

CONTRAT C.E.E. - O.R.S.T.O.M.

N° TSD- 0179 - F (Proposition 02.078)

INSECTES RAVAGEURS ET PARASITES DES
LEGUMINEUSES A GRAINES EN AFRIQUE DE L'OUEST
(Cultures et stocks)

Contrat de 24 mois allant de juin 1985 à juin 1987

TRAVAUX REALISES SUR

LE CENTRE ORSTOM D'ADIOPODOUME

BP V.51 ABIDJAN
(R. de Côte d'Ivoire)

Coordonnateur: M. A. POLLET Entomologiste

Participants: MM. C. FAUQUET et J.C. THOUVENEL , Phytovirologistes
M. S. SAVARY , Phytopathologiste

Associés: MM. C. DECLERT et J.C. GEIGER, Phytopathologistes
MM. H. FEBER et C. CHAUVIER, Chimistes

RAPPORT D'EXECUTION N°2

Premier semestre de 1986

Avant propos

Ce deuxième Exercice, qui d'ailleurs marque également l'achèvement de la première moitié de ce Projet CCE de deux années, représente une étape essentielle dans le déroulement des recherches prévues.

Terme final de plusieurs études de terrain, il nous a ainsi permis de rassembler de nombreuses données importantes sur des domaines aussi variés que:

- Etats sanitaires des cultures et des stocks de légumineuses en milieu villageois (troisième et dernière Campagne d'Enquêtes)
- Protection des cultures et des stocks et suivis de tests pesticides variés
- Compléments d'inventaires pour les ravageurs des arachides et niébés, (virus et arthropodes essentiellement)

Les résultats correspondants sont actuellement en cours de traitements sur ordinateur De fait, outre un fichier photographique et technique conséquent, dont la publication reste envisageable (voir Rapport n°1), plusieurs Mémoires de synthèse seront ainsi proposés à terme tels, pour n'en citer que quelques uns, Productions et stockages traditionnels des légumineuses en Côte d'Ivoire, Dynamique des populations de mites sur arachide, Caractérisation de la moucheture chlorotique de l'arachide, etc.. Cette dernière virose, qui serait, semble-t-il très importante d'un point de vue écologique fait d'ailleurs l'objet dans ce deuxième rapport technique d'un petit paragraphe distinct (voir plus loin)

Le deuxième semestre d'activité de ce Projet, nous a également permis de préparer la mise en place d'un volet d'étude consacré plus spécialement aux problèmes que posent actuellement les aflatoxines aux stocks villageois d'arachide. Le développement de ce Programme spécifique, qui représentera d'ailleurs l'essentiel des activités de recherches prévues pour la deuxième année du Projet, et que prévoyait en fait le Rapport technique n°1, répond aussi à des impératifs aigus de la Production ainsi que nous le verrons plus loin

MALADIES VIRALES DES LEGUMINEUSES ALIMENTAIRES
(Laboratoire de Phytovirologie)

Comme nous l'avons expliqué dans le rapport d'exécution N°1 du programme TSD 179, la partie qui concerne la phytovirologie comprend deux grands volets .

- d'une part une action de recherche sur la caractérisation des maladies virales, de l'arachide en particulier, et des légumineuses alimentaires en général, que nous dénommons

Inventaire des maladies virales des légumineuses à graines

- d'autre part un volet qui vise à identifier les maladies potentiellement répandues et pouvant avoir un réel impact sur la culture de ces légumineuses à graines, intitulé

Impact des viroses sur les cultures de légumineuses alimentaires

Au cours du premier semestre 1986, nous n'avons traité que la première partie, réservant la seconde pour la prochaine campagne de cultures de légumineuses à graines. Dans le cadre de ce volet de recherche sur l'Inventaire des maladies virales, nous avons été amené, en 1985, à isoler de nombreuses viroses mais l'une d'entre elles a retenu notre attention du fait qu'elle fut isolée pour la première fois en Côte d'Ivoire et apparemment en Afrique. Nous avons donc décidé d'approfondir les connaissances sur cette maladie et nous nous sommes attachés à mieux caractériser les différents aspects de cette maladie virale de l'arachide que nous avons isolée pour la première fois lors des prospections de 1984. Il s'agit d'une virose provoquant des symptômes de taches chlorotiques sur les feuilles de l'arachide et que nous avons choisi de nommer .

"La moucheture chlorotique de l'arachide"

ou bien en anglais :

"Groundnut chlorotic spotting virus"

Il s'agit donc pour le semestre passé d'un travail de laboratoire dans le but de mieux préciser les caractéristiques de ce nouveau virus. Nous donnons ci-après quelques résultats techniques obtenus sur cette maladie.

REPARTITION Cette maladie n'a été isolée, pour le moment, que dans un seul endroit de Côte d'Ivoire, dans le centre ouest. Mais étant donnée la symptomatologie, il est possible, que jusqu'alors, elle fut confondue avec d'autres viroses. Il faudra donc préciser ce point au cours des prochaines prospections.

SYMPTOMATOLOGIE Les symptômes sont des taches chlorotiques nombreuses et isolées qui ressemblent à celles du Groundnut chlorotic spot virus. Celles-ci, par anastomose, provoquent une chlorose générale puis laissent de grandes taches que l'on pourrait attribuer à du Peanut mottle virus. Enfin il peut également y avoir des taches en forme d'ocelles rappelant celles du Groundnut eye spot virus.

TRANSMISSION La maladie a pu être transmise mécaniquement à une gamme d'hôtes, restreinte à la famille des *solanaceæ*, mais néanmoins spécifique de ce

virus Elle a pu aussi être transmise extrêmement facilement par les pucerons, sur le mode non persistant Les taux de transmission obtenus sont parmi les plus grands que nous ayons jamais enregistrés, c'est donc une maladie virale qui doit se transmettre très facilement par ce type de vecteur et il ne serait donc pas surprenant que cette virose soit beaucoup plus répandue qu'on ne le pense

PROPRIETES BIOLOGIQUES Les propriétés biologiques de cette maladie ont été réalisées et ont montré une relative stabilité de l'agent pathogène, ce qui est également en faveur d'une répartition géographique plus large

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES Toutes les caractéristiques physico-chimiques de ce virus montrent l'existence d'un virus de type filamenteux Ce qui fut d'ailleurs confirmé par les études en microscopie électronique La longueur du virus a été déterminée comme étant 456 nm, ce qui est extrêmement court et laisse supposer qu'il s'agit d'un potexvirus

SEROLOGIE Un antiserum spécifique de ce virus a été préparé. Le virus purifié a été testé contre un grand nombre d'antiserum de virus filamenteux susceptibles d'infester l'arachide, mais aucune relation sérologique n'a pu être mise en évidence Il semble donc que nous ayons à faire à un virus non encore identifié sur cette plante

Nous avons donc isolé un virus filamenteux qui, par ses caractéristiques morphologiques ne peut être qu'un potexvirus Ce type d'agent pathogène n'avait encore jamais été isolé en Afrique De plus, de par sa gamme d'hôtes, ses propriétés physico-chimiques et sa sérologie, il semble que nous ayons identifié un nouveau virus parmi les potexvirus. Par contre ce virus se démarque des autres potexvirus, de par sa transmission par puceron qui est particulièrement aisée, mais il en existe déjà quelques cas en Europe et en Australie.

