



## ETUDE DES AFLATOXINES AU BURKINA FASO :

DETERMINATION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES AFLATOXINES DE  
L'ARACHIDE PAR DES TESTS BIOCHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES

---

**THESE DE DOCTORAT DE SPECIALITE :**  
**Sciences Biologiques Appliquées**

**OPTION : BIOCHIMIE / MICROBIOLOGIE**  
**(Immunologie)**

Présentée par

**Philippe Augustin NIKIEMA**

Soutenu le 25 Février 1993  
devant la commission d'examen :

**Président : M Faustin Sié SIB, Professeur, Université de Ouagadougou**  
**Examineurs : MM - Francis FUMOUX, Professeur, Université de Marseille-Luminy**  
**- Robert SOUDRE, Professeur, Université de Ouagadougou**  
**- Alfred S. TRAORE, Professeur, Université de Ouagadougou**

# SOMMAIRE

	<u>PAGES</u>
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1. Avant propos.....	2
2. Données Bibliographiques.....	4
2.1. Les aflatoxines: histoire, structure et nomenclature.....	4
2.2. Les champignons producteurs d'aflatoxines : distribution géographique et conditions de croissance..	7
2.3. Biosynthèse des aflatoxines.....	8
2.3.1. Voie biosynthétique des aflatoxines.....	8
2.3.2 Facteurs influençant la production des aflatoxines	11
2.4. Effets de la consommation de produits contaminés par les aflatoxines sur la santé humaine et animale.....	11
2.4.1. Aflatoxines et santé animale.....	12
2.4.1.a. Effets de toxicité aiguë.....	12
2.4.1.b. Effets de toxicité chronique.....	14
2.4.1.c. Carcinogénèse due aux aflatoxines.....	14
2.4.2. Aflatoxines et santé humaine.....	18
2.4.2.a Aflatoxicoses aiguës.....	18
2.4.2.b Aflatoxicoses chroniques.....	18
2.5. Impact économique des aflatoxines.....	20
2.6. Limitations et réglementations en matière d'aflatoxines	21
2.7. Méthodes d'analyse des aflatoxines.....	26
2.8. Surveillance de l'infestation par <i>Aspergillus flavus</i> et la contamination par les aflatoxines.....	27

2.8.1. Mesures préventives.....	27
2.8.1.a. Contrôles culturales.....	27
2.8.1.b. Contrôles chimiques.....	28
2.8.1.c. Contrôles biologiques.....	28
2.8.2. Résistance génétique à l'invasion et à la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i>	28
2.8.3. Ségrégation et détoxification.....	29
2.8.3.a. Méthodes physiques de séparation.....	29
2.8.3.b. Méthodes physiques de détoxification...	29
2.8.3.c. Méthodes biologiques de détoxification.	30
2.8.3.d. Méthodes chimiques de détoxification..	30
 CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	 32
1 Echantillonnage.....	33
1.1. Evaluation de la contamination.....	33
1.2. Evolution des paramètres physico-chimiques au cours du stockage.....	34
1.3. Cancer primitif du foie et aflatoxines.....	34
2. Conditions de conservation.....	34
3. Détermination de la teneur en eau.....	34
4. Détermination de la matière grasse.....	35
5. Détermination de la teneur en protéines totales.....	35
6. Dosage des glucides totaux.....	35
7. Détermination de la capacité d'absorption en eau des graines.....	36
8. Extraction et dosage des aflatoxines.....	36
8.1. Dosage immunoenzymatique de l'aflatoxine B1.....	36
8.2. Dosage des aflatoxines par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	42
9. Culture cellulaire.....	43
9.1. Obtention de la souche d' <i>Aspergillus flavus</i> .....	43
9.2. Obtention de spores et production d'aflatoxines.....	43

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	45
1. Evaluation de la contamination de l'arachide et des produits de l'arachide par les aflatoxine.....	46
2. Evolution des paramètres physico-chimiques et production d'aflatoxines dans des graines d'arachide au cours du stockage..	54
3. Effets probables de la contamination par les aflatoxines en pathologie humaine (cancer du foie).....	67
4. Isolement et caractérisation d'une souche d' <i>Aspergillus flavus</i> productrice d'aflatoxines.....	74
5. Inhibition de la croissance et de la production d'aflatoxines d'une souche d' <i>Aspergillus flavus</i> .....	82
6. Conclusion générale et perspectives .....	88
BIBLIOGRAPHIE.....	91
ANNEXES.....	103

A mon père "in memoriam".

A ma mère pour tous les sacrifices consentis.

A mon épouse Olga KABORE pour son affection,  
sa compréhension, sa patience.

A mes enfants Francine et Roseline NIKIEMA,  
source de mes efforts.

A mes frères et soeurs

A la famille Jean CHARLEUX pour leur affection  
et leur soutien.

"Car lorsque je suis faible,  
c'est alors que je suis fort."  
(2 Corinthiens 12 : 10).

# **REMERCIEMENTS**

Nous remercions messieurs les membres du jury :

Mr. le Professeur Faustin Sié SIB,

Mr. le Professeur Robert SOUDRE,

Mr. le Professeur Francis FUMOUX,

Mr. le Professeur Alfred S. TRAORE,

qui ont accepté de juger ce travail.

Au terme de ce parcours, je remercie très sincèrement monsieur le Professeur Alferd S. TRAORE, mon directeur de Thèse qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire. Il a pris sur lui et très tôt, de me guider sur cette voie noble de la Science. Au delà de la rigueur scientifique et de l'amour de la recherche qu'il m'a communiqués, j'ai rencontré en lui un grand frère patient et compréhensif. Qu'il soit assuré de ma constante disponibilité et de mon affection fraternelle.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Bharat SINGH "in memoriam", Professeur au Peanut CRSP, Alabama A&M University, qui n' a ménagé aucun effort à travers le projet Peanut CRSP, pour que ce travail soit réalisé. Je témoigne ma profonde sympathie à sa famille éplorée.

Je voudrais ici témoigner ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Francis FUMOUX de l'Université de Marseille-Luminy, pour sa constante disponibilité et pour le soutien moral et matériel qu'il m'a apporté. Une bonne partie de ce travail n'aurait pas été effectuée sans son concours. Il a malgré ses multiples occupations, accepté d'examiner ce travail avec une extrême diligence, et j'ai acquis à travers ses conseils, plus d'expérience et de capacité d'analyse scientifiques. Puisse t-il être assuré de mes sentiments filiaux respectueux.

Je ne saurais oublier Monsieur Pierre QUERINJEAN, D<sup>r</sup> Sci., mon promoteur de DEA à l'Université Catholique de Louvain (Belgique). Il a été en outre un des initiateurs de ce travail ; qu'il retrouve à travers ce document, le fruit de ses efforts et de son soutien à mon égard.

Je remercie les responsables des laboratoires d'Entomologie et de Phytopathologie de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST), pour leur collaboration dans l'exécution de ce travail.

Je remercie monsieur le Directeur du Centre Hospitalier National Yalgado OUEDRAOGO, et monsieur le Chef de Service de la Banque de sang et son personnel qui m'ont permis d'effectuer des analyses au laboratoire d'Immunologie de la Banque de sang. Puisse cet esprit de collaboration se renforcer pour plus d'efficacité dans la Recherche Scientifique.

Je voudrais aussi exprimer ma profonde reconnaissance au Dr. P. Daniel ILBOUDO du Service de Gastro-Hépto-Entérologie du CHNYO, qui m'a permis d'obtenir des données hospitalières sur le cancer du foie. Qu'il retrouve à travers ces quelques lignes ma gratitude et ma sympathie.

Je remercie monsieur le Directeur de l'Institut National de la Statistique et de la Démographie (INSD) et son personnel, qui m'ont permis d'obtenir les données démographiques de la ville de Bobo Dioulasso.

J'exprime ma profonde gratitude à tous ceux qui ont été à la base de la réalisation matérielle de ce mémoire en particulier, messieurs Cyril GOUNGOUNGA, Jérôme ZABRE, Bernard COMPAORE, Patrice NIKIEMA, Philippe KABORE, Emile BOUNKOUNGOU. Qu'ils reçoivent au centuple ce témoignage de leur solidarité à mon égard.

J'ai rencontré soutien et conseils de la part du personnel enseignant du Département de Biochimie/Microbiologie de la FAST ; qu'ils retrouvent à travers ces lignes mon sincère merci.

Je traduis ici, ma reconnaissance au personnel du Laboratoire de Biotechnologie et de Technologie Alimentaire, pour l'ambiance et la collaboration agissante dont j'ai bénéficié tout au long de ce travail. Je remercie en particulier les techniciens du laboratoire et mes collègues de promotion : madame Hagrétou SAWADOGO, messieurs Dayeri DIANOU et Souandamé KONLANI, pour tout ce que nous avons partagé ensemble.

Enfin, je remercie mesdames Philomène OUATTARA et Maïmouna KAMBOU pour l'assistance combien précieuse qu'ils m'ont apportée dans la confection de ce mémoire.

Nous remercions l'Université d'Alabama et le projet Peanut Collaborative Research Support Programme (CRSP) qui nous ont apporté un financement matériel et technique fort appréciable dans l'exécution de ce travail, à travers le projet Peanut CRSP Grant n° Dans-4048-G-SS-2065-00.

# ABSTRACT

This work is dealing with the study of aflatoxin contamination of groundnuts in Burkina Faso. In this country, almost 100.000 tons of groundnuts are harvested per year, and are consumed under different forms :

- Peanut kernels
- Boiled or roasted peanuts
- Peanut pastes
- Peanut butter
- Defated peanut and suggar nuts.

The quantitative and qualitative evaluation of aflatoxin contamination of peanuts and peanut products showed that the four major aflatoxins (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) are found in peanuts, more often at levels higher than the permissible limite of 30µg/kg, and often, higher than the toxicity level of 250µg/kg.

A registration of physico-chemical parameters evolution and aflatoxin production in peanuts during a storage period of 12 mounths is studied. The alteration of physico-chemical parameters (proteins, faty acids and carbohydrates) is accompanied by an enhancement in aflatoxin production. The seed moisture content, the metabolism of faty acids and the hygrosopic capacity of seeds seemed to be the main factors that influence aflatoxin production during the storage.

A risk estimate of primary liver cancer due to the consumption of peanut pastes contaminated by aflatoxins is evaluated in a population of Bobo Dioulasso (S.W. of the country). Preliminary results shown that a regular intake of peanut pastes contaminated by aflatoxins may induce liver cancer after 35 years or 17 years of the intake meal, depending on the consumption frequency.

In order to conduct a research on detoxification strategies, a strain of *Aspergillus flavus* producing aflatoxins is isolated. Inhibition assays of growth and aflatoxin production made on this strain with *Allium sativum* extracts gave the following conclusions :

- The mould growth is progressively reduced when cultivated on medium containing 10% and 20% of Allium extracts.
- The inhibition of aflatoxin production is complete after 30 days of a culture incubation on Reddy medium containing 20% of Allium extracts.

**Key words** : Aflatoxins, Peanuts, *Aspergillus flavus*, Physico-chemical parameters, Primary liver cancer, Inhibition, *Allium sativum*, Burkina Faso.

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

AF	=	Aflatoxines
AFB <sub>1</sub>	=	Aflatoxine B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	=	Aflatoxine B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	=	Aflatoxine G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	=	Aflatoxine G <sub>2</sub>
AFM <sub>1</sub>	=	Aflatoxine M <sub>1</sub>
AFM <sub>2</sub>	=	Aflatoxine M <sub>2</sub>
AFB <sub>1</sub> -dhd	=	Aflatoxine B <sub>1</sub> dihydrodiol
A.T.A	=	Alimentary Toxic Aleukia
BHA	=	Butyl-hydroxyanisol
CCM	=	Chromatographie sur Couche Mince
CCMHP	=	Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance
CLHP	=	Chromatographie Liquide Haute Performance
CITEC	=	Consortium International de Technologie
DL <sub>50</sub>	=	Dose létale 50 %
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
EEC	=	European Economic Community
FAO	=	Food and Agricultural Organization
FDA	=	Food and Drug Administration
HBV	=	Hépatite B Virale
IARC	=	International Agency for Research on Cancer
OMS	=	Organisation Mondiale de la Santé
HR	=	Humidité Relative
IP	=	Intrapéritonéale
NRRL	=	Northern Regional Research Laboratory
ppb	=	Partie Par Billion
PO	=	Per Os
RMN	=	Résonance Magnétique Nucléaire
SOFIVAR	=	Société de Financement et de Vulgarisation de l'Arachide

Le kit TRANSIA permet un dosage des aflatoxines à la fois à des taux élevés ou à de faibles taux de contamination.

La sensibilité du test varie en fonction de la dilution de l'extrait employée (tableau II.1).

**Tableau II.1.** : Sensibilité du test ELISA du kit TRANSIA en fonction de la dilution de l'extrait employée.

dilution de l'extrait	sensibilité du test en ppb
1/3	1 à 10
1/15	5 à 50
1/75	25 à 250
1/375	125 à 1250

### **\*Mode opératoire**

Afin de réaliser le test dans les conditions optimales, les réactifs doivent être ramener à la température ambiante.

#### Distribution de l'étalon AFB<sub>1</sub> et des extraits d'échantillons

##### ***étalon AFB<sub>1</sub>***

Les solutions étalons AFB<sub>1</sub> sont distribuées de la manière suivante:

- témoin négatif (0 % d'inhibition)

Déposer 50 ml de témoin négatif dans les puits A1, A2.

## **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

## 1. - AVANT PROPOS

Le Burkina Faso est l'un des grands pays producteurs/consommateurs de l'arachide en Afrique de l'Ouest. La production d'arachide pour la campagne agricole 1988-1989 a été de 160.220 tonnes et de 152.240 tonnes pour la campagne 1989-1990 (Annexe 1).

La quasi totalité de la production d'arachide est consommée au Burkina Faso sous diverses formes :

- Cacahuètes crues, cuites ou grillées (marba tiguè)
- Pâtes d'arachide
- Huiles à base d'arachide
- Tourteaux d'arachide.

Si l'arachide constitue un apport lipidique, protéique et glucidique fort appréciable dans l'alimentation (44 - 56 %, 22 - 30 % et 12 - 20 % respectivement), sa consommation et celle de ses produits dérivés pourraient revêtir des conséquences pathologiques non moins négligeables pour l'Homme et le bétail. Il est ainsi apparu dans la culture et le stockage de l'arachide, des champignons parasites (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*) qui produisent des mycotoxines (aflatoxines) dont certaines (AFB<sub>1</sub> et AFG<sub>1</sub>) sont à l'origine de carcinomes hépatocellulaires pour l'Homme et les animaux.

En outre, il y ' aurait une interaction entre l'exposition aux aflatoxines et d'autres pathologies telles, les infections à HBV (hépatite B Virale).

Le problème des aflatoxines est mondial et au Burkina Faso, une étude sur les aflatoxines dans l'arachide est nécessaire à plus d'un titre :

1) Elle permettra dans un premier temps de savoir quel est le degré de contamination des produits et sous produits de l'arachide par les aflatoxines, et par voie de conséquence, d'évaluer l'impact de la consommation de produits à base d'arachide contaminée par les aflatoxines sur la santé humaine et animale.

2) Les aflatoxines (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>) sont détectables dans le sérum, et sont excrétées sous forme d'aflatoxines M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> dans les urines et le lait des Mammifères. Des dosages par voies immunoenzymatique et/ou chimique de l'aflatoxine M<sub>1</sub> dans le lait maternel au cours des périodes périnatales, permettraient d'évaluer les risques sur la santé de l'enfant.

3) Dans le domaine de l'alimentation et compte tenu de la valeur nutritive des produits à base d'arachide, des transformations peuvent être conduites par le biais de la technologie alimentaire (bouillons de sevrage pour enfants, farines complémentées). Une surveillance des taux d'aflatoxines dans les matières premières est donc nécessaire pour préserver la qualité des produits transformés et garantir la santé des consommateurs.

4) Dans le domaine de l'économie, malgré les fluctuations dans la production de l'arachide dues aux contraintes pluviométriques (entre autres), le Burkina Faso, du point de vue climatique, constitue une zone de prédilection pour la culture de l'arachide. Il est à prévoir qu'avec la demande de plus en plus croissante et l'amélioration des techniques culturales, l'arachide occupera une place encore plus importante dans l'économie burkinabè. Des méthodes adéquates de stockage de l'arachide, et des méthodes de détection plus rapides et plus sensibles des aflatoxines sont à promouvoir pour répondre aux normes internationales et garantir la qualité des produits.

5) Enfin, en dehors de l'arachide, les aflatoxines sont rencontrées dans d'autres oléagineux (soja, grains de coton) et dans les céréales (riz, maïs, sorgho...). Les résultats obtenus dans le cas de l'arachide sont applicables à ces produits.

## 2. - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### 2.1. - Les aflatoxines : histoire, structure et nomenclature

Les champignons et leurs métabolites toxiques (les mycotoxines), présents dans les graines, les semences et sur les champs, ont constitué un problème pour l'Homme et les animaux domestiques depuis des siècles (35).

Les mycotoxicoses causées par l'ingestion d'aliments rendus toxiques par les champignons, ont été à l'origine de mortalité chez l'Homme et les animaux ; c'est le cas de l'ergotisme au Moyen Age en Europe, et celui de l'A.T.A. (Alimentary Toxic Aleukia) en 1930 et 1940 en Russie (19 a, 35).

Le problème des mycotoxicoses s'est posé avec acuité pour la première fois au Royaume Uni, lors de l'apparition de la maladie dite maladie "X" des dindes, qui a causé la mort de 100.000 dindes dans 500 fermes en 1960. Le facteur commun était une alimentation commune des dindes à partir de farine d'arachide provenant du Brésil. Des recherches menées à partir de cet aliment ont montré que la maladie était provoquée par des toxines produites par des souches du champignon *Aspergillus flavus*, d'où le nom aflatoxine qui leur a été donné par la suite (1, 35, 72, 73 a, 98, 121).

Des travaux ultérieurs ont permis de savoir que les aflatoxines sont essentiellement produites par les champignons: *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, et que plusieurs oléagineux, céréales, légumes et épices s'avéraient être naturellement contaminés par les aflatoxines.

Les aflatoxines sont considérées comme étant les plus cancérigènes parmi les substances naturelles toxiques ; elles sont hépatotoxiques, cancérigènes, tératogènes et immunosuppressives. Les régions du globe les plus affectées par les champignons aflatoxinogènes sont les pays situés entre les latitudes 23°N et 23°S (30, 32, 68, 121).

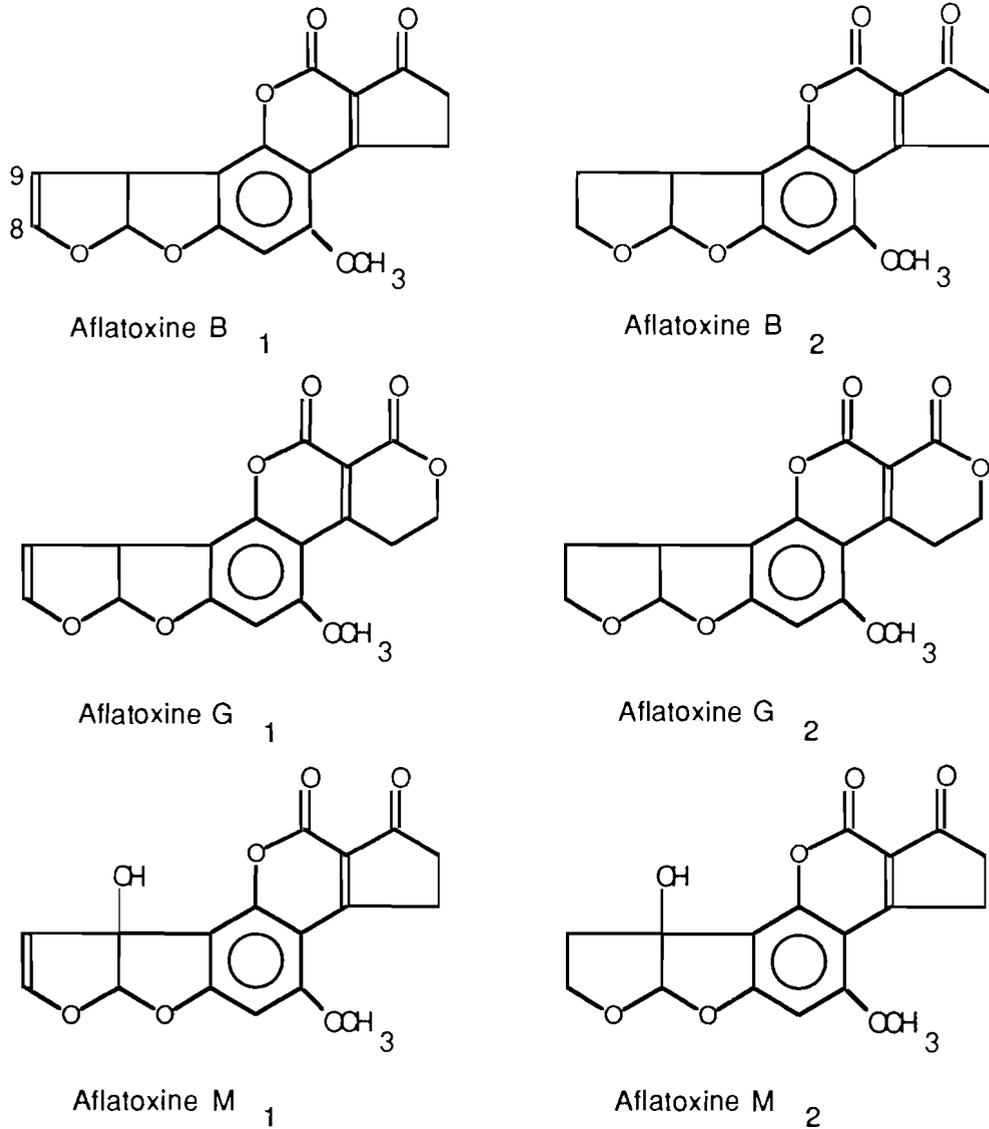
Les recherches menées sur les aflatoxines depuis une trentaine d'années ont établi la prévalence de deux principaux types d'aflatoxines :

- Les aflatoxines du type B
- Les aflatoxines du type G

Les aflatoxines du type M, non moins importantes que les premières, ont été détectées pour la première fois dans le lait comme métabolites des aflatoxines du type B. Mais le plus important dans les produits alimentaires, et le plus potentiellement cancérigène est l'aflatoxine B<sub>1</sub> (98, 106).

La structure de base de la molécule d'aflatoxine est constituée de cycles bifurane coumarine-lactone/cyclopentanone. Les aflatoxines du type G possèdent un cycle lactone, tandis que celles du type B ont un cyclopentanone. Chaque type d'aflatoxines est subdivisé en deux groupes (1 et 2) ; les aflatoxines du groupe 1, à la différence de celles du groupe 2, sont caractérisées par la présence d'une double liaison en C<sub>8,9</sub> du premier anneau furane (figure I.1). Les aflatoxines du type M possèdent un anneau cyclopentanone comme celles du type B, mais sont hydroxylées en C<sub>10</sub> (106).

Les aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> présentent une fluorescence bleue à 365 nm et sont produites par les souches toxigéniques de *Aspergillus flavus*. Les aflatoxines G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> (vert fluorescent), sont produites par les souches toxigéniques de *Aspergillus parasiticus*, qui en outre, produisent des aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>. Certaines souches d'*Aspergillus parasiticus* produiraient des aflatoxines M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> (106).



**Figure I.1** : Structure et nomenclature des aflatoxines naturelles  
(d'après SCHMIDT F.R. and ESSER K. 1985).

## **2.2. - Les champignons producteurs d'aflatoxines :** **distribution géographique et conditions de croissance**

Géographiquement, les tropiques constituent la partie du globe comprise entre 23°N et 23°S. La plupart des pays tropicaux sont chauds et humides (70 à 100 % d'humidité relative (HR)), conditions favorables à une rapide prolifération des champignons.

Les espèces du genre *Aspergillus* sont avec quelques espèces du genre *Penicillium*, les principales espèces constituant ce qu'on appelle : les champignons de stockage ; l'invasion des semences des plantes céréalières par ces champignons ne devient importante qu'après la récolte. Des exceptions subsistent toutefois ; on note l'invasion de semences d'arachide par *Aspergillus flavus* bien avant leur récolte (12, 35, 48, 65, 91, 121).

Les champignons de stockage peuvent se développer à des valeurs d'HR élevées et à des températures relativement basses. Ils sont adaptés à une vie sans eau libre, et peuvent contaminer des graines en stockage ayant des teneurs en eau comprises entre 13 et 18 %, et à une HR comprise entre 70 et 85 % (35, 65, 91).

