



Original Paper

<http://indexmedicus.afro.who.int>

## Caractérisation de souches d'*Aspergillus spp* isolées des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso, Afrique de l'Ouest

Pane B. OUATTARA-SOURABIE\*, Philippe A. NIKIEMA et Alfred S. TRAORE

Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN) - Département de Biochimie / Microbiologie - Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR/SVT) - Université de Ouagadougou, 09 BP 848 Ouagadougou 09, Burkina Faso; Tel: +226 50 47 08 34  
Fax : +226 50 30 72 42

\*Auteur correspondant, E-mail: [b\\_sourabie@yahoo.fr](mailto:b_sourabie@yahoo.fr), [pane\\_sourabie@univ-ouaga.bf](mailto:pane_sourabie@univ-ouaga.bf) ;  
Tel: +226 50 37 31 31 ou +226 50 36 14 89

---

### RESUME

Cette étude vise à isoler et caractériser quelques souches d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* productrices et non-productrices d'aflatoxines sur des graines d'arachides cultivées au Burkina Faso. Cinq souches d'*Aspergillus* ont été isolées et purifiées sur le milieu mazé et le milieu de Czapek à l'extrait de levure. La caractérisation a porté sur les critères morphologiques, microscopiques et la capacité de production d'aflatoxines, évaluée par test de fluorescence sous lumière ultra violette à 254 et 312 nm, des colonies cultivées sur le milieu de coco. Quatre souches de références d'origines américaines ont servi de base de comparaison. Deux souches locales appartenant à l'espèce *Aspergillus flavus* ont été caractérisées: l'une est productrice d'aflatoxines (BfaS1) et l'autre non productrice d'aflatoxines (BfaS5). La souche BfaS1 était comparable à une souche de référence CDC B5333. Les trois autres souches locales (BfaS0, BfaS3, BfaS4) appartiennent à l'espèce *Aspergillus niger*, non productrice d'aflatoxines.

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

**Mots clés :** Isolement, Identification; Aflatoxines.

---

### INTRODUCTION

Les *Aspergillus* sont des champignons microscopiques qui contaminent les récoltes dans les champs ou pendant la conservation dans les silos ou greniers (Barros et al., 2005). Lorsque les conditions climatiques sont favorables, certaines souches du genre *Aspergillus* produisent des aflatoxines qui sont des métabolites secondaires reconnus cancérigènes, immunosuppresseurs et tératogènes (WHO, 2006). Les espèces *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*

sont les plus connues et ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherches qui ont démontré leur capacité de production d'aflatoxines (Ito et al., 2001; Johnsson et al., 2008; Doster et al., 2009; Reddy et al., 2009). En plus de ces trois espèces, les capacités de production d'aflatoxines ont été découvertes plus récemment chez les espèces d'*Aspergillus* suivantes: *A. tamarii*, *A. ochraceoroseus* (Klich et al., 2000), *A. pseudotamarii* (Ito et al., 2001), *A. bombycis*

© 2011 International Formulae Group. All rights reserved.

(Peterson et al., 2001) et *A. rambelli* (Frisvad et al., 2005).

Selon Blanc (2001), la législation communautaire de l'Europe sur les aflatoxines et les nouvelles exigences en matière de sécurité sanitaire dans le commerce international des produits agroalimentaires ont un impact énorme sur le commerce et l'économie des pays en développement. En effet, lorsque des céréales, oléagineux et produits animaux sont contaminés par les aflatoxines, leur prix de vente baisse ou ces produits sont tout simplement rejetés à l'exportation (WHO, 2006).

Les mycotoxines sont détectées dans une gamme variée de produits alimentaires tels que les oléagineux, les céréales, la viande, les épices et le lait des mammifères nourris aux aliments contaminés (Nikiéma, 1993 ; Sanou, 2000 ; Cho et al., 2007). Les aflatoxines sont des substances naturelles les plus carcinogènes des biotoxines et classées dans le Groupe I par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, 2002).

Plusieurs travaux entrepris sur l'innocuité des denrées alimentaires ont révélé que les mycotoxines constituent une préoccupation mondiale de santé publique, malgré les avancées technologiques de nos jours, telles que l'étude systématique et génomique des *Aspergillus* en tant qu'agents pathogènes (Samson et al., 2006). Christensen (1981) a établi une clé synoptique d'évaluation en vue de la classification des souches de l'espèce *Aspergillus flavus*. Klich and Pitt (1988) ont travaillé sur la différenciation entre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* et leurs espèces apparentées et ont établi également une clé de classification. Des recherches plus récentes ont été menées pour comprendre le mécanisme de biosynthèse des aflatoxines et ont montré l'implication de 25 gènes dont la majorité est régulée par le gène de régulation positive *AflR* (Bhatnagar et al., 2006). Mais ce gène qui peut s'autoréguler peut également être sous l'effet de facteurs de régulation négative tels que les facteurs

environnementaux et les métabolites naturels de certaines plantes (Bhatnagar et al., 2006 ; Dehghan et al., 2008).

Au Burkina Faso, les travaux menés par Nikiéma (1995) et Sanou (2000) ont montré de fortes teneurs en aflatoxines dans le maïs (*Zea mays*), les oléagineux notamment l'arachide (*Arachis hypogea*) et leurs produits dérivés dans la région Ouest du pays. C'est pourquoi, une meilleure connaissance du caractère aflatoxinogène et du potentiel de production d'aflatoxines des souches d'*Aspergillus* facilitera une meilleure prévision des risques et des mesures correctives dans un système de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point). Dès lors, le présent travail a été initié et porte sur la caractérisation de quelques souches locales d'*Aspergillus* spp et leur aptitude de production ou non d'aflatoxines.