Nous avons donc enrichi notre inventaire des maladies virales des légumineuses alimentaires d'un agent nouveau et intéressant Il est probable que grâce à sa transmission par pucerons et grâce à sa stabilité, il ne soit beaucoup plus répandu que nous ne le pensions, nous nous attacherons à le déterminer lors des prospections prévues pour 1986

MISE EN PLACE D'UN VOLET DE RECHERCHES "AFLATOXINE" (Laboratoires d'entomologie Agricole et de Phytopathologie)

1. JUSTIFICATIFS ET GENERALITES

Facteurs de risque élevés pour les consommateurs, car jugées particulièrement cancérigènes, les aflatoxines représentent finalement une cause de dépréciation des cultures d'arachide et de quelques autres vivriers des zones tropicales Le seuil de tolérance qui est retenu pour ces substances par les acheteurs occidentaux est actu-

ellement de l'ordre de 5 à 10 ppb de toxines présents par kilogramme de graines. Ce seuil très bas, qui correspond pratiquement à la présence d'une seule graine moisie et même parfois moins pour 1 000 graines saines (soit pratiquement aussi pour un litre d'arachide) se trouve donc facilement atteint. Ce problème, lié à la présence de *Aspergillus flavus*, champignons responsables de cette contamination des stocks par toxines, peut donc à terme représenter un problème économique fâcheux pour les PVD qui se consacrent déjà où qui, telle la Côte d'Ivoire, voudraient bien pouvoir se consacrer de manière plus approfondie à des productions d'arachide de type industriel.

Le développement des *Aspergillus* se réalise sur des graines insuffisamment séchées (teneur en eau entre 8% et 95% selon GILLIER, 1969) et demande également un climat chaud et humide (températures moyennes de 25 à 30° et humidités relatives de 75%, selon BURREL et autres (1964) ou DICKENS et PATEL (1966)). Il semble également se trouver favorisé par les dégâts que certains arthropodes peuvent provoquer aux gousses et aux graines déjà mûres, en partie dans le sol juste avant les récoltes, puis ensuite durant les 7 à 8 premiers jours de stockage. Les punaises, au niveau des seccos (tas d'arachide en cours de séchage au champ), les acariens, les termites et surtout les iules durant les dernières phases de cultures, et les actions spécifiques des ravageurs primaires et (ou) secondaires pendant les stockages sont ainsi très souvent cités. Pour BOCKEELEE - MORVAN et GILLIER (1964), les attaques au champ des coques par les myriapodes pourraient multiplier au moins par 10 les risques de contamination des graines par les toxines.

Les conditions climatiques, techniques et technologiques, réunies en Côte d'Ivoire sont finalement très favorables pour le développement des aflatoxines. Comparées au Sénégal, pays pour lequel ce problème est devenu aujourd'hui des plus sérieux, la Côte d'Ivoire se marque par un climat beaucoup plus humide et par des populations de iules et de termites également souvent plus importantes, toutes conditions nous l'avons vu, qui tendent à favoriser l'extension des contaminations.

En 1983, 1984 et 1985 à l'occasion de diverses Enquêtes "Arachides" (culture et stocks), des infestations par iules avec 10 à 20% de coques détruites et percées, ont pu être notées assez souvent dans de nombreuses zones des savanes ivoiriennes. Ces chiffres déjà fort appréciables, ne représentent pourtant bien souvent que des estimations très minorées des valeurs réelles d'attaques par arthropodes. Les différents taux d'attaques calculés ici ignorent en fait dans la plupart des cas les nombreuses gousses blessées, ou rongées par certains ravageurs, que divers champignons et quelques insectes detritiphages détruisent généralement assez vite (POLLET, 1982 et années suivantes).

Les conditions sanitaires habituelles des stocks villageois semblent également, dans l'ensemble assez peu favorables. Les récoltes sont généralement assez mal séchées avant entrées dans les magasins et contiennent encore trop souvent des proportions élevées d'arachide cassées, ou percées par iules, ou rongées par les termites, ou simplement tachées et noircies (POLLET, 1984 et 1985).

En dépit de quelques études contradictoires, il ne semble pas que l'on puisse é-

gler aujourd'hui ce problème de contaminations par aflatoxines, au moyen de sélections particulières de variétés résistantes, ou peu favorables aux développements des moisissures dans les gousses et sur les graines, (McDONALD et HARKNESS, 1963) L'utilisation de ces variétés dites "immunes" pour réduire l'importance de ces contaminations, que préconisent certains auteurs tels ZAMBITTAKIS et autres, (1981), se trouve actuellement remise en question par quelques études plus récentes (McDONALD et autres, 1984)

La résolution de ce problème particulier, demeure en fait purement technique et très étroitement dépendante des processus utilisés pour préparer puis conditionner les stocks durant une courte période, qui correspond aux quelques jours qui suivent les récoltes (McDONALD et HARKNESS, 1965 et aussi d'après DAVIS et autres, 1980)

Ces remarques déjà faites lors de précédentes études (POLLET, 1985 et 1986), se trouvent aujourd'hui vérifiées par les résultats de l'Audit que réalise actuellement le Bureau d'étude BERGER S.A sur les implications de tous ordres que pourrait entraîner le développement en Côte d'Ivoire d'une importante filière "arachide" MM GILLIER, FAVIER et WERBROUCK, Experts concernés par cette étude de factibilité viennent ainsi de souligner très particulièrement deux problèmes considérés comme majeurs et déterminants pour le devenir de cette plante en milieux villageois éburnéens soit précisément

- 1 La rouille et quelques autres maladies fongiques pour tout ce qui concerne les cultures de plein champ
- 2 Et pour ce qui est des stocks, importances pour chaque zone et évolutions des contaminations par aflatoxines Interactions remarquables liant arthropodes ravageurs des cultures et des stocks, champignons responsables et toxines.

La rouille fait l'objet actuellement en Côte d'Ivoire d'un Programme de recherche conséquent mené par SAVARY Certaines des bases préliminaires de cette recherche ont d'ailleurs été traitées précédemment lors de la première étape de ce présent Projet (voir rapport technique n°1)

Ce problème des contaminations des stocks par les toxines fongiques, deuxième point essentiel du rapport d'Audit, se trouve précisément aujourd'hui être à l'origine de ce volet de recherche "Aflatoxines", qui a été retenu comme Thème principal d'activité pour la dernière partie de cette Opération CCE De type éminemment multidisciplinaire (voir plus loin) ce Thème se définit de surcroît en fonction d'objectifs prioritaires pour le développement de la Côte d'Ivoire Il répond donc également de ce fait à l'un des impératifs majeurs retenus par la CCE pour l'orientation des divers Projets, et que définit globalement le Programme "La Science et la Technique au Service du développement"

2 SCHEMAS DIRECTEURS DU PROGRAMME "AFLATOXINES"

Utilisant un dispositif d'échantillonnage déjà testé en partie au cours de la

dernière campagne, avec suivis notamment de stocks d'arachide constitués en Côte d'Ivoire de juillet 1985 à mai 1986, faisant aussi appel à diverses méthodes également mises au point durant cette période pour les études des ravageurs entomologiques ou phytopathologiques, et pour les dosages de toxines (voir plus loin), ce volet "Aflatoxines" se mettra en place concrètement à partir de septembre 1986

De définitions pluridisciplinaires, les recherches prévues seront notamment réalisées ici dans le cadre d'Actions concertées, qui vont associer à temps partiel plusieurs Laboratoires et Structures de recherche, situés sur le Centre ORSTOM d'Adiopodoumé et également à Abidjan tels en particulier

1 ENTOMOLOGIE AGRICOLE ORSTOM M POLLET Coordination du Projet Détermination des principales données entomologiques liées à ce problème de toxines Etudes en particulier des impacts exercés sur les *Aspergillus*, des divers dégâts que les arthropodes portent successivement aux cultures puis aux stocks Etudes de synthèses

2 PHYTOPATHOLOGIE ORSTOM MM DECLERT et GEIGER Respectivement études systématiques des *Aspergillus* et autres moisissures présents dans les stocks, et implications biochimiques des dosages de toxines

3 LABORATOIRE CENTRAL D'ANALYSE ORSTOM - MM FERRER et CHAUVIER Participations aux études et appuis techniques pour la réalisation des extraits nécessaires pour les dosages

4 LABORATOIRE DE NUTRITION ANIMALE D'ABIDJAN (LACENA) - M. WIEGANDT Participation aux études et appuis techniques pour la réalisation des dosages de toxines sur chaîne H P L C (High Pressure Liquid Chromatography)