Les principaux facteurs influençant la croissance des champignons de stockage sur les semences sont : l'HR, la température, le temps de stockage et la composition gazeuse de l'environnement de stockage (3, 12, 28, 31, 65, 67, 110).

L'invasion de la mycoflore est très souvent associée à la teneur en eau des graines à stocker ; plus la teneur en eau des graines est élevée, plus l'invasion de la mycoflore est importante.

L'interaction combinée de la température et de l'HR détermine la vitesse de germination des spores ; pour une HR donnée, plus la température est élevée, plus le temps requis pour la germination des spores est court.

Au cours du stockage des semences, la teneur en eau des semences n'est pas aussi importante que la capacité hygroscopique des semences et l'HR du micro-environnement des semences stockées.

Les champignons de stockage sont des organismes hautement aérobies ; de ce fait, leur activité est fonction de l'oxygène de l'air. Des études menées sur l'effet de concentrations variées de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), d'azote (N<sub>2</sub>) et d'oxygène (O<sub>2</sub>) sur la croissance et la sporulation de *Aspergillus flavus* dans des graines d'arachide montrent qu'il y a une nette réduction dans la croissance et la sporulation du champignon lorsque la concentration en O<sub>2</sub> diminue de 5 à 1 % en association avec O, 20 ou 80 % de CO<sub>2</sub>. La croissance et la sporulation fongique sont également réduites à chaque augmentation de 20 % en CO<sub>2</sub> lorsqu'on passe de 40 à 80 %. Aucune croissance n'est possible à 100 % de concentration en CO<sub>2</sub> (26, 35).

### **2.3. - Biosynthèse des aflatoxines**

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires des champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Leur production peut se faire *in vitro* et en culture stationnaire, au cours de l'idiophase (phase secondaire de croissance du champignon) (35, 98, 121).

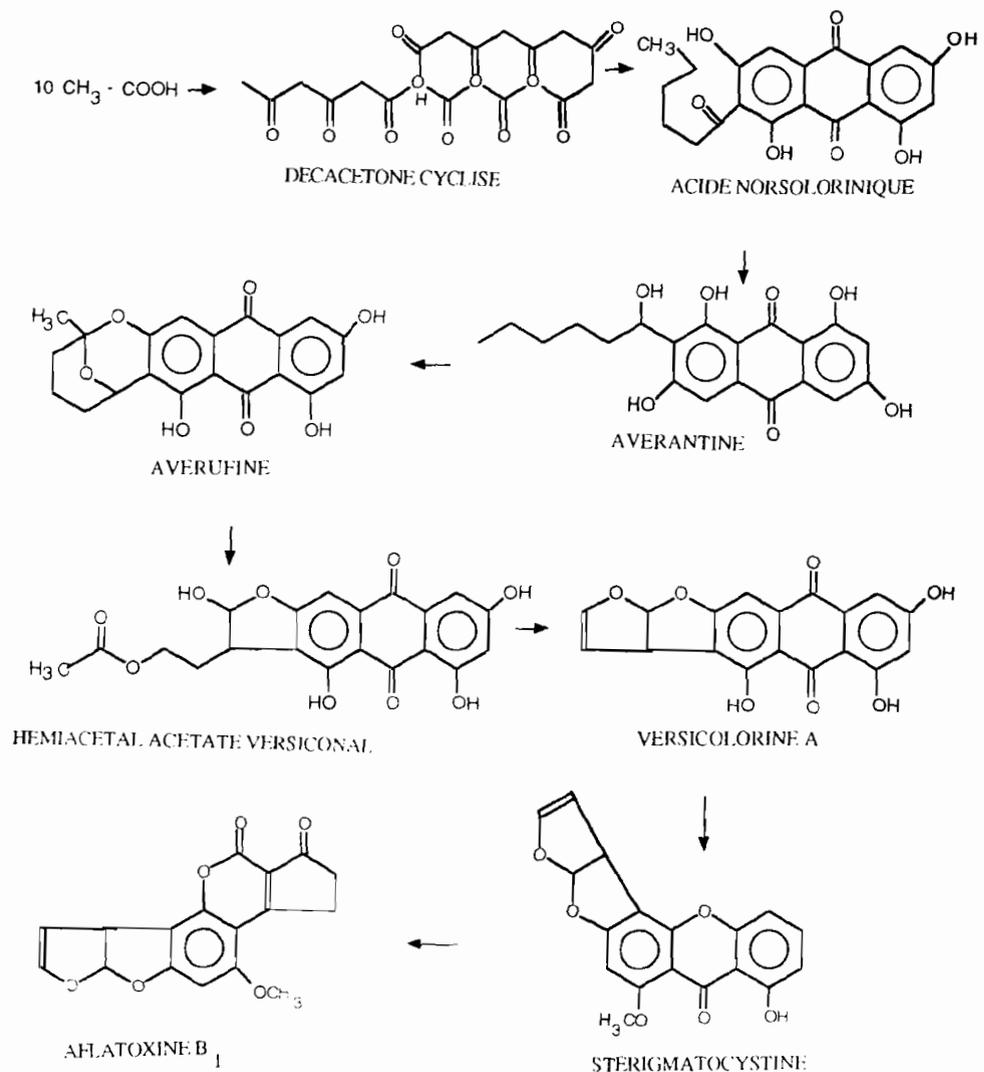
#### **2.3.1. - Voie biosynthétique des aflatoxines**

Certaines étapes de la voie biosynthétique des aflatoxines sont jusqu'à nos jours mal comprises ; de ce fait, la voie exacte de biosynthèse des aflatoxines n'est pas encore élucidée. Néanmoins, un consensus existe quant à l'étape initiale de leur biosynthèse. La synthèse commence avec des unités d'acétate (Figure I.2) et de malonate ; qui sont métabolisées en AFB<sub>1</sub> via des polycétones, avec pour intermédiaires principaux : l'acide norsolorine, l'avérufine, la versicolorine A et la stérigmatocystine (19 a, 106). Un doute subsiste quant à l'existence d'intermédiaires non encore identifiés ; par ailleurs, on se demande si l'AFB<sub>1</sub> constitue le précurseur des autres types d'aflatoxines ou si ces derniers possèdent chacun sa voie de biosynthèse (106).

Les travaux *in vitro* sur la biosynthèse des aflatoxines constituent une des parties les plus importantes des recherches menées sur les aflatoxines. Ils concernent essentiellement : les dynamiques du métabolisme des hydrates de carbone, les activités enzymatiques du cycle de l'acide tricarboxylique et de la

voie d'Embden-Meyerhof, la polycétone synthétase, le rôle des métaux, le rôle des nucléotides et des acides aminés et enfin, l'influence du métabolisme des lipides sur la biosynthèse des aflatoxines (8, 35,55, 62, 87, 94, 96, 111).

L'AFB<sub>1</sub>, plus souvent rencontrée et plus toxique que les autres types d'aflatoxines a été le point de départ des recherches sur les aflatoxines et de la recherche sur le cancer (121).



**Figure II.2 :** Voie la biogénèse de l'AfB<sub>1</sub> proposée par APPLEBAUM R.S. et MARTH E.H.,1981.

(source SCHMIDT F.R. et ESSER K.,1985).

### **2.3.2. - Facteurs influençant la production des aflatoxines**

Durant les premières années des recherches sur les aflatoxines, bon nombre de travaux ont porté sur la détermination des substrats naturels capables de favoriser la production d'aflatoxines par infestation artificielle ou naturelle à partir de souches toxigéniques. Ces travaux étaient soutenus en outre par la nécessité de produire des aflatoxines à des fins expérimentales (73 b).

Plusieurs substrats naturels (céréales, oléagineux) ont été utilisés en vue de la production de grandes quantités d'aflatoxines au laboratoire (33, 34, 36, 47, 73 b) ; l'un des substrats naturels ayant donné de meilleurs rendements était l'arachide.

Les différences enregistrées dans la production des aflatoxines sur substrat homogène sont essentiellement attribuées aux facteurs tels que : la souche de champignon utilisée, la température, la teneur en eau du substrat et/ou l'HR de l'environnement de culture, l'aération, la durée de la période d'incubation de la culture et la méthode d'analyse utilisée (19 f, 33, 34, 35, 73b).

Des études menées sur la production des aflatoxines sur milieu synthétique ont montré qu'en plus des facteurs sus-cités, la production d'aflatoxines est fortement influencée par certains acides aminés (asparagine, proline), des oligoéléments (zinc) et certains corps gras (triglycérides d'acides gras et huiles essentielles de certaines plantes telles que la Rosemarie) (35, 37, 38, 49, 55, 87).

### **2.4. - Effets de la consommation de produits contaminés par les aflatoxines sur la santé humaine et animale**

L'aflatoxicose est une pathologie causée par l'action des aflatoxines. Elle a été reconnue et décrite pour la première fois sur les animaux de ferme ; aussi est-il important de considérer le problème au niveau des différents groupes d'animaux avant d'en arriver à l'Homme (73 a).

### **2.4.1. - Aflatoxines et santé animale**

Le premier cas notoire d'aflatoxicose a été la découverte de la maladie des dindes en 1960 en Grande Bretagne (maladie "X" des dindes). Les oiseaux affectés par cette maladie perdent l'appétit, deviennent léthargiques et meurent dans les 7 jours suivant le début des symptômes. Les foies des dindes atteintes étaient sévèrement endommagés. Des symptômes similaires ont été rapportés chez des canetons et de jeunes faisans dans le même pays et ailleurs (Kenya, Brésil, Inde, Australie...). Le facteur commun de toutes ces maladies était que l'alimentation des oiseaux affectés se composait (entre autres) de farine d'arachide en provenance du Brésil. Par la suite, on a découvert que cette farine contenait des toxines produites par un champignon ; *Aspergillus flavus*, d'où le nom d'aflatoxines qui leur a été attribué (1, 2, 19 b, 35, 73 a, 121).

La plupart des données sur la susceptibilité des animaux de ferme et de laboratoire aux aflatoxines sont fournies par des tests d'ingestion réalisés à partir d'aliments à base d'arachide contaminée par les aflatoxines. Les effets de l'ingestion des aflatoxines sur les animaux sont de trois ordres :

- 1) Effets de toxicité aiguë associés à l'ingestion de doses létales.
- 2) Effets de toxicité chronique dus à l'administration de doses sous létales.
- 3) Carcinomes hépatocellulaires, provoqués par l'exposition chronique à de faibles doses d'aflatoxines (19 b, 29, 40, 73 a, 86).

#### **2.4.1.a. - Effets de toxicité aiguë**

Les aflatoxines ont des effets de toxicité aiguë sur la plupart des animaux (tableau I.1). Les canetons y sont plus sensibles ; la DL50 (Dose létale 50 %) pour un caneton âgé d'un jour est d'environ 0,3 mg/kg de poids corporel. Les souris présentent une plus grande résistance ; des souris nourries par des aliments à base d'arachide contenant 4.500 µg/kg d'AFB1 et AFG1, et 600 µg/kg d'AFB2 et AFG2, pendant 3 mois ne présentent aucun effet nuisible de santé (19b, 73 a, 86).

Les effets de toxicité aiguë due aux aflatoxines pour une espèce donnée sont influencés par les facteurs tels que l'âge, le sexe et la composition de l'alimentation.

Dans la plupart des cas de toxicité aiguë, la mort survient dans les 72 heures après l'administration de la toxine. L'examen *post mortem* révèle de sérieuses lésions du foie (foie stéatosique, nécroses, hyperplasie du canal biliaire), et des hémorragies dans le tractus intestinal et la cavité péritonéale (19 b, 29, 73 a).

**Tableau I.1.** : DL50 des différents types d'aflatoxines

Toxine	Animal	Sexe	Age/ Poids	Voie	DL50	Référence
Aflatoxine B <sub>1</sub>	Canard	M	1 jour	PO	0,37mg/kg	Butler, 1964
	Rat	M-F	1 jour	PO	1,0 mg/kg	Wogan, 1965
	Rat	M	21 jours	PO	5,5 mg/kg	"
	Rat	F	21 jours	PO	7,4 mg/kg	"
	Rat	M	100 g	IP	6,0 mg/kg	"
	Rat	F	150 g	PO	17,9 mg/kg	"
	Chien	M-F	adulte	IP	1,0 mg/kg	"
	Chien	M-F	adulte	PO	0,5 mg/kg	"
	Hamster	M	30 jours	PO	10,2 mg/kg	"
Aflatoxine B <sub>2</sub>	?					"
Aflatoxine G <sub>1</sub>	Canard	M-F	1 jour	PO	0,79 mg/kg	Lijinsky and Butler, 1966
Aflatoxine G <sub>2</sub>	Canard	M-F	1 jour	PO	172,5 µg/animal	Lijinsky and Butler, 1966
Aflatoxine M <sub>1</sub>	Canard	M-F	1 jour	PO	16,6 µg/Animal	Purchase, 1967

PO = Per os      IP = Intrapéritonéale      (Source CAST, 1989).

#### **2.4.1.b. - Effets de toxicité chronique**

Des animaux ayant consommé des doses sous létales d'aflatoxines pendant plusieurs jours (14 à 28 jours), développent des syndromes de toxicité chronique se manifestant par des lésions aussi bien modérées que sévères au niveau du foie (69). Parmi les différents types de lésions hépatiques rencontrées dans ces cas, l'hyperplasie biliaire est celle communément observée chez toutes les espèces d'animaux excepté le mouton (73 a). Dans les cas de toxicité chronique, la production de lésions hépatiques n'entraîne pas nécessairement la mort ; la réversibilité des symptômes peut être obtenue par l'introduction d'une alimentation dépourvue d'aflatoxine.

#### **2.4.1.c. - Carcinogénèse due aux aflatoxines**

L'induction de néoplasmes (croissance anormale de tissus) par les aflatoxines a été largement étudiée ; l'AFB<sub>1</sub> ainsi que son métabolite secondaire l'AFM<sub>1</sub>, l'aflatoxicol et l'AFG<sub>1</sub> induisent des néoplasmes au niveau du foie, du rein et du colon chez le Rat, le Canard, la Truite, le Singe, la Souris et bien d'autres animaux (19 b, 73 a).

La carcinogénèse causée par l'AFB<sub>1</sub>, serait due à l'activation métabolique d'un produit dérivé de l'AFB<sub>1</sub>, l'AFB<sub>1</sub> époxyde, par les enzymes microsomales du foie (figure I.3). Cet intermédiaire métabolique (électrophile), se lie aux macromolécules (ADN, ARN, protéines), à l'intérieur des hépatocytes (dans le cas des carcinomes hépatiques) (19 b, 73 a, 77). La liaison de l'AFB<sub>1</sub> aux macromolécules des hépatocytes, peut de ce fait interférer avec la transcription de l'ADN et la synthèse des protéines. Cette liaison de l'AFB<sub>1</sub>, à l'ADN se fait par liaison covalente entre l'AFB<sub>1</sub> et la Guanine en position N7 (68).

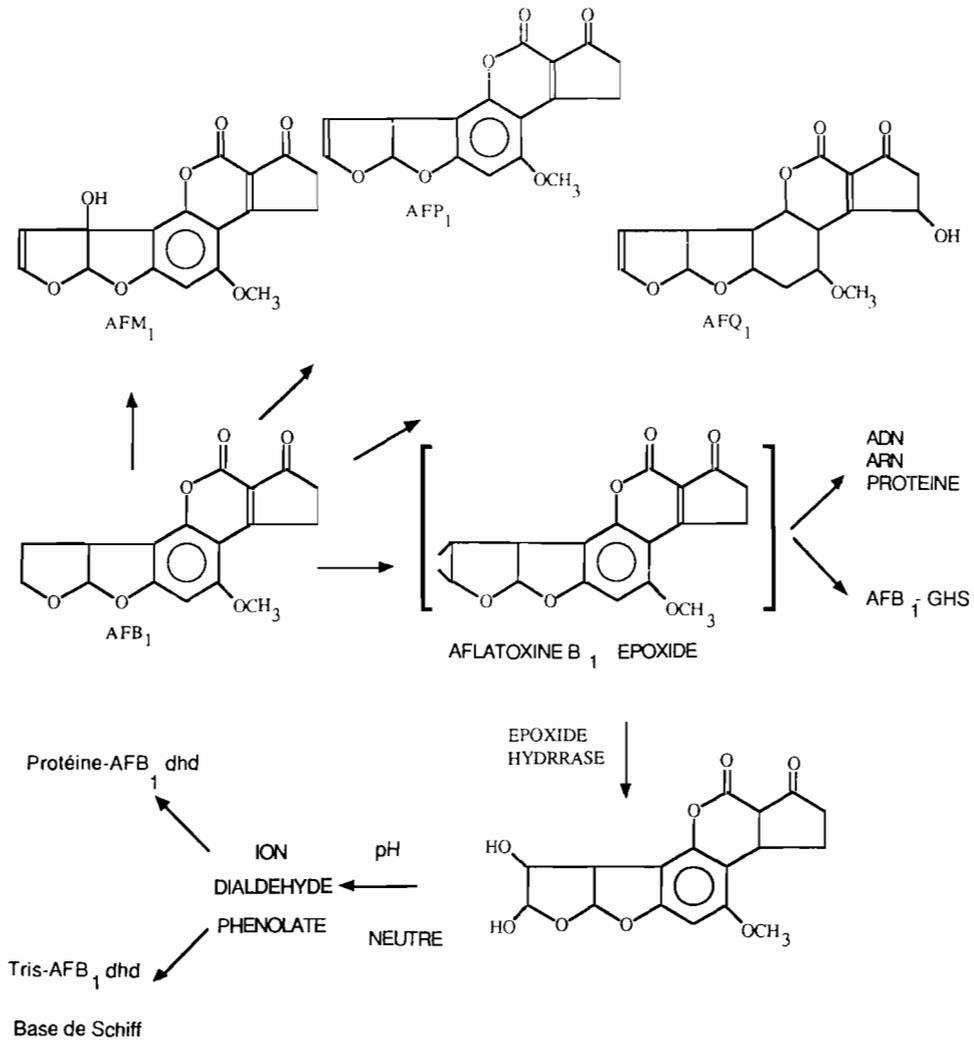
La liaison de l'AFB<sub>1</sub> aux protéines hépatocellulaires entraînerait la formation de bases de Schiff, la réduction de l'activité enzymatique et des effets de toxicité aiguë (19 b, 77).

Les PB-Cytochromes P-450 et les Cytochromes P-448, seraient la plaque tournante du métabolisme des aflatoxines (entre autres) dans le foie (Figure I.4) (77).

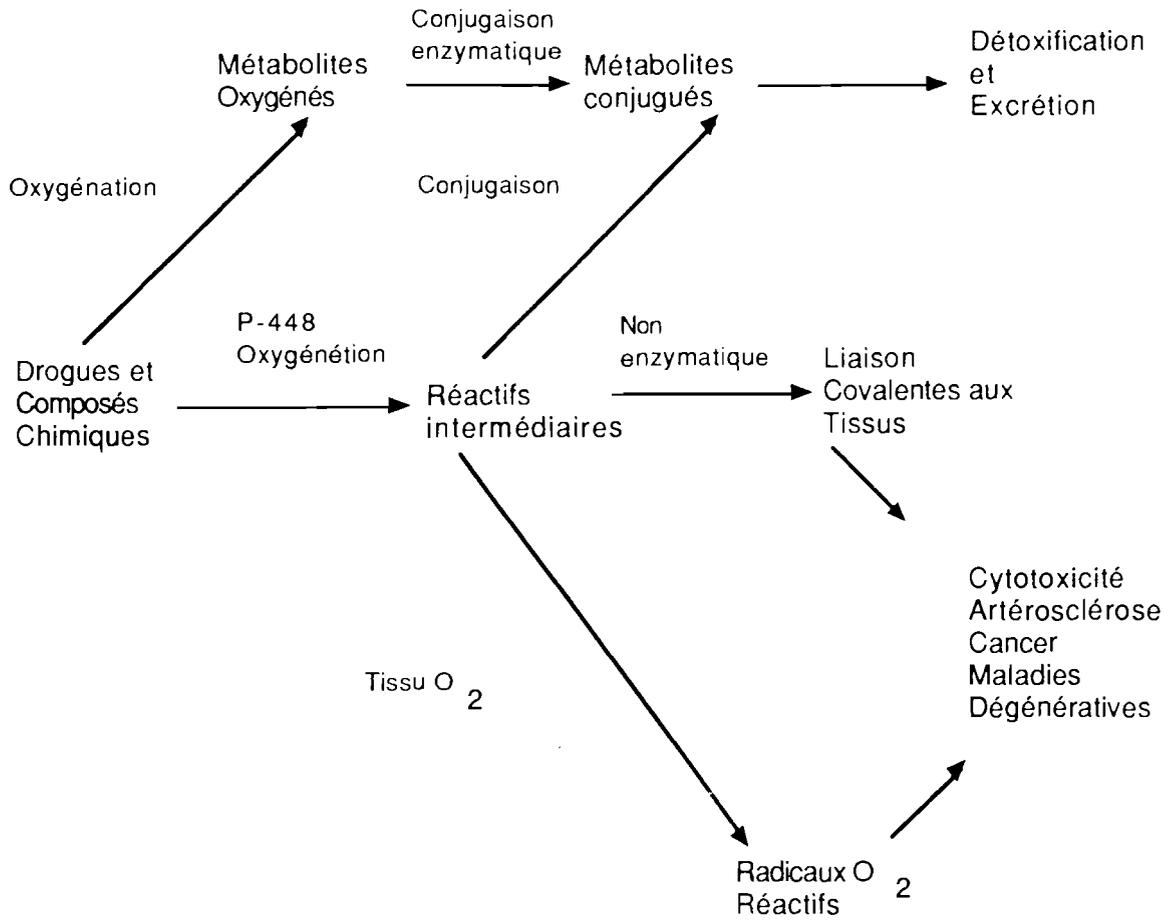
Les aflatoxines auraient en outre, des effets hématopoiétiques et immunosuppresseurs sur les animaux :

Les effets hématopoiétiques aboutissent au syndrome d'anémie hémorragique caractérisé par des lésions hémorragiques massives dans la plupart des organes.

Les effets immunosuppresseurs concernent essentiellement l'immunité à médiation cellulaire ; les aflatoxines suppriment la fonction des cellules T, cellules spécifiques du système lymphocytaire. Elles altèrent aussi la fonction des cellules mononucléées du système phagocytaire, et réduisent l'activité hémolytique du complément (19 b, 69, 73 a).



**Figure II.3 :** Voie métabolique de l'AFB<sub>1</sub> *in vitro*  
 (source MOSS E.I. and NEAL G.E. 1985)



**Figure I.4 :** Rôle des PB-Cytochromes et des Cytochromes P-448 dans la détoxification et l'activation des drogues, composés chimiques et carcinogènes  
(source IOANNIDES C. and PARKE D.V.,1987)

### **2.4.2. - Aflatoxines et santé humaine**

Depuis la découverte en 1960 des effets carcinogènes des aflatoxines chez les animaux, et la détection de ces toxines dans une large gamme de produits alimentaires, des tentatives ont été menées pour établir des corrélations entre l'exposition aux aflatoxines et ses effets à plus ou moins long terme sur la santé humaine.

Les recherches entreprises ont montré que les conséquences vont de la toxicité hépatique aiguë aux maladies chroniques telles que le cancer du foie (7, 10, 19 c, 32, 73 a, 84, 106, 116).

#### **2.4.2.a - Aflatoxicoses aiguës**

L'évidence de l'aflatoxicose aiguë chez l'Homme provient de cas rapportés de Taïwan et de l'Ouganda. Le syndrome était caractérisé par des vomissements, des douleurs abdominales des oedèmes pulmonaires, une infiltration des matières grasses, et des nécroses au niveau du foie (19 c, 73 a). Par la suite, des études de cas précis rapportent qu'en Inde, la consommation de maïs fortement contaminé par des aflatoxines (6 à 16 mg/kg), dans 200 villages, a entraîné la mort de 97 personnes sur les 994 patients examinés. Les cas de décès étaient essentiellement dus à des hémorragies gastro-intestinales. L'histopathologie des tissus hépatiques révèle une hyperplasie du canal biliaire, caractéristique d'une aflatoxicose aiguë chez les animaux.

Des cas semblables ont été rapportés du Kenya où, à la suite d'une alimentation à base de maïs fortement contaminés par des aflatoxines, 20 % de mortalité ont été enregistrés sur les 20 patients admis à l'hôpital (19 c, 73 a).