## MATERIEL ET METHODES

### Souches d'*Aspergillus* spp

Quatre souches de références ont été utilisées dans cette étude. Il s'agit des souches NRRL 484 (*Aspergillus flavus* non aflatoxinogène) et NRRL 5862 (*Aspergillus parasiticus* aflatoxinogène) d'origine Illinoise, du Département d'Agriculture des Etats Unis (USDA) et les souches B5333 (*Aspergillus flavus*) et B4571 (*Aspergillus parasiticus*) d'origine Atlanta, du Centre de prévention des maladies (CDC). La capacité de production d'aflatoxines des souches d'origines CDC Atlanta n'avait pas encore été étudiée au moment où elles nous ont été offertes. Ces souches de références ont été gracieusement offertes par l'« USDA-Research, Education and Economics Agriculture Research service de l'Illinois » et par « CDC » Atlanta des Etats-Unis d'Amérique.

Cinq souches d'*Aspergillus* isolées localement à partir des graines d'arachide provenant de la région Ouest du pays ont été également utilisées pour cette étude. Il s'agit de souches codées BfaS0, BfaS1, BfaS3, BfaS4 et BfaS5.

### **Isolement et identification des souches d'*Aspergillus***

#### **Revivification des souches de références**

Les souches ont été revivifiées à  $30 \pm 1$  °C pendant 5 jours dans le Czapek à l'extrait de levure (milieu liquide). Le cinquième jour, les souches revivifiées ont été repiquées sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) et incubées à  $30 \pm 1$  °C. Après dix jours d'incubation, les souches sont repiquées sur le milieu de Czapek à l'extrait de levure (CYA) à  $37 \pm 1$  °C pour une comparaison des caractères culturels et microscopiques avec les souches isolées localement.

### **Isolement et identification des souches locales**

Un échantillon d'une cinquantaine de gousses d'arachides issues de la campagne agricole 2000-2001 a été mouillé avec de l'eau distillée stérile et laissé à la température ambiante ( $27$  °C à  $34$  °C) dans des boîtes de Pétri pendant 7 jours. Les gousses d'arachides ont été ouvertes mais les graines et leurs coques ont été mouillées ensemble. Partant du consortium de champignons poussés, un isolement et une purification des souches d'intérêt (*Aspergillus*) ont été faits. Pour cela des repiquages successifs en points par épuisement des champignons poussés ont été effectués sur le milieu mazé. Les dernières colonies poussées sur les points de repiquages successifs par épuisement ont constitué les souches pures. Une observation microscopique des conidiophores des souches nouvellement isolées a permis de les retenir en fonction d'un certain nombre de caractères, pour la suite de l'étude. Ainsi les souches ayant un conidiophore cloisonné et non hyalin ont été écartées.

L'isolement des *Aspergillus* a été fait sur le milieu mazé composé d'un litre de bouillon de haricot blanc (pH 6.8 à 7) auquel il a été ajouté 20 g de glucose, 2 g de peptone bactériologique et 20 g d'agar-agar. Les souches isolées ont été purifiées sur le milieu non sélectif de Czapek Yeast Extract Agar

(CYA) constitué de  $K_2HPO_4$  (1 g), de Czapek concentré (10 ml), de solution de métaux (1 ml), d'extrait de levure (5 g), de saccharose (30 g), d'agar-agar (15 g) et d'eau distillée (1 L). Cette purification sur CYA a également été faite par repiquage successif en point par épuisement. Le milieu d'identification « *Aspergillus Flavus and Parasiticus Agar* » (AFPA) dont la composition est la suivante : peptone bactériologique (10 g), extrait de levure (20 g), citrate d'ammonium ferrique (0.5 g), 100 mg de chloramphénicol, agar-agar (15 g), dichloran (1 ml à 0.2% dans de l'éthanol), eau distillée (1 L), (pH 6.0-6.5), a été utilisé pour identifier les *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* selon les protocoles de Pitt et al. (1983) et Cotty (1994). Le milieu Glycérol Nitrate Agar (G25N) à  $25$  °C a également été utilisé pour apporter une différenciation supplémentaire des souches. La détermination systématique et l'identification des souches a été faite sur le milieu de Czapek Yeast Extract Agar (CYA) à  $25$  °C et  $37$  °C selon les méthodes utilisées par Christensen (1981) et Hocking (1982). Les milieux coulés en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre ont été ensemencés en trois points équidistants.

### **Caractérisation des souches d'*Aspergillus* locales isolées**

Les souches d'*Aspergillus* ont été identifiées sur le milieu de culture CYA par observation des caractères culturels au septième jour d'incubation. Les clés majeures utilisées étaient : La vitesse de croissance (diamètre des colonies), la couleur des colonies qui est appréciée avec l'aide de la carte des couleurs Vasart qui dérive des cartes du handbook des couleurs de Methuen, l'envers de la colonie et le changement éventuel de la couleur du milieu, la texture de la surface de la colonie (Christensen, 1981 ; Hocking, 1982; Doster et al., 2009).

En plus des caractères culturels, des fractions de culture ont été observées en microscopie optique sur une lame porte objet

ordinaire. Les dimensions des éléments structuraux ont été mesurées en équipant le microscope optique d'un oculaire micrométrique et en utilisant une lame micromètre porte-objet. L'observation a été faite sur des cultures de 48 à 120 h et a porté sur les caractéristiques suivantes de la tête aspergillaire : La présence ou l'absence de métules (sériation) ; l'arrangement et la forme des phialides ; la forme et la taille de la vésicule ; la taille, l'aspect et la couleur du conidiophore et des conidies.

#### **Détermination visuelle de la capacité de production d'aflatoxines**

Les souches isolées et celles de références ont été toutes mises en culture sur le milieu de coco dilué ( $1/5^{\text{ème}}$ ) à  $30 \pm 1$  °C pendant au minimum 3 jours. Ainsi, 20 g de noix de coco déchiquetées ont été homogénéisés pendant 5 mn avec 300 ml d'eau distillée chauffée à environ 70 °C. La solution a été filtrée à l'aide de tissu. L'agar a été ajouté au bouillon de coco à raison de 20 g/L puis le mélange a été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 15 mn. Le pH final a été ajusté à 7.0. Une plaque UV est utilisée pour visualiser les colonies sous une lumière ultra violette à 254 et 312 nm. Cette visualisation a permis de mettre en évidence qualitativement la capacité de production d'aflatoxines des souches à travers la fluorescence bleue (Davis et al., 1987; Nguyen, 2007 ; Abdel-Hadi et al., 2011). Lorsque le test est négatif il n'y a pas de fluorescence bleue autour des colonies observées.