5 SERVICE DE PHARMACOLOGIE, FACULTE DE MEDECINE D'ABIDJAN - M BESSARD Mise à disposition du Projet d'une Chaîne H P L C Participations aux études et développement en parallèle et indépendamment de nos études, d'un quatrième volet plus spécifiquement consacré aux implications médicales des aflatoxines (voir plus loin)

6 CENTRE NEERLANDAIS d'ADIOPODOUME Avec mises à disposition du Projet par affectations successives de plusieurs Etudiants Nutritionnistes et Biochimistes venant de l'Université agronomique de Wageningen, tels dans l'immédiat

- Melle Karina VENCKEN, de mars à avril 1986 Pour réalisation des approches préliminaires et mises au point méthodologiques Dosages par chromatographies sur couches minces

- Melle Els Van LISDONK, pour un stage de 6 à 9 mois à partir de septembre 1986 Pour réalisation des études biochimiques et régionalisation des données Dosages par chromatographies sur H P L C

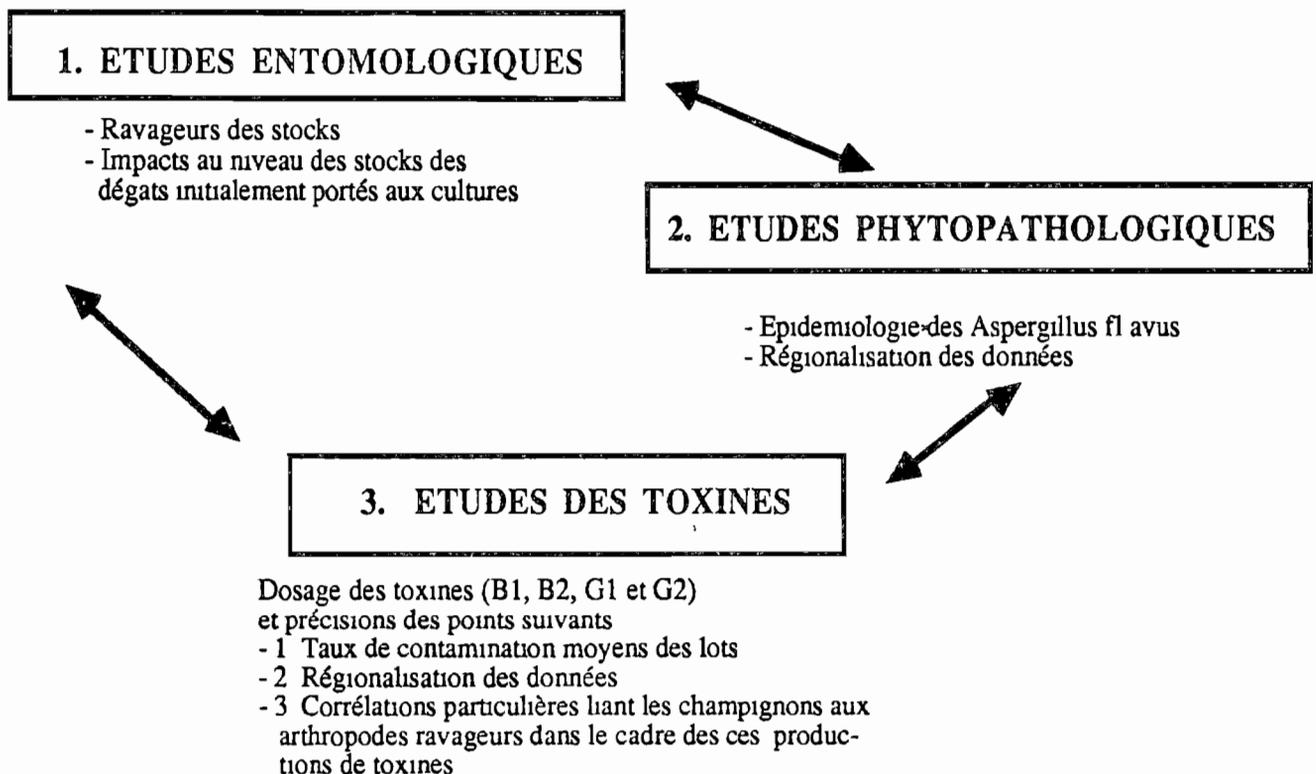
Se différenciant non seulement dans le temps (vieillissements et évolutions des stocks), mais également dans l'espace (régionalisations) les études particulières définies pour ce matériel par chacune des disciplines concernées, vont se diver-

sifier en fait selon trois directions particulière qui déterminent également les trois pôles d'activité principaux de ce Projet soit selon la figure 1 donnée plus loin

- 1 Etudes des ravageurs entomologiques, primaires et secondaires observés au niveau des stocks et (ou) précédemment dans les cultures d'origine
- 2 Etudes des ravageurs fongiques et plus particulièrement des *Aspergillus flavus*
- 3 Etat de contamination par les aflatoxines des divers stocks échantillonnés, et interactions remarquables susceptibles de lier les insectes et autres arthropodes ravageurs, les champignons et les toxines

Ces recherches sont strictement liées et l'ogarnigramme que présente la figure 1, définit également de fait le cadre de réflexion à l'intérieur duquel devront se situer nécessairement ces différentes études

Figure 1 Etudes multidisciplinaires liées, définies dans le cadre du volet de recherche "Aflatoxines " du Projet CCE



Un quatrième volet, médical cette fois, sera mis en place dans le courant de septembre Cette dernière Opération, développée à partir de notre réseau d'échantillonnage par des Professeurs, des Services de médecine (Drs SOUBEYRAND, NIAMKEY et BEDA) et de Pharmacologie (Dr BESSARD) de la Faculté d'Abidjan, permettra aux équipes de recherche concernées de suivre plus précisément les

évolutions des taux d'aflatoxines présentes dans l'organisme des utilisateurs de stocks suivis

Prolongeant le Projet CCE, qu'elle complète d'ailleurs fort heureusement, cette étude de portée très médicale, se définit également dans le cadre d'une exploitation commune des moyens actuellement disponibles sur la Place pour réaliser les prélèvements et les analyses d'échantillons liées à ces études de toxines fongiques: Réseau des Enquêteurs de la CIDT, moyens logistiques du Projet, appareillages H.P.L.C. du Service de Pharmacologie, bases méthodologiques du Laboratoire de Nutrition animale d'Abidjan

3. DONNEES METHODOLOGIQUES

- TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGES

Réalisées dans les seules zones arachidières de la Côte d'Ivoire et mises en oeuvre sur le terrain avec les appuis techniques des 45 Agents Enquêteurs du réseau Cellule et Evaluation de la CIDT (voir figure 2), différentes études sont actuellement programmées pour la prochaine Campagne. Le Plan d'échantillonnage prévoit ainsi de suivre plus particulièrement les devenirs de divers greniers villageois tirés au hasard en début de campagne parmi les producteurs techniquement les moins évolués et ceci à raison de 4 stocks par Agents. De type "Culture manuelle traditionnelle" les paysans considérés dans cette étude sont également représentatifs de plus de 80% des producteurs d'arachide de la Côte d'Ivoire.