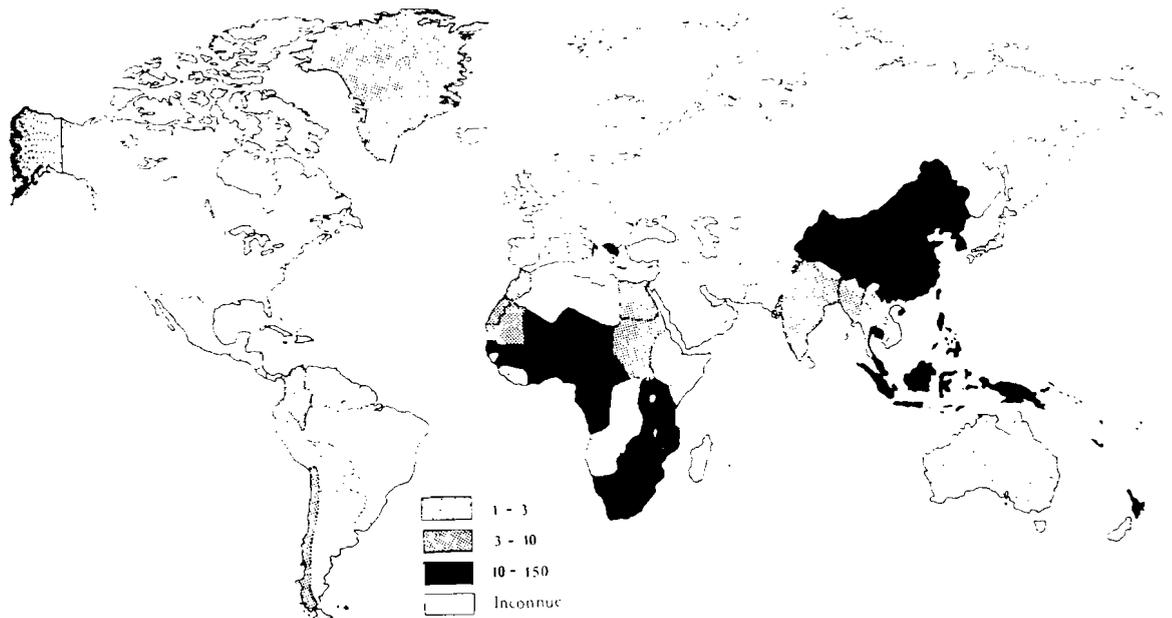
#### **2.4.2.b - Aflatoxicoses chroniques**

L'aflatoxine B<sub>1</sub> (entre autres), étant le carcinogène potentiel pour les animaux, plusieurs études ont porté sur ses effets à long terme et à de faibles doses sur la santé humaine. Actuellement, seules l'AFB<sub>1</sub> et la stérigmatocystine sont reconnues par l'IARC (International Agency for

Research on Cancer), comme étant les deux substances potentiellement carcinogènes pour les animaux ; l'AFB<sub>1</sub> est classée par la même agence, comme étant un carcinogène probable pour l'Homme (19 c, 73 a).

Des effets d'aflatoxicose chronique sont rapportés par le Sénégal où plusieurs nourrissons de moins d'un an ont reçu chacun 70 - 140 g d'aliments à base d'arachide pendant 10 mois comme traitement contre le Kwashiorkor (73 a). Des échantillons de ces aliments testés par la suite ont révélé que les prises d'aflatoxines par jour et par nourrisson variaient entre 35 à 140 µg. Le suivi de deux d'entre les nourrissons pendant 4 à 6 ans a montré que l'un présentait des anomalies persistantes au niveau du foie, et que l'autre avait des anomalies mineures réversibles au bout de 6 ans.

Le cancer du foie, est une des principales causes de mortalité par suite de cancer en Asie et en Afrique. En Afrique de l'Ouest, l'incidence annuelle du cancer du foie varie entre 10 et 150 pour 100.000 habitants (figure I.5) (19 c, 41, 97). Par ailleurs, il existerait une corrélation entre l'exposition aux aflatoxines et certaines pathologies telles que l'HBV, les cirrhoses infantiles, le Kwashiorkor et le syndrome de Reye (19 c, 73 a, 81).



**Figure I.5 :** Incidence annuelle du carcinome hépatocellulaire  
(pour 100.000 habitants) dans le monde.  
(Source GENTILINI M. et al, 1986).

### **2.5. - Impact économique des aflatoxines**

La FAO (Food and Agricultural Organization) estime que 25 % de la production agricole mondiale sont affectés par les mycotoxines. Les pertes économiques causées par les aflatoxines proviennent non seulement de celles liées à la détérioration des récoltes et des baisses de rendement au niveau du bétail, mais surtout à cause des réglementations en matière d'aflatoxines ; depuis 1970, des programmes de réglementations internationales ont instauré des teneurs limites d'aflatoxines dans les différents produits et denrées alimentaires (19 d, 54, 73 e).

L'importance de la contamination des produits par les aflatoxines est fonction de la nature du produit, de l'année et de la région.

D'une façon générale, les produits de la récolte les plus affectés économiquement par les aflatoxines sont : le maïs, l'arachide et le coton (20).

## **2.6. - Limitations et réglementations en matière d'aflatoxines**

Il est impératif que tout aliment contaminé par des substances aléatoires soit considéré impropre à la consommation humaine. De ce fait, toutes les lois sur l'alimentation qui prohibent le commerce des produits falsifiés considèrent tout produit alimentaire contaminé par des substances aléatoires comme produit falsifié (73 e).

Dans bon nombre de pays, cette loi générale a conduit à des réglementations spécifiques qui imposent des limites tolérables pour certaines mycotoxines (aflatoxines) dans les aliments. En 1970, seulement 18 pays possédaient des lois sur la limitation des teneurs en aflatoxines dans les produits alimentaires. En 1991, la liste se composait de 50 pays dont certains possèdent leur propre réglementation.

Les teneurs limites en aflatoxines, permises dans les denrées varient considérablement d'un pays à l'autre et d'un produit à l'autre. Elles varient aussi suivant que le produit est destiné à la consommation humaine ou animale (19 e, 73 e). La teneur maximale en aflatoxines, permise dans l'alimentation humaine varie de 0 à 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (tableau I.2) ; mais la tendance générale actuelle est en faveur de la teneur limite recommandée par la FDA (Food and Drug Administration), pour mieux protéger la santé humaine et animale. Cette limite pour la consommation humaine est de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'aflatoxines totales dans les produits finis, et de 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  d'aflatoxine M<sub>1</sub> dans les produits laitiers.

**Tableau I.2.** : Teneurs maximales en aflatoxines permises dans les aliments et les produits alimentaires dans certains pays.

Country	Commodity	Aflatoxin limit ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Remarks
Australia	groundnuts and groundnut products	15	
Australia	all feeds	50	
Belgium	all foods	5 <sup>a</sup>	
	all feeds	see EEC	EEC Regulation
Brazil	groundnut meal	50 <sup>a</sup>	Export control
Canada	nuts and nut products	15 <sup>b</sup>	Control under hasard to health
Columbia	groundnuts	10	
	groundnuts	0	
	groundnuts	5	
Cuba	groundnuts and	See EEC	EEC regulation
Czechos-lovakia	groundnut		
Denmark	products feeds groundnuts	0	
Dominican Republic	Straigt feedings tuffs	50 <sup>a</sup>	EEC includes Belgium, Denmark
EEC Countries	complete feedingstuffs (not for dairy cattle, calves, lambs)	50 <sup>a</sup>	France, Germany Greece, Ireland, Italy, Luxembourg the Netherlands, United King-dom
	complete feedingstuffs (for pigs and poultry)	20 <sup>a</sup>	
	other complete feedingstuffs	10 <sup>a</sup>	
	complementary feedingstuffs (for dairy cattle)	20 <sup>a</sup>	
	nuts and nut products		
	all foods	5	
	baby foods		
Finland		10	
		5	
France			

Country	Commodity	Aflatoxin limit ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Remarks
Germany	groundnuts and groundnut products all feeds	5 <sup>a</sup> or 10 <sup>b</sup>	
Greece	all feeds groundnuts, other foods/feeds	See EEC	EEC regulation
Jordan	all foods groundnuts and groundnut products	See EEC 15 <sup>a</sup> or 30 <sup>b</sup>	ECC regulation
Hong Kong	groundnut meal (food)		
	groundnut meal (feed)		
India	all feeds	15	
	all feeds	20	
Ireland	groundnuts and groundnut products	60	
	all feeds	1000	
Israel	groundnuts and groundnut products	See EEC	EEC regulation
Italy	groundnut meal (feed imports)	20	base on EEC recommendation
		50	
Japan		See EEC 10 <sup>a</sup>	EEC regulation
		1000 <sup>a</sup>	not for use in feed for chickens, calves, or pigs ; not more than 2 % in feed for dairy cows ; no more than 4 % in feed for other livestock.

Country	Commodity	Aflatoxin limit (µg/kg)	Remarks
Kenya	groundnuts and groundnut products	20	
Luxembourg	groundnuts and groundnut products	5 <sup>a</sup>	
	all feeds		
	groundnuts		
	all foods	see EEC	EEC regulation
Malawi	groundnuts and groundnut products	5 <sup>a</sup>	Export regulation
Malaysia	groundnut products feeds	0	
The Netherlands	all foods	5 <sup>a</sup>	
	foods		
	groundnuts	see EEC	
New Zealand	all feed	15	EEC regulation
Nigeria	groundnuts and groundnut products	5 <sup>a</sup> or 20 <sup>b</sup>	Export regulation
Norway	all foods	50	
Philippines	all mixed feeds	20	based on WHO recommendation
Poland		5 <sup>a</sup>	dependent on animal, and regulated limit of groundnut meal in feed
	groundnuts	0 - 200 <sup>a</sup>	
	groundnuts		
	groundnuts and groundnut products,		
Portugal	edible oils	0	
Republic of china		50 <sup>a</sup>	
Singapore	all foods		
	groundnuts and groundnut products	10 - 15	
South Africa			
Surinam		5 <sup>a</sup> or 10 <sup>b</sup>	
		5 <sup>a</sup>	

Country	Commodity	Aflatoxin limit ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Remarks
Sweden	all foods, groundnuts groundnut meal	5 <sup>b</sup> 600 <sup>a</sup>	Dairy feed limit 15 %
Switzerland	nuts and nut products edible oils	1 <sup>a</sup> or 5 <sup>b</sup>	
Thailand	all foods	20	EEC regulation
Union of Soviet Socialist Repu- blics	nuts and nut products feeds	5 5 <sup>a</sup>	
United Kingdom	all foods and feeds consumer	see EEC	
United states	groundnut products raw shelled groundnuts fluid milk	20 <sup>b</sup> 15 <sup>b</sup>	
	groundnuts other nuts and nut products other foods	25 <sup>b</sup> 0,5 <sup>c</sup>	
Yugoslavia	groundnuts	10 5	
Zimbabwe		1 25 <sup>a</sup>	

\* (Source MEHAN V.K. et al. 1991)

a = Aflatoxine B<sub>1</sub> ; b = aflatoxines Totales ; c = Aflatoxine M<sub>1</sub>

EEC = European Economic Community.

## 2.7. - Méthodes d'analyse des aflatoxines

Trois types de méthodes ont été développés pour la détection et le dosage des aflatoxines:

- les méthodes Biologiques
- les méthodes Chimiques
- les méthodes Immunochimiques.

Les premières méthodes développées pour la détection des aflatoxines (méthodes biologiques) étaient basées sur la réponse de l'animal vis-à-vis de différentes doses de toxines administrées (19 e, 73 f). Les tests biologiques sont malheureusement qualitatifs, au mieux, semi quantitatifs. Ils sont longs à exécuter dans les analyses de routine ; cependant, ils servent encore de nos jours comme tests de confirmation.

Après l'isolement, la purification et la caractérisation des aflatoxines, les méthodes d'analyse physico-chimiques ont été très vite développées. Les tests chimiques et immunochimiques sont très utiles dans les analyses de routine telles que les contrôles de qualité et les travaux d'inspection. Ils sont généralement rapides, moins coûteux, plus spécifiques et plus reproductibles que les tests biologiques, souvent plus sensibles (73 f).

Des techniques variées de dosages quantitatifs ont été développées pour l'estimation des teneurs en aflatoxines : Chromatographie sur Couche Mince (CCM), Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance (CCMHP), Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), méthodes fluorimétriques (18, 19 e, 27, 30, 43, 50, 60, 73 f, 75, 82, 98, 99, 109, 112, 113, 114, 120).

Certaines techniques de CCM, développées depuis 1960 sont largement utilisées de nos jours ; mais c'est la méthode CLHP qui est de plus en plus utilisée parce que plus sensible que la méthode CCM, et surtout lorsque de hauts degrés de résolution sont requis. L'introduction des méthodes de dosage en minicolonnes vise beaucoup plus l'efficacité en même temps que la haute capacité de résolution. Le développement, ces dernières années, des

méthodes ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), permet de réduire encore plus le temps d'analyse tout en gagnant en spécificité avec l'usage des anticorps monoclonaux (4, 18, 19 e, 23, 24, 25, 30, 57, 83, 88, 100).

Avec la panoplie de méthodes de dosage actuellement disponibles, il est possible de choisir telle ou telle méthode, en fonction des objectifs poursuivis.

## **2.8. - Surveillance de l'infestation par *Aspergillus flavus* et de la contamination par les aflatoxines dans les produits alimentaires.**

Une des voies possibles pour lutter contre l'incidence des aflatoxines dans la santé humaine et animale, et limiter les pertes économiques liées à la détérioration des produits de la récolte par les champignons toxigènes est la surveillance de l'infestation et de la contamination.

La surveillance de la contamination par les aflatoxines commence au niveau du champ et se poursuit dans l'entretien des produits de la récolte, la commercialisation, le stockage, la transformation et enfin au niveau de la consommation (73 g, 120).

Les pratiques culturales et l'utilisation de produits chimiques (pesticides et insecticides) sont des procédés de surveillance dits préventifs; les mesures curatives s'intéressent à l'isolement et la ségrégation des produits toxiques, et à la recherche de méthodes de détoxification. La recherche de variétés résistantes constitue une autre composante essentielle de tout système intégré de surveillance de la contamination par les aflatoxines.

### **2.8.1. - Mesures préventives**

#### **2.8.1.a. - Contrôles culturales**

Pour être effectif, le contrôle de la contamination par les aflatoxines au niveau des cultures (arachide par exemple), doit prendre en considération tous les facteurs agronomiques et environnementaux qui

influencent l'infestation des semences par les champignons toxigènes. Ces facteurs varient d'une localité à l'autre et d'une saison à l'autre au sein d'une même localité. La contamination par les aflatoxines peut de ce fait survenir au cours des périodes pré-récolte, post-récolte ou péri-récolte (19 e, 59, 63, 67, 73 g, 92, 101).

#### **2.8.1.b. - Contrôles chimiques**

Plusieurs tentatives ont été menées pour contrôler ou réduire l'infestation des semences par *Aspergillus flavus* et/ou *Aspergillus parasiticus*, par application de fongicides aux semis, durant les cultures ou encore après récolte (19 e, 28, 35, 51, 56, 73 g, 121).

#### **2.8.1.c. - Contrôles biologiques**

*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sont souvent rencontrées, en association avec d'autres champignons au niveau des gousses et des semences de produits tels que l'arachide. Des hypothèses basées sur de telles observations stipulent que les interactions entre champignons compétissant pour un même substrat peuvent dans certaines conditions environnementales, limiter l'invasion des champignons toxigènes ; c'est le cas de l'interaction entre *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* (19 e, 35, 73 g, 119, 121).

#### **2.8.2. - Résistance génétique à l'invasion et à la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus***

Le problème de la contamination par les aflatoxines peut être résolu par l'utilisation de cultivars présentant une immunité vis-à-vis de l'infestation par les champignons toxigènes, ou vis-à-vis de la production d'aflatoxines. Des différences génétiques quant à la susceptibilité du maïs et de l'arachide à *Aspergillus flavus* ont été rapportées ; mais le développement de germplasmes résistants est encore au stade primaire (14). Actuellement, aucune résistance génotypique vis-à-vis de la production des aflatoxines n'est connue (19 e, 42, 52, 70, 71, 73 g, 78, 79, 89, 117, 118).

### **2.8.3. - Ségrégation et détoxification**

Les produits destinés à la consommation humaine peuvent contenir des teneurs en aflatoxines au-delà des limites acceptables ; mais dans le cas de l'arachide par exemple, toutes les graines ne sont pas contaminées et il est possible de reconnaître et de séparer les graines toxiques des graines saines (93).

#### **2.8.3.a. - Méthodes physiques de séparation**

Ces méthodes constituent la principale source de décontamination de l'arachide dans les industries de transformation. Elles sont basées sur des caractéristiques telles que la couleur et la taille des graines (73 g, 74).

Le triage manuel ou électronique de graines d'arachide contaminées, permet une réduction notable des teneurs en aflatoxines. Cependant, ces procédés ne permettent pas une décontamination complète (19 e, 80).

#### **2.8.3.b. - Méthodes physiques de détoxification**

Les aflatoxines sont stables jusqu'à leur point de fusion qui se situe autour de 250°C. Le chauffage en atmosphère sèche n'est pas particulièrement efficace, mais en milieu liquide et par autoclavage, il est possible d'obtenir des réductions significatives de la teneur en aflatoxines (11, 19 e, 73 g). Les différents types d'aflatoxines ne résistent pas de la même façon à la chaleur ; l'AFB<sub>1</sub> serait plus thermostable que l'AFG<sub>1</sub> (73 g). Le problème rencontré dans l'inactivation des aflatoxines par la chaleur, dans les produits, est que ce procédé peut affecter la qualité des protéines et/ou la disponibilité de la lysine lorsque le temps d'inactivation est prolongé.

Les rayons Ultra Violets (UV) et les radiations gamma permettent la réduction des teneurs en aflatoxines dans certains cas, mais pas dans celui de l'arachide (19 e, 21, 66, 73 g, 102, 105). Par contre, plusieurs études montrent que les radiations solaires détruisent de manière significative les aflatoxines dans l'huile.

### 2.8.3.c. - Méthodes biologiques de détoxification

Plusieurs micro-organismes (champignons, actinomycètes, bactéries et algues) ont été testés pour leur capacité de détruire ou de transformer les aflatoxines (19e, 46). *Flavobacterium aurantiacum* (NRRL B - 184) s'est avérée efficace dans l'élimination des aflatoxines en solution et dans des préparations de lait à base d'arachide (46, 95). Le problème réside dans l'adoption de cette technique comme moyen de détoxification des produits et sous produits de l'arachide.

### 2.8.3.d. - Méthodes chimiques de détoxification

Des produits chimiques variés ont été testés pour leur capacité de dégrader ou d'inactiver les aflatoxines parmi lesquels : les acides, les bases, les aldéhydes, les bisulfites, les agents oxydants et des gaz (8, 9, 13, 15, 16, 38, 64, 90, 95, 103, 104, 115). De tous les procédés chimiques, l'ammoniation (traitement à l'ammoniac/que) serait le plus efficace dans la réduction des taux d'aflatoxines dans les produits (19 e, 73 g). Le mécanisme de l'ammoniation consiste à la conversion des aflatoxines en produits dérivés moins toxiques.

Les produits chimiques peuvent être utilisés comme moyen de détoxification lorsqu'ils répondent aux critères fixés par la conférence de Naïrobi (FAO/OMS/PNUD 1977) sur les mycotoxines (73 g) ; ces critères sont :

- a) Les procédés utilisés doivent détruire ou inactiver les toxines
- b) Ils ne doivent produire ni laisser des résidus toxiques ou cancérigènes dans les produits finis.
- c) Ils doivent pouvoir détruire les spores et mycélium des champignons pouvant proliférer par la suite et produire des aflatoxines.
- d) Ils doivent préserver la valeur nutritive et organoleptique des produits.

- e) Enfin, ces procédés ne doivent altérer de manière significative, les propriétés technologiques importantes des produits.

L'un des nouveaux axes de recherche en matière de détoxification dans le domaine des aflatoxines est la détoxification *in situ* par l'utilisation de produits chimiques alimentaires qui altèrent la réponse normale du métabolisme des Mammifères vis-à-vis des aflatoxines (19 e).

Des facteurs chimiques variés, incluant les composés nutritionnels (protéines alimentaires, acides gras, agents lipotrophiques, vitamines et traces de métaux), les antibiotiques et d'autres facteurs chimiques, peuvent interagir pour modifier l'effet des aflatoxines chez les animaux. De récentes découvertes montrent que le butyl-hydroxyanisole (BHA) augmente la résistance à l'effet carcinogène des aflatoxines chez le rat par stimulation de l'activité glutathion S-transférase ; cet enzyme réduirait la liaison de l'aflatoxine B<sub>1</sub> à l'ADN en augmentant la complexation glutathion-AFB<sub>1</sub> - époxyde (19 e).

## **CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES**

## **1. - ECHANTILLONNAGES**

Les échantillonnages ont été effectués en fonction des objectifs d'études poursuivis:

### **1.1. - Evaluation de la contamination**

Des échantillons de graines d'arachide de deux variétés locales (Boanga et Wobgo), ont été fournis par les laboratoires d'Entomologie et de Phytopathologie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Ouagadougou. Ils proviennent de la récolte 1989-1990.

La variété Boanga est une variété à cycle court (90 jours), cultivée essentiellement dans les régions Centre, Est et Nord du Burkina Faso. La variété Wobgo est de 120 jours, et est cultivée dans les régions Ouest et Sud du pays.

Au total, 56 échantillons de graines d'arachide (28 de chacune des deux variétés) ont été utilisés pour cette étude. Ces échantillons constituent en réalité des sous échantillons (250 g chacun), de 26 échantillons (1000 g) issus de 26 parcelles de 216 m<sup>2</sup> chacune; ils n'ont subi aucun traitement chimique et proviennent d'une même date de récolte. Les échantillons de la variété Boanga proviennent de la station de Gampèla (Ouagadougou); ceux de la variété Wobgo proviennent de la station de Léo (Sud du Burkina Faso).

Des échantillons de produits à base d'arachide (pâtes d'arachide, marba tiguè, arachide sucrée), ont été prélevés sur différents marchés de la ville de Bobo Dioulasso (Sud-Ouest du Burkina Faso) en Mars 1991. Vingt six échantillons (200-300 g chacun) dont 13 échantillons de marba tiguè et d'arachide sucrée confondus et 13 échantillons de pâtes d'arachide ont été utilisés.

Des échantillons de pâtes d'arachide de la CITEC (Consortium International de Technologie), conditionnées en boîtes de 500 g, ont été prélevés dans des alimentations de la ville de Ouagadougou et servent d'échantillons témoins. Trois échantillons témoins ont été utilisés dans cette étude.

### **1.2. - Evolution des paramètres physico-chimiques au cours du stockage**

Vingt cinq échantillons de graines d'arachide, soit 13 échantillons pour la variété Boanga et 12 pour la variété Wobgo ont été utilisés. Ces échantillons proviennent des parcelles ci-dessus décrites (§ 1.1.).

### **1.3. - Cancer primitif du foie et aflatoxines**

Quinze échantillons de pâtes d'arachide provenant de l'échantillonnage effectué à Bobo Dioulasso ont été utilisés pour cette étude.

## **2. - CONDITIONS DE CONSERVATION**

Tous les échantillons sont conditionnés dans des sachets plastiques.

Les échantillons utilisés pour l'évaluation des teneurs en aflatoxines et du cancer primitif du foie, sont broyés et stockés à -20°C. Ceux utilisés dans l'étude au cours du stockage, de l'évolution des paramètres physico-chimiques et de la production d'aflatoxines sont stockés à température de salle (25-27°C). La température ambiante et l'humidité Relative (HR) sont relevées quotidiennement et à heures fixes (8h. et 16h.). Les différentes analyses (matière grasse, protéines totales, glucides totaux, teneur en eau, aflatoxines totales) sont effectuées tous les 6 mois, à partir de fractions aliquotes des échantillons stockés. La période de stockage est de 12 mois.

## **3. - DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU**

Cinq grammes de l'échantillon à analyser sont pesés à 0,001 près, dans une boîte de pétri préalablement tarée, et disposés à l'étuve à 103°C pour dessiccation, jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La teneur en eau est donnée par la relation :

$$\% \text{ eau} = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100$$

$M_0$  = poids initial de l'échantillon

$M$  = poids de l'échantillon après dessiccation.

#### **4. - DETERMINATION DE LA MATIERE GRASSE**

L'extraction de la matière grasse est réalisée selon la méthode par extraction directe (5), avec comme solvant d'extraction l'éther de pétrole.

Le pourcentage de la matière grasse dans l'échantillon est donné par la relation :

$$\% \text{ M.G.} = \frac{M}{\text{P.E.}} \times 100$$

$M$  = poids de la matière grasse

P.E. = prise d'essai de l'échantillon.

