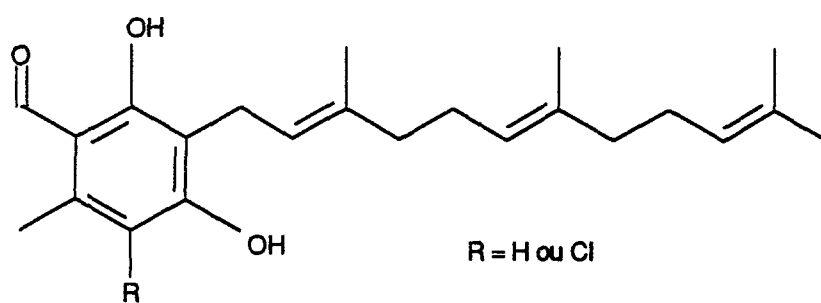


3-5) Antibiotiques.

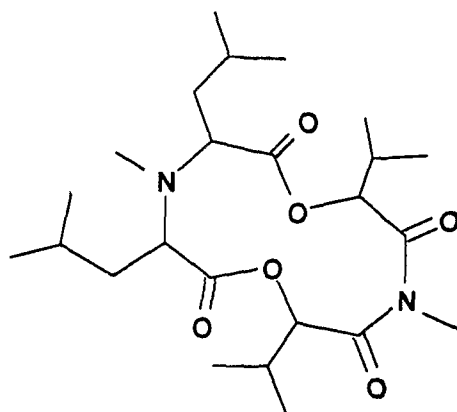
LL 1272 de *Fusarium* sp. (115, 192)



R = H ou OCOCH₃

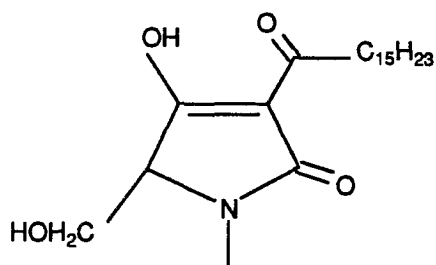


L'enniantine C de *F. tricinctum* (193) qui est aussi un inhibiteur de la croissance de plantes.

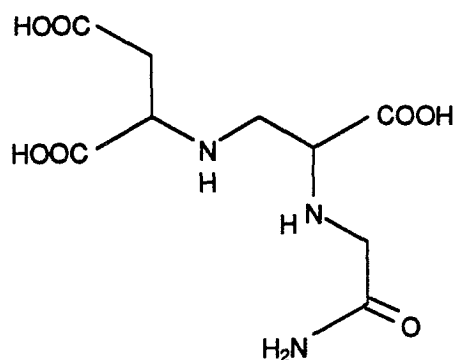


enniantine C

L'équisétine de *F. equiseti* (194) et la lycomarasmine de *F. lycopersici* (115).

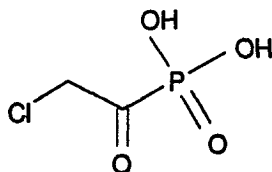


équisétine



lycomarasmine

La fosfonochlorine isolée de *F. avenaceum*, *F. oxysporum* et *F. tricinctum* a un effet antibiotique avec formation de sphéroplastes (195).