De conceptions volontairement simplifiées les protocoles retenus pour effectuer les divers prélèvements peuvent être définis comme suit,

1. Périodicités des prélèvements: Prélèvements réguliers de matériels dans chacun des greniers suivis, réalisés selon les cas tous les deux mois (Bouna), où tous les mois (autres zones, voir figure 2)

2. Période d'étude De septembre 1985 à juin 1986

3. Echantillon type En moyenne 500 grammes de gousses à prendre dans tout le stock restant (somme de multiples petits prélèvements)

4. Référencement des lots Fiche descriptive établie par les Enquêteurs pour chaque échantillon avec toutes indications utiles sur ses principaux paramètres de stockage tels localisations précises du grenier concerné, importance des réserves restantes, problèmes sanitaires majeurs éventuellement vus ou encore expressément signalés par les paysans, et le cas échéant méthodes de lutte utilisées au village

5. Collattonnement et utilisation des prélèvements Au maximum dans les

8 à 15 jours qui suivent chaque échantillonnage et selon le schéma suivant

5.1. Rassemblements rapides des divers lots, réalisés par la CIDT dans deux localités du Pays, Bondoukou pour les secteurs de cette zone, ou Bouaké pour toutes les autres zones (voir figure 2)

5.2. Ramassages ensuite de ce matériel par le véhicule de liaison du Projet et retour rapide à Abidjan pour réalisation des études prévues (Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, voir organigramme figure 1)

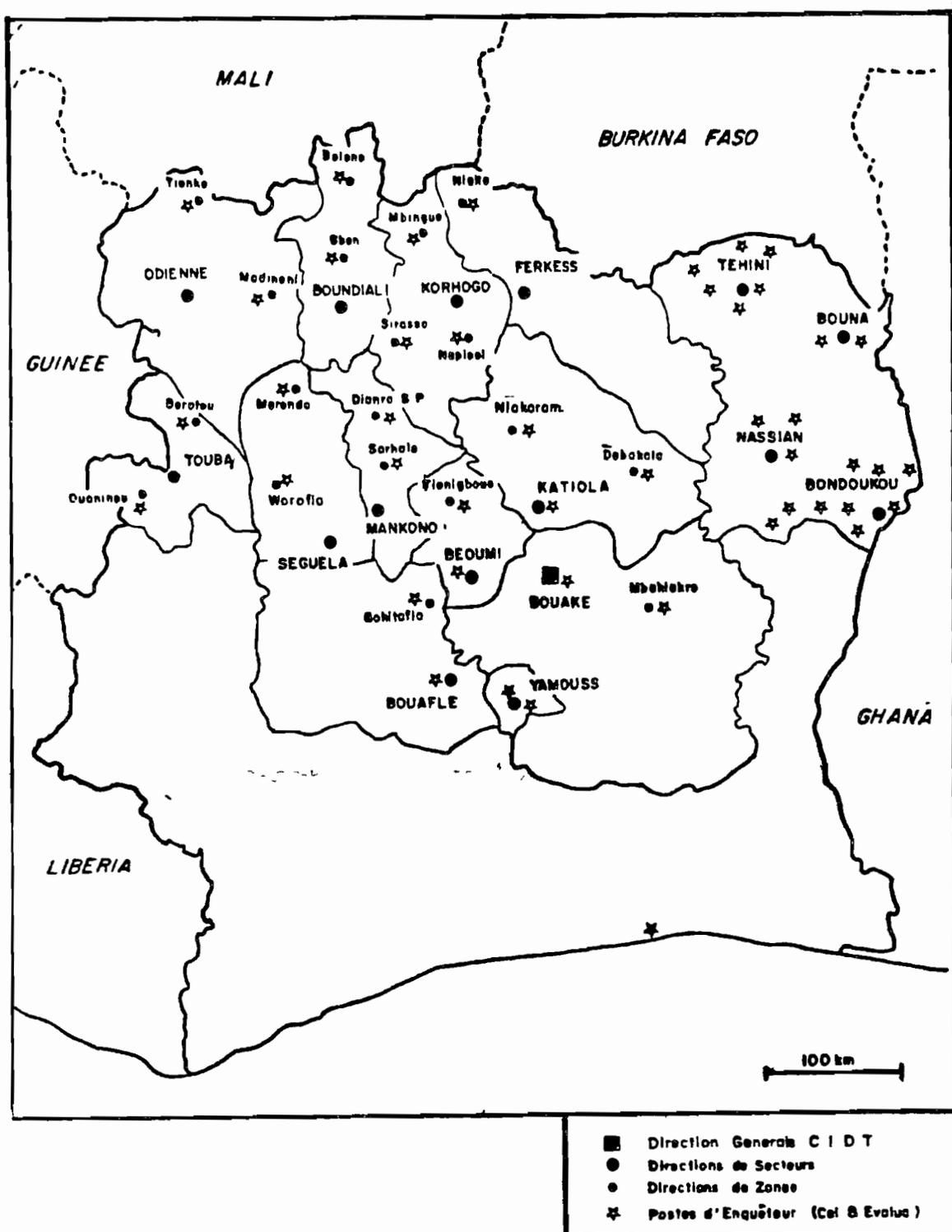


Figure 2 Zones arachidières de Côte d'Ivoire développées dans toutes les régions de savane du pays et découpage administratif correspondant défini par le Centre Ivoirien des Textiles (CIDT). Localisations géographiques des divers Enquêteurs concernés par les études du Projet Une étoile pleine marque la position du Centre d'Adiopodoumé



Figures 3: (Soit de gauche à droite et de haut en bas). **3a:** Aspect le plus courant d'un échantillon type avec présences en particulier de nombreuses coques non indemnes. **3b:** lules et dégâts spécifiques. **3c:** plages d'attaques dues aux actions des termites. **3d:** Dégâts particuliers provoqués par une larve de Scarabéides ("ver blanc") et agent responsable.

ETUDES ENTOMOLOGIQUES

Les insectes ravageurs rencontrés dans les stocks lors des fortes infestations, ou encore signalés par les paysans comme spécialement dangereux pour la production devront également être notés dans les feuilles d'enquête. Les espèces potentiellement dangereuses sont peu nombreuses, 4 à 5 formes au total. Les identifications correspondantes demandées aux uns et aux autres, s'appuient ici sur les utilisations simultanées d'une boîte de démonstration et d'une feuille de schémas (tailles réelles et morphologies des individus), remises à chaque Enquêteur au début de la Campagne.

Les suivis entomologiques au Laboratoire des échantillons sont réalisés ici à partir de quelques techniques simples, notamment:

1. Analyses immédiates des différents lots dès leur arrivée. Poids, nombres et pourcentages de gousses d'apparences saines ou portant des traces d'attaques provoquées par les iules (coques percées, figure 3b), ou par les termites (coques rongées, figures 3a et 3c), ou par les bruches dans certains cas très rares pour la Côte d'Ivoire (cocons de nymphose et trous de sortie), ou enfin par les Lépidoptères (faeces et soies). Recherches des insectes responsables et éventuellement caractérisations des espèces. Nombres d'individus rencontrés et stades de développement concernés.

2. Ensuite mises en observation de ces divers groupes de coques, durant 2 mois. Recherches particulières des espèces qui se trouvaient à un stade de développement "non visible" lors des premières analyses: oeufs, premiers stades larvaires, ou encore larves âgées mais cachées à l'intérieur de gousses apparemment très saines (bruches par exemple).

ETUDES PHYTOPATHOLOGIQUES

L'arachide au champ est confrontée à un certain nombre de champignons parasites responsables de maladies. Toutefois, après la récolte, d'autres problèmes de pathologie se posent, consistant notamment en l'altération des gousses entreposées. Des champignons dégradent les enveloppes des fruits, pénètrent à l'intérieur et provoquent la moisissure des graines. Par les dangers qu'il fait courir, l'*Aspergillus* est l'un des plus importants. Les aflatoxines, dont les grains sont imprégnés, causent en effet de graves intoxications (mycotoxicoses) chez les consommateurs.

La détection de l'agent producteur de ces toxines est l'une des clefs de l'analyse de la valeur alimentaire des produits. Une technique simple a été choisie ici pour étudier, sous ce rapport, des échantillons de gousses d'arachide, collectées en Côte d'Ivoire chez des paysans et sur les marchés urbains.

Les échantillons, fournis par le laboratoire d'Entomologie, sont stockés en boîtes de polyéthylène étanches pour une période de courte durée. Des boîtes de Petri, de 12 cm de diamètre, sont utilisées pour l'incubation des graines. Elles sont remplies de 90 cm³ de sable fin, lui-même recouvert de deux rondelles de papier filtre de 115 mm de diamètre et stérilisées au four Pasteur (150° - 3 heures). Au moment de l'emploi, 15 cm³ d'eau sont versés dans chaque boîte. Les graines sont déposées sur la première rondelle de papier filtre, la seconde rondelle étant posée ensuite en couverture des graines avant la remise en place du couvercle.

