

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTÉ DES SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

**Centre de Recherche et de Formation Doctorale en Science de la Vie, Santé et
Environnement**

*Centre for Research and Doctoral Training in Life Sciences,
Health and the Environment*

**DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY**

**LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
LABORATORY OF MICROBIOLOGY**

**LABORATOIRE DE TECHNOLOGIE AGROALIMENTAIRE
LABORATORY OF FOOD TECHNOLOGY**

**La scopolétine et le cyanure d'hydrogène de manioc (*Manihot esculenta*
Crantz) : propriétés biologiques et application dans la conservation de
maïs (*Zea mays* Linné)**

"THESE"

« Présentée et soutenue en vue de l'obtention partielle du Doctorat/Ph.D en Biochimie »

Option : Phytobiochimie et Pharmacologie

Par

NJANKOUO NDAM Youchahou

Matricule : 09R0608

Master en Biochimie

Sous la co-direction de

MOUNJOUENPOU Pauline
Directeur de Recherche / HDR

NYEGUE Maximilienne Ascension
Professeur titulaire / HDR



Année académique : 2021/2022

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

BP: 812 YAOUNDE



REPUBLIC OF CAMEROON
UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

PO BOX : 812 YAOUNDE

ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, soussignés Pr. BOYOMO ONANA, Pr. TCHANA Angèle, Dr NGOME AJEBESONE Francis et Pr. FOKOU Elie respectivement Examineurs et Président du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie option Phytobiochimie et Pharmacologie, soutenue par Monsieur NJANKOUO NDAM Youchahou (Matricule 09R0608) le 24 Mars 2022 à 09 heures dans la Salle S01/S02 du Nouveau Bloc Pédagogique de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : " **La scopolétine et le cyanure d'hydrogène de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) : propriétés biologiques et application dans la conservation de maïs (*Zea mays* Linné)**", attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi, la présente attestation lui est établie pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le **19 AVR 2022**

Examineurs


Boyomo Onana

Pr. TCHANA A.

Dr. Ngome Francis

Président du jury


Pr. Elie Fokou
Dr. d'Etat en Biochimie
Nutrition et Sciences Alimentaires

Le Chef de Département


Professeur
Enzymologie


UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Sclolarité et de la Recherche DAASR :
 AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste

17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste

35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/UYY
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE

15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
----	-----------------------------	------------	----------

16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste

42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste

5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste

18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste

27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHO Louis-Paul- Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>

7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>

11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste

21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste

31	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste

5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UIYI
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/ Chef de Département</i>
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste

7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
---	--------------------------	-----------------------	--------------------

8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUMBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOUH – KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste

9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	MAKEMBE. S. Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)

1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>

3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UII</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste

11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste

17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste

26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste

4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>
4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste

16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ENS/UYI</i>

30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
----	-----------------------------------	-----------	----------

40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
----	---------------------	-----------	----------

10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	CD/Uma
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste

37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des enseignants de la faculté des sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	38 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	46 (14)
BPV	07 (01)	10 (01)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	33 (5)
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	02 (0)	34(7)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	40 (5)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42(7)
Total	75 (5)	105 (29)	116 (31)	43 (10)	339 (75)

Soit un total de **339 (75)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **105 (29)**
- Chargés de Cours **116 (31)**
- Assistants **43 (10)**

() = Nombre de Femmes **75**

DEDICACE

À ma maman,

Mme NJAPDOUNKE Mariama

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie du Département de Microbiologie et au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, au Laboratoire de Technologie Agroalimentaire et au Laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Lutte Biologique de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) de Yaoundé. Elle a été rendue possible grâce au soutien indéniable de nombreuses personnes que j'ai l'honneur et l'immense plaisir de remercier.

Mes remerciements les plus profonds sont adressés en premier à ma directrice de thèse, le Docteur **MOUNJOUENPOU Pauline** sans qui l'entame, la réalisation et la finalisation de cette thèse n'auraient eu lieu. Docteur, vos encouragements, votre amour pour la recherche et votre soutien inconditionnel m'ont permis de garder la tête haute dans les moments difficiles et de ne pas abandonner quand bien même toutes les conditions étaient réunies pour l'occasion.

Je remercie également le Professeur **NYEGUE Maximilienne Ascension**, ma directrice qui m'a accepté dans son équipe de recherche et guidé mes premiers pas dans le domaine de la recherche en m'inculquant rigueur scientifique et amour du travail bien fait. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements sont également adressés,

Au Professeur **MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef de Département de Biochimie pour l'expertise apporté à ce travail et à l'ensemble du corps enseignant dudit Département pour le confort académique et la qualité des enseignements qu'ils nous ont assuré durant notre formation ;

Au **Directeur Général** de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (**IRAD**) et tout son **personnel** qui nous ont garanti un accès inconditionnel aux différents Laboratoires sollicités et des facilités pour la réalisation de notre travail ;

Au Professeur **LENTA Bruno** chef de Laboratoire de **Chimie Organique** de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I et coordonateur du projet YABINAPA, pour la logistique mise à ma disposition ;

Au Professeur **KANSCI Germain** pour ses multiples conseils et encouragements et son soutien matériel ;

Au Professeur **NJAYOU Frédéric Nico** pour ses multiples conseils, encouragements, suggestions et son soutien matériel ;

Aux différents membres du Jury pour avoir accepté d'examiner ce travail, recevez toute ma gratitude pour le temps consacré à cet exercice ;

Aux responsables du **Laboratoire de Microbiologie** du Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I pour l'accueil et le matériel mis à notre disposition ;

A mes aînés de laboratoire qui, à travers des échanges fructueux ont contribué dans l'appréhension et la réalisation de cette thèse. Je pense notamment à : **Dr VOUNDI Steve, Dr AFAGNIGNI Alian, Dr NDJIB Rosette, Dr MONI Esther, Dr MAJIA Jacky, Dr DJOVA Steve Valdi, Dr NGONGANG TCHAMI Dimitri, Dr KENGNE GOUNMADJE Landry, Mme GHAPOUTSSA NKANDI Rahinatou et M. NGALANI Eric ;**

A mes camarades et amis de promotion devenus des frères par leur attachement et leur esprit de fraternité, qualité qui nous a procuré un espace de travail convivial. Il s'agit de **BETOTE DIBOUE Patrick, NJINGOU Ibrahim, NJATAO Patrice, MBOINDI MFOPOU Ousmane et NGOUMBE Hamed Bechir** de regrettée mémoire ;

A tous mes cadets de laboratoires, en particulier **KENFACK ZANGUIM Marie Josiane, NGASSAM Ibrahim** qui m'ont apporté une assistance irréfutable sur la paillasse.

A mes frères et sœurs **NZIE NDAM, MFOUT NDAM, GBETNKON NDAM, NGNINEWOU NDAM, NTOUO NDAM, NGOUGOURE NDAM, NGADOUOTE NDAM, POKEKO NDAM, KPOUFOUNCHE NDAM, MFOUAPON NDAM et MONGBET NDAM** pour leur soutien financier et moral ;

A tous les membres de ma famille qui m'ont soutenu financièrement depuis le début de cette thèse jusqu'à sa finalisation ;

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à cette œuvre, je vous manifeste ma reconnaissance éternelle.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS.....	i
DEDICACE.....	xii
REMERCIEMENTS	xiii
TABLE DES MATIERES.....	xv
RESUME.....	xxi
ABSTRACT	xxii
LISTE DES ABREVIATIONS	xxiii
LISTE DES TABLEAUX	xxv
LISTE DES FIGURES	xxvi
LISTE DES ANNEXES.....	xxviii
INTRODUCTION.....	1
QUESTIONS DE RECHERCHE.....	4
HYPOTHESE DE LA RECHERCHE	4
OBJETIF GENERAL.....	4
OBJECTIFS SPECIFIQUES.....	4
I.1- GENERALITES SUR LA SCOPOLETINE	5
I.1.1- Définition et structure	5
I.1.2- Sources potentielles de la scopolétine.....	5
I.1.2.1- Synthèse chimique de la scopolétine	5
I.1.2.2- Synthèse naturelle de la scopolétine	6
I.1.2.3- Mécanisme de biosynthèse naturelle de la scopolétine.....	7
I.1.2.3.1- Voie majeure de la (E)-ferulate.....	7
I.1.2.3.2- Voies mineures de la 2, 4- dihydroxycinnamate et 2, 4, 5- trihydroxycinnamate	7
I.1.3- Propriétés biologiques de la scopolétine.....	9
I.1.3.1- Activité anti tumorale	9
I.1.3.2- Activité hépatoprotectrice.....	9
I.1.3.3- Activité antidiabétique.....	9
I.1.3.4- Activité antimicrobienne.....	9
I.1.3.5- Rôle de la scopolétine dans le piégeage des espèces oxygénées réactives (EOR).....	10
I.1.4- Donnée pharmacologique et toxicologique de la scopolétine.....	11
I.2- GENERALITES SUR LE MANIOC.....	11
I.2.1- Botanique du manioc	11
I.2.2- Ecologie du manioc	12
I.2.3- Production du manioc	12

I.2.4- Contraintes de production	13
I.2.4.1- Faible utilisation des technologies améliorées.....	13
I.2.4.2- Stockage.....	13
I.2.4.3- Maladies ravageuses des cultures	14
I.2.4.3.1- Mosaïque du manioc	14
I.2.4.3.2- Striure brune du manioc.....	15
I.2.4.3.3- Bactériose vasculaire du manioc.....	15
I.2.5-Consommation du manioc au Cameroun.....	15
I.2.6- Composition du manioc en éléments nutritifs	16
I.2.7- Différentes variétés de manioc.....	16
I.2.8- Toxicologie du manioc	18
I.2.8.1- Biosynthèse des glycosides cyanogéniques	18
I.2.8.2- Libération du HCN	18
I.2.8.3- Pathologies liées aux composés cyanogéniques et traitements.....	19
I.2.8.4- Transformation du manioc en produits dérivés.....	19
I.2.8.5- Quelques méthodes de détoxification du manioc	20
I.2.9- Mécanisme de la détérioration physiologique post-récolte	21
I.2.10- Aspect physique du processus de détérioration physiologique post-Récolte.....	22
I.2.11-Facteurs affectants le processus de détérioration physiologique post-récolte	23
I.3- GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS MYCOTOXINOGENES	25
I.3.1- Définition et types de champignons.....	25
I.3.2- Isolement et identification des moisissures.....	26
I.3.2.1- Isolement des moisissures.....	26
I.3.2.1.1- Milieux de culture	27
I.3.2.1.2- Addition des antibiotiques	27
I.3.2.1.3- Choix des milieux de cultures sélectifs.....	27
I.3.2.1.4- Techniques d'isollements.....	27
I.3.2.2- Identification des moisissures	28
I.3.2.2.1- Techniques d'identification	28
I.3.2.2.1.1- Identification morphologique.....	28
I.3.2.2.1.1.1- Critères d'identification macroscopique	28
I.3.2.2.1.1.2- Critères d'identification microscopique.....	29
I.3.2.2.1.1.2.1- Le thalle	29
I.3.2.2.1.1.2.2- Les spores	29
I.3.2.2.1.1.2.3- Aspect des spores.....	30