#### **5. - DETERMINATION DE LA TENEUR EN PROTEINES TOTALES**

Les teneurs en protéines totales sont déterminées d'après la méthode de Kjeldahl (6), par dosage de l'azote total dans les échantillons. La teneur en protéines totales est déterminée par multiplication d'un coefficient égal à 5,46 à la teneur en azote, pour tenir compte du taux d'azote dans les protéines de l'arachide qui est de 18 %.(108)

#### **6. - DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX**

Les glucides totaux sont dosés par l'orcinol sulfurique selon la méthode décrite par Montreuil et Spik (76).

## **7. - DETERMINATION DE LA CAPACITE D'ABSORPTION EN EAU DES GRAINES**

Cinquante grammes de graines d'arachide sont mis à tremper dans un bécher contenant 200 ml d'eau distillée pendant 5 mn. Les graines sont ensuite égouttées pendant 5 mn, puis pesées. La capacité d'absorption en eau est déterminée par la relation :

$$C.A. = \frac{M - M_0}{M_0} \times 100$$

M = poids des graines après 5 mn de trempage

M<sub>0</sub> = poids initial des graines.

**N.B** : La capacité d'absorption en eau, qui est le pourcentage d'eau absorbée par rapport au poids initial des graines est limitée par le temps de trempage.

## **8. - EXTRACTION ET DOSAGE DES AFLATOXINES**

L'extraction et le dosage des aflatoxines sont réalisées soit selon La méthode par Chromatographie sur Couche Mince (CCM), soit selon la méthode immunoenzymatique (méthode de type compétitif) utilisant les kits TRANSIA (113).

### **8.1. - Dosage immunoenzymatique de l'aflatoxine B<sub>1</sub>**

#### **\*Principe**

Les solutions d'échantillons supposés contaminés par les aflatoxines sont distribuées dans les puits d'une plaque de microtitration préalablement sensibilisée à l'AFB<sub>1</sub> de manière irréversible et sont alors mises en contact avec une quantité déterminée d'anticorps monoclonal couplé à la peroxydase.

Lorsque les aflatoxines sont présentes dans l'échantillon, elles se lient à l'anticorps et empêchent, selon une réaction de compétition, la liaison de cet anticorps à l'aflatoxine fixée sur la plaque. Le complexe anticorps-aflatoxine libre est éliminée lors du lavage.

Dans les limites du test, la quantité d'anticorps qui se fixe à l'antigène porté par la plaque est inversement proportionnelle à la quantité d'aflatoxines contenues dans l'échantillon. Cette fixation d'anticorps est mise en évidence par l'activité de l'enzyme couplée, révélée par l'apparition d'un produit coloré, résultant de la dégradation du substrat.

Ainsi, plus la quantité d'aflatoxine est grande dans l'échantillon, plus l'intensité de la coloration dans les puits de la plaque de microtitration est faible.

### **\*Extraction**

L'extraction est basée sur la propriété de solubilité des aflatoxines dans les solvants organiques (chloroforme, méthanol, acétone...).

L'échantillon alimentaire doit être dégraissé et réduit en poudre fine à l'aide d'un broyeur, avant son extraction.

Vingt grammes de poudre d'échantillon sont pesés à 0,001 près, et mis en contact à température ambiante avec 60 ml d'un mélange méthanol/eau (80:20). La suspension obtenue est homogénéisée pendant 3 mn à grande vitesse et filtrée à travers du papier Whatman n°1 ou équivalent. Les premiers millilitres sont éliminés et 5 ml d'extrait sont récupérés dans un tube de 10 ml.

**NB :** Seuls les extraits méthanoliques peuvent être directement utilisés pour la réaction immuno-enzymatique. Dans le cas où d'autres solvants organiques sont utilisés pour l'extraction, ils seront éliminés par évaporation.

Pour ce faire, et afin de travailler toujours avec les mêmes proportions de poids sec d'échantillon et de volume de solvant, l'extrait obtenu sera traité de la façon suivante :

- prélever un volume V (ml) d'extrait dans le solvant organique choisi;
- évaporer à sec, en dessiccateur sous vide, ou sous courant d'azote ;
- soit X (ml), le volume de solvant utilisé pour extraire 1 g d'échantillon solide, le volume de reconstitution ( $V_r$ ) de l'extrait est donné par la relation suivante :

$$V_r = \frac{3V}{X} \text{ (ml)}$$

- solubiliser le résidu d'évaporation avec un volume de méthanol égal à  $0,8 V_r$ , puis ajouter un volume d'eau égal à  $0,2 V_r$ .

Quelle que soit la méthode d'extraction choisie, les extraits méthanoliques seront dilués au 1/3 à l'aide d'un tampon de dilution.

### **\*Test ELISA**

#### Réactifs du kit

- solutions étalons AFB<sub>1</sub> prêtes-à-l'emploi :
  - solution à 0,5 ppb
  - solution à 1,0 ppb
  - solution à 2,0 ppb
  - solution à 5,0 ppb
- témoin négatif
- solution A : tampon de dilution des extraits au 1/3
- solution B : tampon de dilution des extraits au 1/15 ; 1/75 et 1/375
- conjugué prêt-à-l'emploi
- tampon de lavage 10x
- substrat
- chromogène
- solution d'arrêt: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- plaque de microtitration à l'AFB<sub>1</sub> (96 puits)

- étalon AFB<sub>1</sub>

Déposer : 50 µl du 0,5 ppb dans les puits A3, A4  
50 µl du 1,0 ppb dans les puits A5, A6  
50 µl du 2,0 ppb dans les puits A7, A8  
50 µl du 5,0 ppb dans les puits A9, A10

### *Extraits*

Le taux de contamination en aflatoxines peut varier considérablement selon le type d'échantillon et son origine. Lorsque le niveau de contamination est inconnu, des dilutions en série au 1/5 permettent d'obtenir une gamme de concentration de 1 à 1250 ppb.

Cinquante microlitres des extraits dilués sont distribués dans les puits en dupliqué.

### Distribution du conjugué

Cinquante microlitres de la solution de conjugué sont déposés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 20 mn à température ambiante.

Chaque puits de la plaque est alors lavé quatre fois avec 300 µl de la solution de lavage diluée. L'excédent de tampon de lavage est éliminé en retournant la plaque sur un papier filtre et en la secouant.

### Révélation de l'anticorps lié à l'antigène fixé sur la plaque :

- distribuer 50 µl de substrat dans chaque puits ;
- distribuer ensuite 50 µl de chromogène dans chaque puits ;
- laisser incuber 20 mn à température ambiante ;
- arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de la solution d'arrêt.

Tapoter légèrement la microplaque pour bien homogénéiser les solutions présentes dans les puits.

## Lecture

Lire la Densité Optique (DO) dans chaque puits à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration.

## **\*Résultats**

### Courbe étalon

Les différentes quantités de solution étalon AFB<sub>1</sub> déposées sur la plaque permettent l'établissement d'une courbe :

- calculer pour chaque concentration de la solution étalon, la moyenne des deux absorbances ;
- calculer le pourcentage d'inhibition comme suit :

$$\frac{\text{Absorbance (témoin négatif)} - \text{Absorbance ((AFB}_1\text{) ppb)}}{\text{Absorbance (témoin négatif)}}$$

(AFB<sub>1</sub>) ppb = 0,5 ppb ; 1,0 ppb ; 2,0 ppb ; 5,0 ppb.

- tracer la courbe étalon sur la feuille de papier semi logarithmique (Annexe 2) : % inhibition = f ((AFB<sub>1</sub>) ppb).

### Extraits

- calculer pour chaque extrait, la moyenne des deux absorbances ;
- calculer le pourcentage d'inhibition comme suit :

$$\frac{\text{Absorbance (témoin négatif)} - \text{Absorbance (50 } \mu\text{l extrait)}}{\text{Absorbance (témoin négatif)}} \times 100$$

Seules les valeurs du pourcentage d'inhibition situées sur la partie linéaire de la courbe étalon sont à prendre en considération (entre 15 et 60 % environ).

Pour toutes les valeurs comprises dans cette intervalle, il est possible de déterminer la quantité d'aflatoxines donnant le même pourcentage d'inhibition d'après la courbe étalon.

Les résultats sont obtenus avec le maximum de précision lorsque les valeurs du pourcentage d'inhibition obtenues sont comprises entre 25 et 50 %.

La concentration en aflatoxines de l'échantillon est déterminée de la manière suivante :

#### *échantillon de dilution 1/3*

La concentration en aflatoxines de l'échantillon est directement obtenue avec la droite étalon (résultats en ppb).

#### *échantillon de dilution autre que 1/3*

La concentration en aflatoxines de l'échantillon est obtenue en multipliant le résultat obtenu avec la droite étalon par le facteur de dilution (15, 75 ou 375), et en le divisant par 3.

**NB :** Le kit TRANSIA permet le dosage des aflatoxines dans les céréales, les graines oléagineux et les aliments dérivés et composés.

Le seuil de détectabilité du test pour l'AFB<sub>1</sub> est de 0,055 ng/ml en solution, et égale à 0,5 ppb dans les aliments selon le protocole d'extraction choisi.

### **8.2. - Dosage des aflatoxines par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)**

L'extraction et le dosage des aflatoxines par CCM sont réalisés selon une technique préconisée par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists), pour le dosage des aflatoxines dans les céréales et les arachides de bouche (5).

Cette méthode a été modifiée en ce qui concerne la détermination de la quantité d'aflatoxines ; au lieu d'une estimation visuelle par référence aux étalons d'aflatoxines, ou d'une estimation densitométrique après la CCM, des mesures spectrophotométriques sont effectuées à 363 nm, à partir des spots d'AFB<sub>1</sub> récupérés dans deux millilitres de chloroforme.

La teneur en aflatoxines totales est alors exprimée en équivalent ppb AFB<sub>1</sub>, à partir d'une courbe étalon d'AFB<sub>1</sub> d'équation  $Y = 0,07 X$ .

## **9. - CULTURE CELLULAIRE**

### **9.1. - Obtention de la souche d'*Aspergillus flavus*.**

La souche d'*Aspergillus flavus* utilisée dans ce travail a été obtenue à partir de champignons ayant poussé sur des graines d'arachide mouillées et incubées à l'étuve à 30°C. Le clonage est réalisé sur milieu de Czapek (61) ; chaque colonie de champignon issue de la première culture subit un repiquage en points, par épuisement. La dernière colonie ayant poussée constitue une souche pure. La détermination systématique est faite d'après la méthode décrite par Christensen M. (22).

### **9.2. - Obtention de spores et production d'aflatoxines**

Le champignon est mis en culture sur milieu de Czapek par repiquage en stries, et incubation à l'étuve (28-30°C) pendant 10 jours. Les conidies sont alors récoltées dans de l'eau distillée stérile contenant 0,1 % de Tween 80 (104), et sont centrifugées à 4500g pendant 20 mn. Le culot contenant les spores est resuspendu dans de l'eau distillée et centrifugé de nouveau à 4500g pendant 20 mn. Cette dernière opération est reprise trois fois. Le culot cellulaire est finalement récupéré dans 5 ml d'eau distillée. Le nombre de spores par millilitre est déterminé par un comptage à la cellule de Thomas.

La production d'aflatoxines est réalisée en milieu de Reddy (94), dans des flacons erlenmeyer de 250 ml. Chaque flacon contenant 100 ml de milieu stérile pH 4,5, reçoit la suspension de spores de façon à ce que la concentration finale soit de  $10^5$  spores/ml. Les cultures sont incubées à l'étuve à 28-30°C pendant 8 jours. L'extraction et le dosage des aflatoxines se font d'après la méthode immunoenzymatique TRANSIA.

## **CHAPITRE III. - RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## **1. - EVALUATION DE LA CONTAMINATION DE L'ARACHIDE ET DES PRODUITS DE L'ARACHIDE PAR LES AFLATOXINES**

### **Introduction**

L'objectif poursuivi à travers cette étude est d'obtenir des informations sur le degré de contamination des différents produits à base d'arachide par les aflatoxines, et sur les différents types d'aflatoxines présents dans ces produits. Ces données, obtenues à partir de dosages quantitatifs et qualitatifs, permettront d'une part, d'apprécier l'incidence du degré de contamination sur la santé humaine, et d'autre part, d'avoir une idée sur l'espèce de champignon aflatoxinogène qui prévaut dans l'attaque de l'arachide au Burkina Faso. Par ailleurs, les résultats issus de cette étude permettront d'orienter les recherches vers des méthodes mieux adaptées à la conservation des produits de l'arachide.

### **Résultats**

L'analyse qualitative a été effectuée par CCM d'extraits chloroformiques d'échantillons de graines d'arachide (figure. III.1.).

L'analyse quantitative des aflatoxines a été effectuée sur des échantillons de graines d'arachide, de pâtes d'arachide, de marba tiguè et d'arachide sucrée.

Les résultats de l'analyse quantitative sont présentés dans les tableaux III.1 , III.2., figure III.2., et tableau III.3..



A

B

**Figure,III,1.** : Chromatographie sur couche mince d'extrait chloroformique de graine d'arachide

A - Piste de standard d'aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (10 µg/ml ; dépôts de 20 µl)

B - Piste d'extrait de graine d'arachide (dépôts de 300 µl). Solvant de migration : chloroforme-Acétone-isopropanol-eau 98/2/1/1

Rf. étalons

AFB<sub>1</sub> = 0,42

AFB<sub>2</sub> = 0,37

AFG<sub>1</sub> = 0,32

AFG<sub>2</sub> = 0,27

Rf. échantillon

AFB<sub>1</sub> = 0,43

AFB<sub>2</sub> = 0,37

AFG<sub>1</sub> = 0,34

AFG<sub>2</sub> = 0,29

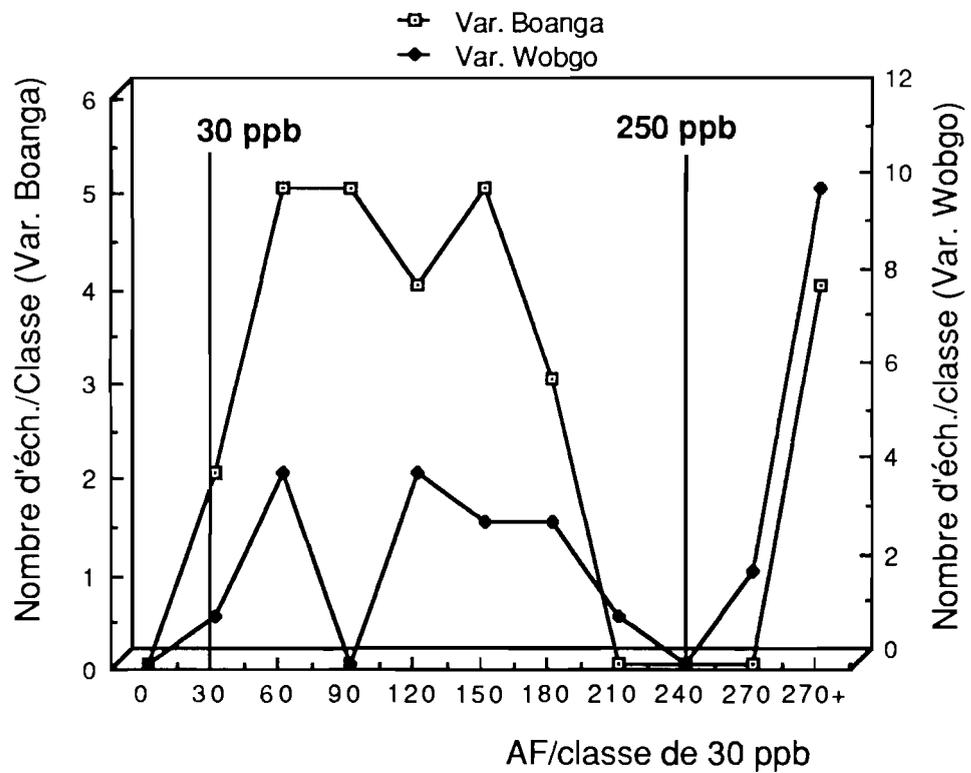
**Tableau III.1.** :Teneurs en aflatoxines dans des échantillons de graines d'arachide de deux variétés locales Boanga et Wobgo.

Variété Boanga		Variété Wobgo	
Aflatoxines (ppb AFB <sub>1</sub> )		Aflatoxines (ppb AFB <sub>1</sub> )	
64	± 6	204	± 2
121	± 2	346	± 7
407	± 3	417	± 2
37	± 1	53	± 6
64	± 1	48	± 5
116	± 11	167	± 4
79	± 1	318	± 6
167	± 1	39	± 4
42	± 1	54	± 4
176	± 4	154	± 4
38	± 1	19	± 2
94	± 4	109	± 3
11	± 1	136	± 2
136	± 4	147	± 4
322	± 2	919	± 8
89	± 8	141	± 2
497	± 6	376	± 5
55	± 5	694	± 16
137	± 1	641	± 14
79	± 4	264	± 2
46	± 1	506	± 5
104	± 2	115	± 5
22	± 3	509	± 2
149	± 2	279	± 6
112	± 6	156	± 4
407	± 8	262	± 1
124	± 6	101	± 1
174	± 3	116	± 1
Moyenne + écart type = 138,2 ± 123,3		Moyenne + écart type = 260,4 ± 230,0	

Résultats obtenus sur des essais réalisés en triple.

Tableau III.2. Répartition des teneurs en aflatoxines totales par classes de 30 µg/kg.

Classe	0-30	31-60	61-90	91-120	121-150	151-180	181-210	211-240	241-270	270+
Var. Boanga	2	5	5	4	5	3	0	0	0	4
Var. Wobgo	1	4	0	4	3	3	1	0	2	10



NB : AF = aflatoxines ; Var. = variété

**Figure III.2 :** Courbes de répartition des teneurs en aflatoxines totales dans les échantillons des deux variétés (Boanga et Wobgo) par classes de 30 ppb.

**Tableau III.3** : Teneurs en aflatoxines dans des produits à base d'arachide  
(Marba tiguè + arachide sucrée, pâtes d'arachide).

Cacahuètes + Arachide sucrée		Pâtes d'arachide	
Aflatoxines (ppb AFB <sub>1</sub> )		Aflatoxines (ppb AFB <sub>1</sub> )	
160	± 3	489	± 3
594	± 7	386	± 3
198	± 3	238	± 2
604	± 5	169	± 2
474	± 2	142	± 3
269	± 8	335	± 5
678	± 10	559	± 4
129	± 2	311	± 4
183	± 4	258	± 3
125	± 2	407	± 5
144	± 1	166	± 3
616	± 5	132	± 2
456	± 3	117	± 3
Moyenne + écart type = 356 ± 217		Moyenne + écart type = 285 ± 144	

Résultats obtenus sur des essais réalisés en double.

## Discussion

### **\* De l'analyse qualitative.**

L'analyse par CCM des extraits chloroformiques de graines d'arachide (cf. figure III.1.) montre la présence dans les extraits, des quatre principaux types d'aflatoxines (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>). Les aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> qui sont bleu fluorescent en U.V. sont produites par les souches toxigènes de *Aspergillus flavus*, tandis que les aflatoxines G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> (vert fluorescent) seraient produites par les souches toxigènes de *Aspergillus parasiticus*, qui produiraient en outre, les aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> (106). Il existe donc au Burkina Faso, les deux espèces de champignons toxigènes sans qu'on puisse, dans l'étape actuelle des recherches juger de la prévalence de l'une ou de l'autre espèce.

### **\* De l'analyse quantitative des échantillons de graines d'arachide.**

L'analyse quantitative des aflatoxines montre, au niveau des échantillons de graines d'arachide, (cf. tableau III.1., III.2. et figure III.2.) que 7 % et 3,5 % des échantillon (resp. pour les variétés Boanga et Wobgo), présentent des teneurs en aflatoxines inférieures à la limite autorisée de 30 µg/kg; 14 % et 43 % de ces échantillons ont des teneurs supérieures au seuil de toxicité de 250 µg/kg.

Par ailleurs, on note à travers les résultats, des différences significatives de teneurs intravariétales et intervariétales.

Les fortes teneurs en aflatoxines observées de manière générale dans les produits, seraient dues au développement des champignons aflatoxinogènes dans les graines au cours du stockage ; plusieurs auteurs font en effet état de l'altération physique, suivie d'une augmentation des teneurs en aflatoxines dans des échantillons d'arachide au cours du stockage (19 e, 35, 36, 66, 107, 121) : les échantillons utilisés dans cette étude n'ont été analysés qu'après une période de stockage de 7 mois dans des sachets plastiques.

Les différences de teneurs intravariétales qui sont de 486 µg/kg dans la variété Boanga et 900 µg/kg dans la variété Wobgo (différences entre les teneurs extrêmes), s'expliqueraient par l'hétérogénéité des échantillons de chaque variété à la récolte ; les gousses d'arachide étant de qualités physiques différentes, les différents lots d'arachide n'auront pas la même teneur initiale en aflatoxines même s'ils appartiennent à une seule variété.

Les différences de teneurs intervariétales (122 µg/kg en moyenne entre les deux variétés), proviendraient de la texture et des composantes des enveloppes des graines de chaque variété ; les échantillons de la variété Wobgo sont dans l'ensemble plus contaminés que ceux de la variété Boanga. (figure III.2.). Si l'on considère les échantillons ayant des teneurs en aflatoxines au-delà du seuil de toxicité de 250 µg/kg, le rapport entre la variété Boanga et la variété Wobgo est égal à 0,4 (différence entre les échantillons les plus contaminés). Les échantillonnages ont pourtant été effectués de manière aléatoire, et les conditions de conservation sont identiques.

Des études menées par d'autres auteurs (35, 53) ont montré que la résistance de certains cultivars d'arachide à la contamination par les aflatoxines, ou à l'invasion des champignons aflatoxinogènes était liée à des facteurs tels que, l'arrangement compact des cellules du tégument, la moindre tendance de la graine à réabsorber l'eau après séchage, la haute concentration en lignine et en composés phénoliques entre les cellules du tégument.

Les différences de teneurs en aflatoxines entre les deux variétés de la présente étude, pourraient être liées aux facteurs sus cités.

D'autre part, l'invasion des gousses par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* pouvant s'effectuer avant la récolte, ces différences de teneurs peuvent être liées aux conditions environnementales (HR, température), et donc aux sites culturaux. La pluviométrie annuelle varie entre 900 - 1300 mm pour la région de Léo, et 500 - 950 mm pour la région de Ouagadougou.

**\* De l'analyse quantitative dans les produits de l'arachide.**

Les résultats de l'analyse quantitative des aflatoxines dans les produits de l'arachide (cf. Tableau III.3), montrent que tous les échantillons analysés ont des teneurs supérieures à la limite autorisée de 30 µg/kg. Cinquante quatre pour cent des échantillons possèdent des teneurs au-delà du seuil de toxicité. D'autres analyses effectuées sur des échantillons de pâtes d'arachides de préparation locale dont les graines ont subi un triage préalable, montrent des teneurs en aflatoxines nettement plus faibles et dans la limite acceptable (Tableau III.4).

**Tableau III.4.** : Teneur en aflatoxines dans des échantillons de pâtes d'arachide de la CITEC, et dans des échantillons de pâtes d'arachides de préparation locale dont les graines ont subi un triage préalable.

Pâtes d'arachide CITEC	Pâtes d'arachide locales avant triage	Pâtes d'arachide locales après triage
Aflatoxines(ppbAFB <sub>1</sub> )	Aflatoxines(ppbAFB <sub>1</sub> )	Aflatoxines(ppbAFB <sub>1</sub> )
2,8 ± 0,8	108 ± 4	4,5 ± 0,8
3,7 ± 0,2	112 ± 8	4,9 ± 0,2
3,9 ± 0,5	167 ± 7	4,6 ± 0,5

Ces résultats montrent que le triage constitue un moyen de décontamination efficace ; il est à conseiller comme pratique préalable à la transformation des graines d'arachides en sous produits (pâtes d'arachide, marba tiguè...), pour limiter les risques d'intoxication.

Il faut toutefois noter qu'au niveau des pâtes d'arachide, les habitudes culinaires au Burkina Faso permettent l'élimination d'une partie des aflatoxines ; les pâtes d'arachide sont généralement utilisées dans la préparation des sauces cuites. Une partie des aflatoxines peut être éliminée par la chaleur de cuisson (13, 35, 39).

## **Conclusion**

Au Burkina Faso, les aflatoxines sont présentes dans l'arachides et les produits de l'arachide, à des teneurs situées très souvent au-delà de la limite autorisée de 30 µg/kg, souvent au-delà du seuil de toxicité de 250 µg/kg.

Les quatre principaux types d'aflatoxines (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>) se rencontrent dans les produits de l'arachide contaminée, ce qui suppose la présence dans l'environnement burkinabè, des deux principales espèces de champignons aflatoxinogènes (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*).