Les gousses sont ouvertes avec précaution à l'aide d'une pince forte. Les graines, prélevées aseptiquement, sont déposées dans les boîtes de Petri, à raison de 8 par boîte. Chaque lot échantillon est représenté par 2 boîtes soit 16 graines. L'incubation, réalisée à la température du laboratoire (28°C), est poursuivie pendant 4 à 5 jours.

Les observations consistent à relever le nombre de graines germées par boîte, le nombre de plantules dont la radicule est altérée, et le nombre de graines sur lesquelles des colonies de moisissures sont apparues (*Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*). Les colonies de l'*Aspergillus flavus* sont distinguées par la coloration vert-jaunâtre du poudrage que constituent les fructifications. Les colonies sont ensuite ensemencées en tube de culture sur milieu Czapeck gélosé pour examen ultérieur. L'aspect des cultures sur ce milieu différentiel, ainsi que l'examen microscopique, permettront de lever un certain nombre d'équivoques.

- RECHERCHE D'AFATOXINES DANS DES GRAINES D'ARACHIDE

Dans l'état actuel d'avancement de ce projet, seuls les essais préliminaires ont été réalisés consistant à tester deux techniques de dosages et à comparer leurs intérêts respectifs.

1 Dosage de l'aflatoxine B1 par chromatographie sur couche mince de silice

Cette technique, relativement ancienne et peu performante (semi-quantitative), présente néanmoins l'intérêt d'être reconnue au niveau international. Nous avons en effet adopté le protocole expérimental correspondant à la Norme Française décrite sous le code NF V 18-200 (enregistrée le 12 mai 1980) qui est elle-même identique à la méthode d'analyse adoptée par la Communauté Européenne pour le dosage de l'aflatoxine B1. Elle consiste en une séparation par chromatographie en couche mince de silice suivie d'une révélation des spots sous éclairage UV.

De manière générale nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés au cours de la mise en oeuvre du dosage : mauvaise migration de la toxine, spot diffus et peu intense. L'adaptation de la norme néerlandaise n'a guère amélioré les résultats. Il semblerait que les difficultés soient, au moins partiellement, à mettre au compte de la très forte humidité ambiante. L'activation des plaques et leur conservation en atmosphère asséchée a conduit à un certain progrès, cependant la non-disponibilité

de solvants organiques parfaitement anhydres constituait un frein à une utilisation en routine de cette technique

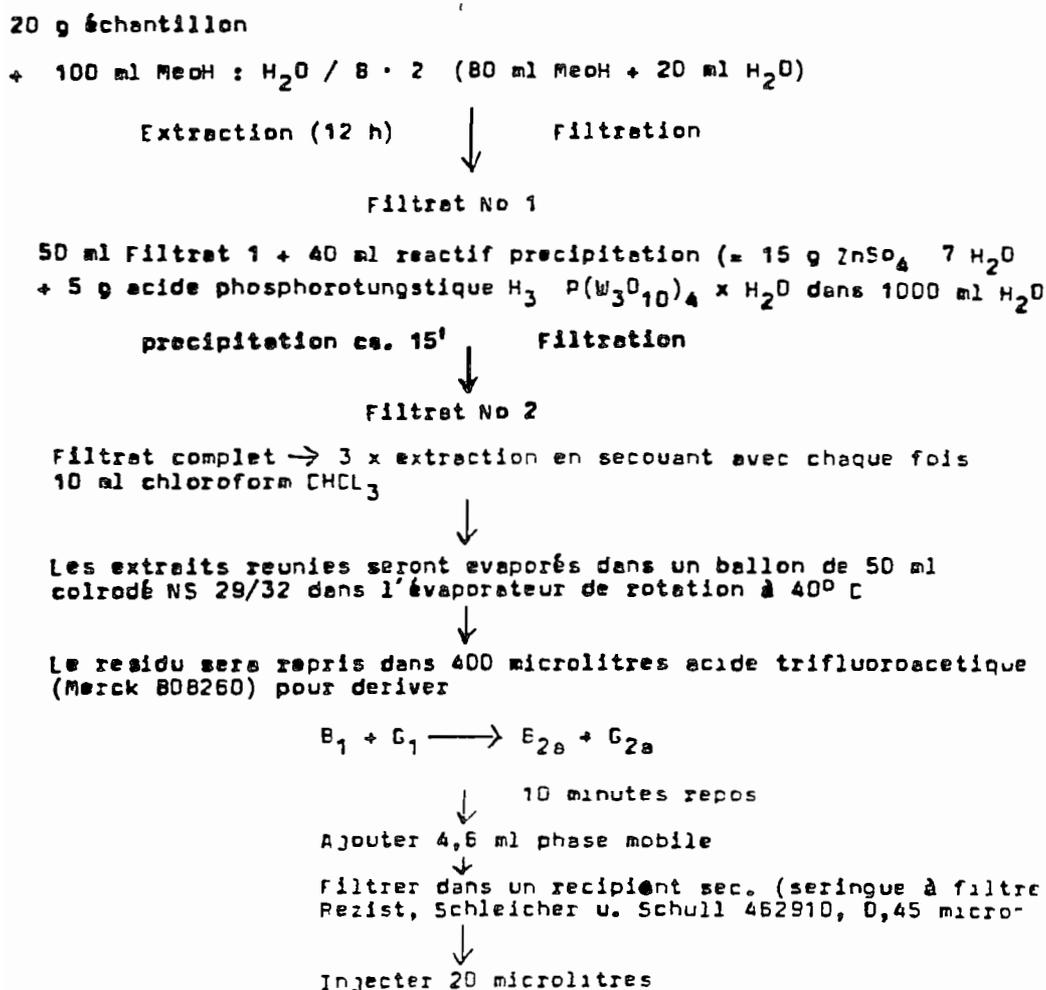
Quoi qu'il en soit, les essais que nous avons menés à bien (en collaboration avec Mlle K VENCKEN) n'ont pas été entièrement négatifs puisqu'ils ont révélé la présence d'aflatoxine B1 dans certains échantillons analysés

2 Dosage des aflatoxines par HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Cette technique consiste en une séparation des aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) sur colonne de silice greffée en C18 (O D S) et un dosage par fluorimétrie des toxines à la sortie de la colonne. Malgré son degré élevé de sophistication et le coût très important du matériel nécessaire à sa mise en oeuvre, cette méthode présente un intérêt indéniable en raison de la facilité de la technique d'extraction préalable des aflatoxines, de la rapidité des dosages, de sa haute résolution au plan qualitatif et, surtout de sa très grande sensibilité (seuil de détection quelques picogrammes (10^{-12} g))

Le protocole expérimental que nous avons adopté est celui mis au point par le Dr WIEGANDT (Laboratoire de Nutrition Animale) pour le dosage des aflatoxines dans les aliments pour bétail. Le détail de cette méthode est donné ci-après pour information (tableau 1)

Tableau I.: Processus analytique (mode opératoire) utilisé pour le dosage des aflatoxines de l'arachide par chromatographie en phase liquide (HPLC) Méthode définie par WIEGANDT W, Laboratoire Nutrition animale d'Abidjan, pour chaîne HPLC, système BECKMANN, avec colonne ty ODS 250 x 4,6 mm, 5 microns et précolonne 4,6 x 45 mm ODS



4. PREMIERS RESULTATS - ANALYSES PRELIMINAIRES

Se distribuant dans toutes les zones arachidières de la Côte d'Ivoire (figure 2), 163 stocks au total ont pu être effectivement échantillonnés à trois reprises durant la dernière Campagne, soit plus précisément courant décembre 1985, et ensuite en février et enfin en avril 1986. Cet important matériel permet d'ores et déjà de souligner deux points essentiels, qui se visualisent d'ailleurs assez bien dans les deux graphiques partiels de la figure 4, établis pour les deux premières séries de prélèvements, soit dans ce cas

1. Présences constantes dans tous les stocks de pourcentages appréciables de gousses endommagées, tachées et (ou) diversement attaquées par les ravageurs

2. Dégradations progressives très nettes de l'état général des récoltes, au cours des stockages Actions cumulées des insectes et de divers autres ravageurs.