I.3.2.2.1.1.3- Modes de formation des conidies	30
I.3.2.2.1.1.4- Mode de groupement des conidies.....	31
I.3.2.2.1.1.5- Mode d'implantation des cellules conidiogènes	31
I.3.2.2.1.1.6- Présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée	32
I.3.2.2.1.1.7- Présence des chlamydo-spores	33
I.3.2.2.1.2- Tests biochimiques	33
I.3.2.2.1.3- Identification génétique	34
I.3.2.2.1.4- Identification des genres par la technique de scotch.....	34
I.3.2.3- Principaux genres fongiques	34
I.3.2.3.1- Genre <i>Aspergillus</i>	35
I.3.2.3.1.1- Caractères cultureux généraux.....	35
I.3.2.3.1.2- Morphologie microscopique	36
I.3.2.3.1.3- Pouvoir pathogène	36
I.3.2.3.2- Genre <i>Penicillium</i>	37
I.3.2.3.2.1- Caractères cultureux généraux.....	37
I.3.2.3.2.2- Pouvoir pathogène	39
I.3.2.3.3- Genre <i>Fusarium</i>	39
I.3.2.3.3.1- Caractères cultureux généraux.....	40
I.3.2.3.3.2- Morphologie microscopique	40
I.3.2.4- Colonisation des denrées alimentaires par les moisissures toxigènes.....	41
I.3.2.4.1- Mycotoxines dans la chaîne alimentaire: la biogénèse	42
I.3.2.4.2- Différentes mycotoxines rencontrées dans les aliments	43
I.3.2.4.3- Propriétés toxiques des mycotoxines	44
I.3.2.5- Facteurs favorisant la mycotoxinogénèse	46
I.3.2.5.1- Facteurs intrinsèques (liés à la souche fongique elle-même).....	46
I.3.2.5.2- Facteurs extrinsèques (ensemble des conditions écologiques)	46
I.3.2.5.2.1- Température	46
I.3.2.5.2.2- pH des aliments.....	47
I.3.2.5.2.3- Tension d'oxygène	47
I.3.2.5.2.4- Disponibilité en eau	47
I.3.2.5.2.5- Substrat	48
I.3.2.5.2.6- Facteurs biologiques	48
I.3.2.5.2.6.1- Prédateurs.....	48
I.3.2.5.2.6.2- Interactions entre microorganismes	48
I.3.2.5.2.7- Facteurs chimiques	48

I.4- GENERALITES SUR LE MAÏS	49
I.4.1- Production et consommation du maïs au Cameroun.....	49
I.4.2- Pertes post-récoltes du maïs en stockage	50
I.4.2.1- Pertes physiques du maïs	50
I.4.2.2- Pertes chimiques du maïs.....	51
I.5- GENERALITES SUR LES METHODES DE LUTTE MYCOTOXIQUE	52
I.5.1- Prévention par la manutention pré-récolte.....	52
I.5.2- Prévention par la manutention post-récolte	52
I.5.3- Manutention des produits contaminés	53
I.5.4- Limites de quelques méthodes de conservation des aliments	54
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	55
II.1- DESCRIPTION DU SITE D'ÉCHANTILLONNAGE DES VARIÉTÉS DE MANIOC	55
II.2- MATERIEL.....	55
II.2.1- Matériel végétal.....	55
II.2.2- Matériel microbiologique	57
II.2.3- Matériel animal.....	57
II.2.4- Réactifs et équipements.....	57
II.3- METHODES	58
II.3.1- Organigramme méthodologique	58
II.3.2-Transformation des tubercules de manioc en quelques produits dérivés.....	60
II.3.3- Dosage de l'acide cyanhydrique par la méthode du papier picrate	61
II.3.3.1- Principe.....	61
II.3.3.2- Mode opératoire.....	61
II.3.4- Quantification de la scopolétine dans les extraits issus des échantillons par LC-MS	62
II.3.4.1- Préparation des extraits bruts.....	62
II.3.4.2- Préparation des échantillons	62
II.3.4.3- Préparation du standard	62
II.3.4.4- Principe de dosage de la LC-MS	63
II.3.4.5- Procédure expérimentale de la LC-MS	63
II.3.4.6- Quantification et screening de la variété et du produit de transformation de manioc ayant la teneur la plus élevée en scopolétine	64
II.3.5- Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antifongique des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine sur les moisissures isolées du maïs.....	64
II.3.5.1- Isolement et identification des moisissures des grains de maïs	64
II.3.5.2- Test <i>in vitro</i> de l'activité antifongique des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine.....	65

II.3.5.3- Détermination des paramètres d'inhibition des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine.....	67
II.3.5.3.1- Principe.....	67
II.3.5.3.2- Préparation des microplaques.....	67
II.3.5.3.3- Détermination de la Concentration Minimale Fongicide (CMF) des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine.....	67
II.3.6- Etude toxicologique de l'extrait contenant de la scopolétine) et de la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN	68
II.3.6.1-Toxicité orale aigüe de l'extrait issu du cortex de manioc « 0110 » et contenant de la scopolétine	68
II.3.6.1.1- Préparation des solutions d'essai	69
II.3.6.1.2- Principe de l'essai limite à 2000 mg/kg	69
II.3.6.1.3- Justification du choix de la méthode de l'essai limite	69
II.3.6.1.4- Administration de la substance d'essai	70
II.3.6.1.5- Observations.....	70
II.3.6.1.6- Poids corporels	71
II.3.6.2- Test de toxicité subaigüe de la poudre issue du cortex de manioc « 0110 » contenant la scopolétine et le HCN.....	71
II.3.6.2.1- Préparation de l'aliment.....	71
II.3.6.2.2- Groupage des poulets et alimentation.....	72
II.3.6.2.3- Observations.....	72
II.3.6.2.4- Poids corporels	72
II.3.6.2.5- Biochimie clinique.....	73
II.3.6.2.6- Coupes histologiques.....	80
II.3.6.3- Analyse statistique.....	81
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	82
III.1- Quantification du HCN et de la scopolétine dans les variétés et produits de transformation de manioc	82
III.1.1- Teneur en HCN du parenchyme des principales variétés de manioc	82
III.1.2- Impact de la transformation sur la teneur initiale du HCN dans le parenchyme de manioc	83
III.1.3- Teneur en HCN du cortex	83
III.1.4-Teneurs en scopolétine dans les 20 variétés de manioc	84
III.1.5- Teneurs moyennes en scopolétine dans quelques produits de transformations du manioc.....	86
III.1.6-Teneurs moyennes en scopolétine dans les différentes parties de la racine	87
III.1.7- Influence de la teneur en HCN sur l'accumulation de la scopolétine dans le parenchyme de manioc	88
III.1.8- Discussion partielle numéro 1	89

III.1.9- Conclusion partielle numéro 1	96
III.2- Evaluation de l'activité antifongique des extraits issus du parenchyme et du cortex de manioc « 0110 » sur les moisissures isolées du maïs.....	97
III.2.1- Identification macroscopique et microscopique des moisissures isolées du maïs.....	97
III.2.2- Pourcentage d'Inhibition des isolats de moisissures isolées des grains de maïs par les extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine	99
III.2.3- Paramètres d'inhibition (CMI - CMF)	103
III.2.4- Application des formulations poudreuses à base de la farine du cortex de manioc « 0110 » dans la conservation de maïs	104
III.2.5- Discussion partielle numéro 2.....	105
III.2.6- Conclusion partielle numéro 2	107
III.3- Etude toxicologique	107
III.3.1- Toxicité orale aiguë de l'extrait issu du cortex de manioc « 0110 » chez les rats Wistar.....	107
III.3.1.1- Effets de l'extrait sur l'aspect général, le comportement, et la mortalité des rats	107
III.3.1.2. Effets de l'extrait sur le poids corporel de rats.....	108
III.3.2- Etude de la toxicité subaiguë de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » chez les poulets de chair	109
III.3.2.1- Signes généraux	109
III.3.2.2- Effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN sur le poids corporel des poulets de chairs	109
III.3.2.3- Effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » sur quelques paramètres biochimiques	110
III.3.2.4- Effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » sur le poids relatif des organes.....	111
III.3.3- Discussion partielle numéro 3	114
III.3.4- Conclusion partielle numéro 3	116
III.4- Discussion générale.....	117
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126
ANNEXES	a
Liste de publications issues de la thèse	q

RESUME

La scopolétine est une phytoalexine de la classe des coumarines biosynthétisée par plusieurs plantes, dont le manioc (*Manihot esculenta* Crantz). Ces travaux ont été réalisés afin de contribuer à la réduction des pertes post-récoltes du maïs par l'utilisation de la poudre du cortex de manioc contenant la scopolétine. L'étude a porté sur 20 variétés de manioc (10 locales et 10 améliorées), les différentes parties du tubercule de manioc (cortex, parenchyme, entier), ainsi que quelques produits de transformation (*gari, fufu*, cossettes). La scopolétine et le cyanure d'hydrogène (HCN) ont été quantifiés par les méthodes de Chromatographie Liquide/Spectrométrie de Masse (LC/SM) et du papier picrate. Les méthodes d'incorporation sur milieu gélosé et de microdilution ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antifongique des extraits du cortex et du parenchyme de la variété de manioc « 0110 » sur cinq isolats de moisissures isolés du maïs stockés (*Aspergillus flavus* (*A. flavus*), *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Fusarium* sp, *Penicillium* sp et un isolat non identifié). le test de conservation des grains de maïs a été fait par enrobage avec la poudre du cortex de manioc « 0110 » à des proportions de 2 mg, 4 mg et 8 mg de poudre pour 100 g de maïs contenant respectivement 0,07 µg ; 0,14 µg et 0,28 µg de scopolétine et 2,8 µg ; 5,6 µg et 11,2 µg de HCN. La méthode de l'essai limite à 2000 mg/kg de l'OCDE a été utilisée pour déterminer la DL₅₀ de l'extrait du cortex de manioc « 0110 » chez les rats femelles Wistar et la toxicité subaiguë a été évaluée chez les poulets de chair par incorporation de la dite poudre a leur aliment aux doses de 2 mg, 4 mg et 8 mg/100 g de provende. Les résultats ont montré que les variétés de manioc camerounais contiennent la scopolétine, et cette dernière s'accumule différenciellement en fonction des variétés. Les teneurs dans le parenchyme varient de 33,48 ± 0,02 à 155,32 ± 0,42 mg/kg (P > 0,05). La variété améliorée « 0110 » est celle qui se démarque avec 155,32 ; 46,37 mg/kg de scopolétine et 116,43 ; 142,33 mg/kg de HCN dans le parenchyme et le cortex respectivement. La cossette est le produit dérivé du manioc qui favorise une meilleure accumulation de la scopolétine. Outre la teneur en HCN, la sélection variétale et les traitements technologiques influencent son accumulation. Les extraits bruts issus du cortex et du parenchyme ont montré une activité fongicide sur les cinq isolats de moisissures testés : les CMI varient de 0,30 à 2,50 µg/mL avec l'extrait du parenchyme et de 0,07 à 0,30 µg/mL avec l'extrait du cortex. La dose de 8 mg pour 100 g de maïs (0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN) a été plus efficace dans la conservation du maïs. L'étude toxicologique a permis de classer cet extrait comme une substance faiblement toxique car la DL₅₀ est supérieure à 2000 mg/kg. La dose antifongique efficace obtenue est non toxique. Ainsi, l'utilisation de la poudre du cortex de manioc « 0110 » comme biopesticide est envisageable, afin de limiter les pertes post-récoltes des grains.

Mots clés: Scopolétine, variétés de manioc camerounais, activité antifongique, toxicité, maïs.