## **RESULTATS**

### **Caractères culturels**

Les caractères culturels de toutes les souches cultivées sur le milieu CYA sont présentés dans le Tableau 1. Les souches locales BfaS1 et BfaS5 présentent les mêmes caractères sur le milieu CYA à l'exception du diamètre de la colonie et du nombre de sclérotas à 25 °C. En effet, BfaS5 présente plus de sclérotas à 25 °C que la BfaS1 et la

CDC B5333. Sur le milieu G25N, les colonies de la souche BfaS5 sont nettement différentes de celles de la BfaS1. Les colonies de la BfaS5 sont de couleur verte olive foncée tandis que celles de la BfaS1 sont de couleur verte jaunâtre avec des bordures blanchâtres (Figure 1). Par ailleurs, la même Figure 1 révèle que la colonie de la souche de référence *Aspergillus parasiticus* NRRL 5862 est de couleur blanche rosâtre tandis que la souche de référence *Aspergillus flavus* CDC B5333 est de couleur verte jaunâtre avec des bordures blanchâtres à l'instar de la souche locale BfaS1. Il est à noter cependant que les pigmentations verte et jaune sont plus intenses chez la CDC B5333 que chez la BfaS1. Ainsi, ces deux dernières souches bien que très proches sont différentes au niveau de la nuance des pigments. Cette proximité des couleurs des souches BfaS1 et la CDC B5333 pourrait être en corrélation avec leur capacité de production d'aflatoxines confirmée par la fluorescence des colonies sous la lumière UV.

La culture sur le milieu coco agar (CA) suivi de l'observation de la fluorescence sous UV a montré que les colonies des souches CDC B4571 et la souche locale BfaS1 ont montré une fluorescence bleue sous UV avec cependant une faible intensité, ce qui correspond à une réponse positive sur le milieu CA. La fluorescence bleue étant celle émise par les aflatoxines produites. Quant aux souches de références NRRL 5862 et CDC B5333 cultivées sur le milieu CA, elles ont montré une très forte fluorescence sous UV. Par contre, les colonies de la souche de référence NRRL 484 ne sont pas fluorescentes sous UV, correspondant à une réponse négative sur CA et le caractère non aflatoxinogène de cette souche de référence. Les souches locales BfaS5, BfaS0, BfaS3 et BfaS4 ont également présenté une réponse négative sur le milieu CA, signifiant qu'elles sont non aflatoxinogènes.

Les souches de références utilisées ont permis une bonne assurance de la qualité des

expériences menées et ont permis une caractérisation des souches locales.

La culture sur le milieu AFPA a permis d'identifier les souches locales BfaS1 et BfaS5 comme des *Aspergillus flavus* ou *A. parasiticus* car elles ont donné une réponse positive sur AFPA, illustrée par une coloration jaune orangée de l'envers de la colonie (Figure 2). Les souches de référence NRRL 484, NRRL5862 et B5333 de CDC ont également donné une réponse positive sur AFPA. Par contre, la souche de référence CDC 4571 et les souches locales BfaS0, BfaS3 et BfaS4 ont donné une réponse négative sur AFPA.

Les résultats combinés de la culture sur le milieu AFPA et la capacité de production d'aflatoxines évaluée par fluorescence sous UV des colonies poussées sur le milieu CA sont synthétisés dans le Tableau 2. De façon générale les souches qui ont donné une réponse positive sur AFPA, sont également positives sur CA et vice versa, exceptée la souche de référence CDC 4571 et la souche locale BfaS5.

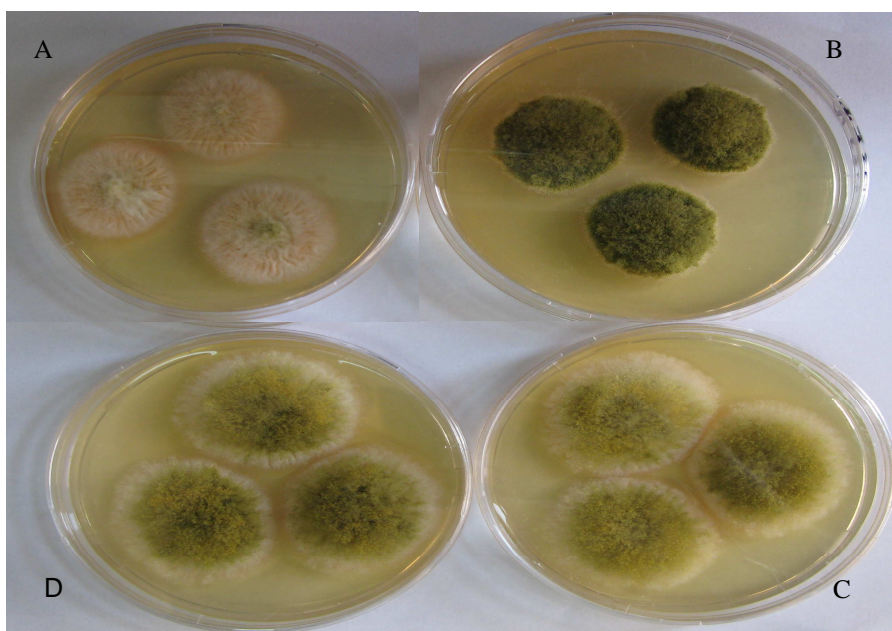
### Caractères microscopiques

Les caractères microscopiques observés (Figures 3, 4 et 5) des différentes souches montrent que les souches étudiées ont un conidiophore non cloisonné, hyalin avec une tête conidienne rayonnante et des variations au niveau de la sériation, de la forme et des dimensions de la vésicule, du conidiophore, et des conidies (Tableau 3). Ainsi les souches de références *Aspergillus parasiticus* ont un conidiophore relativement plus court (24 à 250 µm) que les souches *A. flavus* (300 à 1200 µm). Les souches locales isolées ont un conidiophore dont la longueur est comprise entre 350 et 2070 µm et le diamètre de la vésicule compris entre 28 et 140 µm. En outre, les souches de références *Aspergillus parasiticus* ont une vésicule plus petite (12 à