Etant donné l'importance de l'arachide dans l'économie et l'alimentation burkinabè, des lois et/ou réglementations nationales sur la limitation des teneurs d'aflatoxines dans ce produit sont nécessaires pour préserver la santé humaine et animale.

Le triage des graines d'arachide contaminées avant leur transformation en produits dérivés constitue un des premiers moyens, praticables et moins coûteux, de détoxification des produits contaminés.

Des études plus orientées sont à envisager pour mieux cerner les différences intervariétales de teneurs en aflatoxines (122 µg/kg) constatées dans la présente. Ceci permettrait de déceler l'existence possible d'une résistance à la contamination par les aflatoxines dans l'une des variétés utilisées.

## **2. - EVOLUTION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES ET PRODUCTION D' AFLATOXINES DANS DES GRAINES D' ARACHIDES AU COURS DU STOCKAGE**

### **Introduction**

Des analyses qualitatives et quantitatives des aflatoxines effectuées dans des produits et sous produits de l'arachide (cf. Tableau III.1), il ressort que les aflatoxines sont présentes dans l'arachide à des teneurs souvent situées

au-delà du seuil de toxicité de 250 µg/kg. D'autre part, l'étude comparative sur les teneurs en aflatoxines dans les deux variétés locales (Boanga et Wobgo), montre qu'il existe des différences de teneurs intervariétales qui pourraient être liées à des propriétés spécifiques à chaque variété. Par ailleurs, au cours du stockage des graines d'oléagineux telles que les graines d'arachide, la production d'aflatoxines s'accompagne d'une altération physique et d'une baisse de la qualité nutritive (19 e, 35, 121).

L'objectif de la présente étude est d'obtenir des informations sur l'évolution des paramètres physiques et chimiques dans la conservation de l'arachide au Burkina Faso, d'apprécier l'évolution de ces paramètres et au besoin, de préconiser de meilleures conditions de stockage.

Par ailleurs, un suivi de l'évolution des paramètres physico-chimiques permettrait d'obtenir des informations sur la voie de biosynthèse des aflatoxines et sur certains facteurs de résistance (propres aux variétés), à la contamination par les champignons aflatoxinogènes.

### **Résultats et discussions**

Les échantillons utilisés dans cette étude sont constitués de graines d'arachide fournies par les laboratoires d'Entomologie et de Phytopathologie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Ouagadougou. Au total, 25 échantillons de graines des deux variétés Boanga et Wobgo, ont été utilisés.

#### **\* Constituants chimiques et production d'aflatoxines**

Les résultats des analyses des teneurs en protéines, lipides, glucides et aflatoxines effectuées sur les échantillons des deux variétés sont présentés dans les tableaux III.5 et III.6, et les figures III.3. et III.4.

**Tableau III.5.** : Evolution des constituants chimiques et de la production d'aflatoxines au cours du stockage dans des échantillons de graines d'arachide de la variété Boanga.

Période de stockage Juin-Juil. 1989				Période de stockage Déc.-Janv. 1990				Période de stockage Juil.-Août 1990			
Protéines (g%)	Glucides (g%)	lipides (g%)	AFlat. (ppb AFB1)	Protéines (g%)	Glucides (g%)	lipides (g%)	AFlat. (ppb AFB1)	Protéines (g%)	Glucides (g%)	lipides (g%)	AFlat. (ppb AFB1)
26,7 ± 0,3	12,8 ± 0,2	47,7 ± 0,1	230	21,4 ± 0,9	11,7 ± 2,2	47,2 ± 0,9	424	20,8 ± 0,6	8,6 ± 0,3	44,6 ± 0,4	462
28,6 ± 0,4	15,0 ± 0,3	43,5 ± 0,1	120	26,4 ± 0,4	13,6 ± 1,3	43,4 ± 0,4	275	22,8 ± 1,0	10,0 ± 0,2	40,3 ± 0,4	375
29,5 ± 0,2	17,7 ± 0,6	47,7 ± 0,2	159	22,0 ± 0,7	14,2 ± 1,7	46,7 ± 0,5	199	18,7 ± 0,4	10,5 ± 0,7	46,2 ± 0,1	295
28,8 ± 0,7	16,3 ± 0,2	44,8 ± 0,3	303	22,8 ± 0,8	11,8 ± 1,6	43,5 ± 0,9	426	18,4 ± 0,4	10,2 ± 0,6	42,2 ± 0,1	685
22,0 ± 0,2	18,8 ± 0,8	48,4 ± 0,2	109	20,6 ± 0,2	12,4 ± 1,1	48,1 ± 0,7	243	20,2 ± 0,7	11,6 ± 0,9	47,7 ± 2,1	362
27,6 ± 0,2	16,9 ± 0,7	48,1 ± 0,1	152	22,3 ± 1,0	14,6 ± 1,5	47,8 ± 0,1	234	21,1 ± 0,6	9,7 ± 1,3	46,6 ± 0,2	481
30,5 ± 0,2	14,2 ± 1,0	46,2 ± 0,2	71	23,1 ± 0,3	13,3 ± 0,9	44,2 ± 0,9	140	20,3 ± 0,9	9,6 ± 0,5	44,1 ± 0,8	265
29,4 ± 2,2	24,2 ± 1,2	41,3 ± 0,1	231	22,8 ± 0,5	15,8 ± 1,3	40,6 ± 0,3	396	22,0 ± 0,4	15,7 ± 0,4	40,1 ± 0,8	734
27,6 ± 0,2	11,3 ± 0,3	47,8 ± 0,1	403	22,8 ± 0,2	10,7 ± 1,6	47,7 ± 0,1	430	19,7 ± 0,3	7,4 ± 0,9	47,4 ± 0,1	576
23,0 ± 0,3	14,2 ± 0,3	43,5 ± 0,2	144	21,8 ± 0,8	12,7 ± 1,6	42,5 ± 0,8	158	18,4 ± 0,1	9,5 ± 0,4	40,1 ± 0,6	282
24,7 ± 0,6	12,8 ± 0,4	46,0 ± 0,1	268	21,9 ± 0,8	10,4 ± 1,2	45,3 ± 0,4	318	20,9 ± 0,4	8,9 ± 0,6	44,5 ± 0,5	584
26,6 ± 0,4	13,2 ± 0,2	45,7 ± 0,3	159	22,5 ± 0,2	12,2 ± 1,0	44,5 ± 0,3	170	21,3 ± 0,6	7,7 ± 0,5	44,3 ± 0,1	215
25,1 ± 0,3	13,3 ± 0,4	47,4 ± 0,1	121	22,1 ± 0,2	11,4 ± 0,6	46,6 ± 0,1	268	20,1 ± 0,4	9,1 ± 0,2	44,9 ± 0,8	382
26,9 ± 2,6	15,4 ± 3,4	46,0 ± 2,2	198 ± 86	22,5 ± 1,4	12,7 ± 1,6	45,2 ± 2,3	291 ± 99	20,4 ± 1,3	9 ± 2,1	44,1 ± 2,7	438 ± 165

Aflat.= Aflatoxines

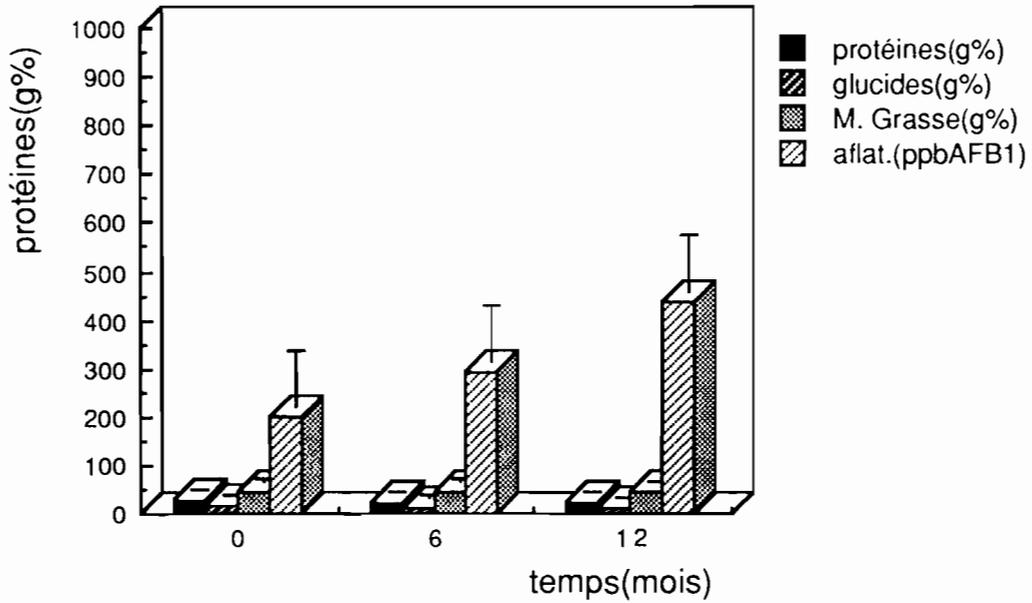
Résultats obtenus sur des essais réalisés en triple.

**Tableau III.6.** : Evolution des constituants chimiques et de la production d'aflatoxines au cours du stockage dans des échantillons de graines d'arachide de la variété Wobgo.

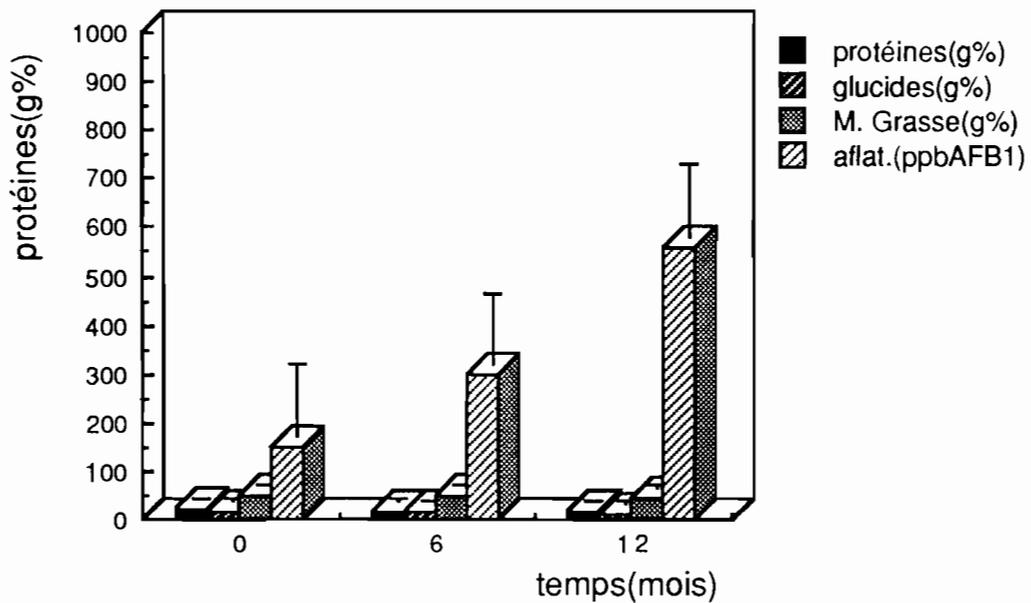
Période de stockage Juin-Juil. 1989				Période de stockage Déc.-Janv. 1990				Période de stockage Juil.-Août 1990			
Protéines (g%)	Glucides (g%)	lipides (g%)	AFlat. (ppb AFB1)	Protéines (g%)	Glucides (g%)	lipides (g%)	AFlat. (ppb AFB1)	Protéines (g%)	Glucides (g%)	lipides (g%)	AFlat. (ppb AFB1)
22,5 ± 0,2	19,0 ± 1,9	54,1 ± 0,1	153	19,3 ± 0,7	14,3 ± 0,5	52,9 ± 0,2	230	17,1 ± 0,1	11,9 ± 1,4	50,6 ± 0,4	782
18,6 ± 0,1	19,1 ± 0,7	48,2 ± 0,2	130	15,7 ± 0,8	16,5 ± 1,7	45,6 ± 0,1	580	13,3 ± 0,2	14,0 ± 0,4	45,0 ± 0,5	704
20,7 ± 0,2	18,4 ± 1,2	52,5 ± 0,2	157	16,6 ± 0,2	13,3 ± 0,6	49,9 ± 0,2	301	14,3 ± 0,8	10,6 ± 1,3	48,5 ± 0,6	787
19,1 ± 1,0	17,9 ± 1,7	54,1 ± 0,2	199	15,8 ± 0,3	16,0 ± 0,9	52,1 ± 0,1	382	10,0 ± 0,7	12,6 ± 1,2	44,4 ± 0,9	656
23,0 ± 0,4	12,8 ± 0,4	48,9 ± 0,1	167	18,3 ± 0,5	10,3 ± 0,7	48,5 ± 0,3	191	16,4 ± 0,3	9,2 ± 2,1	47,2 ± 0,4	609
20,6 ± 0,3	16,8 ± 1,3	46,4 ± 0,1	65	17,1 ± 0,3	16,7 ± 1,5	44,1 ± 0,1	103	16,5 ± 0,3	12,2 ± 0,5	43,6 ± 0,3	386
18,4 ± 0,2	16,3 ± 3,1	49,8 ± 0,3	339	15,1 ± 0,4	14,1 ± 0,4	49,7 ± 0,1	560	13,3 ± 0,4	12,2 ± 0,5	47,5 ± 0,2	971
19,9 ± 0,8	21,8 ± 0,8	47,2 ± 0,2	27	16,4 ± 0,4	21,3 ± 0,6	44,2 ± 0,2	145	15,2 ± 0,2	14,6 ± 0,3	43,8 ± 0,1	236
23,0 ± 0,1	12,9 ± 1,3	49,5 ± 0,1	126	21,4 ± 1,2	10,2 ± 0,5	48,0 ± 0,2	369	19,1 ± 0,2	9,2 ± 0,6	46,2 ± 0,5	562
19,7 ± 0,1	18,2 ± 1,4	49,9 ± 0,3	152	16,1 ± 0,3	12,6 ± 1,2	49,0 ± 0,1	207	14,5 ± 0,2	10,7 ± 1,9	47,8 ± 0,3	523
26,7 ± 0,2	14,0 ± 2,7	49,1 ± 0,4	106	21,2 ± 1,7	12,2 ± 0,7	47,4 ± 0,2	209	20,0 ± 0,3	10,4 ± 0,4	46,0 ± 0,5	276
29,1 ± 0,2	14,2 ± 1,9	49,7 ± 0,4	156	19,8 ± 0,1	11,9 ± 0,8	49,7 ± 0,2	280	16,0 ± 0,3	10,4 ± 0,4	46,0 ± 0,5	567
21,7 ± 3,3	16,8 ± 2,8	49,9 ± 2,4	148 ± 76	17,7 ± 2,2	14,1 ± 3,1	48,4 ± 2,9	296 ± 152	15,5 ± 2,7	11,3 ± 1,9	46,4 ± 2,0	588 ± 215

Aflat.= Aflatoxines

Résultats obtenus sur des essais réalisés en triple.



**Figure III.3.** : Evolution des constituants chimiques et de la production d'aflatoxines au cours du stockage dans des échantillons de graines d'arachide de la variété BOANGA.



**Figure III.4.** : Evolution des constituants chimiques et de la production d'aflatoxines au cours du stockage dans des échantillons de graines d'arachide de la variété WOBGO

Au cours du stockage, on note dans les deux variétés de graines d'arachide, une baisse moyenne de 6 à 6,5 % et de 5,5 % respectivement pour les protéines totales et les glucides totaux. La baisse des teneurs en lipides est moins importante et est de 1,9 %, pour la variété Boanga et 3,5 % pour la variété Wobgo.

La baisse globale des teneurs en protéines, glucides et lipides est accompagnée d'une augmentation notable des teneurs en aflatoxines qui sont de 120 % pour les graines de la variété Boanga, et 300 % pour la variété Wobgo, pour les 12 mois de stockage.

Il existe, entre les deux variétés de graines, une différence dans l'évolution des constituants chimiques et la production d'aflatoxines. La baisse des teneurs en protéines et glucides est sensiblement égale dans les deux variétés, mais celle des teneurs en lipides est moins importante dans la variété Boanga (1,9 %) que dans la variété Wobgo (3,5 %). Corrélativement, la production d'aflatoxines est plus importante dans la variété Wobgo que dans la variété Boanga.

Ces résultats montrent qu'il existe un impact certain de l'évolution des teneur en protéines, glucides et lipides sur la production d'aflatoxines ; la baisse des teneurs de ces constituants chimiques s'accompagne d'une augmentation de la production d'aflatoxines. Ces résultats concordent avec les données de plusieurs études déjà réalisées sur les dynamiques du métabolisme des hydrates de carbones, les activités enzymatiques de l'acide tricarboxylique et la voie d'Embden-Meyerhof, la polycétone synthétase, le rôle des acides aminés et l'influence du métabolisme des lipides sur la biosynthèse des aflatoxines (35, 55, 62, 87, 111, 121). L'altération des composantes chimiques des graines s'accompagne d'une augmentation de la production d'aflatoxines.

Dans le cas des graines d'arachide stockées, le métabolisme des lipides (lipoperoxydation notamment) semble être plus déterminant dans la production des aflatoxines.

**\* Teneur en eau, humidité relative et production d'aflatoxines**

La température moyenne de stockage est d'environ 26°C ; l'humidité relative moyenne de l'environnement de stockage est de 60 % entre Juin et Juillet 1989; elle chute à 50 % entre Décembre et Janvier 1990, puis remonte à 70 % entre Juillet et Août 1990. Les teneurs en eau des échantillons évoluent dans le même sens que l'humidité relative tout au long du stockage (tableaux III.7 et III.8, et figures III.5. et III.6.). Les teneurs en aflatoxines quant à elles, vont croissantes du début à la fin de la période de stockage.

**Tableau III.7:** Evolution de la teneur en eau, de l'humidité relative et de la production d'aflatoxines au cours du stockage dans des échantillons de graines d'arachide de la variété Boanga.

Période de stockage Juin-Juil. 1989			Période de stockage Déc.-Janv. 1990			Période de stockage Juil.-Août 1990		
Teneur en eau (%)	Humidité relative (%)	AFlat. (ppb AFB1)	Teneur en eau (%)	Humidité relative (%)	AFlat. (ppb AFB1)	Teneur en eau (%)	Humidité relative (%)	AFlat. (ppb AFB1)
3,2 ± 0,1		230	2,0 ± 0,1		424	4,3 ± 0,3		462
2,6 ± 0,1		120	1,6 ± 0,1		275	3,4 ± 0,1		375
2,7 ± 0,2		159	2,0 ± 0,1		199	3,8 ± 0,2		295
3,0 ± 0,2		303	2,6 ± 0,1		426	3,4 ± 0,1		685
3,4 ± 0,1		109	2,0 ± 0,1		243	3,2 ± 0,1		362
3,0 ± 0,4	60 ± 5	152	2,3 ± 0,2	50 ± 5	234	4,4 ± 0,3	70 ± 5	481
3,2 ± 0,2		71	2,6 ± 0,1		140	4,2 ± 0,1		265
3,9 ± 0,1		231	2,0 ± 0,1		396	3,8 ± 0,3		734
3,5 ± 0,3		403	2,0 ± 0,1		430	4,0 ± 0,1		576
3,0 ± 0,1		144	2,0 ± 0,1		158	3,2 ± 0,1		282
2,9 ± 0,1		268	2,0 ± 0,1		318	2,7 ± 0,3		584
2,8 ± 0,2		159	2,0 ± 0,1		170	4,2 ± 0,1		215
2,9 ± 0,1		121	2,0 ± 0,1		268	3,7 ± 0,4		382
3,1 ± 0,4		198 ± 86	2,1 ± 0,3		291 ± 99	3,7 ± 0,5		438 ± 165

Aflat..= Aflatoxines

Résultats obtenus sur des essais réalisés en triple.

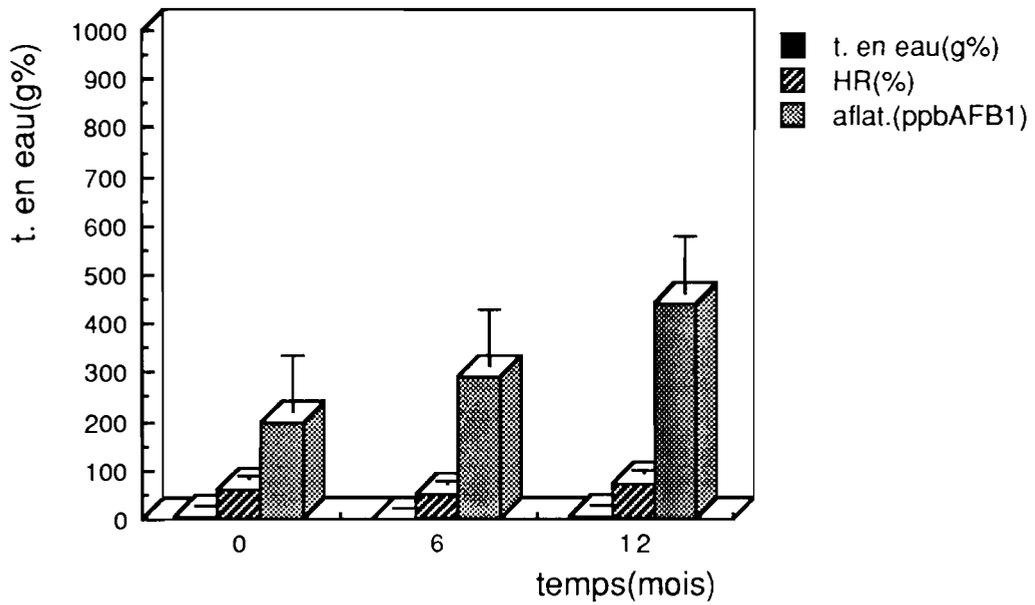
**Tableau III.8** : Evolution de la teneur en eau, de l'humidité relative et de la production d'aflatoxines au cours du stockage, dans des échantillons de graines d'arachide de la variété Wobgo.

Période de stockage Juin-Juil. 1989			Période de stockage Déc.-Janv. 1990			Période de stockage Juil.-Août 1990		
Teneur en eau (%)	Humidité relative (%)	AFlat. (ppb AFB1)	Teneur en eau (%)	Humidité relative (%)	AFlat. (ppb AFB1)	Teneur en eau (%)	Humidité relative (%)	AFlat. (ppb AFB1)
7,8 ± 0,2		153	3,4 ± 0,3		230	6,1 ± 0,2		782
7,5 ± 0,4		130	5,7 ± 0,1		580	6,2 ± 0,1		704
8,1 ± 0,1		157	4,4 ± 0,1		301	5,0 ± 0,2		787
8,1 ± 0,3		199	3,8 ± 0,1		382	6,1 ± 0,4		656
7,6 ± 0,4		167	4,0 ± 0,1		191	6,0 ± 0,2		609
7,3 ± 0,2	60 ± 5	65	4,4 ± 0,1	50 ± 5	103	5,7 ± 0,4	70 ± 5	386
7,6 ± 0,2		339	5,1 ± 0,4		560	5,3 ± 0,1		971
8,0 ± 0,3		27	5,1 ± 0,4		145	5,2 ± 0,1		236
7,1 ± 0,1		126	3,2 ± 0,1		369	6,1 ± 0,2		562
8,3 ± 0,2		152	3,7 ± 0,3		207	5,8 ± 0,3		523
8,1 ± 0,4		106	3,1 ± 0,1		209	5,6 ± 0,1		276
8,2 ± 0,2		156	3,4 ± 0,4		280	6,0 ± 0,1		567
7,8 ± 0,4		148 ± 76	4,1 ± 0,8		296 ± 152	5,7 ± 0,4		588 ± 215

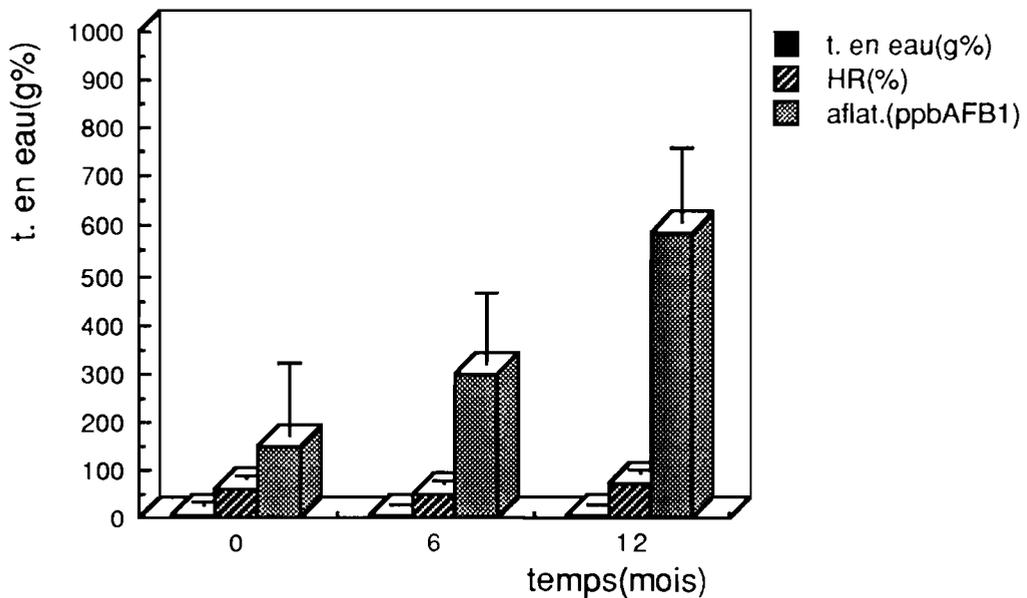
62

Aflat.= Aflatoxines

Résultats obtenus sur des essais réalisés en triple.