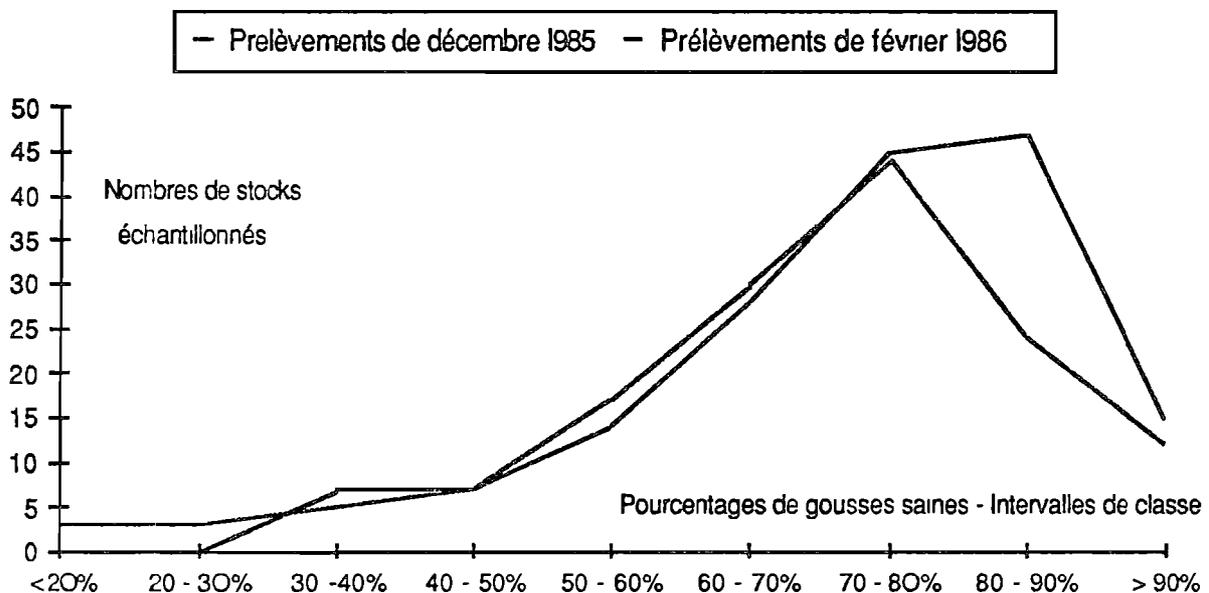


Figure 4.: Distribution par classes de fréquences "pourcentages de gousses saines" des deux séries d'échantillons prélevés successivement en décembre 1985 puis en février 1986, dans les 163 stocks suivis durant la première campagne.

Les insectes rencontrés, nous l'avons d'ailleurs déjà notés dans le précédent rapport, sont généralement représentés dans tous les greniers par des populations multispécifiques et souvent abondantes vers la fin des phases de stockage. Responsables de pertes de production parfois appréciables et généralement difficiles à élimi-

ner, ces ravageurs appartiennent classiquement à deux groupes de potentialités assez différentes

- Les ravageurs primaires, *Ephestia cautella* dans la grande majorité des cas
- Les ravageurs secondaires représentés ici essentiellement par l'une ou l'autre des trois espèces suivantes, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum*, ou *Carpophilus sp* Présences très occasionnelles de quelques formes dont *Araecerus fasciculatus* ou *Trogoderma granarium*

Les suivis phytopathologiques au laboratoire de ces divers lots permettent également quelques remarques intéressantes. Ainsi la mise en incubation sur papier filtre humidifié placé dans des boîtes de Pétri, de graines (8 par boîte et 2 boîtes par échantillon), provenant de gousses prélevées au hasard dans chacun des lot, permet au bout de quelques jours de mettre en évidence pour certaines d'entre-elles des colonies poudreuses et de teinte vert jaunâtre. Ces colonies qui se situent généralement à la surface des amandes sont en fait présumées à priori se rapporter à *Aspergillus flavus*. D'autres colorations peuvent aussi être notées. Correspondant le souvent à un *Zygomycète*, *Rhizopus nigricans*, ces dernières colonies affectent le plus souvent l'aspect de feutrages denses et à développement suffisamment rapide pour leur permettre d'envahir toute la boîte en quelques jours. L'état sanitaire des lots, paraît finalement assez médiocre. En effet ainsi que le montre la figure 5, donnée plus loin, sur un total de 334 boîtes de Pétri observées (soit 167 échantillons répartis sur les deux premières campagnes), *A. flavus* apparaît dans 14% des cas et *R. nigricans* dans 34 % de ces mêmes boîtes.

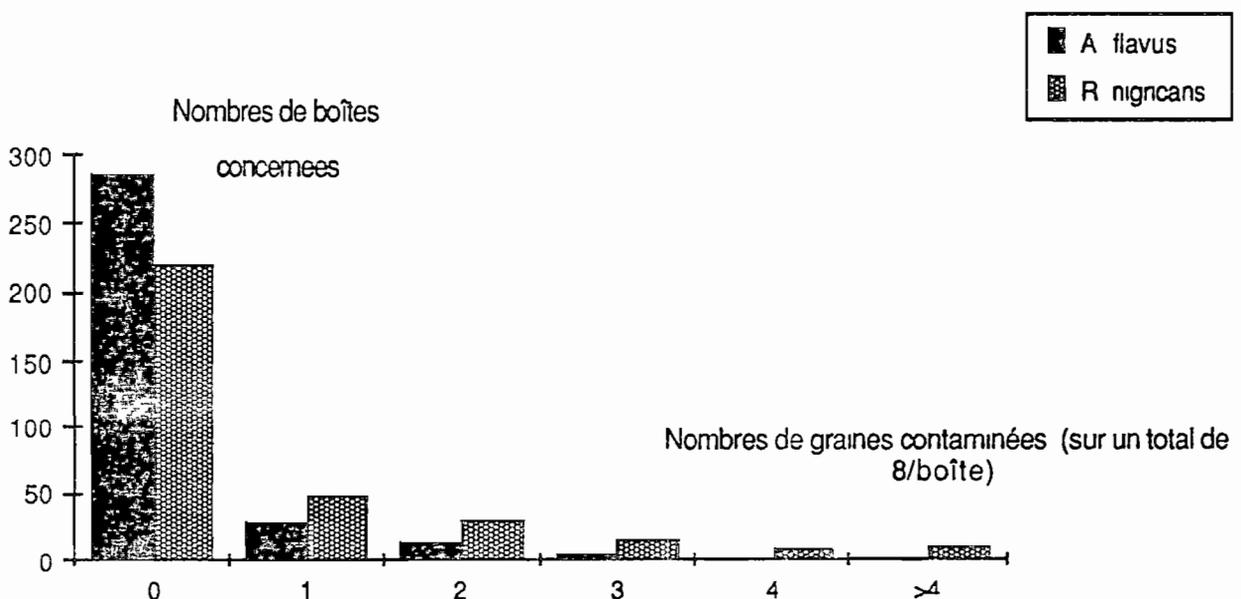


Figure 5.: Distributions notées par classes de fréquence "nombres de graines contaminées", des boîtes de Pétri comprenant des échantillons unitaires de 8 graines placées en incubation, prélevées dans 167 des stocks suivis au cours de la dernière campagne, et à raison de 2 boîtes par stocks