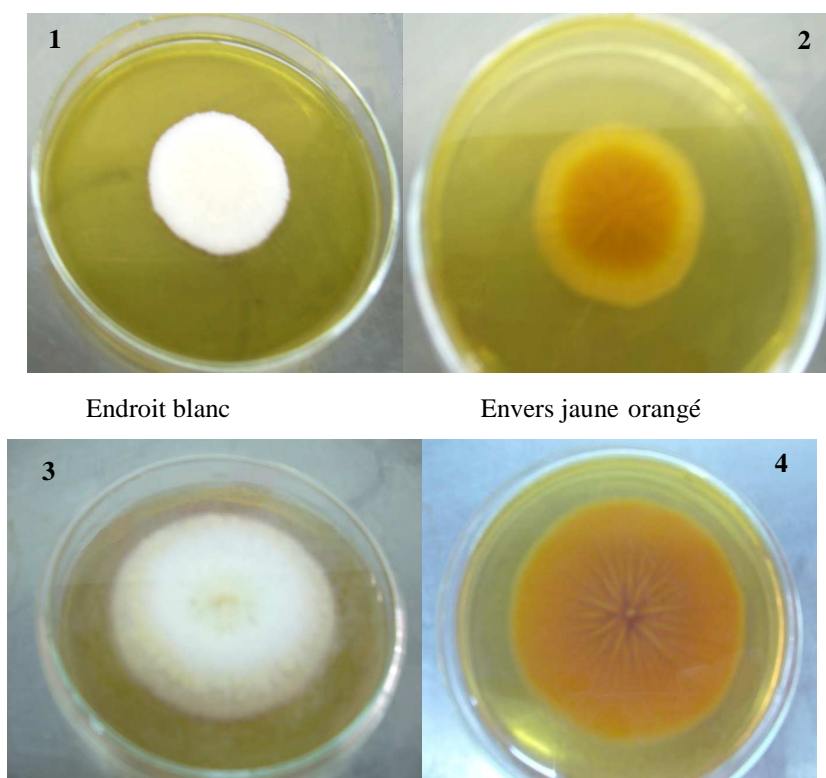
19 µm) que celle des *A. flavus* (20 à 40 µm). La souche locale BfaS5 possède une plus grosse vésicule (80 à 140 µm). Ce caractère microscopique permet également de confirmer que la BfaS5 est bien différente de la BfaS1 dont le diamètre de la vésicule est compris entre 28 et 37 µm. En n'utilisant que seul le diamètre de la vésicule comme paramètre de différenciation, il est à noter l'absence d'*Aspergillus parasiticus* parmi les souches locales isolées car le diamètre minimum des souches locales est supérieur à 19 µm, limite supérieure du diamètre mesuré pour les vésicules des souches de références *A. parasiticus*. Nos résultats présentés dans le Tableau 3 ont été comparés avec ceux trouvés antérieurement par plusieurs auteurs (Tableau 4). Il s'agit des résultats de Christensen (1981), Klich et Pitt (1988), Ito et al. (2001), Gao (2007). Cette comparaison a permis de constater une concordance entre les différents caractères microscopiques trouvés par ces auteurs et ceux observés dans le présent travail.

### Capacité de production d'aflatoxines

L'analyse de l'aptitude des souches à produire des aflatoxines au travers l'émission de la fluorescence bleue des colonies a montré que la souche locale BfaS1 est productrice d'aflatoxines tandis que les souches locales BfaS5, BfaS0, BfaS3, BfaS4 et la souche de référence NRRL 484 n'en produisent pas. La capacité de production d'aflatoxines des souches de références NRRL 5862, CDC B5333 et CDC B4571 a également été confirmée dans nos conditions de culture sur le milieu de coco agar (CA). Une confirmation de la production d'aflatoxines par dosage chromatographique liquide à haute performance (HPLC) a été faite et les résultats présentés dans un autre article sont en parfaite adéquation avec les résultats d'émission de la fluorescence sous UV.