**Figure III.5.** : Evolution de la teneur en eau des graines, de l'humidité relative et de la production d'aflatoxines au cours du stockage (Variété BOANGA)



**Figure III.6.** : Evolution de la teneur en eau des graines, de l'humidité relative et de la production d'aflatoxines au cours du stockage (Variété WOBGO).

Les principaux facteurs intervenant dans la croissance des champignons de stockage sont : l'humidité relative, la température, le temps de stockage et la composition gazeuse de l'environnement de stockage (26, 35, 49, 66, 68, 85, 121). Une étude effectuée sur des semences d'arachide par Austwick et Ayerst (35), montre une corrélation entre l'humidité relative et la teneur en eau des semences à une température constante de 30°C ; à 70 % d'HR correspond une teneur en eau de 7 % dans les semences et à 98 % d'HR correspond une teneur en eau de 30,5 %. Les résultats de la présente étude, obtenus sur les échantillons de la variété Wobgo concorde en partie avec ces données.

Les valeurs optimales d'HR favorable à la croissance des champignons tels que *Aspergillus flavus* se situent entre 80 et 85 %, et la biosynthèse des aflatoxines est possible lorsque la teneur en eau est de 8 % (35). Les résultats obtenus sur les deux variétés d'arachides montrent que la variété Wobgo a une teneur en eau deux fois supérieure à celle de la variété Boanga. Par ailleurs, au cours du stockage, la teneur en eau est plus importante dans la variété Wobgo que dans la variété Boanga. Le taux de réabsorption d'eau est équivalente pour les deux variétés lorsque l'HR augmente, mais la teneur en eau demeure plus élevée dans les échantillons de la variété Wobgo. Les teneurs en aflatoxines sont elles aussi, plus élevées dans les échantillons de la variété Wobgo que dans ceux de la variété Boanga.

La teneur en eau des graines est donc un facteur déterminant dans la biosynthèse des aflatoxines au cours du stockage des graines d'arachide.

## **Conclusion**

### **\* Teneur en eau, capacité hygroscopique, métabolisme des lipides et biosynthèse des aflatoxines.**

L'étude sur l'évolution des paramètres physico-chimiques et la production d'aflatoxines au cours du stockage des graines d'arachide fait ressortir que :

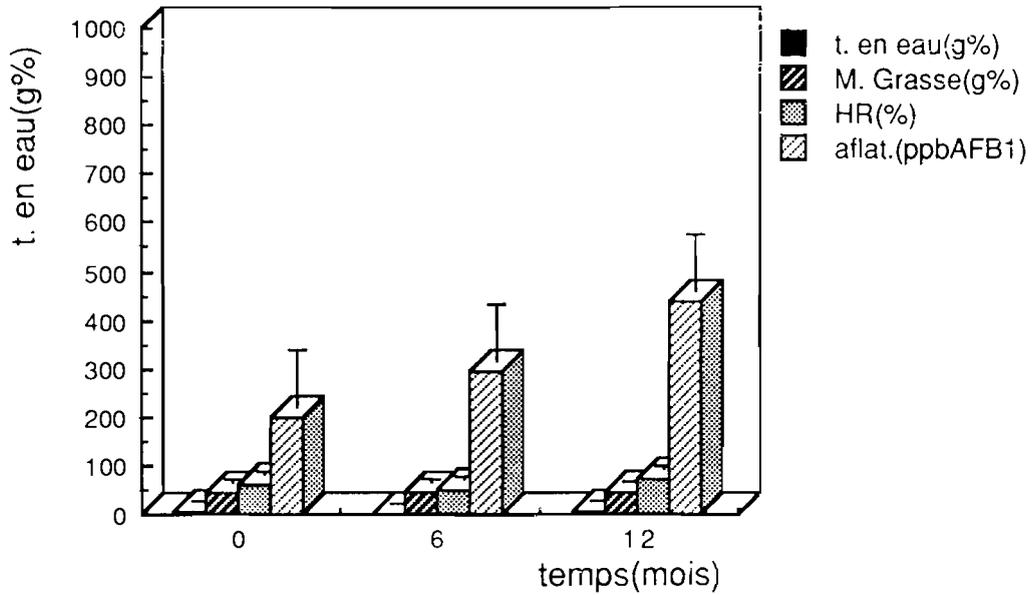
- Plus il y a perte de la teneur en lipides dans les graines, plus il y a production d'aflatoxines.

- Plus la teneur en eau des graines est élevée, plus la production d'aflatoxines est importante.

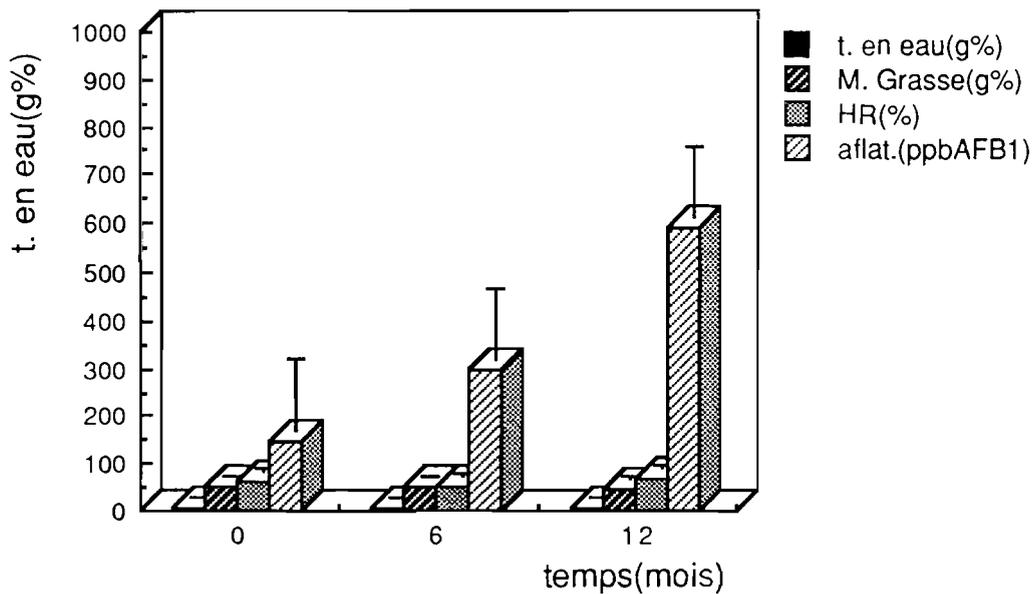
Teneur en eau et métabolisme des lipides sont donc les deux facteurs les plus déterminants dans la production des aflatoxines au cours du stockage des graines d'arachide (figures III.7. et III.8.).

Des études réalisées sur des semences d'arachide (35) font ressortir qu'au cours du stockage, la teneur en eau en elle même, n'est pas aussi importante que la capacité hygroscopique des graines et l'HR du microenvironnement autour des graines stockées. Dans la présente étude, les résultats obtenus montrent que dans les mêmes conditions de stockage, les échantillons de la variété Wobgo ont une capacité de rétention en eau plus élevée que ceux de la variété Boanga. Des essais réalisés sur le taux d'absorption en eau des graines ont montré que les graines de la variété Wobgo avaient un taux moyen d'absorption de 15 %, alors que ce taux pour les graines de la variété Boanga est de 10 %. Les graines de la variété Wobgo sont donc plus hygroscopiques que celles de la variété Boanga, et sont de ce fait plus susceptibles à l'invasion des champignons tels que *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*.

Au regard des résultats enregistrés, les graines d'arachide de la variété Boanga sont plus à recommander comme arachide de bouche, parce que moins susceptibles à l'invasion des champignons aflatoxinogènes, surtout lorsque des paramètres tels que la teneur en eau et l'HR sont maîtrisés.



**Figure III.7.** : Effets du métabolisme des lipides, et de la teneur en eau des graines sur la biosynthèse des aflatoxines au cours du stockage. (Variété Boanga).



**Figure III.8.** : Effets du métabolisme des lipides, et de la teneur en eau des graines sur la biosynthèse des aflatoxines au cours du stockage. (Variété Wobgo).

### **3. - EFFETS PROBABLES DE LA CONTAMINATION PAR LES AFLATOXINES EN PATHOLOGIE HUMAINE (CANCER DU FOIE)**

#### **Introduction**

Au Burkina Faso, les différents types d'aflatoxines sont présents dans les produits et sous produits de l'arachide, souvent à des teneurs dépassant le seuil de toxicité. Ces fortes teneurs sont liées à différents facteurs, internes ou externes, aux produits de l'arachide. Les aflatoxines sont reconnues comme étant les plus cancérigènes parmi les substances naturelles toxiques ; elles sont en outre hépatotoxiques, tératogènes et immunosuppressives (19 b, 32, 35, 44, 73 a, 77, 84, 106, 121).

L'un des sous produits de l'arachide les plus utilisés dans l'alimentation humaine au Burkina Faso est la pâte d'arachide ; elle entre dans la composition de la plupart des sauces, surtout dans la partie Sud-Ouest du Burkina Faso.

L'objectif de cette étude est d'obtenir des données sur l'ampleur de la consommation de la pâte d'arachide dans une zone définie du Burkina Faso (Bobo-Dioulasso), et d'évaluer les effets de consommation sur la santé humaine, connaissant le degré de contamination par les aflatoxines dans les pâtes d'arachide.

#### **Résultats et discussions**

Une enquête a été menée au niveau des concessions de la ville de Bobo-Dioulasso, de façon à avoir une idée sur la consommation de la pâte d'arachide (quantités consommées, rythme de consommation). Les résultats sont présentés dans le Tableau III.9. ; et la fiche d'enquête en annexe 3.

Cette enquête a porté sur 35 concessions de 10 personnes en moyenne. La population concernée représente environ 1/650 de celle de la ville de Bobo Dioulasso, si l'on se réfère aux données du recensement de 1985 (annexe 4).

**Tableau III.9** : Résultats de l'enquête menée sur la consommation de la pâte d'arachide dans la ville de Bobo-Dioulasso.  
Taille de l'échantillon : 35 concessions

<p><b>A. <u>Questions d'ordre général</u></b></p> <p>1) Nombre moyen de personnes par concession : 10 2) Nombre moyen d'enfants de 0 - 2 ans : 2</p>
<p><b>B. <u>Consommation de la pâte d'arachide</u></b></p> <p>1) Mets dans lesquels la pâte d'arachide est utilisée : riz, tô 2) Rythme de consommation par semaine : 5 fois en moyenne 3) Quantité moyenne utilisée par préparation : 185 F CFA : 544 g (100 F CFA de pâte d'arachide = 294 g) 4) Provenance des pâtes d'arachide utilisées - 70 % pour les pâtes de la préparation locale vendue sur les marchés - 60 % pour les pâtes préparées et consommées à domicile - 30 % pour les pâtes de la CITEC 5) Durée de la période de consommation - 14 % tout au long de l'année - 86 % pour une partie de l'année 6) Taux d'utilisation des pâtes d'arachide en tenant compte de leur qualité physique (coloration) - 86 % pour les pâtes brunes - 60 % pour les pâtes blanches.</p>

**NB** : Certains résultats dépassent les 100 % ( n° 4 et 6 notamment). Ceci vient du fait que une question peut entraîner deux réponses. Par exemple, concernant la qualité physique des pâtes utilisées, la même personne dira:

- quelquefois brune
- quelquefois blanche.

Les résultats de l'enquête montrent que la pâte d'arachide est couramment utilisée dans l'alimentation humaine de la ville de Bobo-Dioulasso ; 14 % des concessions en consomme tout au long de l'année, et

86 %, une partie de l'année. La quantité de pâte d'arachide consommée par individu et par an est d'environ 20 kg lorsque la période de consommation dure toute l'année. La majeure partie de la pâte d'arachide consommée provient de la préparation locale.

A partir des données recueillies de l'enquête, 15 échantillons de pâtes d'arachide ont été prélevés sur différents marchés de la ville de Bobo-Dioulasso en Mars 1991, pour un dosage quantitatif des aflatoxines et une estimation du degré d'intoxication en rapport avec les résultats de l'enquête. Les résultats des teneurs en aflatoxines dans les échantillons de pâtes d'arachide sont présentés dans le tableau III.10.

**Tableau III.10** : Teneurs en aflatoxines dans des échantillons de pâtes d'arachide prélevés dans la ville de Bobo-Dioulasso

Echantillon	Site de prélèvement	Qualité (couleur)	Aflatoxines (ppb AFB <sub>1</sub> )
1	Acarville	Brune	387
2	Acarville	Brune	169
3	Acarville	Brune	142
4	Acarville	Brune	559
5	Acarville	Brune	148
6	Grand marché	Blanche	407
7	Grand marché	Brune	165
8	Grand marché	Blanche	132
9	Grand marché	Brune	116
10	Grand marché	Brune	116
11	Saint Etienne	Brune	489
12	Saint Etienne	Brune	238
13	Saint Etienne	Blanche	335
14	Saint Etienne	Brune	311
15	Saint Etienne	Brune	258
Teneur	moyenne	d'aflatoxines	265 ± 143 ppb

Les résultats des analyses (tableau III.10) montrent que près de 47 % des échantillons ont des teneurs en aflatoxines supérieures à 250 µg/kg (seuil de toxicité) ; la teneur moyenne des échantillons est de 265 µg/kg. Ces résultats extrapolés à ceux de l'enquête (tableau III.9) montrent que dans 14 % des concessions, une personne consomme en moyenne 14 µg d'aflatoxines provenant de pâtes d'arachide contaminée, par repas.

De nombreux travaux font ressortir que quelques mg d'aflatoxines par kg de poids corporel chez l'Homme peuvent occasionner un cancer du foie (2, 12, 19 b, 30, 32, 73 a). Par ailleurs, 6 % environ des aflatoxines consommées par l'Homme sont excrétés dans les urines sous forme d'AFM (122).

Si l'on tient compte de ces éléments, il est possible d'estimer le temps au bout duquel un individu peut développer un cancer du foie.(tableau III.11). Cette estimation est donnée par la courbe d'équation  $Y = 10,96 x + 3,35$  (figure III.9.).

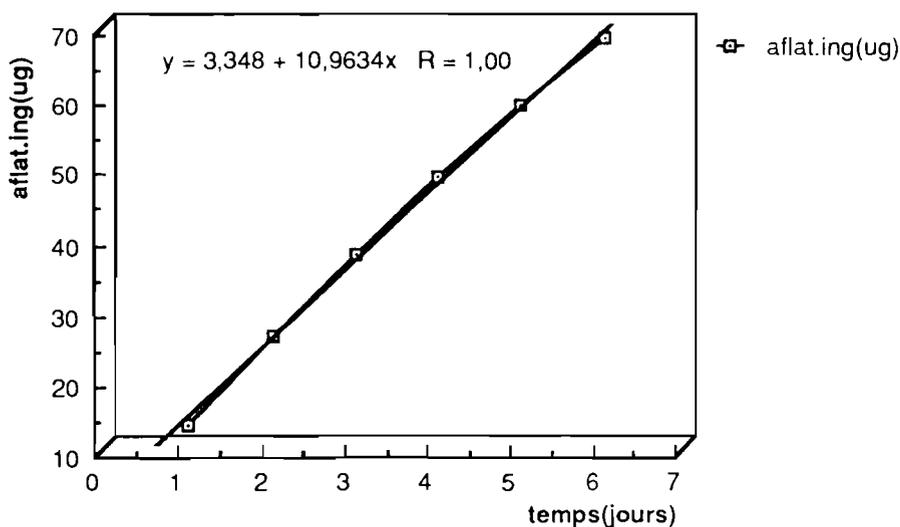
**Tableau III.11.** : Estimation de l'incidence du cancer du foie par suite de la consommation de pâtes d'arachide contaminées par les aflatoxines.

- Nombre de personnes par famille = 10
- Quantité de pâte d'arachide consommée par personne et par repas = 54,4 g
- Teneur moyenne d'aflatoxines dans les pâtes d'arachide des échantillons = 265 µg/kg
- Teneur en aflatoxines dans 54,4 g de pâtes = 14,4 µg/kg

Temps(jours)	Quantité d'AF ingérée (µg)	Quantité éliminée par les reins (µg)	Quantité résiduelle (µg)
1	14	0,84	13,16
2	13,16+14= <u>27,16</u>	1,63	25,53
3	25,53+14= <u>39,53</u>	2,37	37,16
4	37,16+14= <u>51,16</u>	3,07	48,09
5	48,09+14= <u>62,09</u>	3,72	58,36
6	58,36+14= <u>72,36</u>	4,34	68,01

A partir de cette équation et en supposant que 2 mg/kg de poids corporel d'aflatoxines peuvent entraîner le développement du cancer du foie chez un individu de 70 kg, on déduit que le risque surviendra après 35 ans d'une ingestion régulière et journalière de 14 µg d'aflatoxines.

Ce temps est réduit de moitié (17 ans), si l'individu consomme 2 repas par jour, à base de pâtes d'arachide contaminées par les aflatoxines.



**Figure III.9.** : Droite de régression représentant l'accumulation d'alfatoxines dans l'organisme en fonction du temps.

$y$  = quantité d'aflatoxines en  $\mu\text{g}$

$x$  = temps en jours.

L'équation de la droite est obtenue sur la base d'une ingestion de  $14 \mu\text{g}$  par jour avec un taux d'élimination rénale de  $6 \%$  par jour de la quantité ingérée.

### Conclusion

Il faut noter que cette équation ne donne qu'une indication de la réalité. D'une part, la contamination par les aflatoxines dans les denrées alimentaires varie d'une année à l'autre en fonction des conditions environnementales, et mêmes d'un mois à l'autre lorsque les conditions de stockage de la matière première ne sont pas satisfaisantes ; d'autre part, le taux d'élimination rénale sous forme d'AFM, varie de  $1$  à  $6 \%$  en réalité (17, 122), et est fonction du métabolisme de chaque individu. Les aflatoxines AFM<sub>1</sub> et AFM<sub>2</sub> sont excrétées aussi dans le lait maternel, et cet aspect doit être pris en compte lorsqu'on s'intéresse aux femmes.

Un suivi périodique du taux de consommation de l'arachide et de ses produits dérivés associé au dosage des aflatoxines dans le sang, le lait et les urines, permettrait de donner une appréciation plus réaliste du degré d'intoxication.

#### **4. - ISOLEMENT ET CARACTERISATION D'UNE SOUCHE D'ASPERGILLUS PRODUCTRICE D'AFLATOXINES**

##### **Introduction**

Les travaux précédents ont montré que :

- Les aflatoxines sont présentes dans l'arachide et ses produits dérivés, à des teneurs souvent situées au delà du seuil de toxicité (§.1).

- Les teneurs en aflatoxines dans les produits de l'arachide augmentent au cours du stockage lorsque certains paramètres tels que la teneur en eau du produit et l'humidité relative ne sont pas maîtrisés (§. 2.).

- Il existe un risque certain de toxicité sous létale avec développement du cancer du foie dans certaines régions du Burkina Faso où les produits de l'arachide sont régulièrement consommés. Les résultats obtenus (§.3) montrent que l'incidence du cancer du foie est de 35 ans, voire 17 ans dans 14% de l'échantillon concernée par l'enquête. D'autre part, les données hospitalières sur l'incidence du cancer du foie au Burkina Faso (annexe 5), permettent de supposer qu'une partie de la mortalité par suite de cancer du foie est due aux aflatoxines.

Il apparaît donc urgent de développer des méthodes efficaces de lutte, en vue de préserver la santé humaine et animale. Cette étude a été menée dans le but de disposer d'un matériel biologique pur, pour la conduite d'autres recherches sur les champignons aflatoxinogènes (Biosynthèse, production et inhibition de la production des aflatoxines).

## **Résultats et discussions**

L'isolement de la souche a été effectué à partir d'un prélèvement de champignons ayant poussé sur des graines mouillées et incubées à température de salle (25-27°C). Le clonage et les cultures sont réalisés sur milieu de Czapek ; la détermination systématique est faite d'après la méthode décrite par Christensen M. (22). Le dosage des aflatoxines est effectué selon la méthode immunoenzymatique TRANSIA, à partir d'extraits méthanoliques de la souche cultivée sur milieu de Reddy.

### **\* Morphologie et systématique**

Les cultures sur milieu de Czapek (figure III.10.) montrent que la taille générale des colonies après cinq jours d'incubation à 37°C est de 6,5 à 7 cm. Elles ont un aspect blanc laiteux (mycélium immature) à la périphérie des colonies, et des teintes grises centrales (mycélium mûre). La tête conidienne du champignon est jaune chez les colonies de 2 jours (figure III.11.), et devient grise, voire noire chez les colonies âgées de 3 à 12 jours (figures III.12. et III.13.). Les têtes conidiennes ont une structure radiale et sont unisériées (figure III.11.). Le conidiophore peut atteindre 400 à 600 µm de longueur, avec une membrane non cloisonnée et un cytoplasme translucide (figure III.14.). La vésicule est globuleuse et de diamètre compris entre 10 et 20 µm (figure III.11.). Les conidies (figure III.15.), sont globuleuses et présentent des aspérités.

Les éléments morphologiques ci-dessus décrits, permettent de classer cette souche dans l'espèce *Aspergillus flavus* (22).



**Figure III.10.** : Souche d'*Aspergillus flavus* après 5 jours de culture à 37°C sur milieu CZAPPEK. On peut noter l'aspect gris centré (mycélium mûre) et la plage blanche concentrique (mycélium immature).



**Figure III.11.** : Souche d'*Aspergillus flavus* (Gx 400)

Structure de la tête conidienne après une culture de 48 heures sur milieu CZAPEK. On peut noter la structure unisériée et la disposition radiale des métules.



**Figure III.12.** G x 400



**Figure III.13.** : G x 600

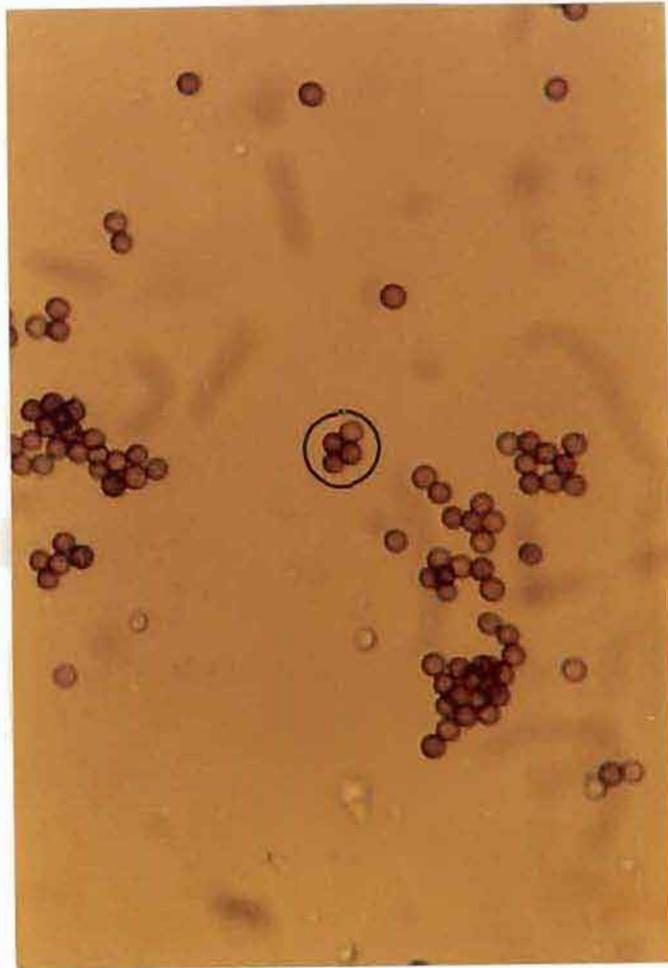
Evolution dans la coloration de la tête conidienne avec l'âge dans une souche d'*Aspergillus flavus*.