ABSTRACT

Scopoletin is a phytoalexin of the coumarin class biosynthesized by several plants including cassava (*Manihot esculenta* Crantz). This study sought to contribute to the reduction of post-harvest losses through the use of cassava cortex powder containing scopoletin. The study focused on 20 cassava varieties (10 locals and 10 improved), the different parts of the cassava tuber (cortex, parenchyma, whole), as well as some processed products (*gari*, *fufu*, chips). Scopoletin and hydrogen cyanide (HCN) were quantified by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS) and picrate paper methods. Agar incorporation and microdilution methods were used to evaluate the antifungal activity of cortex and parenchyma crude extracts of cassava variety "0110" on five mold isolates from stored maize (*Aspergillus flavus* (*A. flavus*), *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Fusarium* sp, *Penicillium* sp and an unidentified isolate). The maize kernels preservation test was done by coating with cassava cortex powder "0110" at proportions of 2 mg, 4 mg and 8 mg of powder per 100 g of maize containing respectively 0.07 µg, 0.14 µg and 0.28 µg of scopoletin and 2.8 µg, 5.6 µg and 11.2 µg of HCN. The limit test method of OECD at 2000 mg/kg was used to determine the LD₅₀ of cassava cortex extract "0110" in female Wistar rats and subacute toxicity was assessed in broilers by incorporating this powder into their food at doses of 2 mg, 4 mg and 8 mg/100 g of feed. The results showed that Cameroonian cassava varieties contain scopoletin, and the latter accumulates differentially depending on the variety. The levels in the parenchyma vary from 33.48 ± 0.02 to 155.32 ± 0.42 mg/kg (P > 0.05). The improved variety "0110" is the one that stands out with 155.32; 46.37 mg/kg of scopoletin and 116.43; 142.33 mg/kg of HCN in parenchyma and cortex respectively. Chips are processed product of cassava tuber that promote better accumulation of scopoletin. In addition to HCN content, varietal selection and technological treatments influence its accumulation. The crude extracts from the cortex and parenchyma showed fungicidal activity on the five mold isolates tested: MICs ranged from 0.30 to 2.50 µg/mL with the parenchyma extract and from 0.07 to 0.30 µg/mL with cortex extract. The dose of 8 mg per 100 g of maize (0.28 µg of scopoletin and 11.2 µg of HCN) was more effective in preserving maize. The toxicological study made it possible to classify this extract as a weakly toxic substance because the LD₅₀ is greater than 2000 mg/kg. The effective antifungal dose obtained is non-toxic. Thus, the use of cassava cortex powder "0110" as a biopesticide is possible in order to limit post-harvest grain losses.

Keywords: Scopoletin, Cameroonian cassava varieties, antifungal activity, toxicity, maize

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP:	Adénosine Diphosphate
<i>A. flavus:</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
ALAT:	Alanine Amino Transférase
<i>A. niger:</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ANOVA:	Analyze of Variance
ARN:	Acide Ribonucléique
ASAT:	Aspartate Amino Transférase
ATP:	Adénosine Triphosphate
CAT:	Catalase
CCoAOMT:	Cafféoyl CoAO- méthyltransférase
CHC:	Cameroon Highland Composite
CHH:	Cameroon High land Hybride
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMA/OA:	Conférence des Ministères d'Agricultures d'Afrique de l'Ouest et du Centre
CMF:	Concentration Minimale Fongicide
CMI:	Concentration Minimale Inhibitrice
CMS:	Cameroon Maize Selection
CTA:	Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation
CYA:	<i>Czapek Yeast extract Agar</i>
Cz:	Czapeck
CZID:	Iprodione Dichloran
C3'H:	Caffeate 3'-hydroxylase
C4'H:	Cinnamate 4- hydroxylase
DAD:	Détecteur à barrette de Diode
DCPA:	Dichloran-chloranphénicol
DL₅₀:	Dose létale 50
EOR:	Espèces Oxygénés Réactives
FAOSTAT:	Food and Agriculture Organisation Statistics
F6'H:	Feruloyl CoA 6'hydrolase
FAO:	Food and Agriculture Organisation
HDL:	High Density Lipoproteins
HCN:	Cyanure d'Hydrogène
HPLC/SM:	Chromatographie Liquide Haute Performance / Spectrométrie de Mass

IARS:	International Agency of Research on Cancer
IITA:	Institut International d'Agriculture Tropicale
IRAD:	Institut de Recherche Agricole pour le Développement
MINADER:	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
MPa:	Méga Pascal
MEA:	<i>Malt Extract Agar</i>
MDA:	Malone dialdéhyde
MRM:	Mode de surveillance à Réactions Multiples
ng/g:	Nanogramme par gramme
OCDE:	Organisation de Coopération et de Développement Economique
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
OGA:	Oxytétracycline glucose agar
2OGD:	2- oxoglutarate-dependantdioxygenase
OTA:	Ochratoxine A
PAL:	Phénylalanine Lyase
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA:	<i>Potatoes Dextrose Agar</i>
pH:	Potentiel d'Hydrogène
PIB:	Produit Intérieur Brut
PIDMA:	Programme d'Investissement et du Développement du Marché Agricole
PNDRT:	Programme National de Développement des Racines et Tubercule
ppm:	partie par million
PPD:	Post Harvest Physiology Deterioration
SIDA:	Syndrome de l'Immuno Déficience Aquisse
SOD:	Superoxyde Dismutase
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences
TBA:	Acide Thiobarbiturique
TCA:	Acide Trichloroacétique
TLC:	Thin Layer Chromatography
UE:	Union Européenne
USA:	United State of America
VIH:	Virus de l'Immuno Déficience Humaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Localisation de quelques variétés améliorées de manioc en fonction de la zone agro-écologique au Cameroun	17
Tableau II: Principales mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale	44
Tableau III: Effets suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés ou expérimentalement	45
Tableau IV: Les principaux insectes ravageurs des gains stockés	51
Tableau V: Caractéristiques morphologiques des différentes variétés de manioc utilisées	56
Tableau VI: Procédure manuelle de dosage du Cholestérol total.....	74
Tableau VII: Procédure manuelle de dosage du HDL-Cholestérol	75
Tableau VIII: Procédure manuelle de dosage des triglycérides	76
Tableau IX: Procédure manuelle de dosage de la Créatinine.....	77
Tableau X: Procédure manuelle de dosage de l'ALAT/ASAT.....	78
Tableau XI: Procédure manuelle de dosage des Aldéhydes Maloniques (MDA)	79
Tableau XII: Teneur en HCN pour chacune des 20 variétés de manioc (10 locales et 10 améliorées) à l'état frais obtenu après dosage par la méthode d'analyse au papier picrate.....	82
Tableau XIII: Teneurs en scopolétine dans le parenchyme des différentes variétés de manioc.....	86
Tableau XIV: Description des principaux isolats fongiques isolés des grains de maïs.....	98
Tableau XVI: Illustration du résultat des tests d'activité antifongique d'extrait du cortex et du parenchyme de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine sur les moisissures isolées du maïs.....	102
Tableau XVII: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Fongicide (CMF) des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc « 0110 » contenant la scopolétine sur les isolats de moisissures isolées des grains de maïs.....	103
Tableau XVIII: Observations des rats en essai aigüe avec l'extrait du cortex de manioc (0110)	108
Tableau XVIII: Taux de quelques paramètres biochimiques dans le sérum des poulets soumis à l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant la scopolétine et du HCN.....	111
Tableau XIX: Poids relatifs des organes de poulets soumis à l'aliment enrichi de la poudre du cortex de manioc de la variété améliorée « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN.....	112

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la scopolétine	5
Figure 2: Synthèse chimique de la scopolétine	6
Figure 3 : Equation de biosynthèse de la scopolétine	8
Figure 4 : Métabolisme de génération et de piégeage des espèces oxygénés réactives de la plante	10
Figure 5: Photo présentant la morphologie d'une jeune plante de manioc de la variété améliorée « 0110 » (tige : blanche vers le bas et verte au sommet, pétiole/feuille : verte).....	12
Figure 6 : Production (en tonne) de manioc en Afrique et dans le monde sur onze ans	13
Figure 7 : Photo d'une plante de manioc attaqué par la mosaïque	14
Figure 8: Manioc attaqué par la striure brune a) feuille ; b) racine	15
Figure 9 : Biosynthèse du glycoside cyanogénique	18
Figure 10 : Réaction de cyanogénèse	19
Figure 11 : Photo des tranches de la racine de manioc : a) quelques heures après la récolte ; b) ; deux jours après la récolte ; c) quatre jours après récolte	22
Figure 12 : structure annotée d'une tranche de la racine de manioc	23
Figure 13: Modèle des voies biologiques affectées pendant la détérioration physiologique post-récolte du manioc	24
Figure 14: Différentes utilisations des moisissures	25
Figure 15: Propriétés des moisissures toxigènes	26
Figure 16 : Modes de formation des conidies	31
Figure 17: Modes de groupement des conidies des moisissures	31
Figure 18: Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	35
Figure 19: Caractères du thalle de genre <i>Penicillium</i>	38
Figure 20: Caractères morphologiques des <i>Penicillium</i>	38
Figure 21: Caractères morphologiques des <i>Fusarium</i>	40
Figure 22: Colonisation d'une denrée alimentaire	42
Figure 23: Voies de biosynthèse des mycotoxines.....	43
Figure 24: Mécanisme de toxicité de l'AFB1	45
Figure 25: Mycotoxinogénèse et moisissures	46
Figure 26: Les paramètres responsables de la mycotoxinogénèse	49
Figure 27: Maïs infectés par les moisissures toxigènes a) Epi de maïs frais infecté ; b) moisissure d'épi <i>Fusarium</i> (champignon blanc recouvrant les grains) ; c) moisissure <i>Gibberella</i> , l'infection commence pour la plupart des cas par le haut (couleur rose foncée à rouge)	52
Figure 28: Structure de sechage moderne et de conservations traditionnelles a) séchoir moderne, b) séchoir traditionnel, c) structure de stockage de type cribs	53

Figure 29: Localisation géographique du site d'échantillonnage	55
Figure 30: Photos matériel végétal : a) Racines de manioc, variété « 0110 »; b) Grain de maïs (variété hybride CHH 105 en stockage à l'IRAD de Yaoundé)	56
Figure 31: Matériel animal. a) Poulets de chairs (<i>Gallus gallus domesticus</i> ; b) Rats albinos de souche Wistar	57
Figure 32: Schéma de l'organigramme de la méthodologie expérimentale	59
Figure 33: Photo de l'aire de séchage des échantillons (cortex, fufu, gari; cossettes de parenchyme et racine entière) obtenus des racines de manioc.....	60
Figure 34: Photo de la procédure de dosage du HCN par la méthode du papier picrate.....	62
Figure 35: Photo d'ensemencement des grains de maïs sur milieu PDA (a); Photo du milieu PDA envahit par les moisissures du maïs (b).....	64
Figure 36: Moyenne des teneurs d'acide cyanhydrique (HCN) résiduel dans les différents produits de transformation du manioc.....	83
Figure 37: Teneurs en acide cyanhydrique (HCN) totale des cortex des différentes variétés de manioc	84
Figure 38: Chromatogramme du standard scopolétine de référence et du parenchyme de la variété « 0110 »	85
Figure 39: Spectre de masse de la scopolétine ($m/z=215$)	85
Figure 40: Structure chimique de la scopolétine	85
Figure 41: Teneurs moyennes en scopolétine dans quelques produits dérivés du manioc.....	87
Figure 42: Teneurs moyennes en scopolétine dans les différentes parties de la racine de manioc	87
Figure 43: Répartition des teneurs en cyanure d'hydrogène et en scopolétine dans les variétés de manioc étudiées.....	88
Figure 44: Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des différents isolats de moisissures isolés du maïs après 7 jours d'incubation à $28 \pm 4^\circ \text{C}$	99
Figure 45: Pourcentage d'Inhibition de moisissures isolées des grains de maïs : extraits issus du parenchyme (a) et du cortex (b) de manioc de la variété « 0110 » contenant de la scopolétine	101
Figure 46: Efficacité antifongique de la poudre de cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine	104
Figure 47: Variations des poids corporels de rats en essai aigüe	109
Figure 48: Variation du poids corporel des poulets au cours de l'étude de la toxicité subaigüe de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN	110
Figure 49: Microphotographies des foies (X100), des reins (X200) et des cerveaux de poulets (X100) (Coloration Hématoxylène-Eosine (HE))	113

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Caractérisation des variétés de manioc étudiées (améliorées et locales)	a
Annexe 2: Aire de séchage des produits de transformation du manioc (cossette, fufu, gari, entier, cortex)	e
Annexe 3: Préparation du tampon phosphate 0,1M et pH 8.....	e
Annexe 4: Composition alimentaire d'aliment de rats	e
Annexe 5: Composition alimentaire des différents régimes de la volaille	f
Annexe 6: Composition des milieux de culture.....	f
Annexe 7: Chromatogramme et spectre de masse du dosage de la scopolétine de référence et des différents échantillons de la variété de manioc améliorée A2 « 0110 » ayant favorisé une bonne accumulation de la scopolétine.....	h
Annexe 8: Courbes d'étalonnages des différents dosages	n
Annexe 9: Schéma d'essai avec une dose limite de 2000 mg/kg	o
Annexe 10: Quelques variétés de maïs améliorées disponibles au Cameroun.....	p
Annexe 11: Liste de publications issues de la thèse	p