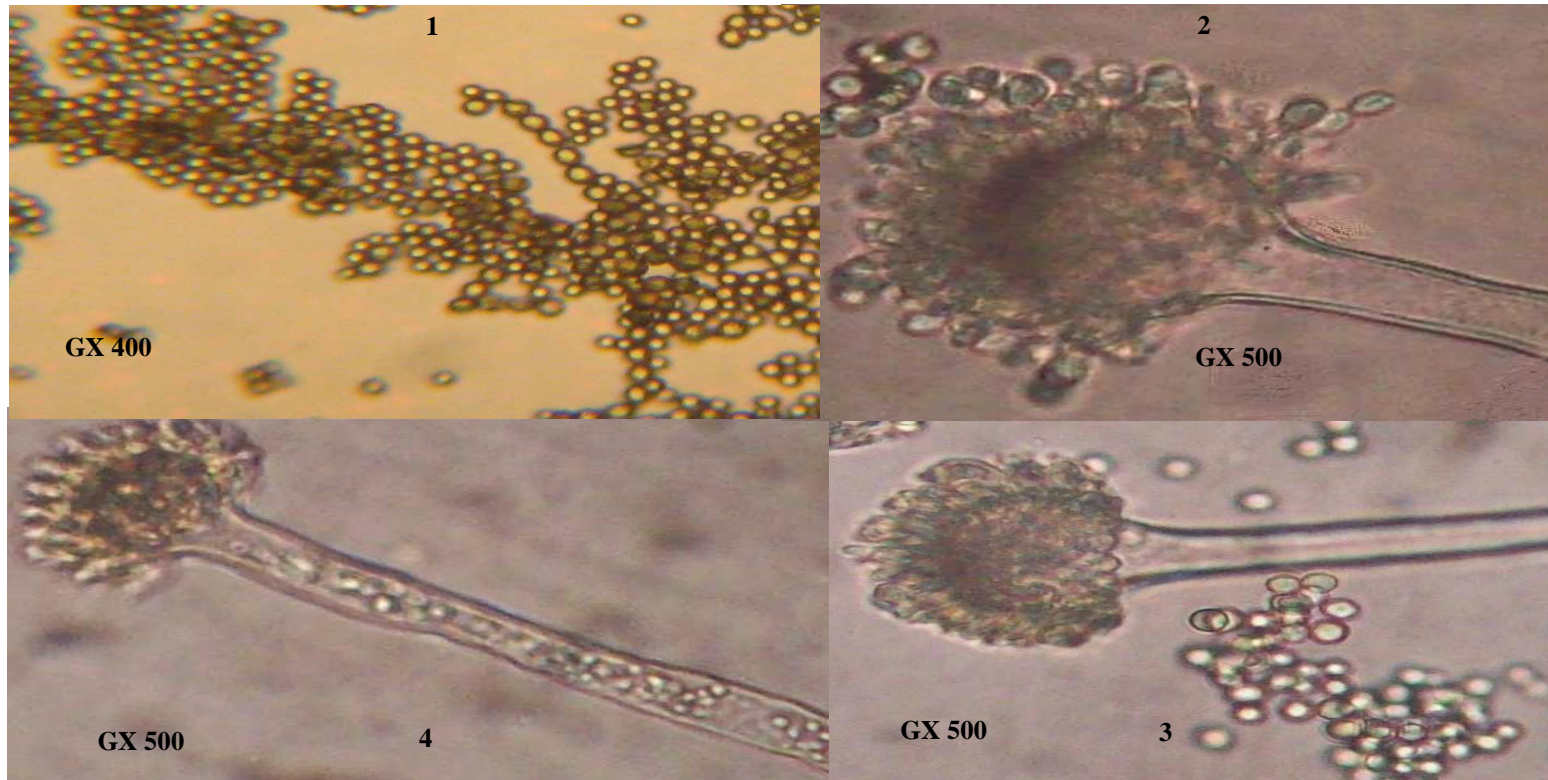


**Figure 1 :** Colonies des souches NRRL5862 (A), BfaS5 (B), BfaS1(C) et CDC B5333 (D) sur G25N à 25°C après 5 jours d'incubation.



**Figure 2 :** Colonies CDC B5333 (1,2) et isolat local BfaS5(3,4) positifs (envers jaune orangé) sur AFPA 72 h après incubation à 30 °C.





**Figure 3:** Conidies de la souche BfaS1 (1) et têtes aspergillaires des souches BfaS1(2), CDC B5333 (3) et NRRL5862 (4).



**Figure 4:** Têtes aspergillaires des souches NRRL 484 (5) et CDCB4571(6).





**Figure 5:** Têtes aspergillaires des souches, BfaS3 (7), BfaS4(8), BfaS0 (9,10).

**Tableau 1:** Caractères cultureux au 7<sup>ème</sup> jour d'incubation à 37 °C des colonies des souches d'*Aspergillus* sur milieu CYA.

	Souches	Caractères cultureux des colonies
Souches locales	<b>BfaS0</b>	colonie noire foncée veloutée, homogène, plane, envahie par les conidies sur toute la surface duveteuse, sans sclérotés ; diamètre compris entre 55 et 60 mm envers brun jaunâtre et rayonnant
	<b>BfaS1</b>	colonie vert-olive avec quelques sclérotés blancs à la surface, texture veloutée rayonnante en bordure, floconneuse plus dense et grisâtre au centre ; diamètre compris entre 50 et 60 mm envers brun clair rayonnant
	<b>BfaS3</b>	colonie noire foncée homogène, plane, envahie par les conidies sur toute la surface, duveteuse, sans sclérotés diamètre compris entre 40 et 55 mm envers brun jaunâtre et rayonnant
	<b>BfaS4</b>	colonie noire foncée homogène, plane, envahie par les conidies sur toute la surface, duveteuse, sans sclérotés. diamètre compris entre 40 et 55 mm. envers brun jaunâtre et rayonnant
	<b>BfaS5</b>	colonie vert-olive sans sclérotés. Par contre à 25 °C, apparition de beaucoup de sclérotés en nombre supérieur à celles de BfaS1 et CDCB5333, texture veloutée rayonnante en bordure, floconneuse plus dense et grisâtre au centre. diamètre compris entre 35 et 50 mm envers brun clair rayonnant
Souches de références	<b>CDC B4571</b> <i>A. parasiticus</i> <b>aflatoxinogène</b>	colonie blanc jaunâtre s'assombrissant légèrement au centre après 7 jours, texture veloutée, sans sclérotés diamètre compris entre 29 et 30 mm envers colonie jaune orangé
	<b>CDC B5333</b> <i>A. flavus</i> <b>aflatoxinogène</b>	colonie vert-olive avec quelques sclérotés blancs à la surface, texture veloutée rayonnante en bordure, floconneuse plus dense et grisâtre au centre diamètre compris entre 50 et 55 mm envers brun jaune rayonnant

<b>NRRL 5862</b> <i>A. parasiticus</i> <b>aflatoxinogène</b>	colonie vert-olive nuit plus foncé que CDCB5333 et BfaS1, sans sclérotés même à 25 °C, texture veloutée rayonnante, un peu floconneuse, plus dense et légèrement grisâtre au centre diamètre compris entre 40 et 50 mm envers brun jaune rayonnant, mais plus brunâtre que CDCB5333 et BfaS1
<b>NRRL 484 A.</b> <i>flavus non</i> <b>aflatoxinogène</b>	Blanc crème uniforme, duveteuse dense sans sclérotés diamètre compris entre 25 et 33 mm. envers jaune brunâtre peu rayonnant

**Tableau 2 :** Tableau synthétique des résultats de la culture sur AFPA, et CA dilué au 1/5<sup>ème</sup>.

Souches		Envers de la colonie jaune orangé sur AFPA voir Figure 2	Capacité de production des aflatoxines par émission de fluorescence par les colonies sous UV sur CA
Souches de référence	<i>A. parasiticus</i> NRRL5862	++	++
	<i>A. flavus</i> NRRL484	++	-
	<i>A. flavus</i> CDCB5333	++	++
	<i>A. parasiticus</i> CDCB4571	-	±
Souches locales	BfaS1	++	±
	BfaS5	++	-
	BfaS0	-	-
	BfaS3	-	-
	BfaS4	-	-

La réaction sur AFPA est positive à partir de 42 h d'incubation. La fluorescence est visible à partir du 3<sup>e</sup> jour.