5 QUELQUES ELEMENTS DE DISCUSSION

Tous ces résultats sont encore à prendre avec une certaine réserve. La taille même des échantillons, 500 grammes de gousses par lot unitaire, peut être contestée. En effet d'après une première étude réalisée avec le Service de calcul du Centre, l'appréciation du risque "seuil" de 5 à 10 ppb de toxine par kilogramme de graines, avec un risque statistique de se tromper de moins de 5%, et en admettant également que la population de graines contaminées se distribuent selon une loi de Poisson, demanderait des prélèvements d'au moins 7 kilogrammes de gousses par échantillon, ce qui se révèle ici totalement irréaliste, et cela au moins pour deux raisons essentielles

- les stocks, nous le verrons, sont généralement assez petits, parfois 150 kilogrammes par famille et même moins et de tels prélèvements auraient finalement pour effet de diminuer trop rapidement les réserves disponibles
- d'autant qu'il s'agit là en plus de réserves destinées à la consommation et non constituées pour les besoins de la recherche

Ces prélèvements de 500 grammes, qui représentent finalement l'échantillon moyen acceptable par les paysans, fournissent néanmoins, nous le verrons ultérieurement, des renseignements intéressants sur les devenir des productions. D'autant que l'existence de fortes contaminations des stocks par toxines, situation qui paraît être relativement fréquente en Côte d'Ivoire, permet de réduire considérablement la taille minimale de l'échantillon optimum.

Les résultats concernant les champignons parfois présents sur les amandes sont également encore sujets à caution. Certaines des colonies observées n'ont pas pu être identifiées par observations microscopiques. De plus la réussite des isoléments "graines sur milieu gélosé", technique habituellement utilisée en Phytopathologie, n'atteint pas le taux de 100%, et cela en raison principalement de l'existence de nombreuses contaminations par *R. nigricans* avec envahissement total du tube de culture par ce champignon. Les données obtenues se marqueront donc le plus souvent par des estimations majorées. Par suite les contrôles biochimiques des toxines qui seront faits ultérieurement avec H P L C, risquent à terme de nous fournir des résultats certainement plus ou moins disjoints de ceux obtenues avec ces analyses mycologiques. D'autant que finalement les techniques d'échantillonnages utilisées dans chaque cas, sont également très différentes les unes des autres.

Enfin d'autres paramètres , qui restent à ce stade de nos études encore assez mal connues exercent aussi très certainement toutes une série d'actions sans doute déterminantes sur le déroulement de ces phénomènes de contaminations. Quelles sont par exemple les relations exactes qui lient l'âge et la durée de l'infestation aux productions de toxines. Certains auteurs parlent également de races d'*A. flavus* qui seraient marquées par des potentialités différentes dans la "production" des aflatoxines.

Finalement les détections cryptogamiques réalisées dans ces premières études ne nous fournissent que des informations qualitatives sur la présence ou l'absence des *Aspergillus* et cela sans préjuger aucunement des délais qui ont été réellement nécessaires pour le développement des infestations observées, ou de la valeur réelle des taux de toxines effectivement présentes dans les lots observés.

Le dosage par HPLC a permis de confirmer la présence d'aflatoxines dans des échantillons d'arachide, la teneur pouvant, dans certains cas dépasser très largement le seuil toléré. Cependant, ces résultats ont été acquis sur un nombre d'échantillons limité, sélectionnés volontairement dans des lots de toute évidence endommagés, de plus, au sein de ces derniers, seules les gousses en très mauvais état avaient été sélectionnées. Ce tri avait été opéré délibérément, le but premier de ces essais étant de tester les méthodes de dosage. C'est pourquoi nous ne présentons dans ce rapport aucune donnée chiffrée qui pourrait induire en erreur. Nous nous bornerons donc ici à proposer les deux séries de conclusions suivantes:

1- La technique en HPLC semble bien adaptée au dosage d'aflatoxines dans les graines d'arachide

2- La présence d'aflatoxine a été reconnue dans des échantillons d'arachide analysés. Il en résulte qu'une étude statistique du taux de contamination paraît utile et cela dans un double but

- * estimation du risque aflatoxine au niveau de la nutrition humaine
- * études de certains facteurs biotiques (insectes) ou abiotiques (conditions de séchage et de stockage), sur le taux en aflatoxine, toutes connaissances qui peuvent conduire à prendre des dispositions de nature à réduire le "risque aflatoxine"

5. DOCUMENTATION CITEE

- AUSTWICK P.K** (1975) - Mycotoxins - British Medical Bulletin, 31 222-229
- BOCKELEEE - MORVAN A et GILLIER P** (1964) - Essai d'élimination de l'aflatoxine par des méthodes physiques - Communication présentée à la conférence intitulée "Conférence on the animal feed of tropical origin" London, 1 - 4 april 1974 in Oléagineux, 29 513-516
- BURRELL N.J, GRUNDEY J K et HARKNESS C** (1964) - Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins in groundnuts Part V - Trop Sci, 5 (6) 74-90
- DAVIS N D, DICKENS J.W., FREIE R L., HAMILTON P.B., SHOTWELL O.L. et WYLLIE T D** (1980) - Protocols for surveys, sampling, post collection handling, and analysis of grain samples involved in mycotoxin problems - J Assoc Off Anal Chemi, 6(1) 95-102
- DICKENS J W et PATTEE H E** (1966) , - The effects of time, temperature and moisture on aflatoxin production in peanuts inoculated with a toxic strain of *Aspergillus flavus*. Trop Sci, 8 11-22
- GILLIER P et SYLVESTRE P.** (1969) - L'arachide - ed G P Maisonneuve 292 pages
- JONES B D** (1972)- Methods of aflatoxin analysis ed ropical Product Institute G7O 58p
- McDONALD D et HARKNESS C.** (1963) - Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins in groundnuts Part II - Trop Sci, 5 143-154
- McDONALD D et HARTKNESS C** (1965) - Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins in groundnuts Part VIII - Trop Sci, 7/ 122-137
- MEHAN V.K et McDONALD D** (1984) - Resarch on the aflatoxin problem in groundnut at ICRISAT - Plant and soil, 79 255-260
- Norme Française enregistrée N.F.** (1980) - Aliments des animaux Dosage de l'aflatoxine B1- Publication Norme Française N F V 18 200 de juin 1980 295-305
- POLLET A** (1982a) - Les insectes ravageurs des légumineuses à graines en Côte d'Ivoire (soja, niébé, arachide) II Premiers éléments de caractérisation pour les régions centrales (2^e cycle de culture de 1981) - Ronéo ORSTOM 83 pages
- POLLET A** (1982b) - Quelques réflexions sur le développement actuel au Sénégal des légumineuses à graines cultivées Rapport de Mission (4 au 10 juillet 1982) - Roneo ORSTOM 83pp
- POLLET A** 1984a) - Problemes phytosanitaires des cultures villageoises d'arachide de la Côte d'Ivoire Insectes et Myriapodes ravageurs des coques en maturation dans le sol pour les régions Nord, Nord Ouest, Ouest et Centre (Enquête arachide CIDT et IDESSA ORSTOM, premier cycle de culture et cycle unique de 1983) - Ronéo ORSTOM 28 pages
- POLLET A** (1984b) - Caracterisations des stocks villageois de légumineuses à graines constitués en Côte d'Ivoire (arachide, niébé, pois bambarra) Identification des problemes posés à la production (Enquête CIDT et IDESSA ORSTOM, Campagnes 1983 et 1984) - Roneo ORSTOM 39 pages et 20 tableaux annexes
- POLLET A** (1985) - Le stockage des légumineuses en milieux villageois traditionnels (Côte d'Ivoire 1983, 1984 et 1985) - Communication au Colloque sur les légumineuses alimentaires en Afrique (Université de Niamey et A U P E L F) 3 pages et 3 tableaux
- RODRICKS J V** - Mycotoxins and other related food problems Advances in chemistry Senes, 149 Washington
- ZAMBITTAKIS C, WALIYAR F, BOCKELEEE - ,MORVAN A et PINS O** (1981) - Results of four years of research on resistance of groundnut varieties to *Aspergillus flavus* - Oleagineux, 36 377-385

**Insectes ravageurs et parasites des légumineuses à
graines en Afrique de l'Ouest**

(Cultures et stocks villageois)

Contrat n° TSI - O179 - F (O2.078)

Relevés des dépenses pour la période
du 1 janvier au 31 juin 1986

RECAPITULATIF

Personnel	410 547 FF
Autres dépenses	13 000 FF
Déplacements	10 000 FF
Utilisation matériel durable	10 300 FF
Matériel non durable	168 800 FF
	<hr/> 612 647 FF

N.B.: Répartition conforme au plan de charge global du Projet avec en particulier pour ce deuxième Exercice un crédit supplémentaire de 20.000 FF venant s'ajouter au budget * Matériel non durable fixé initialement à 148 800 FF (selon lettre d'autorisation CCE n° 013142 du 13-05-86 et Plan de charge rappelé ici en annexes).