INTRODUCTION

De nombreux produits agricoles sont sujets aux attaques d'un groupe de champignons qui produit des métabolites toxiques appelés mycotoxines (**Botton et al., 1990**). Les aliments tels que les céréales, les oléagineux, les épices, les noix, le lait et les fruits secs sont les plus contaminés (**Abdellah et Larbi, 2007**). De plus en plus, l'attention est portée sur les problèmes de contamination des aliments de grande consommation tels que les céréales. Parmi ces dernières, des études ont montré que le maïs est celle dont le risque de contamination par les champignons producteurs de mycotoxine est le plus élevé à la différence des autres céréales (l'orge et le blé) susceptibles d'être plus résistantes (**Abdellah et Larbi, 2007**). La contamination par ces champignons peut survenir à tout moment avant, pendant et après la récolte, au cours du séchage ou du stockage. Cette infestation fongique peut conduire à une perte de la valeur nutritive du produit, une diminution du pouvoir germinatif des grains, à la décoloration et à la production d'odeurs nauséabondes (**Magan et al., 2003**). En effet, les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques qui peuvent causer des maladies ou la mort (substances toxiques et réputées cancérigènes) lorsqu'elles sont ingérées par les animaux ou les êtres humains (**Qazi & Fayyaz, 2006**). Parmi ces derniers, les aflatoxines et les fumonisines sont à l'origine des maladies d'origine alimentaire, qui constituent à l'heure actuelle l'un des problèmes de santé publique les plus répandus à l'échelle internationale. Ces mycotoxines sont principalement produites par les souches de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (**Wilson et al., 2002**); *A. pseudotamarius* et *A. bombycis* et les fumonisines par les souches de *F. verticilloides* et *F. proliferatum* (**Peterson et al., 2001**). Par ailleurs, **Turner et al. (2002)** ont montré que l'hépatite B peut agir en synergie avec les aflatoxines pour augmenter le risque de carcinome hépatocellulaire. De plus, l'expérience suggère qu'il peut y avoir une interaction entre la consommation des aflatoxines et les maladies comme le paludisme et le VIH/SIDA (**Gong et al., 2004**). Ce constat devient d'autant plus sérieux chez des personnes vivant avec ces dommages, car ces maladies sont susceptibles de les rendre plus vulnérables aux infections émergentes telles que l'infection par le nouveau Coronavirus (**Grayson, 2020**).

Ainsi, pour limiter la propagation des moisissures sur les céréales, notamment le maïs, les producteurs utilisent les méthodes traditionnelles de lutttes antifongiques qui consistent au triage manuel pour éliminer les grains ou les épis moisissés, le séchage solaire pour réduire le taux d'humidité et l'utilisation des structures de conservation telles que les greniers, les cribs, les magasins. Les méthodes modernes utilisent les séchoirs modernes qui favorisent la réduction de l'humidité à des taux inférieurs à 12 %, les pesticides chimiques et enfin la lutte biologique,

respectueuse de l'Homme et de son environnement et provenant des moyens naturels. Ce sont : les extraits de plantes (huiles essentielles), la libération des souches de moisissures non toxigènes dans le milieu, qui entrent en compétition avec les souches toxigènes pour le substrat et l'utilisation des semences génétiquement modifiées, c'est le cas du maïs Bt, qui inhibe l'altération par les insectes et par suite les infections fongiques (**Reddy et al., 2010**). Ces méthodes de lutttes antifongiques présentent des limites telles que les structures de conservation rudimentaires favorisant la propagation des moisissures. L'application abusive, à répétitions et non raisonnée de fongicides synthétiques contre les moisissures entraîne des effets néfastes tant pour les consommateurs que pour l'environnement et la biodiversité (**Aubertot et al., 2005**). Ils posent en outre à l'échelle du petit producteur des problèmes de disponibilité, de coût et de stockage. Pour la préservation de la santé des consommateurs, il est impératif de développer des produits alternatifs aux pesticides extrêmement dangereux utilisés pour le contrôle des moisissures dans les denrées stockées et ainsi éviter la famine et la pauvreté.

Cependant, le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) du fait de son potentiel en composés bioactifs constitue une alternative prometteuse dans la lutte antifongique. Sa teneur élevée en eau fait de lui une denrée hautement périssable suite à la détérioration physiologique post-récolte, initiée après la récolte affectant la qualité organoleptique du manioc et favorisant l'accumulation des composés bioactifs ayant des propriétés biologiques, notamment antifongiques (**Buschman et al., 2000 ; Ba et al., 2017**). Parmi ces composés bioactifs, la scopolétine, un produit du métabolisme des phénylpropanoïdes appartenant à la classe des hydroxycoumarines, synthétisée par plusieurs plantes est le composé majeur qui s'accumule dans les racines de manioc et caractérisé par la coloration bleu-noir (**Silva et al., 2002 ; Bayoumi et al., 2010**). Son accumulation dans les racines de manioc est lié à la réponse aux attaques microbiennes et autres stress incluant les lésions physiques et à la déshydratation (**Tanaka et al., 1983 ; Bayoumi et al., 2010**). Elle s'accumule très rapidement durant la détérioration physiologique post-récolte et est généralement présente dans les racines de manioc frais sous forme de trace à des teneurs indétectables. Cette accumulation augmente significativement suite aux lésions et atteint son pic autour du deuxième jour après la récolte, dépendant du génotype, des facteurs environnementaux et de la présence de certains composés comme les micronutriments (Zn, Ca, Mg, K) et le HCN (**Buschman et al., 2000 ; Cooper et Brown, 2008**). C'est une molécule aux propriétés antifongique, anti tumorale, antibactérienne, antiinflammatoire, hépato protectrice, antidiabétique, antioxydante (**Obidoa et al., 1991 ; Chun-Long Li et al., 2015 ; Ba et al., 2017**).

En revanche, les études récentes menées au Bénin pour connaître le potentiel en scopolétine des variétés de manioc ont montré une accumulation différentielle de la scopolétine dans quatre variétés de manioc dont les caractéristiques n'ont pas été décrites (**Gnonlonfin et al., 2011**). Par contre, **Ba et al. (2016)** en étudiant l'influence du séchage sur l'accumulation de la scopolétine dans les produits de transformation de manioc ont montré que le séchage solaire sur grille des tranches de manioc découpées favorise une meilleure accumulation de la scopolétine comparativement au séchage traditionnel à l'ombre et à l'étuve. **Ba et al. (2017)** ont également montré qualitativement que la scopolétine s'accumule dans toutes les parties (cortex, parenchyme) de la racine de manioc. Par ailleurs, **Gloria et al. (2014)**, ont montré les signes cliniques (l'écoulement nasal du sang, les vomissements, la faiblesse musculaire, la difficulté de déplacement, le retard de croissance, la nécrose des cellules des muscles cardiaques, squelettiques et hépatiques) relatifs à l'effet toxique de la scopolétine chez les porcs soumis pendant 24 mois sans dose précise à un régime constitué de farine de manioc bouillie.

Au regard de ce qui précède, le Cameroun dispose de plusieurs variétés de manioc (environ 200, dites améliorées et locales) cultivées dans toutes les cinq zones agro écologiques. Quelques-unes de ces variétés étant bien décrites sur le plan morphologique et par des modifications génomiques subies lors de la sélection variétale et dont le potentiel en scopolétine reste inconnu. Cependant, la scopolétine de manioc du fait de ses propriétés antifongiques, constitue une alternative prometteuse face aux méthodes conventionnelles de lutttes antifongiques ayant suffisamment montré ses limites. Par ailleurs, aucune étude n'a jamais été menée à notre connaissance pour connaître le niveau de toxicité des extraits contenant de la scopolétine. Il convient alors d'explorer ces propriétés afin de limiter la propagation des moisissures toxigènes sur les denrées alimentaires, notamment le maïs, qui, consommé par les Hommes et les animaux, constitue également une matière première de choix pour les industries agroalimentaires et dont la production demeure très faible au Cameroun. En effet, la production nationale du maïs est évaluée à 2.200.000 tonnes, soit un déficit de 600.000 tonnes par rapport à la demande évaluée à 2.800.000 tonnes (**MINADER, 2019**). Alors que l'offre peine à satisfaire la demande, l'autre obstacle à l'autosuffisance alimentaire du maïs est la perte post-récolte. Environ 30 % de la quantité de maïs produite connaissent les pertes post-récolte chaque année (**FAO, 2013**). La recherche des solutions pour la réduction de ces pertes constitue l'un des enjeux majeurs du Programme d'Investissement et de Développement du Marché Agricole (PIDMA) porté par l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD).

QUESTIONS DE RECHERCHE

- ✚ La scopolétine s'accumulent t'elle dans les variétés de manioc camerounais, la teneur en HCN et les traitements technologiques influencent t'ils cette accumulation ?
- ✚ Les extraits issus des produits de transformation de manioc contenant la scopolétine et le HCN inhibent-ils la croissance des moisissures ?
- ✚ La dose antifongique efficace est-elle toxique ?

HYPOTHESE DE LA RECHERCHE

- ✚ La scopolétine s'accumulent dans les variétés de manioc camerounais, la teneur en HCN et les traitements technologiques post-récoltes influencent son accumulation ;
- ✚ Les extraits issus des produits de transformation de manioc contenant la scopolétine et le HCN inhibent la croissance des moisissures isolées du maïs ;
- ✚ La dose antifongique efficace est non toxique.

OBJETIF GENERAL

Nous nous proposons dans ce travail de développer un moyen de réduction des pertes post-récoltes du maïs par l'utilisation de la poudre du cortex de manioc contenant la scopolétine et le HCN.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- ✚ Quantifier la scopolétine et le HCN dans les racines des variétés de manioc camerounais ainsi que les produits de transformation de manioc ;
- ✚ Rechercher les effets des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine sur la conservation du maïs ;
- ✚ Étudier la toxicité aigüe de l'extrait issu du cortex (scopolétine) et subaigüe de la poudre de cortex (scopolétine et HCN) de manioc « 0110 » respectivement chez les rats et chez les poulets de chair.

Cette thèse est présentée en trois chapitres :

- ❖ Le chapitre I ressort l'état actuel de la science et les données disponibles concernant le sujet traité.
- ❖ Le chapitre II présente l'ensemble des matériels utilisés dans la première partie ensuite, l'ensemble des méthodes utilisées pour atteindre l'ensemble des objectifs fixés dans la deuxième partie.
- ❖ Le chapitre III présente l'ensemble des résultats obtenus et la discussion.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1- GENERALITES SUR LA SCOPOLETINE

I.1.1- Définition et structure

La scopolétine (scopolétole ou la 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine) (Figure 1) est un métabolite secondaire de la classe des coumarines. C'est une coumarine aglycone de formule brute $C_{10}H_8O_4$. C'est l'équivalent de l'esculétole dont un des substituants hydroxyles est remplacé par un méthoxy ($-OCH_3$). Il tient son nom du fait qu'elle a été extraite pour la première fois dans la racine des plantes du genre *Scopolia* comme *Scopolia japonica* (Karla *et al.*, 2015).