(++) = positif avec fluorescence bleue intense ou couleur jaune orangée très prononcée ;

(-) = Négatif (pas de fluorescence ou pas de couleur jaune orangée) ;

(±) = Positif avec fluorescence moins intense.

**Tableau 3 :** Caractères microscopiques.

Souche	Conidiophore	Tête conidienne	Dimensions (µm)					
			Longueur conidiophore	Largeur conidiophore	Diam. vésicule	Diam. conidies	Épaisseur paroi conidiophore	Épaisseur paroi vésicule
BfaS0	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante bisériée avec vésicule globuleuse à subglobuleuse	1000 à 2070	13 à 15	40 à 50	2.7 à 4	1 à 1.3	2.7
BfaS1	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante unisériée/ bisériée avec vésicule sphéroïdale, globuleuse	350 à 500	13 à 15	28 à 37	2.7 à 5	0.8 à 1.1	1.8
BfaS3	Hyalin non cloisonné	Rayonnante bisériée avec vésicule globuleuse à subglobuleuse	600 à 1300	13 à 15	40 à 50	2.2 à 2.5	1 à 1.5	1.8
BfaS4	Hyalin non cloisonné	Rayonnante bisériée avec vésicule globuleuse à subglobuleuse	600 à 1400	13 à 15	35 à 45	3 à 5	1 à 1.5	1.8
BfaS5	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante bisériée avec vésicule sphéroïdale, globuleuse	400 à 550	7 à 10	80 à 140	4 à 5	0.9 à 1.5	2.3
CDC B4571	Hyalin, non cloisonné	Petites têtes rayonnantes unisériées avec vésicule en forme de massue	24 à 120	5.3 à 7.9	12 à 15	2.6 à 3	0.5 à 0.8	0.7
CDC B5333	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante unisériée/ bisériée avec vésicule sphéroïdale, globuleuse	300 à 500	7 à 13	20 à 40	2.7 à 5	1 à 1.5	1.8

NRRL 5862	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante unisériée avec vésicule sphéroïdale, globuleuse	190 à 250	8 à 10	15 à 19	4 à 5	1.5 à 1.8	2.7
NRRL 484	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante unisériée avec vésicule sphéroïdale, globuleuse	400 à 1200	7 à 13	20 à 35	3 à 5	0.9 à 1.2	1.6

**Tableau 4 :** Résultats de travaux antérieurs menés par d'autres auteurs sur les caractères microscopiques des *Aspergillus*

Références	Souche	Conidio- phore	Tête conidienne	Dimensions (µm)					
				Longueur conidiophore	Largeur conidiophore	Diamètre vésicule	Diamètre conidies	Épaisseur paroi coni- diophore	Épaisseur paroi vésicule
Christensen, 1981	<i>A. flavus</i> Var. <i>flav.</i>	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante unisériée et ou 20-80% bisériée	400 à 850 2000 à 2500	-	10 à 85	3 à 7.5 4 à 5	-	0.5 à 1.8
	<i>A. clavato-flavus</i>	Hyalin, non cloisonné	Rayonnante bisériée et ou trisériée	200 à 500	-	13 à 24	2.8 à 4.2	-	-
	<i>A. parasiticus</i>	Hyalin non cloisonné	Rayonnante unisériée rarement bisériée	300 à 700	-	20 à 35	3.5 à 5.5	-	-

Gao, 2007	<i>A. flavus S</i>	Hyalin /brun pâle	unisériée	150 à 1130	7 à 15	17 à 22 x16 à 21	2 à 7 x 2.5 à 6	-	-
	<i>A. flavus L</i>	Hyalin /brun pâle	Unisériée et bisériée	210 à 700	4 à 16	16 à 50 x 15 à 47	3 à 5 x 3 à 4,5	-	-
	<i>A. parasiticus</i>	-	-	350 à 387.5	8	-	4 à 8 x 3 à 8	-	-
Klich and Pitt, 1988	<i>A. flavus</i>	-	Bisériée (≈50 à 100%), unisériée	≤800	-	≤60	3 à 6	-	-
Klich and Pitt, 1988	<i>A. parasiticus</i>	-	Unisériée (92 à 94%), rarement bisériée	≤500	-	-	4 à 6	-	-
Pitt., 1998	<i>Aspergillus niger</i>	Hyalin,	Rayonnante bisériée (100%)	1000 à 3000	-	50 à 75	4 à 5	-	-
Ito, 2001	<i>A. pseudotamarii</i>	Hyalin	Rayonnante bisériée	500 à 770	-	26 à 38	3.9 à 9.9	-	-

- : données manquantes



## DISCUSSION

Les moisissures du genre *Aspergillus* contaminant les arachides au Burkina Faso sont de caractéristiques microscopiques et métaboliques variées. Ainsi à travers ce présent travail dont l'objectif est la caractérisation de quelques souches locales d'*Aspergillus* spp et leur aptitude de production ou non d'aflatoxines, il apparaît que les deux souches locales BfaS1 et BfaS5 ont des caractéristiques communes aux *Aspergillus flavus*. De ce fait, nous les avons classées comme appartenant à cette espèce. Cette classification s'est appuyée sur la détermination des caractères cultureux observés sur les milieux CYA (Tableau 1), G25N (Figure 1) et AFPA (Figure 2) et des caractères microscopiques qui correspondent à ceux des *A. flavus* (Tableau 3 et Figures 3, 4, 5). En plus des caractères cultureux et microscopiques correspondants, la souche BfaS1 est capable de produire des aflatoxines. La mise en évidence a été faite par l'émission de la fluorescence sur le milieu de coco gélosé et par HPLC. Ce sont des méthodes couramment utilisées par d'autres auteurs pour vérifier la production d'aflatoxines. Lin et Dianese (1976), Davis et al. (1987), Nguyen (2007), Abdel-Hadi et al. (2011) ont utilisé le milieu de coco pour mettre en évidence par fluorescence la production des aflatoxines.