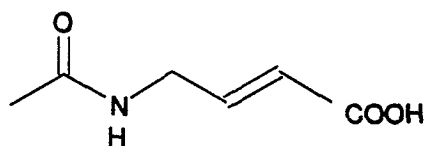


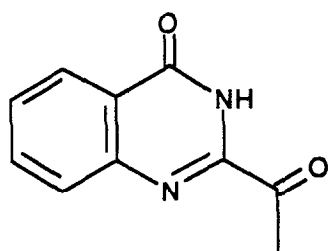
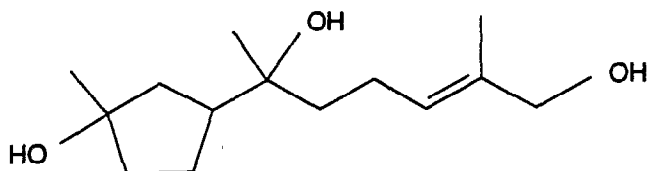
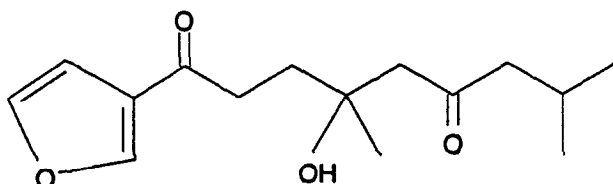
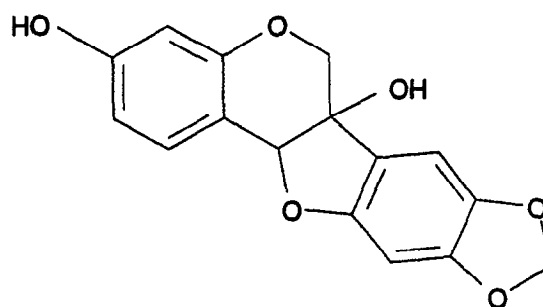
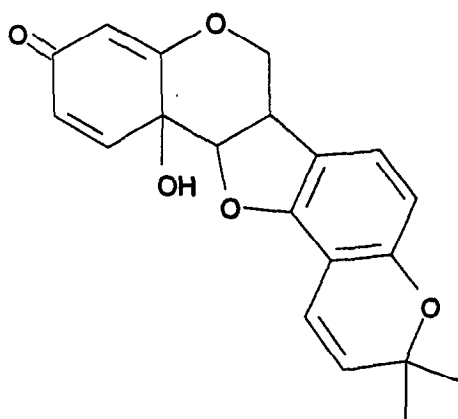
fosfonochlorine

Des pigments naphthoquinoniques liés à la fusarubine et ayant de légères activités antibactériennes ont aussi été isolés de *F. solani* (196).

3-6) Acide acétamido-4 butène-2 oïque

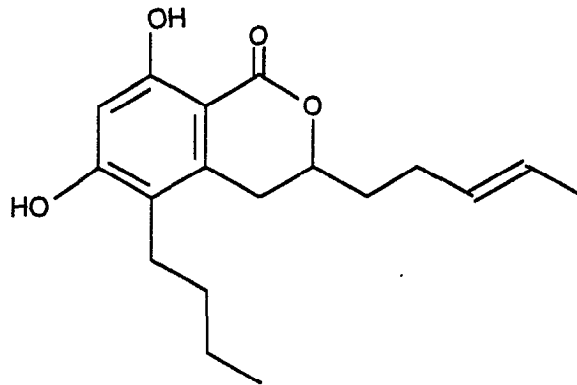
De *F. graminearum* (115)



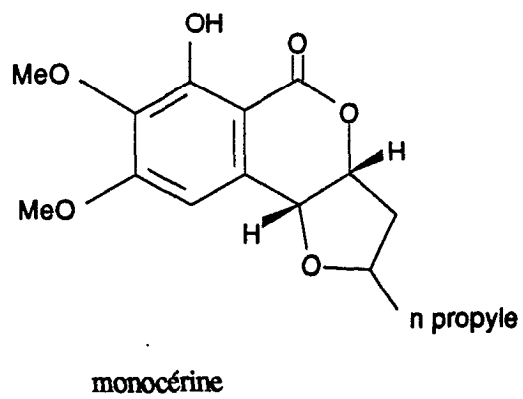
3-7) acétyl-2 quinazolinone-4*De F. culmorum* (115)**3-8) Cyclonérotriol.***De F. culmorum* (115)**3-9) Hydroxy-4 myoporone***De F. solani* (115)**3-10) Dérivés des phytoalexines***De F. solani* (115)

3-11) Fusamarine

De *Fusarium sp.* (115)

**3-12) Isocoumarines**

De *F. larvarum*. Ils ont des propriétés insecticides (197).



ISBN : 2-7099-1048-9
Éditions de l'ORSTOM
72, route d'Aulnay
93143 BONDY Cedex