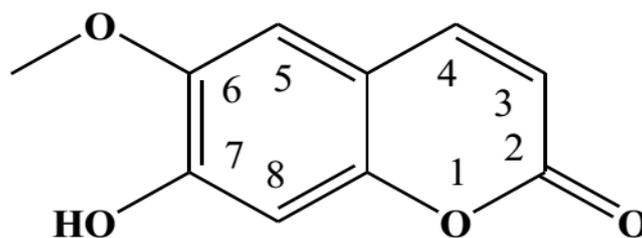


Figure 1 : Structure de la scopolétine (Buschman *et al.*, 2000)

I.1.2- Sources potentielles de la scopolétine

I.1.2.1- Synthèse chimique de la scopolétine

Les dérivés de coumarines tels que la 7-Hydroxy-6, 8-diméthoxy-2H-chromen-2-one (isofraxidine), la 7-Hydroxy-6-méthoxy-2H-chromen-2-one (scopolétine) et la 7-Hydroxy-6-éthoxy-2H-chromen-2-one sont obtenus par synthèse chimique à partir des dérivés des composés phénoliques simples (Figure 2). La nature des produits finaux est fonction des résidus R1 et R2 de ces réactifs. Par exemple si le résidu R1 est le groupement méthoxy ($-OCH_3$) et R2 l'hydrogène ($-H$), la synthèse aboutit à la scopolétine. En effet, la synthèse commence par la protection du groupement hydroxyle de la molécule de départ par le chlorure de pivaloyle. Cette réaction aboutit à un produit ayant 100 % de rendement (Kraus *et al.*, 2002). L'ajout de la N-iodo-succinimide à ce composé aboutit alors à trois composés intermédiaires ayant des rendements de 80 %, 77 % et 80 % respectivement (Castanet *et al.*, 2002). L'hydrolyse de ces derniers par la pyridine-2-aldoxime, le tetrabutylammonium bromide et l'hydroxyde de césium donne les O-hydroxybenzaldéhydes qui réagissent avec l'éthyl (triphenylphosphoranylidène) acétate et la N, N-diéthylaniline pour donner les coumarines 1, 2 et 3 (Figure 2) (Harayama, 2006 ; Yang et Fu, 2010).

- **Procédure générale de la synthèse chimique de la scopolétine**

Pour la préparation des dérivés de coumarines 1, 2 et 3 (Figure 2), 1 mmol d'O-hydroxybenzaldéhyde et 1,2 mmol d'éthyl (triphénylphosphoranylidène) acétate sont dissouts dans 1,5 mL de N, N-diéthylaniline. Le mélange ainsi obtenu est agité en présence d'azote atmosphérique pendant 15 min. Le solvant est éliminé sous pression réduite (1 mmHg, 52 °C) et le liquide huileux résultant, de couleur brune est purifié par chromatographie sur colonne (pétrole d'éther-éthyl/acétate, 3 :1) (Harayama, 2006).

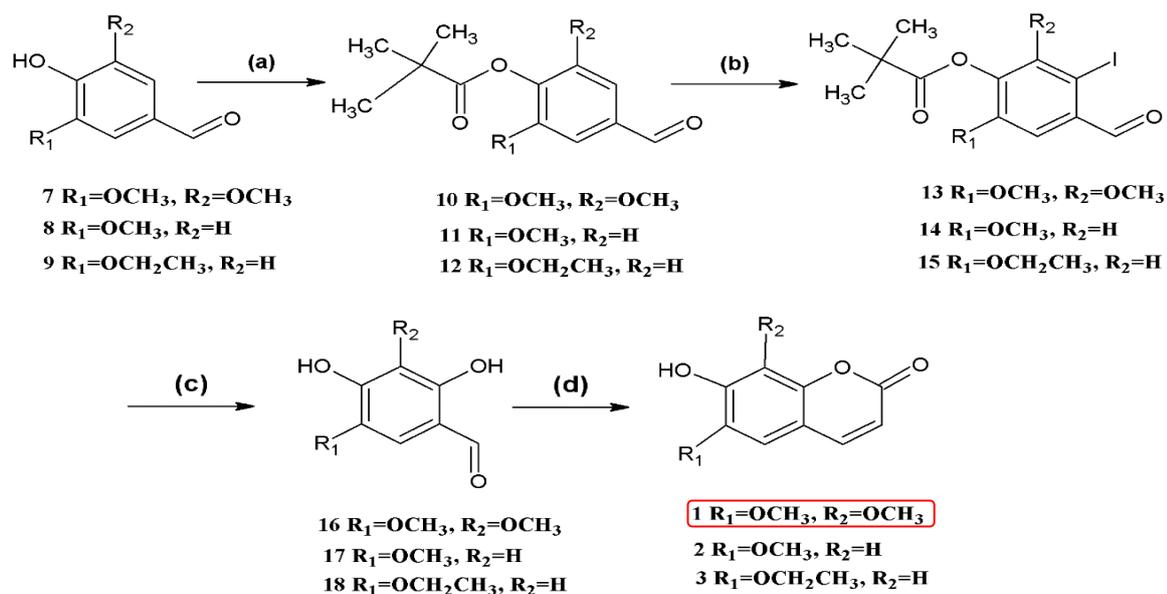


Figure 2: Synthèse chimique de la scopolétine (Harayama, 2006)

Réactifs et conditions : (a) $(\text{CH}_3)_3\text{COCl}$, DMAP, Et_3N , CH_2Cl_2 ; (b) 10 NIS, CF_3COOH , CH_3CN , reflux; 11,12 N-iodosuccinimide (NIS), $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$, MeOH; (c) CsOH, syn-2-pyridinealdoxime, Cu_2O , Bu_4nbr , N_2 , H_2O ; (d) $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P} = \text{CHCOOCH}_2\text{CH}_3$, Et_2NPh , N_2 (15 min). 1: 7-Hydroxy-6, 8-diméthoxy-2H-chromen-2-one (isofraxidine); 2: 7-Hydroxy-6-méthoxy-2H-chromen-2-one (Scopolétine); 3: 7-Hydroxy-6-éthoxy-2H-chromen-2-one.

I.1.2.2- Synthèse naturelle de la scopolétine

La scopolétine est biosynthétisée à des proportions différentes chez les plantes telles que *Artemisia scoparia*, *Brunfelsia*, *Nicotiana glauca*, *Lycium chinense*, *Aster tataricus*, *Foeniculum vulgare*, *Angelica dahurica*. Chicorée sauvage, *Viburnum prunifolium*, *Kleinhovia hospita*, Tournesol (Wang et al., 1997) où elle participe à leur protection contre les attaques microbiennes et des prédateurs. Elle est également présente dans les racines de manioc suite au processus de détérioration physiologique post-récolte qui s'y produit 24 à 72 heures après la récolte et est caractérisée par la coloration bleu-noir (Silva et al., 2002 ; Bayoumi et al., 2010).

I.1.2.3- Mécanisme de biosynthèse naturelle de la scopolétine

La biosynthèse de la scopolétine dans la racine de manioc se déroule suivant trois voies telles que décrites par **Bayoumi et al. (2008)** dans la Figure 3 ci-dessous. La voie de la phénylalanine, celle de la 2, 4-dihydroxycinnamate et la voie de la 2, 4, 5- trihydroxycinnamate (6-hydroxycaffeate). La voie majeure est celle de la phénylalanine (**Bayoumi et al., 2008**).

I.1.2.3.1- Voie majeure de la (E)-ferulate

Sous l'action de la phénylalanine lyase (PAL), la phénylalanine perd son groupement amine par un mécanisme de désamination qui entraîne la formation de la (E)-cinnamate (Figure 3). Elle subit une hydroxylation pour donner la P-coumarate catalysée par la cinnamate 4-hydroxylase (C₄'H). Le groupement carboxyle du P-coumarate se lie au coenzyme A grâce à une liaison thioester catalysée par la 4-coumarate coenzyme A ligase pour donner le P-coumaroylCoA (**Ferrer et al., 2008**). L'ajout d'un groupement hydroxyle au carbone 3' sous l'action du cafféate 3'-hydroxylase (C₃'H) favorise la conversion du P-coumaroylCoA en CafféoylCoA. Ce groupement hydroxyle est méthylé, catalysé par la cafféoyl CoAO-méthyltransférase (CCoAOMT) pour donner le feruloyl CoA. Un autre groupement hydroxyle sous l'action du 2- oxoglutarate-dependant dioxygenase (2OGD) est ajouté au carbone 6 du feruloyl (**Kai et al., 2008**). Cette action est catalysée par la feruloyl CoA 6'hydrolase (F6'H) qui régule la formation du 6-hydroxyferuolyCoA très impliqué dans la régulation de la synthèse de la scopolétine (**Kai et al., 2008**). La 6-hydroxyferuolyCoA subit une E-Z isomérisation permettant la formation d'une lactone qui va favoriser la synthèse du noyau de la scopolétine, ce processus passe par la conversion des groupements 6- hydroxyl et carboxyl de E à Z isomérisation (**Gnonlonfin et al., 2011**). La lactonisation se produit souvent de façon spontanée, la scopolétine par glycosylation avec un glycoside inactif sous l'action d'une O-glucosyltransférase donne la scopoline qui s'accumule dans les vacuoles et par déglycosylation libère la scopolétine catalysée par la B- glucosidase (**Ahn et al., 2010**).

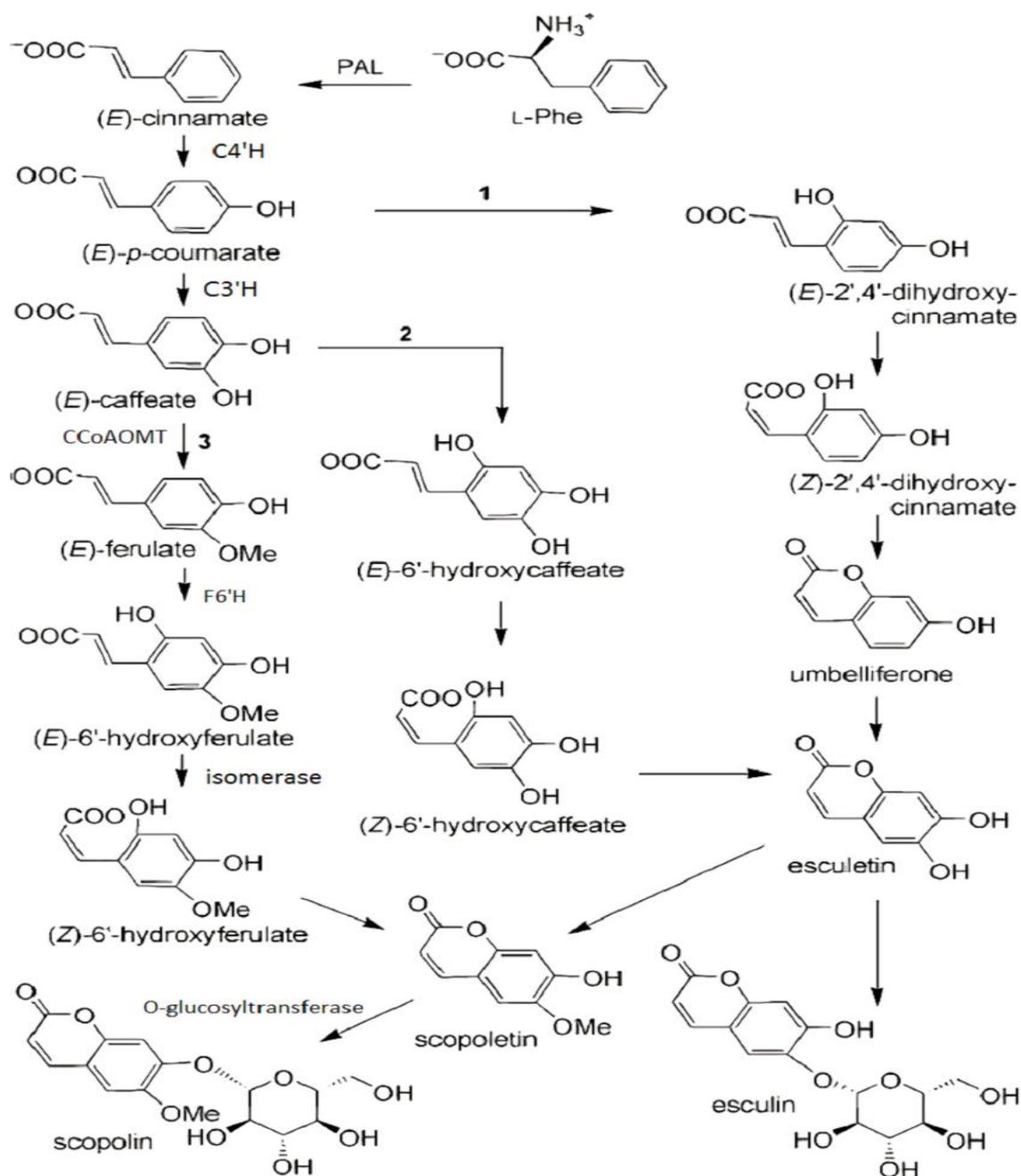
I.1.2.3.2- Voies mineures de la 2, 4- dihydroxycinnamate et 2, 4, 5- trihydroxycinnamate

La scopolétine peut être synthétisée dans le manioc en passant par l'esculétine (figure 3) qui est un carrefour vers où convergent deux voies bien distinctes :

- La P-coumaroyl CoA subit une hydroxylation et donne le (E) 2, 4- dihydroxycinnamate (Figure 3(1)). Ce dernier va subir une E-Z isomérisation en (Z)-2,4-dihydroxycinnamate. Par un mécanisme de lactonisation, la (Z)-2,4-dihydroxycinnamate donne une umbéliférone puis l'esculétine. La molécule ainsi

obtenue va subir une série de réactions, puis une réaction de méthylation permettant la formation de la scopolétine.