Selon Cotty (1994), le milieu AFPA permettrait de détecter 100% de ses souches cibles mais n'est pas capable de détecter toutes les souches productrices d'aflatoxines. Ceci est un des arguments qui justifie notre classification étant donné que nos souches BfaS1 et BfaS5 ont donné une réponse positive sur AFPA. Les travaux de Cotty (1994), réalisés sur 4 milieux (AFPA, BCRB, M-RB, BC-RB) n'expliquent pas la réaction négative obtenue sur AFPA pour la souche de référence CDC 4571, *A. parasiticus* productrice d'aflatoxines. Cet exemple montre que le milieu AFPA n'est pas infaillible à la détection de toutes ces souches cibles (Cotty, 1994). Pitt et al. (1983) avaient aussi observé 1,4% de faux positifs parmi les souches

testées sur le milieu AFPA et 2,9% de faux négatifs.

La différence morphologique de la BfaS5 avec la BfaS1 réside dans l'aspect de la colonie sur G25N. En outre, la BfaS5 ne produit pas d'aflatoxines et fait partie donc des espèces d'*Aspergillus flavus* non productrices d'aflatoxines à l'instar de la souche de référence NRRL 484 bien que ces deux souches soient morphologiquement très différentes (Tableaux 1 et 3). Ces deux souches ont une réaction positive sur AFPA mais ne présentent aucune fluorescence sous la lumière UV. Ce qui augure que ces deux souches non aflatoxinogènes sont capables de produire l'acide aspergillique. Selon Hocking (1982) et Pitt et al. (1983), l'acide aspergillique produite par les *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* réagit avec le citrate d'ammonium ferrique pour former un pigment de couleur jaune orangé visible dans la gélose à l'envers de la colonie. Par ailleurs, Frisvad (2005) a utilisé le milieu AFPA pour tester la capacité de production de l'acide aspergillique par la souche d'*Aspergillus rambellii* sp. Nov. isolée et classifiée. Davis et al. (1987) ont trouvé contrairement à Lin et Dianese (1976), que la production de pigment jaune orangé n'était pas un indicateur suffisamment fiable pour juger de la capacité de production d'aflatoxines d'une souche. Cette observation corrobore bien avec les résultats obtenus avec la souche BfaS5.

Eu égard à la grande similarité morphologique entre la BfaS5 et la BfaS1, la différence de capacité de production d'aflatoxines peut être liée au stress oxydatif étant donné que chaque souche a sa propre sensibilité au stress lié au manque d'oxygène (Narasaiah et al., 2006), même si tous les gènes de la voie de biosynthèse des aflatoxines sont présents (Bhatnagar et al., 2006 ; Chang et al., 2007). Une autre explication plausible de la non production d'aflatoxines par la BfaS5 réside dans la perte précoce de la propriété de production d'aflatoxines, au cours des étapes de purification supplémentaires (transferts successifs sur milieu de culture) appliquées et

qui n'ont pas été nécessaires pour les autres souches. Cette hypothèse s'appuie sur les travaux de Horn et Dorner (2001) et ceux de Chang et al. (2007) qui ont démontré que les souches d'*Aspergillus flavus* peuvent perdre progressivement leur capacité de production d'aflatoxines lorsqu'on procède à des transferts successifs sur milieu de culture. La vitesse de cette perte varie en fonction de la sensibilité de la souche aux transferts. Certaines lignées de souches perdent leur capacité de production d'aflatoxines à la deuxième génération c'est-à-dire après un seul transfert tandis que d'autres lignées produisent encore des aflatoxines à la 20<sup>e</sup> génération (Horn et Dorner, 2001). La BfaS5 ayant subi 7 transferts lors de sa purification, une éventuelle perte de la capacité de production d'aflatoxines, pourrait survenir. Toutefois, la souche BfaS5 n'a pas produit d'aflatoxines et cette propriété non aflatoxinogène pourrait être exploitée dans des essais de bio-contrôle en mettant les deux souches BfaS1 et BfaS5 en croissance compétitive (Cotty et Bayman, 1993) pour vérifier si la souche non aflatoxinogène BfaS5 pourrait réduire la croissance de la BfaS1 ainsi que sa production d'aflatoxines par exclusion biocompétitive (Ruiqian et al., 2004) avec une réduction subséquente de l'exposition des populations aux aflatoxines à l'instar de l'Agence de Protection Environnementale des Etats Unis (EPA) qui exploite cette propriété. A cet effet, les souches d'*Aspergillus flavus* non aflatoxinogènes « strain AF36 (006456) » et « strain NRRL 21882 (006500) » ont été approuvées les 24 juin 2003 et 28 mai 2004 comme ingrédients actifs pouvant jouer le rôle de bio-pesticide. Les résultats de la présente étude augurent d'une telle opportunité de recherche fondamentale et appliquée aux biocontrôles de la prolifération des souches et de la production des mycotoxines. Les souches locales BfaS0, BfaS3 et BfaS4 que nous avons isolées ont des caractéristiques communes aux *Aspergillus niger* et peuvent être considérées comme des souches appartenant à cette espèce au regard des résultats morphologiques et microscopiques

(Tableaux 1, 2, 3, 4 et Figure 5). Les colonies présentent des têtes conidiennes noires, rayonnantes sur toute leur surface avec un conidiophore nettement plus long (1000 à 2070 µm) que celui des *A. flavus* et *A. parasiticus* (120 à 1200 µm, Figure 5). Les conidies de couleur brune à noire ont un diamètre compris entre 4 et 5 µm. Les souches ont eu une réaction négative sur les milieux AFPA et CA. Les caractères morphologiques et microscopiques restent dans les limites de la variabilité et corroborent avec les résultats obtenus par Pitt (1998).

C'est la première fois, au CRSBAN qu'une étude détaillée est menée à la fois sur les caractères morphologiques, microscopiques et la capacité de production d'aflatoxines de souches d'*Aspergillus*. Et cette étude préliminaire a permis d'isoler et de caractériser des souches d'*Aspergillus flavus* et *A. niger* (BfaS1, BfaS5, BfaS0, BfaS3 et BfaS4) basée sur une approche polyphasique. Elle nous a ainsi permis de maîtriser les méthodes mycologiques de base pour l'isolement et l'identification des *Aspergillus* qu'ils soient producteurs d'aflatoxines ou non.