De la coloration jaune pâle (Figure III.12.) on passe à une coloration vert sombre à noire (Figure III.13) avec toutefois la persistance de la teinte jaune par- endroits.



**Figure III,14.** : Conidiophore de la souche d'*Aspergillus flavus* (G x 1000).

On peut noter la différence de coloration des parois de la membrane : paroi interne incolore, à vert olive, paroi externe noire.



**Figure III.15.** : Conidies (spores) d'*Aspergillus flavus* (G x 400). On note les structures globuleuses et la présence des aspérités.

### \* Production d'aflatoxines

Les tests sur la production d'aflatoxines par la souche sont réalisés à partir d'extraits méthanoliques du champignon. Les extraits réalisés à partir de cultures de 8 jours sur milieu de Reddy, sont dosés selon la méthode ELISA de type compétitif décrite par TRANSIA.

Les résultats des analyses effectuées sur 8 passages de la souche sur milieu de Reddy, sont présentés dans le Tableau III.12. L'analyse qualitative des extraits par CCM montre que la souche ne produit que des aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>.

**Tableau III.12** : Teneurs en aflatoxines produites par la souche d'*Aspergillus flavus* sur milieu de Reddy, au cours de 8 passages successifs de 8 jours chacun.

Passage	1	2	3	4	5	6	7	8
Aflatoxines (ppb AFB <sub>1</sub> )	4,8±0,1	4,3±0,6	5,3±0,9	3,4±1,4	5,1±0,1	3,4±0,2	5,2±1,9	5,2±0,8
Moyenne + écart type = 4,1 ± 2,4								

Les résultats des analyses qualitative et quantitative des aflatoxines confirment l'appartenance de la souche isolée à l'espèce *Aspergillus flavus*, qui selon certains auteurs, ne produit que les aflatoxines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> (106).

La quantité de spores utilisée par culture à chaque passage étant approximative (10<sup>5</sup> spores/ml), et étant donné les variations du métabolisme du champignon dans le temps, on peut estimer que la variation de la production d'aflatoxines au cours des 8 passages (4,1 ± 2,4 ppb) est non significative (cf. tableau III.12.).

## **Conclusion**

Cette étude a permis l'obtention d'une souche d'*Aspergillus* productrice d'aflatoxines qui, d'après la clé synoptique utilisée (22), appartiendrait à l'espèce *Aspergillus flavus*. Une étude systématique beaucoup plus complète permettrait de classer définitivement cette souche.

La capacité de production d'aflatoxines de cette souche permettra :

1. d'obtenir à moindre coût, des aflatoxines purifiées, à des fins expérimentales.
2. de conduire des recherches plus approfondies sur la voie biosynthétique des aflatoxines.
3. de mener des études d'inhibition (par voie biologique ou chimique) de la croissance et de la production d'aflatoxines par le champignon.

## **5. INHIBITION DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION D' AFLATOXINES.**

### **Introduction**

Un des axes de la recherche sur les aflatoxines est la surveillance de l'infestation par *Aspergillus flavus* et celle de la contamination des produits alimentaires par les aflatoxines (19 e). Cette partie de la recherche s'occupe, entre autres, des méthodes chimiques de détoxification:

- dégradation et/ou inactivation des aflatoxines par des acides, des bases, des aldéhydes, des agents oxydant, des gaz (8, 9, 13, 15, 16, 19 e, 38, 62, 72).
- altération des effets de toxicité chez les Mammifères par action de composés nutritionnels et de certains additifs alimentaires tels que les antibiotiques (19 e).

Plusieurs publications font état de l'effet de substances extraites de l'oignon et de la carotte sur la croissance et de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (8, 103, 104).

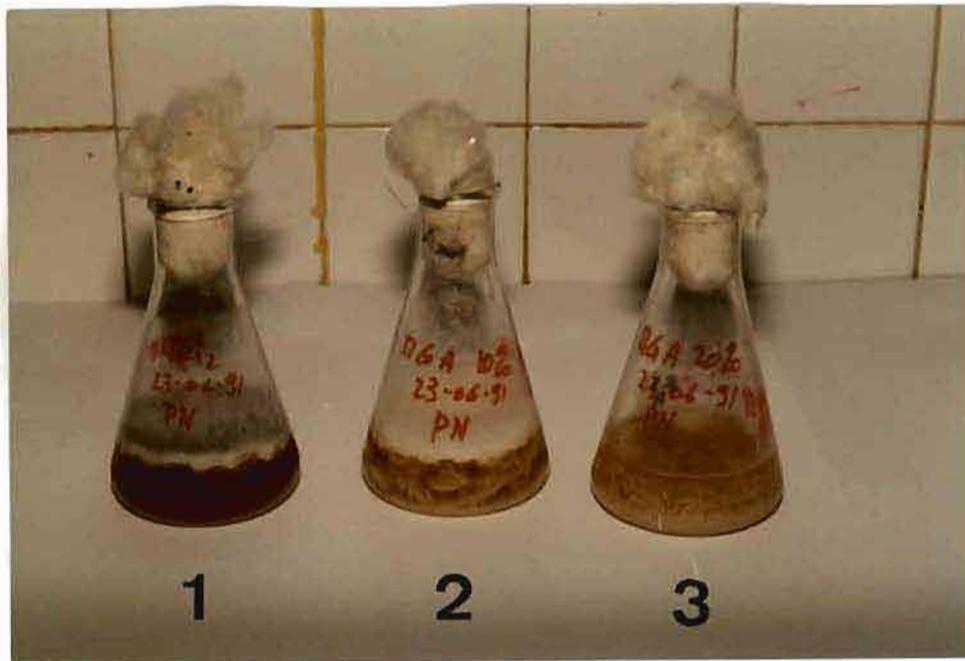
Le présent travail est consacré à une évaluation préliminaire de l'effet d'extraits d'ail (58), sur la croissance et la production d'aflatoxines de la souche d'*Aspergillus flavus* obtenue (§. 4).

### **Résultats et discussions**

La culture du champignon est réalisée sur milieu de Reddy par inoculation de  $10^5$  spores dans des flacons erlenmeyer contenant 100 ml de milieu. Les essais d'inhibition sont effectués par addition aux cultures, de différentes quantités d'extraits de l'ail.

Des essais réalisés par addition de broyats de gousses d'ail, dans des cultures en milieu liquide (bouillon Mazé) (45) ont montré que l'inhibition de la croissance était totale pendant 7 jours d'incubation lorsque le rapport ail/milieu de culture est de 20 % (W/V). Au-delà de 7 jours, l'inhibition de la croissance est réversible (figure III.16). D'autres essais d'inhibition de la croissance réalisés sur milieu de CZAPEK, à l'aide d'extraits aqueux frais de l'ail et d'extraits aqueux chauffés à 120°C pendant 20 mn ont montré que les extraits d'ail chauffés n'avaient pas de pouvoir inhibiteur.

Des tests effectués à l'aide de distillats d'ail frais montrent que les propriétés inhibitrices de l'ail se retrouvent au niveau des substances volatiles (Figures III.17. et III.18.).

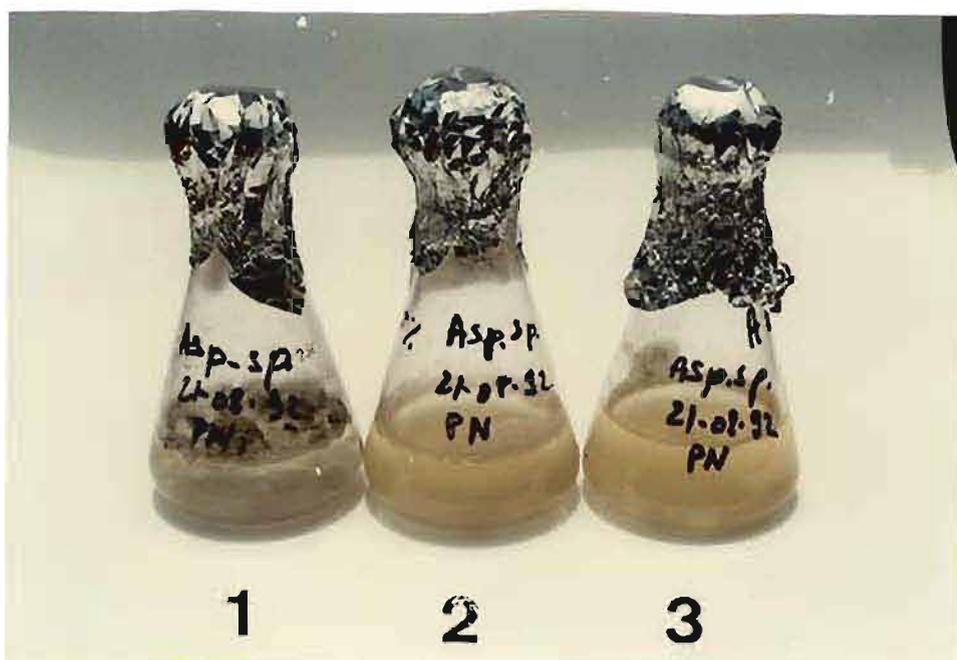


**Figure III.16.** : Test d'inhibition de la croissance chez *Aspergillus flavus* à l'aide de broyats de gousses d'ail.

De gauche à droite :

- 1 - culture témoin sur bouillon Mazé glucosé
- 2 - essai d'inhibition avec 10 % de broyats d'ail
- 3 - essai d'inhibition avec 20 % de broyat d'ail

On note l'inhibition totale de la croissance dans la culture à 20 % de broyat d'ail, après 7 jours d'incubation à l'étuve à 30°C.



**Figure III.17.** : Test d'inhibition de la croissance d'une souche d'*Aspergillus flavus* à l'aide d'extraits de substances volatiles d'ail.

De gauche à droite :

- 1 - culture témoin sur milieu de Reddy
- 2 - culture contenant 10 % d'un extrait aqueux de substances volatiles d'ail
- 3 - culture contenant 20 % d'un extrait aqueux de substances volatiles d'ail.

Au bout de 7 jours d'incubation à 30°C, on note la croissance du champignon dans la culture témoin, et l'inhibition totale de cette croissance dans les cultures à 10 % et 20 % d'extraits d'ail.



**Figure III.18.** : Test d'inhibition de la croissance de la souche d'*Aspergillus flavus* à l'aide d'extraits de substances volatiles d'ail.

De gauche à droite :

- 1 - culture témoin sur milieu de Reddy
- 2 - culture contenant 10 % d'un extrait aqueux de substances volatiles d'ail
- 3 - culture contenant 20 % d'un extrait aqueux de substances volatiles d'ail.

Au bout de 30 jours d'incubation à 30°C, on constate que l'inhibition de la croissance observée la première semaine (figure III.17) n'est pas totale. Toutefois, il y a un ralentissement certain de la croissance lorsqu'on passe de la culture contenant 10 % à celle contenant 20 % de l'extrait d'ail.

Les résultats obtenus montrent qu'au bout de 7 jours d'incubation des cultures, il y a une inhibition totale de la croissance, surtout dans la culture contenant 20 % d'extraits d'ail (Figure III.17) ; cette inhibition n'est cependant pas permanente puisqu'au bout de 30 jours d'incubation, on note une reprise progressive de la croissance du champignon.

Les résultats du dosage des aflatoxines effectués après 30 jours de culture montrent une inhibition de la production d'aflatoxines corrélative aux degrés d'inhibition de la croissance (Tableau III.13).

**Tableau III.13** : Inhibition de la production d'aflatoxines par la souche d'*Aspergillus flavus* à l'aide d'extraits aqueux de substances volatiles d'ail au bout de 30 jours de culture à 30° C.

Cultures	Témoin	Inhibition à 10 %	Inhibition à 20 %
Aflatoxines (ppb AFB <sub>1</sub> )	3,8 ± 0,6	1,8 ± 0,6	0,0

**NB.** : Inhibition à 20 % = 0,0 (dans les limites de sensibilité du test).

La perte progressive du pouvoir inhibiteur des substances volatiles de l'ail constatée surtout au niveau de la croissance du champignon, pourrait être due aux conditions de culture. Les cultures se faisant en milieu aérobie, il y aurait volatilisation progressive des substances inhibitrices dans l'enceinte de culture. L'hypothèse selon laquelle ces substances seraient plutôt fongostatiques que fongicides n'est pas non plus à écarter. Enfin, des réactions chimiques ou enzymatiques entre les substances inhibitrices et des métabolites du champignon pourraient contribuer à l'altération du pouvoir inhibiteur des substances de l'ail.

### **Conclusion**

Cette étude a permis de jeter les bases d'une voie de résolution du problème des aflatoxines à savoir, l'inhibition de la croissance des champignons aflatoxinogènes et de la production d'aflatoxines par l'utilisation de substances naturelles.

Les orientations futures de la recherche dans ce domaine seraient l'obtention d'extraits quantifiables pour une meilleure conduite des essais d'inhibition. Des analyses qualitatives des extraits par RMN et/ou par HPLC permettraient aussi d'identifier les substances inhibitrices.

## **6. - CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Ce travail nous a permis de mieux cerner le problème des aflatoxines au Burkina Faso, en particulier dans le cas de l'arachide.

1. L'évaluation de la contamination par les aflatoxines dans l'arachide et ses produits dérivés (§.1.) a montré que les principaux types d'aflatoxines (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> et AFG<sub>2</sub>) sont rencontrés dans l'arachide, à des teneurs souvent toxiques pour l'Homme et les animaux ; 14 % et 43 % des échantillons de la variété Boanga et Wobgo respectivement, et 54 % des produits à base d'arachide (marba tiguè, arachide sucrée, et pâtes d'arachide), ont des teneurs supérieures au seuil de toxicité de 250 µg/kg. Etant donné l'importance de l'arachide dans l'alimentation et l'économie burkinabè, des mesures doivent être prises au niveau national pour limiter les taux d'aflatoxines dans l'arachide destinée à la consommation intérieure et à l'exportation.

Les aflatoxines se rencontrent dans d'autres céréales et oléagineux tels que le maïs, le riz, le sorgho et le coton ; il apparaît nécessaire d'entreprendre des études sur l'importance de la contamination des aflatoxines dans ces produits, en particulier le coton qui constitue une des bases de l'économie et de l'alimentation burkinabè.

Une sensibilisation doit être menée, surtout à l'endroit des transformateurs locaux de l'arachide en produits dérivés (marba tiguè, pâtes et tourteaux d'arachide, arachide sucrée) en vue d'une réduction des teneurs en aflatoxines dans les produits de l'arachide. Dans cette optique, le triage des graines contaminées dans la matière première avant la transformation, constitue une méthode efficace et moins onéreuse à promouvoir que certaines méthodes physiques (chauffage, UV), et chimiques (acides, bases, gaz) de décontamination.

2. L'étude sur l'évolution des paramètres physico-chimiques et la production d'aflatoxines au cours du stockage (§.2.) montre que les conditions climatiques du Burkina Faso sont favorables au développement des

champignons aflatoxinogènes. Une étude sur les différentes méthodes de conservation de l'arachide déjà existantes dans le pays, permettra de connaître leurs avantages et inconvénients, et de mieux orienter les recherches vers de meilleures méthodes de stockage.

Cette étude menée à partir de deux variétés locales d'arachide du Burkina Faso (Boanga et Wobgo), a permis de noter une différence de comportement de ces deux variétés au cours du stockage. La production d'aflatoxines est moins importante dans la variété Boanga que dans la variété Wobgo, avec une évolution corrélative des paramètres physico-chimiques ; l'augmentation des teneurs en aflatoxines au bout des 12 mois de stockage est de 120 % pour les échantillons de la variété Boanga, alors qu'elle est de 300% pour les échantillons de la variété Wobgo. Cette différence de comportement serait liée, entre autres, à la capacité hygroscopique des graines de chaque variété. Des études plus poussées sur les caractéristiques intrinsèques des graines de chaque variété (dureté, teneurs en composés polyphénoliques) permettront de savoir s'il existe ou non des propriétés de résistance intrinsèques à la contamination par les aflatoxines dans ces variétés ; ceci permettra éventuellement de poursuivre des recherches sur la sélection de variété résistantes génétiquement à la contamination par les aflatoxines.

3. L'étude sur l'évaluation de l'incidence du cancer du foie dû à la consommation de pâtes d'arachide contaminées par les aflatoxines, a permis d'appréhender l'ampleur du problème : la consommation régulière de pâtes d'arachide contenant des teneurs en aflatoxines telles que présentées (§.1 et 3), peut entraîner le développement du cancer du foie chez un individu, au bout de 36 ans. Ce temps au bout duquel le cancer du foie peut survenir chez l'Homme est encore plus court lorsqu'on doit prendre en compte les autres produits susceptibles à la contamination par les aflatoxines.

Connaissant l'interaction possible entre intoxication par les aflatoxines, cancer du foie et HBV, et étant donné la prévalence de l'HBV au Burkina Faso (figure I.5. et annexe 5), une étude épidémiologique intégrée permettra de mieux apprécier l'importance du problème et de développer des stratégies de lutte. Cette étude peut se faire par dosage des aflatoxines dans le sang, les urines et le lait maternel, et extrapolation des résultats obtenus aux taux moyens d'ingestion d'aflatoxines par individu et par jour.

Dans cette optique, une étude est déjà entreprise pour la production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-aflatoxines, à des fins diagnostiques. L'obtention de ces anticorps permettra d'effectuer des tests immunologiques (ELISA, Immunoprécipitation, Immunodiffusion...), plus rapides et plus précises que certaines méthodes classiques de dosage des aflatoxines (CCM par exemple). L'obtention de ces anticorps permettra aussi de développer des trousseaux à des fins didactiques.

4. Enfin, les études menées sur l'isolement et la caractérisation d'une souche d'*Aspergillus* productrice d'aflatoxines, et sur l'inhibition de la croissance et de la production d'aflatoxines par cette souche à l'aide d'extraits d'*Allium sativum*, ont permis de jeter les bases d'une recherche sur la surveillance de l'infestation des produits alimentaires par les champignons aflatoxinogènes au Burkina Faso ; en effet, nous disposons actuellement d'un matériel biologique pur permettant de mener des recherches sur la décontamination biologique, par compétition avec d'autres micro-organismes, et/ou chimique, par utilisation de substances naturelles inhibitrices de la croissance et de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus*.

Un autre axe de recherche à partir du matériel biologique obtenu est l'étude des mécanismes génétiques conduisant à la production des aflatoxines. Les aflatoxines sont produites au cours de l'idiophase de la croissance du champignon ; il serait intéressant d'identifier le ou les gènes mis en jeu au cours de cette phase. Ceci permettra éventuellement de mener des essais d'inhibition de la production d'aflatoxines par répression de l'expression de certains de ces gènes.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. ADRIAN, J. and LUNVEN, P. 1969. Les aflatoxines : les agents responsables. Oléagineux 1 : 31-35.
2. ADRIAN, J. and LUNVEN, P. 1969. Les aflatoxines : les manifestations de la toxicité. Oléagineux 2 : 83-86.
3. AHMED, N. E., YOUNIS, Y. M. E. and MALIK, K. M. 1989. *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin contamination of groundnut in Sudan. ICRISAT 255-261, 1989.
4. ANJAIHAH, V., MEHAN, V. K., JAYANTHI, S., REDDY, D. V. R. and McDONALD, D. 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for aflatoxin B<sub>1</sub> estimation in groundnuts. ICRISAT 183-189.
5. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1984. Official methods of analysis. WILLIAMS S. Ed., Arlington 477-489.
6. APRIA (Association pour la Promotion Industrie-Agriculture). 1981. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires (Vol.4). Technique et Documentation, Paris.
7. BAQUETE, E. F. and FREIRE, M. J. 1989. Present status and perspectives of aflatoxin research in Mozambique. ICRISAT 93-94.
8. BATT, C., SOLBERG, M. and CEPONIS, M. 1983. Effect of volatile components of Carrot seed oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. J. Food science 48 : 762-768.
9. BEAN, G. A. and SOUTHALL, A. 1983. Effect of pyridazinone herbicides on growth and aflatoxin release by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 503-505.
10. BHAT, R. V. 1989. Risk to human health associated with consumption of groundnuts contaminated with aflatoxins. ICRISAT 19-29.
11. BLANCO, J. L., DOMINIGUEZ, L., GOMEZ-LUCIA, E., GARAYZABAL, J. F. F., GOYACHE, J. and SUAREZ, G. 1981. Behavior of aflatoxin during the manufacture, ripening and storage of Manchego type cheese. J. Food science 47 : 313-321.

12. BLANKENSHIP, P. D., SANDERS, T. H., DORNER, J. W., COLE, R. J. and MITCHELL, B. W. 1989. Engineering aspects of aflatoxin research in groundnuts: evolution of environmental control plot facility. ICRISAT 269-278.
13. BUCHANAN, R. L., TICE, G. and MARINO, D. 1981. Caffeine inhibition of Ochratoxin A production. *J. Food science* 47 : 313-321.
14. BUCHANAN, R. L. and HOUSTON, W. M. 1982. Production of blue-fluorescent pyrazines by *Aspergillus parasiticus*. *J. Food science* 47 : 779-782.
15. BUCHANAN, R. L., HOOVER, D. G. and JONES, S. B. 1983. Caffeine inhibition of aflatoxin production : mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 : 1193-1200.
16. BUCHANAN, R. L., HARRY, M. A. and GEALT, M. A. 1983. Caffeine inhibition of sterigmatocystin, citrinin and Patulin production. *J. Food science* 48 : 1226-1228.
17. CAMPBELL, T. C. et al. 1970. Aflatoxin M<sub>1</sub> in Human Urine. *Nature* 227 : 403-404.
18. CARBONEL, F. 1989. Evaluation de quelques techniques immunologiques appliquées au dosage de l'aflatoxine B<sub>1</sub>. *Microb. Hyg. Ali.* 1 : 4-10.
- 19 a. CAST (Concil for Agricultural science and Technology). 1989. Mycotoxins - Economic and Health risks (chap. 1). Task Force Report, USA.
- 19 b. CAST (Concil for Agricultural science and Technology). 1989. Mycotoxins - Economic and Health risks (chap. 2). Task Force Report, USA.
- 19 c. CAST (Concil for Agricultural science and Technology). 1989. Mycotoxins - Economic and Health risks (chap. 3). Task Force Report. USA.
- 19 d. CAST (Concil for Agricultural science and Technology). 1989. Mycotoxins - Economic and Health risks (chap. 5). Task Force Report, USA.
- 19 e. CAST (Concil for Agricultural science and Technology). 1989. Mycotoxins - Economic and Health risks (chap. 6). Task Force Report, USA.

20. CHANDRASHEKHAR, G. 1989. Groundnut trade in India and the world : implication of aflatoxin contamination. ICRISAT 39-45.
21. CHIOU, R. Y.-Y., LIN, C. M. and SHYU, S.-L. 1990. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. J. Food science 55 : 210-213.
22. CHRISTENSEN, M. 1981. A. Synoptic key and evaluation of species in the *aspergillus flavus* group. Mycologia 73 :1056-1084.
23. CHU, F. S. 1989. Current immunochemical methods for analysis of aflatoxin in groundnuts and groundnut products. ICRISAT 161-172.
24. CHU, F. S. et al. 1977. Preparation and characterization of aflatoxin B<sub>1</sub>-1- (0-carboxymethyl) oxime. J. Assoc. off. Anal. Chem. 60 : 791-794.
25. CHU, F. S. et al. 1982. Ethylenediamine modified bovine serum albumin as protein carrier in the production of antibody against mycotoxins. J. Immunol. Methods 55 : 73-78.
26. CLEVSTROM, G. et al. 1983. Production of aflatoxin by an *Aspergillus flavus* isolate cultured under a limited oxygen supply. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 400-405.
27. COKER, R. D. 1989. Control of aflatoxin in groundnut products with emphasis on sampling, analysis, and detoxification. ICRISAT 123-132.
28. COLE, R. J., SANDERS, T. H., DORNER, J. W. and BLANKENSHIP, P. D. 1989. Environmental conditions required to induce preharvest aflatoxin contamination of groundnuts: summary of six years' research. ICRISAT 279-287.
29. COULIBALY, B. 1989. The problem of aflatoxin contamination of groundnut and groundnut products as seen by the African Groundnut Council. ICRISAT 47-55.
30. CUARTERO, M. et al. 1990. Evaluation de deux techniques immunologiques appliquées au dosage des aflatoxines B, G et M dans l'alimentation humaine. Ann. Fals. Exp. Chim. 83 : 63-82.