- La cafféate par O-hydroxylation donne la 6-hydroxycafféate (Figure 3 (2)) qui va également subir la E-Z isomérisation ensuite la lactonisation pour donner l'esculetine (Bayoumi *et al.*, 2008).



Légende : 1)- 2, 4- dihydroxycinnamate ; 2)- 2, 4, 5- trihydroxycinnamate ; 3)- (E)- ferulate.

Figure 3 : Equation de biosynthèse de la scopolétine (Bayoumi *et al.*, 2008)

I.1.3- Propriétés biologiques de la scopolétine

Les métabolites secondaires sont des molécules généralement synthétisées par les plantes pour se défendre contre les situations de stress biotique ou abiotique. Elles ont un rôle premier de protection, et peuvent suivant leur spécificité biologique et chimique avoir des fonctions plus élargies. La scopolétine est une coumarine qui regorge un ensemble de propriétés biologiques tant bénéfiques pour la plante que pour l'homme ; on peut ainsi énumérer.

I.1.3.1- Activité anti tumorale

La scopolétine présente des propriétés anti tumorales intéressantes agissant sur divers types de cancers. Des études *in vitro* ont démontré qu'elle empêchait la prolifération des cellules cancéreuses dans le cas du cancer de la prostate (**Liu et al., 2001**). Elle peut aussi être utilisée comme agent chimio thérapeutique naturel contre le cancer de la prostate (**Chun-long Li et al., 2015**).

I.1.3.2- Activité hépatoprotectrice

La scopolétine a des actions bénéfiques au niveau du foie. Elle a la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique hépatique, d'augmenter l'activité des antioxydants (superoxyde dismutase et catalase), de réguler l'hyperthyroïdie et hyperglycémie (**Panda et al., 2006**).

I.1.3.3- Activité antidiabétique

Les effets de l'administration orale de la scopolétine sur les caractéristiques métabolique, biochimique et moléculaire anormaux du diabète de type 2 ont été investigués chez les rats Wistar. Dans cette étude ils ont montré que la scopolétine protège contre le méthylglyoxale induite par l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline (**Wen-Chang et al., 2015**).

I.1.3.4- Activité antimicrobienne

L'accumulation de la scopolétine dans une plante lui confère une résistance aux attaques microbiennes et permet à la plante de réagir efficacement au stress externe tels que les blessures et la déshydratation (**Tanaka et al., 1983**). En outre elle a une teneur considérable dans les feuilles de *Hevea brasiliensis* infectées que dans les feuilles matures de la même plante non infectées (**Silva et al., 2002**). L'activité antifongique de la scopolétine a été observée sur les cossettes de manioc. Sa présence dans les cossettes de manioc a permis d'observer d'une part l'absence de quelques mycotoxines sur les échantillons de manioc prélevés au Ghana (**Wareing et al., 2001**) et d'autre part sur les échantillons de cossettes de manioc collectés au Bénin (**Gnonlonfin et al., 2011**). Cette activité antifongique est aussi perceptible sur d'autres

champignons comme *Phomamac donaldii* responsable de la maladie noire du tournesol également sur les cellules *Ulmus pumila* et *Ulmus campestris* infectées avec les spores de *Ophiostoma ulmi* (Marion, 2006). Elle s'accumule aussi dans les plantes infectées par les champignons de la famille des ascomycètes telles que *Mycrocylus ulei* et *Colletotrichum gloeosporioides* (Teresa Valle et al., 1997). La scopolétine présente également une action inhibitrice contre *Eucherichia coli* et *Helicobacter pylori* (Duncan et al., 1998).

I.1.3.5- Rôle de la scopolétine dans le piégeage des espèces oxygénées réactives (EOR)

L'accumulation dramatique de la scopolétine lors de la détérioration physiologique post-récolte indique qu'il joue un rôle important dans le processus de détérioration. En effet, dans le tabac la scopolétine agit comme un agent de piégeage majeur du H_2O_2 après le flux oxydatif déclenché par les blessures et contribue à la formation de la lignine pour cicatrifier la blessure (Figure 4) (Dorrey, 1999). La scopolétine peut piéger les EOR avec son groupe hydroxyle, alors que la scopoline qui a son groupe hydroxyle protégé par le résidu de glucose ne permet pas le piégeage des EOR (Reilly et al., 2004). Généralement, la molécule d'oxygène (O_2) est convertie en radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), puis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) moins nocifs par le superoxyde dismutase (SOD). Et enfin décomposé en molécule d'eau (H_2O) et oxygène (O) par la catalase (CAT) ou l'ascorbate peroxydase (APX) avec l'oxydation des antioxydants appropriés (Owiti et al., 2011).

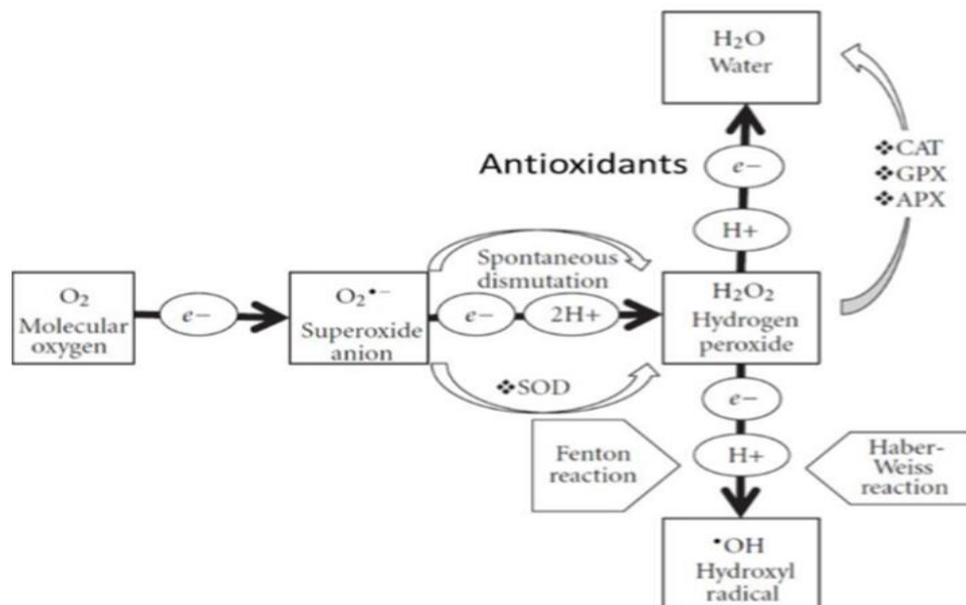


Figure 4 : Métabolisme de génération et de piégeage des espèces oxygénés réactives de la plante (Sharma et al., 2012)

I.1.4- Donnée pharmacologique et toxicologique de la scopolétine

Les données de toxicité sur la scopolétine pure ont été rapportées par le **Cayman Chemical Company, (2016)**. Une DL₅₀ de 3800 mg/kg a été obtenu par voie orale chez les rats et 10 mg/kg par voie intrapéritonéale chez les souris. Par ailleurs, **Obidoa et Obasi, (1991)** ont indiqué la présence des taux significatifs (50-70 µmoles/100 g de poids sec) de scopolétine dans les produits de transformation de manioc. Ces composés dans de tels aliments n'est pas altéré ni par la transformation ni par le stockage. De même, l'étude de la pharmacocinétique de ces composés chez les sujets humains a montré une possible rétention systémique de 15 % du taux de scopolétine ingéré (**Obidoa et al., 1993**). En effet, la définition des substances nocives ou toxiques est généralement basée sur les doses produisant la mortalité plutôt que produisant la morbidité (maladies, invalidités). Ainsi, la scopolétine a été classé non toxique par ingestion. Cependant, l'inconfort du tractus gastro-intestinal peut causer la nausée et les vomissements et se confondre aux effets toxiques d'une substance. Elle pourrait également être nocive pour la santé d'un individu suivant l'ingestion, spécialement pour des organes où les dommages préexistants comme par exemple les hépatites, les maladies rénales sont présentes (**Cayman Chemical Company, 2016**).

I.2- GENERALITES SUR LE MANIOC

I.2.1- Botanique du manioc

Le manioc du nom scientifique *Manihot esculenta* Crantz, est une plante dicotylédone de la famille des *Euphorbiaceae*, du genre *Manihot* qui comprend plus de 98 espèces (**Nassar et al., 2008**). Il est originaire de l'Amérique du Sud et a été introduit dès le 16^{ème} siècle en Afrique par le phénomène de la colonisation (**El-Sharkrawy et Mabrouk, 2012 ; Achidi et al, 2015**). C'est un mini arbuste d'un à quatre mètres environ dont les racines et les feuilles sont comestibles par les hommes (**Betiku et Alade, 2011**) et parfois utilisées dans l'alimentation des animaux (Figure 5). Ses racines de tubercules se trouvent à quelques centimètres de la surface du sol et sont fixées au collet de la plante par un pédoncule. Elles sont au nombre de 5 à 10 suivant les espèces, leur longueur varie de 15 à 100 cm pour un poids avoisinant 3 kg.



Figure 5: Photo présentant la morphologie d'une jeune plante de manioc de la variété améliorée « 0110 » (tige : blanche vers le bas et verte au sommet, pétiole/feuille : verte) (**Njankouo**)

I.2.2- Ecologie du manioc

Le manioc est une plante cultivée en majorité dans les régions tropicales, subtropicales de préférence sous une pluviométrie annuelle variant de 600 à 4000 millimètres. Sa température optimale de croissance se situe entre 25° C à 29° C (**CMA/OAC, 2004**). Il a la capacité de s'adapter aux conditions climatiques défavorables (sècheresse prolongée) où d'autres plantes comme le sorgo, le maïs, le haricot, le soja ne pourraient continuer leur croissance (**Nassar et al., 2008 ; Rosenthal et Ort, 2012**). Il peut poursuivre sa croissance même dans les sols pauvres, déficients en nutriments et acides qui ne sont en général pas productifs pour d'autres cultures (**Temagne et al., 2015**). La culture du manioc se fait généralement par bouturage des plants rigoureusement sélectionnés. Les tiges sont mises sous terre de façon oblique avec une partie découverte. Après la mise sous terre des boutures, la récolte des racines a lieu 6 mois à 3 ans suivant que la variété est précoce ou pas (**CTA, 2016**).

I.2.3- Production du manioc

La production mondiale des tubercules de manioc en 2014 était évaluée à 270 millions de tonnes (**FAOSTAT, 2014**). L'Afrique centrale enregistre des pourcentages considérables, soit une moyenne de 27 millions de tonnes entre 1993 et 2014 et un pic de 40 millions de tonnes enregistrés en 2013 avec comme principaux producteurs la République démocratique du Congo et le Cameroun (Figure 6) (**CTA, 2016**). Au Cameroun, la production annuelle du manioc est évaluée à 2,5 millions de tonnes (**Ngome et al., 2013**) avec un pic de 4.287.177 tonnes atteint en 2013 (**FAOSTAT, 2015**). Elle représente 20 % des superficies cultivables emblavées et près

de 46 % de la production vivrière nationale (Emmanuel, 2013 ; Mouafor *et al.*, 2016). Le manioc constitue 80 % des tubercules dans la zone de forêt (IRAD, 2013) et est la première source d'hydrate de carbone au Sud du pays (Tricoche *et al.*, 2008). Il occupe avec ses produits 43 % des parts de marché des racines et tubercules, soit 26 % pour les produits transformés et 17 % pour les racines fraîches (PNDRT, 2003).