En perspective, des souches *Aspergillus niger* produisant d'autres types de métabolites d'intérêt industriel dans le génie de la fermentation pour la production d'acide citrique ou la sécrétion de protéines (Baker, 2006) pourront être étudiées. En outre l'utilisation de méthodes taxonomiques plus modernes telles que le séquençage de l'ADN et la construction d'arbre phylogénétique permettront une meilleure connaissance des souches présentes sur le territoire national. A partir de cette étape, notre objectif général qui est la lutte pour la réduction de la production d'aflatoxines par les *Aspergillus* pourra mieux s'organiser.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Dr S.W. Peterson de l'« USDA-Research, Education and Economics Agriculture Research service de l'Illinois » et Dr Mary E. Brandt de « CDC » Atlanta pour avoir offert gracieusement les souches de références. Ils

remerciement également le Dr Aly Savadogo du CRSBAN pour son soutien technique.

## REFERENCES

- Abdel-Hadi A, Carter D, Magan N. 2011. Discrimination between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus* section Flavi strains from Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques. *World Mycot. J.*, **4**(1): 69-77.
- BAKER SE. 2006. *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Med. Mycol.*, **44**: 17-21.
- Barros D, Torres A, Chulze S. 2005. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *J. Sci. Food. Agric.*, **85**:2349-2353.
- Bhatnagar D, Cary JW, Ehrlich K, Yu J, Cleveland TE. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathol.*, **162**: 155-166.
- Blanc M. 2001. Législation communautaire sur les aflatoxines : incidences sur le commerce de l'arachide de bouche et de la pistache. *FAO: Aliment. nutri. Agric. Anal.*, **28**: 16-24.
- Chang PK, Wilkinson JR, Horn BW, Yu J, Bhatnagar D, Cleveland TE. 2007. Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production by serial transfers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**: 917-925.
- Cho SH, Lee CH, Jang MR, Son YW, Lee SM, Choi IS, Kim SH, Kim DB. 2007. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Korea Food and Drug Administration, Busan* 608-829.
- Christensen M. 1981. A synoptic Key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycol.*, **73**: 1056-1084.
- Cotty PJ. 1994. Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavus* group fungi. *Mycopathol.*, **125**: 157-162.
- Cotty PJ, Bayman P. 1993. Competitive exclusion of a toxigenic strain of *Aspergillus flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathol.*, **83**: 1283-1287.
- Davis ND, Iyer SK, Diener UL. 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**:1593-1595.
- Dehghan P, Zaini F, Rezaei S, Jebali A, Kordbacheh P, Mahmoudi M. 2008. Detection of *AflR* Gene and Toxigenicity of *Aspergillus flavus* Group Isolated from Patients with Fungal Sinusitis. *Iran. J. Public Hlth.*, **37**(3): 134-141.
- Doster MA, Cotty PJ, Michailides TJ. 2009. Description of a Distinctive Aflatoxin-Producing Strain of *Aspergillus nomius* that Produces Submerged Sclerotia. *Mycopathol.*, **168**: 193-201.
- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **28**: 442-453.
- Gao J, Liu Z, Yu J. 2007. Identification of *Aspergillus* section Flavi in maize in northeastern China. *Mycopathol.*, **164**: 91-95.
- Hocking AD. 1982. Aflatoxigenic fungi and their detection. *Food Technol. Aust.*, **34**: 1- 3.
- Horn BW, Dorner JW. 2001. Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. *Mycol.*, **94**(5): 741-751.
- EPA. 2010. [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product\\_lists/new\\_ai\\_2010.html](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists/new_ai_2010.html)
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monograph*, **82**.
- Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, Goto T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus*

- section. *Flavi. Mycol. Res.*, **105**: 233-239.
- Johnsson P, Lindblad M, Thim AM, Jonsson N, Vargas EA, Medeiros NL, Brabet C, Quaresma de Araújo M, Olsen M. 2008. Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. *World Mycot. J.*, **1**(2): 127-137.
- Klich MA, Pitt JI. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. British mycol. Soc.*, **91**(1): 99 -108.
- Klich MA, Mullaney EJ, Daly CB, Cary JW. 2000. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamaris* and *A. ochraceoseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 605-609.
- Lin LM, Dianese JC. 1976. A coconut-Agar Medium for rapid detection of aflatoxin by *Aspergillus* spp. *Phytopathol.*, **66**: 1466-1469.
- Narasaiah KV, Sashidhar RB, Subramanyam C. 2006. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathol.*, **162**: 179-189.
- Nguyen MT. 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxine. Thèse de doctorat, Ecole doctorale de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Nikiéma PA, Traoré AS, Singh B. 1995. Etude de la contamination de graines d'arachide par des aflatoxines produites au cours du stockage. *J.A.R.C.B.*, **1**: 2-16.
- Peterson SW, Ito Y, Horn BW, Goto T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycol.*, **93**: 689-703.
- Pitt JI, Hocking AD, Glenn DR. 1983. An improved medium for detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.*, **54**:109-114.
- Pitt JI. 1998. <http://www.aspergillus.org.uk/species>
- Reddy KRN, Saritha P, Reddy CS, Muralidharan K. 2009. Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. *Afric. J. Biotechnol.*, **8**(14): 3303-3308.
- Ruiqian L, Qian Y, Thanaboripat D, Thansukon P. 2004. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxins production. *Sci. Technol. J.*, **4**(1): 9.
- Samson RA, Hong SB, Frisvad JC. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med. Mycol.*, **44**: S133-S148
- Sanou D. 2000. Etude de la prévalence des mycotoxines dans les produits agricoles du Burkina Faso : Cas de la contamination du maïs (*zea mays L.*) par les aflatoxines et les fumonisines dans l'Ouest du Burkina. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, p.59.
- World Health Organization (WHO). 2006. *AFRO Food Saf. Newsl.*, Issue No 2. July. *Food Safety (FOS)*.