31. DAREN, X. 1989. Research on aflatoxin contamination of groundnut in the People's Republic of China. ICRISAT 95-100.
32. DICHTER, C. R. 1984. Risk estimates of liver cancer due to aflatoxin exposure from peanuts and peanut products. *Fd. Chem. Toxic.* 22 : 431-437.
33. DIENER, U. L. and DAVIS, N. D. 1966. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 56 : 990-993.
34. DIENER, U.L. and DAVIS, N. D. 1977. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. *Bulletin of the Alabama Agricultural Experimental Station* 493 : 49.
35. DIENER, U. L., PETTIT, R. E. and COLE, R. J. 1982. Aflatoxins and other mycotoxins in peanuts. In *Peanut science and technology* (chap. 13). APRES, USA.
36. DOMINGUEZ, L. et al. 1987. Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products contaminated at low levels. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 : 470-477.
37. FARAG, R. S., DAW, Z. Y. and ABO-RAYA, S. H. 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food science* 54 : 74-76.
38. FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C. and SVENDSEN, J. A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 581-585.
39. FURTADO, R. M., PEARSON, A. M., GRAY, J. I., HOGBERG, M. G. and MILLER, E. R. 1981. Effects of cooking and/or processing upon levels of aflatoxins in meat from pigs fed A contaminated diet. *J. Food science* 40 : 1306-1309.
40. GARDINER, E. E. 1962. A comparison of toxicity to poults and chicks of a certain peanut oil meal. *Poult. Sci.* 41 : 1348-1350.
41. GENTILINI, M., DUFLO, B., DANIS, M., LAGARDERE, B., RICHARD-LENOBLE, D., BRUCKER, G., MOUCHET, J. and ROSENHEIM, M. 1986. *Médecine tropicale* (chap. 6). Flammarion Médecine-Sciences, 4<sup>e</sup> ed., Paris.

42. GHEWANDE, M. P., NAGARA, J. G. and REDDY, P. S. 1989. Aflatoxin research at the Indian National Research Centre for Groundnut. ICRISAT 237-243.
43. GOTO, T. and MANABE, M. 1989. Methods for the analysis of aflatoxins in groundnut and other agricultural commodities. ICRISAT 173-182.
44. GUEISSLER, F. and FAUSTMAN, E. M. 1988. Developmental toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in the rodent embryo in vitro: contribution to exogenous biotransformation systems to toxicity. *Teratology* 37 : 101-111.
45. GIRAD, H. et ROUGIEUX, R. 1967. *Techniques de Microbiologie agricole*. DUNODS. 2<sup>nd</sup> Ed. Paris.
46. HAO, Y.-Y. and BRACKETT, R. E. 1988. Removal of aflatoxin B<sub>1</sub> from peanut milk inoculated with *Flavobacterium aurantiacum*. *J. Food science* 53 : 1384-1386.
47. HESSELTINE, C. W., SHOTWELL, O. L., ELLIS, J.J. and STUBBLEFIELD, R. D. 1966. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bacteriological Review* 30 : 795-805.
48. HILL, G.A. et al. 1983. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 628-633.
49. HOLMQUIST, G. U., WALKER, H.W. and STAHR, H. M. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food science* 48 : 778-782.
50. HSIEN, D. P. H., FITZELL, D. L., MILLER, J. L. and SEIBER, J. N. 1976. High-Pressure liquid chromatography of oxydative aflatoxin metabolites. *J. Chromatography* 117 : 474-479.
51. ICRISAT (International Crops Research Institute for semi-Arid Tropics). 1988; Summary and recommendations of the international workshop on aflatoxin contamination of groundnut, 6-9 Oct., 1987. ICRISAT Center, India.
52. IOANNIDES, C. and PARKE, D. V. 1987. The cytochromes P-448 - A unique family of enzymes involved in chemical toxicity and carcinogenesis. *Biochem. Pharm.* 36 : 4197-4207.

53. JAMBUNATHAN, R., MEHAN, V. K. and GURTU, S. 1989. Polyphenols in groundnut genotypes resistant and susceptible to seed colonization by *Aspergillus flavus*. ICRISAT 357-364.
54. JONES, F. T., HAGLER, W. H. and HAMILTON, P. B. 1982. Association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. *Poult. Sci.* 61 : 861-868.
55. JONES, F. T., HAGLER, W. M. and HAMILTON, P. B. 1984. Correlation of aflatoxin contamination with Zinc content of chicken feed. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 : 478-480.
56. KANNAIYAN, J., SNDHU, R. S. and PHIRI, A. L. 1989. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* contamination problem of groundnuts in zambia. ICRISAT 65-70.
57. KAVERI, S. V., FREMY, J.-M., LAPEYRE, C. AND STROSBERG, A. D. 1987. Immunodetection and Immunopurification of aflatoxins using a high affinity monoclonal antibody to aflatoxin B<sub>1</sub>. *Letters in Applied Microbiol.* 4 : 71-75.
58. KERHARO, J. 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle Plantes médicinales et toxiques. VIGOT Frères, Paris pp 499-500.
59. KISYOMBE, C. T. 1989. Aflatoxin contamination of groundnuts : control strategies in Malawi. ICRISAT 71-76.
60. LAMPLUGH, S. M. 1983. Comparison of three methods for the extraction of aflatoxins from human serum in combination with a High-performance Liquid chromatographic assay. *J. Chromatography* 273 : 442-448.
61. LARPENT, J. P. et LARPENT-GOURGAUD, M. 1985. Manuel pratique de Microbiologie. Hermann, Paris.
62. LIN, C. C. S. and FUNG, D. Y. C. 1983. Effect of BHA, BHT, TBHQ and PG on growth and toxigenesis of selected *Aspergilli*. *J. Food science* 48 : 576 -580.
63. MACHMUD, M. 1989. Groundnut aflatoxin problem in Indonesia ICRISAT 215-222.
64. MADHYSTHA, M. S. and BHAT, R. V. 1985. Evaluation of substrate potentiality and inhibitory effects to identify High risk spices for aflatoxin contamination. *J. Food science* 50 : 376-378.

65. MAEBA, H., TAKAMOTO, Y., KAMIMURA, M. and MIURA, T. 1988. Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *J. Food science* 53 : 667-668.
66. MAHJOUR, A. and BULLERMAN, L. B. 1988. Effects of storage time, sunlight, temperature, and frying on stability of aflatoxin B<sub>1</sub> in olive oil. *J. Food science* 21 : 29-32.
67. MANZO, S. K. and MISARI, S. M. 1989. Status and management of aflatoxins in groundnuts in Nigeria. *ICRISAT* 77-90.
68. MARTIN, C. N. and GARNER, R. C. 1977. Aflatoxin B<sub>1</sub>-oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B<sub>1</sub> causes guanine substitution in nucleic acids. *Nature* 267 : 863-865.
69. MAURICE, D. V., BODINE, A. B. and REHRER, N. J. 1983. Metabolic effects of low aflatoxin B<sub>1</sub> levels on broiler chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 980-984.
70. McDONALD, D. 1989. The ICRISAT approach to research on the groundnut aflatoxin problem. *ICRISAT* 317-321.
71. MEHAN, V. K. 1989. Screening groundnuts for resistance to seed invasion by *Aspergillus flavus* and to aflatoxin production. *ICRISAT* 323-334.
72. MEHAN, V. K., Mc DONALD, D. et RAMAKRISHNA, N. 1988. Effets provoqués par l'addition d'un inoculum d'*Aspergillus flavus* dans la zone du sol occupée par les gousses sur l'infestation des graines et sur la contamination par aflatoxines de Génotypes d'arachide. *Oléagineux* 43 : 26-28.
- 73 a. MEHAN, V. K., McDONALD, D., HARAVU, L. J. and JAYANTHI, S. 1991. The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 1). *ICRISAT, India*.
- 73 b. MEHAN, V. K., McDONALD, D., HARAVU, L. J. and JAYANTHI, S. 1991. The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 4). *ICRISAT, India*.
- 73 c. MEHAN, V. K., McDONALD, D., HARAVU, L. J. and JAYANTHI, S. 1991. The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 5). *ICRISAT, India*.

- 73 d. MEHAN, V. K., McDONALD, D., HARAVU, L. J. and JAYANTHI, S. 1991. The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 6). ICRISAT, India.
- 73 e. MEHAN, V. K., McDONALD, D., HARAVU, L. J. and JAYANTHI, S. 1991. The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 7). ICRISAT, India.
- 73 f. MEHAN, V. K., McDONALD, D., HARAVU, L. J. and JAYANTHI, S. 1991. The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 8). ICRISAT, India.
- 73 g. MEHAN, V. K., McDONALD, D., HARAVU, L. J. and JAYANTHI, S. 1991. The groundnut aflatoxin problem. Review and literature database (chap. 9). ICRISAT, India.
74. MIDDLETON, K. J. 1989. Queensland Department of Primary Industries' involvement with aflatoxin in groundnuts in Australia and Indonesia. ICRISAT 209-213.
75. MILLER, D. M. et al. 1982. High-Pressure Liquid Chromatographic determination and clearance time of aflatoxin residues in swine tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65 : 1-4.
76. MONTREUIL, J. et SPIK, G. 1969. Microdosage des glucides: Méthodes colorimétriques de dosages des glucides totaux. Monographie du Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. Lille.
77. MOSS, E. J. and NEAL, G. E. 1985. The metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> by human liver. Biochem. Pharm. 34 : 3193-3197.
78. NAGUIB, Kh., NAGUIB, M. M., DAIB, M. M., SAHAB, A. F., and AMRA, H. 1989. Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in groundnut cultivars in Egypt. ICRISAT 311-315.
79. NAHDI, S. 1989. Geocarposphere mycoflora and resistance of groundnut to *Aspergillus flavus*. ICRISAT 365-378.
80. NAKAYAMA, T. O. M. 1989. Aflatoxin research in Peanut-CRSP : an overview. ICRISAT 203-207.
81. NELSON, D. B. et al. 1980. Aflatoxin and Rey's syndrome : a case control study. Pediatrics 66 : 865-868.

82. NGOMBO, M. et al. 1986. Méthode miniaturisée pour la détermination des aflatoxines dans les farines. Arch. B. Méd. Soc. Hyg., Méd. Tr. et Méd. Lég. 44 : 245-253.
83. NOTERMANS, S., DU FRENNE, J. and SOENTORO, P. S. 1988. Detection of molds in nuts and spices : the mold colony count versus the Enzyme Linked Immunosorbent Assay. J. Food Science 53 : 1831-1834.
84. OLSEN, J. H., DRAGSTED, L. and AUTRUP, H. 1988. Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. Br. J. Cancer 58 : 392-396.
85. PARK, K. Y. and BULLERMAN, L. B. 1983. Effect of cycling temperatures on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in Rice and Cheddar cheese. J. Food science 48 : 889-896.
86. PATHAK, B., SETHI, N., GUPTA, J. and VORA, V. C. 1983. Toxicity studies of metabolites of some fungal isolates in albino Mice. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 944-947.
87. PAYNE, G. A. and HAGLER, Jr. W. M. 1983. Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 805-812.
88. PESTKA, J. J. and CHU, F. S. 1984. Aflatoxin B<sub>1</sub> dihydrodiol antibody : production and specificity. Appl. Environ. Microbiol. 47 : 472-477.
89. PETTIT, R. E., AZAIZEH, H. A., TABER, R. A., SZERSZEN, J. B. and SMITH, O. D. 1989. Screening groundnut cultivars for resistance to *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, and aflatoxin contamination. ICRISAT 291-303.
90. PHILLIPS, T. D. et al. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate : a high affinity sorbent for aflatoxin. Poultr. Science 67 : 243-247.
91. PITT, J. I. 1989. Field studies on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in Australian groundnuts. ICRISAT 223-234.
92. QUITCO, R., BAUTISTA, L. and BAUTISTA, C. 1989. Aflatoxin contamination of groundnuts at the post-production level of operation in the Philippines. ICRISAT 101-110.

93. RANA, I.A. 1989. Aflatoxin contamination of groundnuts in Pakistan. ICRISAT 111-114.
94. RAO, V. M., SARASWATHY, S., MAGGON, K. K. and VENKITASUBRAMANIAN, T. A. 1980. Bioenergetics of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. J. Food science 45 : 1031-1035.
95. READ, M. 1989. Removal of aflatoxin contamination from the Australian groundnut crop. ICRISAT 133-140.
96. REDDY, T. V., VISWANATHAN, L. and VENKITASUBRAMANIAN, T. A. 1979. Factors affecting aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a chemically defined medium. J. Gener. Microbiol. 114 : 409-413.
97. REED, J. D. and KASALI, O. B. 1989. Hazards to livestock of consuming aflatoxin-contaminated groundnut meal in Africa. ICRISAT 31-36.
98. RICHARD, J. L. and LYON, R. L. 1986. Aflatoxins and their detection in animal tissues and fluids. J. Toxicol. 5 : 197-215.
99. ROBB, J. and NORVAL, M. 1983. Comparison of cytotoxicity and thin-layer chromatography methods for detection of mycotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 948-950.
100. ROITT, I., BROSTOFF, J. and MALE, D. 1985. Immunologie fondamentale et appliquée (chap.25). MEDSI, Paris.
101. SABINO, M. 1989. National monitoring and control program on mycotoxin in Brazil. ICRISAT 15-120.
102. SHANTHA, T. 1989. Detoxification of groundnut seed and products in India. ICRISAT, 153-157.
103. SHARMA, A., TEWARI, G. M., SHRIKHANDE, A. J., PADWAL-DESAI, S. R. and BANDYOPADHYAY, C. 1979. Inhibition of aflatoxin-producing fungi by onion extracts. J. Food Science 44 : 1545-1547.
104. SHARMA, A., PADWAL-DESAI, S. R., TEWARI, G. M. and BANDYOPADHYAY, C. 1981. Factors affecting antifungal activity of onion extractives against aflatoxin-producing fungi. J. Food Science 46 : 741-744.

105. SHARMA, A., PADWAL-DESAI, S. R. and NAIR, P. M. 1990. Aflatoxin-producing ability of spores of *Aspergillus parasiticus* exposed to gamma radiation. *J. Food science* 55 : 275-276.
106. SCHMIDT, F. R. and ESSER, K. 1985. Aflatoxins : medical, economic impact, and prospects for control. *Proc. Biochem.* 167-174.
107. SINGH, B., KHALID, A. S., MAGBOUL, B., OKEZIE, B. O., ANDERSON, J. C., WHEELLOCK, G. C., JONES, H. and CAPLES, V. 1989. Aflatoxin contamination of groundnuts with special reference to sudan and some Caribbean countries. *ICRISAT* 245-253.
108. SINGH, U. and SINGH, B. 1991. Functional properties of Sorghum-Peanut composite flour. *Cereal Chem.* 68 : 460-463.
109. SIRAJ, M. Y., WALLACE HAYES, A., UNGER, P. D., HOGAN, G. R., RYAN, N. J. and WRAY, B. B. 1981. Analysis of aflatoxin B<sub>1</sub> in human tissues with High-Pressure Liquide Chromatography. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 58 : 422-430.
110. SIWELA, A. H., and CALEY, A.D. 1989. Aflatoxin contamination of stored groundnuts in Zimbabwe. *ICRISAT* 59-63.
111. STRYER, L. 1981. *Biochemistry*. FREEMAN and Co., San Francisco.
112. TAKAHASHI, D. M. 1977. High-Pressure Liquide Chromatography determination of aflatoxins in wines and other liquid products. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 60 : 799-804.
113. TRANSIA. 1991. Dosage Immunoenzymatique de l'aflatoxine B<sub>1</sub>. Monographie TRANSIA, Lyon.
114. TRUCKSESS, M. W., STOLOFF, L., PONS, Jr. W. A., CUCULLU, A. F., LEE, L. S. and FRANZ, Jr. A. O. 1977. Thin Layer Chromatographic determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in Eggs. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 60 : 795-798.
115. TSAI, W. Y. J., SHAO, K. P. P. and BULLERMAN, L. B. 1984. Effects of sorbate and propionate on growth and aflatoxin production of sublethally injured *Aspergillus parasiticus*. *J. Food science* 49 : 86-90.

116. VANRENSBURG, S. J., COOK-MOZAFFAR,, P., VAN SCHALKWYK, D. J., VAN DER WATT, J. J., VINCENT, T. J. and PURCHASE, I. F. 1985. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br. J. Cancer* 51 : 731-726.
117. VASUDEVA RAO, M. J., NIGAM, S. N., MEHAN, V. K. and McDONALD, D. 1989. *Aspergillus flavus* resistance breeding in groundnut: progress made at ICRISAT Center. ICRISAT 345-355.
118. WALIYAR, F. and BOCKELEEE-MORVAN, A. 1989. Resistance of groundnut varieties to *Aspergillus flavus* in Senegal. ICRISAT 305-310.
119. WICKLOW, D. T., HESSELTINE, C. W., SHOTWELL, O. L. and ADAMS, G. L. 1980. Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* 70 : 761-764.
120. WILSON, D. M. 1989. Aflatoxin analytical methods for groundnuts. ICRISAT 191-197.
121. WOGAN, G. N. 1966. *Mycotoxins in foodstuffs*. The M.I.T. Press, USA.
122. ZHU, J.-Q., ZHANG, L.-S., HU, X., XIAO, Y. CHEN, J. S. XU, Y.-C., FREMY, J. and CHU, F.S. 1987. Correlation of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> levels with excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in human urine. *Cancer Res.* 47 : 1848-1852.

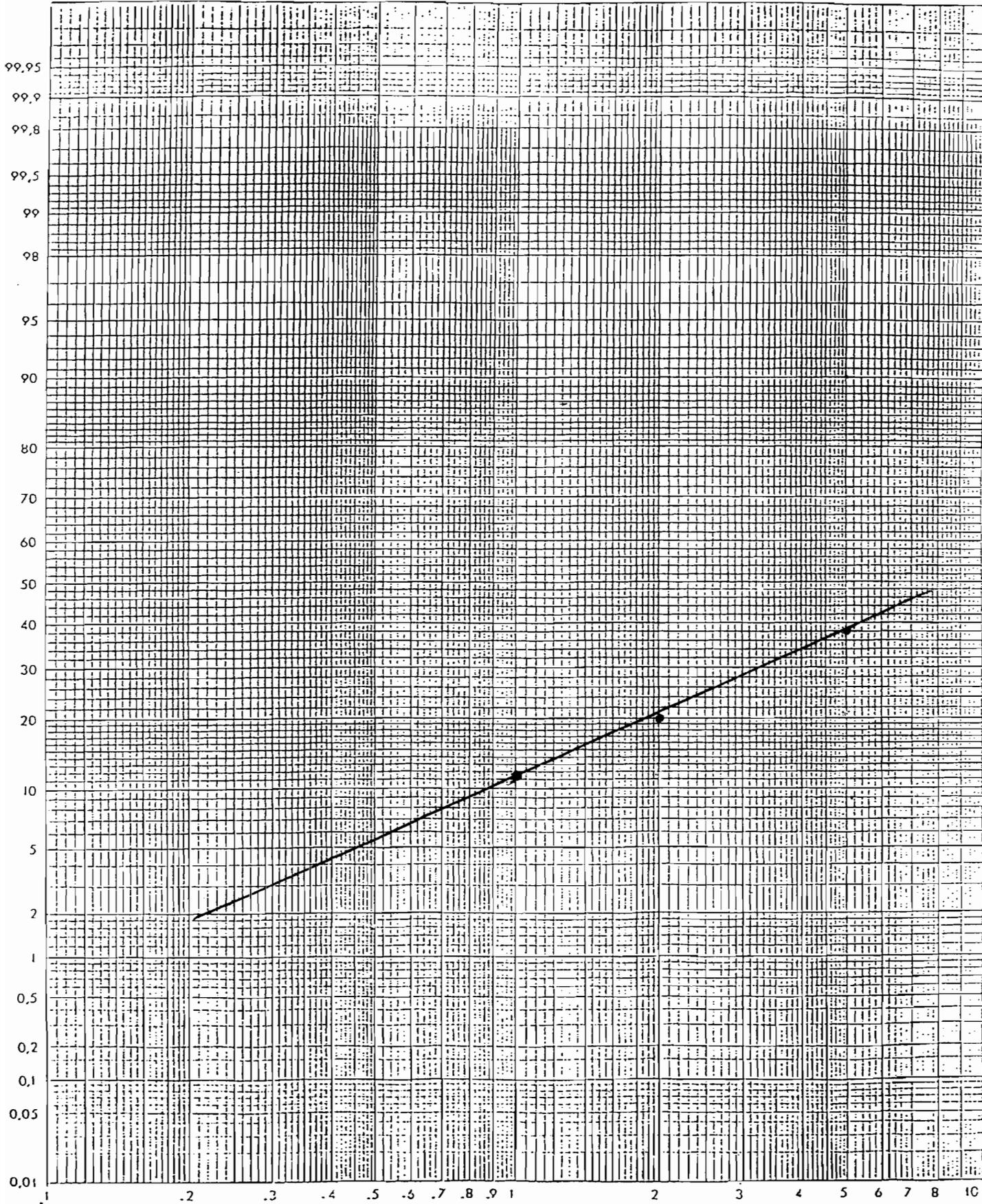
ANNEXES

**ANNEXE 1** : Evolution de la production d'arachide au Burkina Faso de 1960 à 1990 (source SOFIVAR).

Cultures Campagnes	Arachide coque (en tonne)
1960-61	95.720
1961-62	110.350
1962-63	112.910
1963-64	128.939
1964-65	135.900
1965-66	128.939
1966-67	130.000
1967-68	98.420
1968-69	92.100
1969-70	80.372
1970-71	77.965
1971-72	66.182
1972-73	60.408
1973-74	62.865
1974-75	98.200
1975-76	87.200
1976-77	72.686
1977-78	57.073
1978-79	73.258
1979-80	77.831
1980-81	53.943
1981-82	77.667
1982-83	70.658
1983-84	82.591
1984-85	71.495
1985-86	127.786
1986-87	158.789
1987-88	145.857
1988-89	160.220
1989-90	152.240

ANNEXE 2

Exemple de courbe étalon pour le dosage immunoenzymatique des aflatoxines.



**ANNEXE 3**

Fiche d'enquête utilisée pour l'évaluation de la consommation de pâtes d'arachide.

Questions

Code de notation

1. Questions générales

a) Nombre de personnes dans la famille 1 - a - x

b) Nombre d'enfants de 0 à 2 ans/famille 1 - b - x

2. Consommation de la pâte d'arachide

a) Mets dans lesquels la pâte d'arachide est utilisée 2 - a - .....

b) Rythme de consommation par semaine 2 - b - Y/S

c) Quantité de pâte utilisée par famille et par repas (en FCFA) 2 - c - ZFCFA

d) Lieu d'achat ou de préparation de la pâte d'arachide utilisée

- Dans les marchés (préparation locale) 2 - d -
- Préparation à domicile 2 - d -
- Pâte de la CITEC 2 - d -

e) Durée de la période de consommation

- Sur une partie de l'année 2 - e -
- Sur toute l'année 2 - e -

## 3. Qualité de la pâte utilisée (coloration)

- |                 |       |
|-----------------|-------|
| a) Pâte blanche | 3 - a |
| b) Pâte brune   | 3 - b |

**N.B.**      x = nombre de personnes  
                  y = nombre de fois par semaine  
                  z = valeur en FCFA de la pâte achetée.

**ANNEXE 4**

Population de la ville de Bobo Dioulasso en 1985

Superficie=12 km<sup>2</sup> (donnée de 1975)

Classe d'age (an)	Population
0-4	41.298
5-6	15.547
7-14	48.181
15-19	26.797
20-29	42.217
30-44	32.361
45-49	6.811
50+	15.146
Total	228.668: M= 116.312 F= 112.356

M= Mâles      F= Femelles

Source : Institut National de la Statistique et de la Démographie (INSD)  
Ouagadougou/Burkina Faso.

**ANNEXE 5**

Cancer primitif du foie au Centre Hospitalier National Yalgado OUEDRAOGO (CHNYO): répartition selon l'âge et le sexe.

Total/classe d'âge	Mâles	Femelles
>20 ans 1	1	0
20-30 ans 4	3	1
31-40 ans 29	22	7
41-50 ans 30	29	1
51-60 ans 27	22	5
61-70 ans 10	8	2
<70 ans 3	3	0
<b>Total 104 = 100%</b>	<b>88 = 84,6%</b>	<b>16 = 15,4%</b>

Incidence sur 2,91% d'hospitalisation

Etude portant sur 35 mois : Janvier 1990 - Novembre 1992.

Source : CHNYO ; Service d'Hépatogastro-Entérologie.