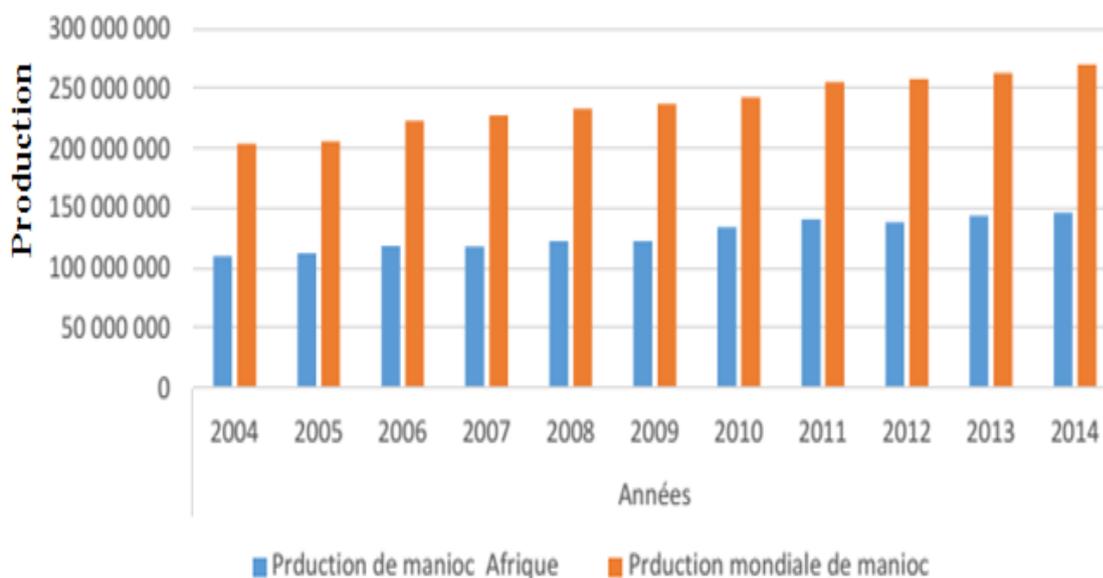


Figure 6 : Production (en tonne) de manioc en Afrique et dans le monde sur onze ans (CTA, 2016)

I.2.4- Contraintes de production

La filière manioc fait face à plusieurs difficultés qui affectent l'ensemble du système de production. Ces contraintes sont d'origines diverses.

I.2.4.1- Faible utilisation des technologies améliorées

Environ 90 % d'exploitants de la filière manioc sont des femmes rurales pauvres (Mvogo et Liang, 2012 ; Emmanuel, 2013). Du fait de leur condition financière précaire, elles utilisent des technologies archaïques voire manuelles lors des cultures et récoltes ce qui réduit considérablement le rendement de production.

I.2.4.2- Stockage

Les racines de manioc ont une durée de conservation très courte, 48 heures après la récolte, elles commencent à se dégrader (Zainuddin *et al.*, 2017). Cette durée de stockage très limitée impacte considérablement sur le marché du manioc. Les tubercules pourrissent lors du

transport, du stockage avant transformation, affectant ainsi le rendement de production, le pouvoir d'achat de même que la demande et le gain des cultivateurs. L'éloignement des zones de récoltes de celles de transformation et commercialisation augmente encore plus le pourcentage de perte. Toute la filière manioc se trouve affectée par cette conservation limitée.

I.2.4.3- Maladies ravageuses des cultures

Les cultures vivrières sont susceptibles d'infections virales et le manioc n'en fait pas exception. Environ dix-sept différents virus du manioc ont déjà été décrits, parmi lesquels huit affectent la culture en Afrique (**Thresh et Otim-Nape, 1994**). Ces virus et parasites sont de véritables destructeurs des récoltes ; ils entraînent des pertes considérables des plantations à des intensités variables suivant le vecteur responsable, la variété de manioc et même la situation géographique du champ. Ainsi, on peut énumérer plusieurs maladies du manioc.

I.2.4.3.1- Mosaïque du manioc

La mosaïque du manioc a été découverte depuis 1894 (Figure7), elle a sévi dans plusieurs pays Africains et a causé beaucoup de pertes de récoltes (**Hillocks et Thresh, 2000**). Elle est causée par le virus de la famille des *Geminiviridae* et est transmise par un aleurode appartenant à la famille des *Aleyrodidae* appelé *Bemisia tabaci Gennadius* (**Sseruwagi et al., 2004**). Le virus se dissémine au travers de la bouture de manioc et attaque la plante entière. Les symptômes les plus visibles sont localisés au niveau des feuilles qui jaunissent et sont déformées; parfois on observe une réduction de leurs dimensions normales (**Hillocks et Thresh, 2000**).



Figure 7 : Photo d'une plante de manioc attaqué par la mosaïque (**Hillocks et Thresh, 2000**)

I.2.4.3.2- Striure brune du manioc

C'est une maladie virale causée par deux espèces de virus : le *cassava brown streak virus* et l'*Ugandan cassava streak virus* (Figure 8). Ces virus agissent au niveau des feuilles et de la racine ; laissant apparaître des tâches jaunes sur les feuilles et provoquant des nécroses brunes dans la racine. Les boutures nécrosées issues des plantes malades ne peuvent plus être utilisées pour de nouvelles plantations (Hillocks et Thresh, 2000).



Figure 8 : Manioc attaqué par la striure brune a) feuille ; b) racine (Hillocks et Thresh, 2000)

I.2.4.3.3- Bactériose vasculaire du manioc

C'est une maladie bactérienne majeure, endémique qui attaque les feuilles et les tiges. Elle est causée par une protéobactérie, la *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* qui agit premièrement au niveau des feuilles laissant apparaître des grandes taches brunes. Les feuilles infectées meurent suivant la sévérité de l'infection qui se propage au niveau des pétioles, tiges ligneuses et tissus vasculaires (FAO, 2014).

I.2.5-Consommation du manioc au Cameroun

Les denrées alimentaires issues du manioc rentrent dans l'alimentation de base de la quasi-totalité des camerounais avec une consommation moyenne de 63 kg par ménage et par an dans la seule ville de Yaoundé. Elles contribuent pour 7,6 % d'apport total en calorie alimentaire au niveau national, occupant ainsi la deuxième position derrière le plantain (9,77 %) (Emmanuel, 2013). Les tubercules sont généralement consommés sous forme bouillie ou transformés en *gari*, bâton de manioc, *Mintoumba*, *Fufu*, *water fufu*, amidon (Ngome et al., 2013).

I.2.6- Composition du manioc en éléments nutritifs

La composition du manioc en éléments nutritifs dépend des facteurs tels que la variété, la localisation géographique, la composition du sol, les conditions environnementales de même que les tissus spécifiques (racines et feuilles). Les feuilles de manioc sont riches en fer, zinc, manganèse, magnésium, calcium, vitamines B1, B2, C, en caroténoïde (Wobeto *et al.*, 2006) et en protéines (21– 39 %) (Montagnac *et al.*, 2009 ; El-Sharkrawy et Mabrouk, 2012). Ces dernières sont égales en termes de qualité aux protéines des œufs, une source protéique de référence (Montagnac *et al.*, 2009). La racine de manioc a une teneur en hydrate de carbone de 80 à 90 % de la matière sèche (Gil et Buitrago, 2002), une très faible teneur en lipide soit 0,1 à 0,3 % du poids de la matière fraîche. Elle contient une grande quantité d'arginine, d'acide glutamique et d'acide aspartique. Par contre, elle est déficitaire en certains acides aminés tels que la méthionine, la cystéine et le tryptophane (Gil et Buitrago, 2002 ; Djuikwo *et al.*, 2011).

I.2.7- Différentes variétés de manioc

Le *codex alimentarius commission* classe les variétés de manioc en deux grands groupes suivant leur teneur en HCN : les variétés amères et les variétés sucrées. La variété sucrée ou améliorée a une teneur en HCN inférieure à 50 mg/kg de poids frais (Codex Alimentarius Commission, 2013). Elle est issue des semences améliorées et prioritairement destinée à l'alimentation humaine. Les variétés améliorées sont adaptées aux différentes zones écologiques du Cameroun et produisent des rendements très intéressants. Pour un hectare, par exemple, ces variétés permettent d'obtenir jusqu'à 25 à 40 tonnes de manioc, contre 12 tonnes seulement pour celles traditionnelles (Mouafor *et al.*, 2016). Les variétés amères ou traditionnelles encore appelées locales ont une teneur en HCN supérieure à 50 mg/kg de poids frais (Codex Alimentarius Commission, 2013). Elles sont issues des semences traditionnelles qui subissent nécessairement des traitements post-récoltes avant consommation.

Compte tenu de l'importante croissance, dans le monde entier, du manioc comme source de nourriture pour l'homme et les animaux, et de matière première pour les industries, il existe une demande de plus en plus marquée pour des cultivars présentant certaines caractéristiques spécifiques et adaptés à différents environnements. En effet, la sélection variétale du manioc a pour objectifs premiers de créer des variétés au rendement élevé et résistantes aux maladies, qui fournissent des boutures de bonne qualité pour assurer une reprise à 100 % et des tubercules sessiles à forte teneur en matière sèche pour faciliter la transformation. La sélection doit donc concilier deux caractères entre lesquels la compétition est forte et permanente : la tubérisation des racines et le développement des tiges (Cock, 1985). Dès lors, des variétés hautement

spécialisées ont été mises au point pour satisfaire à des utilisations finales de plus en plus diversifiées et en concurrence mutuelle. Au Cameroun, de nouvelles variétés ont été adoptées pour accompagner la culture dans les savanes sèches, les régions semi-arides et subtropicales, et l'accélération de la tendance vers une production répondant aux demandes du marché (Tableau I) (Whyte, 2012). Cependant, une enquête menée par Njukwe *et al.* (2013) sur 120 producteurs de manioc répartis dans 4 Régions du Cameroun (Ebolowa, Bertoua, Bamenda, N'Gaoundéré) a montré que 96,7% de la population avaient une préférence pour les variétés précoces, 89,2 % pour le rendement élevé et 88,3 % pour les variétés résistantes aux maladies. De plus les producteurs de Bertoua et Ebolowa avaient une préférence pour les variétés foliaires, aux racines douces et la ramification rapide des branches (TMS 92/0023, TMS 96/0326) tandis que ceux de Bamenda et N'Gaoundéré avaient une préférence plutôt pour les variétés de grandes tailles, résistantes à la sécheresse (TMS 92/0057), fibreuses (TMS 96/1414) pour la fabrication du *gari* et dans quelques cas les variétés florissantes (TMS 94/0121) pour l'apiculture.