Participation de la Commission pour **33.0** % de 612 647 FF
soit pour un montant de 202 100 FF

Arrêtons la somme pour ce deuxième Exercice au total de
DEUX CENT DEUX MILLE CENT FRANCS FRANCAIS

Fait à Abidjan le 30 Juin 1986

Certifié conforme aux documents administratifs
M. André POLLET - Entomologiste ORSTOM

PERSONNEL

Catégorie	Nombre de jours	Tarif	Total
1 Chercheur (POLLET)	4 mois	64.990	259 960
1 Chercheur (FAUQUET)	1,5 mois	46 230	69 345
1 Chercheur (THOUVENEL)	1,5 mois	46 230	69 345
1 Chercheur (SAVARY)	8 jours	46 230	11 897
		<u>Total</u>	<u>410 547 FF</u>

Quatre cent dix mille cinq cent quarante sept francs français

AUTRES DEPENSES

3 Observateurs mensualisés	14 mois	900	12 600
1 Manoeuvre	10 jours	40	400
		<u>Total</u>	<u>13 000 FF</u>

Treize mille francs français

DEPLACEMENTS

Nom	Objet	Durée	Lieu	Coût
M. POLLET	Mission terrain	18 jours	C.I.	8 049
Chauffeurs	Mission terrain	10 jours	C.I.	925
Garçons Labo.	Mission terrain	24 jours	C.I.	1 026
			<u>Total:</u>	<u>10 000 FF</u>

Dix mille francs français

UTILISATION MATERIEL DURABLE

Nature	Valeur	Taux Amortissement	% Utilisation	Montant
Break 504	102 000,00 FF	20%	50%	10 300
			<u>Total</u>	<u>10 300 FF</u>

Dix mille trois cents francs français

ANNEXES 1: Matériels non durable - 2° Semestre. Projet CCE

Genre	Date d'achat	Fournisseur	n° Facture	Coût H.T. FF
Entre. véhic.	3/5/86	Tout pr Auto	8581/86	10 685,02 F
Prod. chim.	13/6/86	Polychim.	2393	7 995,52 F
Plastique	10/04	Caubère	44785	6 451,76 F
Prod. chim.	16/1/86	Hoechst	49774	1 753,90 F
Petit Mat.	19/2/86	Moria	248	5 441,08 F
Livre	10/3/86	Lavoisier	BL86/15	593,40 F
Livre	4/3/86	Lavoisier	BL86/14	1 210,94 F
Petit Mat.	29/5/86	ETEC	16364	18 588,00 F
Mat/ Inform.	21/2/86	Règle Calcul	806750	664,96 F
Petit Mat.	6/5/86	Medi Sciences	1145-05	16 801,96 F
Petit Mat.	11/6/86	Technibat.	5807	237,80 F
Petit Mat.	11/6/86	Technibat.	5806	273,60 F
Petit Mat.	29/5/86	Technibat.	23858	681,40 F
Photo	7/6/86	Tiger Instr.	5/7/86	405,00 F
Librairie	6/6/86	Lib. France	28080	375,36 F
Petit Mat.	29/5/86	Technibat.	36678	88,00 F
Plastique	23/4/86	M. DAOUDA	6/23/04	300,00 F
Echantill.	9/4/86	Zones C.I.	PDC. 9/04	768,00 F
Petit Mat.	27/3/86	Technibat.	32658	395,10 F
bois	22/4/86	M. Ghoglon	PDC 22/04	300,00 F
Petit Mat.	11/3/86	DAGHER	1432	160,00 F
Pneum.	18/3/86	CNCI	182549	912,08 F
Plastique	11/3/86	MDAOUA	PDC 11/03	260,00 F
Echantill.	26/2/86	Zones C.I.	PDC 28/02	368,00 F
Sacs	25/2/86	M. ADAMA	PDC 25/02	440,00 F
Librairie	1/3/86	Lib. France	26917	675,20 F
Petit Mat.	4/3/86	Technibat.	22381	310,30 F
Petit Mat.	4/3/86	Technibat.	12399	314,90 F
Librairie	20/2/86	Lib. France	270068	500,00 F
bois	24/2/86	M. IDI ALLIO	PDC 24/02	378,00 F
Mat. verre	24/2/86	EGESO	8086	1 029,40 F
Mat. verre	28/3/86	EGESO	8886	310,50 F
Photo.	7/3/86	CI Photo	8273	279,40 F
Prod. chim.	21/1/86	Polichimie	42935055	3 374,40 F
Petit. Mat/	22/1/86	Optique Instr.	86133	2 872,40 F
Prod. chim.	20/2/86	Polychimie	35428	7 911,60 F
Prod. chimi.	22/5/86	Sigma	14586	3 355,82 F
Petit. Mat.	7/3/86	Medi Sciences	104904	14 918,80 F
Dactylo.	10/2/86	Centre	203003	490,00 F
Dactylo.	22/2/86	Centre	239007	238,00 F
Avion	7/10/85	Air Ivoire	215672	756,00 F
Avion	7/10/85	Air Ivoire	215673	820,00 F
Docum.	14/4/86	NRA	DOC.6586	145,00 F
Librairie	6/1/86	Pociello	46503	738,90 F
Petit Mat.	30/5/86	Marché	PDC 5211	856,00 F
Petit Mat.	14/3/86	CITEC	70744/TA	1 480,00 F
Transit	18/1/86	Hesnault	14586	2 206,10 F
Essences	26/5/86	Agip	56701	17 694,00 F
Plastique	15/4/86	Polyplast	1059.86/1	900,00 F

ANNEXES 1: Matériels non durable - 2^e Semestre - Projet CCE

Plastique	6/3/86	Polyplast	850.86/1	3 200,00 F
Prod. Trts	15/1/86	Sofaco	24614	5 708,34 F
Papier	27/2/86	Imprisud	555969	689,62 F
Fers	17/1/86	Structor	27029	1 471,00 F
Pots	28/3/86	Bouillard	601964	2 383,42 F
Transit	22/1/86	SAG	6900287	1 904,38 F
Mat Info.	13/3/86	SITEL	86031280	2 674,00 F
Prod. Chim.	28/5/86	Polychimie	36411	4 255,76 F
Entret.	28/2/86	Utafriq.	605131	4 311,04 F
Copies	13/5/86	Rank Xerox	19756	3 496,84 F
				168 800,00 F

ANNEXE 2: PLAN DE CHARGE DU PROJET C.C.E. n° TSI - OI79 - F (en Francs Français)

Semestre considéré	1985 - 2	1986 - 1	1986 - 2	1987 - 1	TOTAL =
Personnel expatrié	352 420	410 547	352 420	410 613	1 526 000
Autres dépenses	15 300	13 000	13 000	5 000	46 300
Déplacements	8 000	10 000	12 000	10 000	40 000
Matériel durable	121 700	148 800	108 400	165 800	544 700
Matériel durable	13 600	10 300	10 300	6 800	41 000
"Réserves"	20 000	20 000	30 000	8 000	78 000
TOTAL =	531 020	612 647	526 120	606 213	2 276 000
Participation CCE =					750 000