Tableau I : Localisation de quelques variétés améliorées de manioc en fonction de la zone agro-écologique au Cameroun (CTA, 2016 ; Temegne, 2015)

Variétés	Localisation	Qualités et spécificités
79308, 7619 ; 7621 ; 961414	Haut plateaux (Nord-Ouest, Ouest)	Résistance aux maladies, fibreuses, ramification tardive, variétés précoces, durée de stockage en sol longue; rendement élevé ; qualité nutritionnelle améliorée (Ca, Mg, K, Fer et Zn)
8017 ; 8034 ; 8061;0110; 04	Zone forestière à une saison de pluie / zone côtière (Sud- 0; Champion; fonctionnaire Ouest, littoral et quelques localités du Sud)	Résistance aux maladies, ramification rapide, variétés précoces, foliation, riche en caroténoïde ; rendement élevé ; qualité nutritionnelle améliorée (Ca, Mg, K, Fer et Zn)
1005;1171;04 0;1285 ; 8017 ; 8034;8061;01 10;Champion;	Zone forestière à deux saisons des pluies (Centre, Sud, Est)	Résistance aux maladies, ramification rapide, variétés précoces, foliation, teneur élevée en matière sèche; riche en zinc, fer et caroténoïde ; rendement élevé ; qualité nutritionnelle améliorée (N, Ca, Mg, K, P, Fer et Zn)
0844 ; 0140 ; 0064 ; 0229 ; 0658;92/0326 ; 95109	Zone des hautes savanes guinéennes (plateau de l'Adamaoua)	Résistance aux maladies, variétés précoces, teneur élevée en matière sèche, tolérance à la sécheresse, floraison ; rendement élevé ; qualité nutritionnelle améliorée (Ca, Mg, Fer et Zn)
0844 ; 0140 ; 0648 ; 0532 ; 0036	Zone soudano-sahélienne (surtout le Nord)	Résistance aux maladies, ramification tardive, variétés précoces, teneur élevée en matière sèche, tolérance à la sécheresse, rendement élevé ; qualité nutritionnelle améliorée (Ca, Mg, K, P, Fer et Zn)

I.2.8- Toxicologie du manioc

Le manioc contient dans les vacuoles des cellules de tous ses tissus des glucosides cyanogéniques. Il s'agit des substances à groupe nitrile (-CN). Les deux principaux glucosides cyanogéniques sont la linamarine, qui est la plus abondante et la lotaustraline. Leur toxicité est due à la libération du HCN suite à une réaction chimique appelée hydrolyse (**Wobeto et al., 2007 ; Montagnac et al., 2009**). L'hydrolyse de la linamarine est catalysée par l'enzyme linamarase, contenue dans les parois cellulaires. Les glucosides cyanogéniques offrent au manioc une défense efficace contre la plupart des ravageurs.

I.2.8.1- Biosynthèse des glucosides cyanogéniques

Les glucosides cyanogéniques sont des métabolites secondaires α -hydroxynitrile des plantes. Ils sont des constituants dérivés d'acides aminés des plantes. Les précurseurs de biosynthèse sont des L-amino acide, qui sont hydroxylés. Les acides N- hydroxylamine sont convertis en aldoximes et en nitriles, puis hydroxylés en α -hydroxynitriles et glycosylés en glucosides cyanogéniques. En effet, sa biosynthèse dans le manioc a lieu dans les feuilles par N-hydroxylation de la valine ou de l'isoleucine, puis distribué dans les tiges et racines où ils sont stockés dans les vacuoles cellulaires (Figure 9) (**Orjiekwe et al., 2013**).

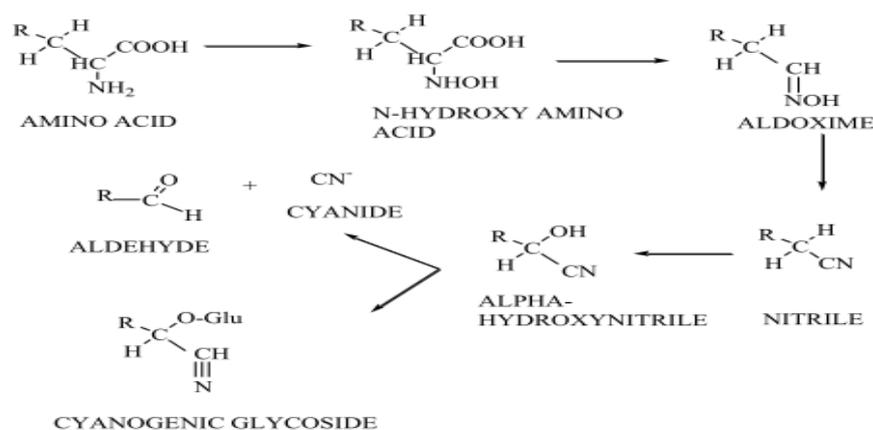


Figure 9 : Biosynthèse du glycoside cyanogénique (**Conn, 1979**)

I.2.8.2- Libération du HCN

Dès qu'une partie de la plante est blessée, par exemple lorsqu'un insecte commence à ronger une feuille ou quand on procède à la transformation, la linamarase entre en contact avec la linamarine et le HCN commence à être généré (Figure 10). C'est un composé volatil et fortement soluble dans l'eau, il s'échappe pendant la transformation, soit en se diluant dans l'eau de trempage, soit dans l'air pendant le séchage, soit en s'évaporant pendant la cuisson ou la torréfaction. Les feuilles, la peau et la tige contiennent plus de glucosides cyanogéniques

(parfois plus de 400 mg de HCN/kg) et de linamarase que toutes les autres parties du manioc (Younoussa *et al.*, 2013).

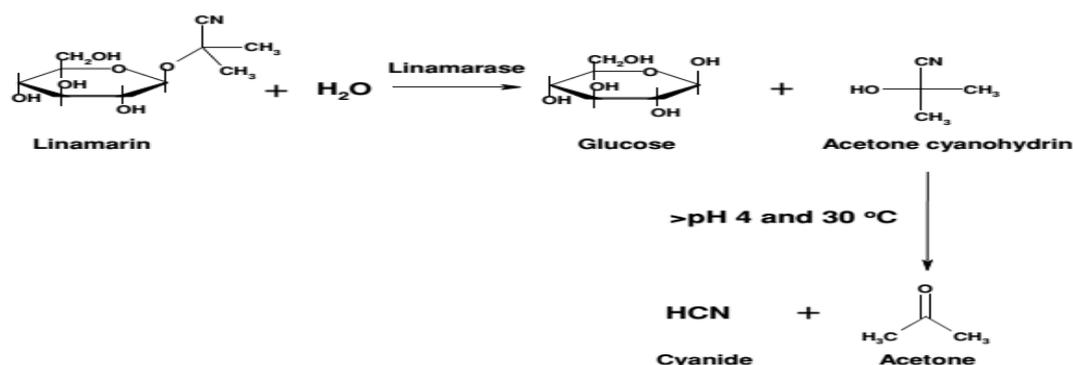


Figure 10 : Réaction de cyanogénèse (Montagnac *et al.*, 2009)

I.2.8.3- Pathologies liées aux composés cyanogéniques et traitements

La consommation régulière du manioc est à l'origine de plusieurs troubles pathologiques dus à la présence des produits de dégradation des composés cyanogéniques. Sont notamment cités : le goitre thyroïdien, le nanisme et la neuropathie tropicale ataxique (Kobawila *et al.*, 2005). Les individus atteints de neuropathie ont une faible teneur en soufre dans leur sang et une concentration élevée en thiocyanates (Bennett *et al.*, 1987). En outre, une forte consommation de HCN provenant de la farine de manioc provoque une maladie appelée Konzo. Celle-ci consiste en une paralysie irréversible des jambes chez les enfants et les femmes en âge de procréer (Essers *et al.*, 1992). Les ions cyanures (CN⁻) se lient à l'ion ferrique du cytochrome-oxydase, enzyme mitochondriale responsable des oxydations cellulaires chez les êtres vivants aérobies et provoquent l'inhibition de l'enzyme (Friedman, 1980). Il s'ensuit une hypoxie cytotoxique qui entraîne dysfonctionnement et mort cellulaire (Gruhnert *et al.*, 1994). L'intoxication au HCN est traitée par administration d'amyle nitrite, qui facilite la respiration cellulaire (Akanji *et al.*, 1990). Ils ont également montré que l'usage du nitrite de sodium par voie intraveineuse, du diméthylaminophénol et d'hydrochlorure d'hydroxylamine par voie intramusculaire et d'amyle nitrite par inhalation sont efficaces pour surmonter la dose létale de HCN. La détoxification du HCN est aussi facilitée par l'administration de thiosulfate nécessaire à la conversion en thiocyanates:



I.2.8.4- Transformation du manioc en produits dérivés

La transformation du manioc est une opération très importante en Afrique. On estime que 70 % du manioc camerounais sont transformés avant utilisation. Les racines de manioc sont

transformées afin de fabriquer des produits dérivés dont la plus-value dépasse celle des racines elles-mêmes (USAID/CORAF/SONGHAI, 2010). La nécessité de transformer les racines de manioc est d'ailleurs fonction de deux problèmes que sont la haute périssabilité et la teneur souvent élevée en glucosides cyanogéniques de la plupart des variétés. Les avantages de la transformation sont:

- Augmentation, liée à la fermentation, de la valeur nutritive ;
- Réduction de la teneur en glucosides cyanogéniques ;
- Fabrication de produits se conservant mieux que les racines fraîches ;
- Réduction des coûts de transport des zones rurales vers les centres urbains en raison de la réduction de poids dans le cas des produits secs ;
- Stabilisation des fluctuations annuelles des quantités disponibles sur le marché.

La transformation du manioc en produits durables (par exemple cossettes et *gari*) permet d'éviter les pertes. Au cours des opérations telles que le trempage, la fermentation, la torréfaction ou la cuisson, la teneur en glucosides cyanogéniques est en outre réduite à un taux minimum, ce qui rend le produit comestible pour l'Homme. Généralement, le taux d'élimination du HCN oscille entre 70 et 100 % (Agbor-Egbe et Lape Mbome, 2006). Il ne fait pas de doute qu'il y a aussi d'autres facteurs, d'ordre culinaire, qui ont amené les gens à transformer les racines de manioc. C'est surtout ce dernier aspect qui est à l'origine de la diversification des produits issus du manioc au Cameroun voir ailleurs. Sa gamme de produits alimentaires est en effet l'expression de la culture de chaque peuple, et il n'est pas surprenant du tout que de nombreuses ethnies s'identifient à certains plats traditionnels.

I.2.8.5- Quelques méthodes de détoxification du manioc

Les méthodes suivantes sont utilisées pendant la transformation dans le but d'éliminer le HCN des produits (USAID/CORAF/SONGHAI, 2010):

Epluchage : La peau contient beaucoup plus de glucosides cyanogéniques que les autres tissus des racines. Le rapport varie de 5 unités dans la peau pour 1 à l'intérieur, et va jusqu'à 10 pour 1. En épluchant, on peut déjà enlever environ 80 % du poison.

Cuisson à l'étuvée : Le taux d'élimination du HCN par cuisson dépend de la quantité d'eau utilisée, de la durée de la cuisson et de la taille des morceaux de racine. Plus on utilise d'eau et plus la cuisson est longue, plus le HCN est lessivé. Si un morceau de 50 g retient près de 75 % de la teneur initiale en cyanogènes après cuisson, celui de 25 g retiendra 50 % et celui de 5 g

25 % seulement. La cuisson n'étant pas très efficace pour l'élimination des cyanogènes, elle ne peut être recommandée comme méthode unique que pour les variétés à faible teneur.

Séchage : Le séchage est recommandé pour les variétés à faible teneur en cyanogènes. Des essais ont montré que lors du séchage naturel au soleil, l'élimination des glucosides cyanogéniques est beaucoup plus efficace que celle réalisée par séchage artificiel à 50° C. Des cossettes de petite taille facilitent ce processus. Après séchage, la teneur en cyanogènes peut encore varier entre 25 et 80 % selon la technique utilisée. Si le séchage est accéléré, l'élimination est de 10 à 30 % seulement, avec des teneurs résiduelles allant jusqu'à 90 %.

Blanchiment et séchage : Le blanchiment de cossettes durant 5 à 10 minutes permet d'éliminer près de 50 % des cyanogènes. Le séchage naturel après blanchiment a peu d'influence sur le reste des glucosides cyanogéniques étant donné que la linamarase est inactivée au cours de ce processus. Si les cossettes sont recuites après séchage, il y aura une réduction de 50 % des cyanogènes restants.

Râpage et séchage au soleil : Cette méthode favorise grandement l'élimination des cyanogènes. La rétention se situe autour de 1,5 à 3,2 % du contenu original, ce qui correspond à environ 0,5 à 17 mg d'équivalent HCN/kg.

Rouissage/fermentation : il consiste à tremper dans l'eau les tubercules de manioc (épluchés ou pas) pendant une période d'environ 3 à 5 jours. Cette immersion favorise la fermentation et un ensemble de mécanismes biochimiques, microbiologiques entraînant ainsi une forte réduction de la teneur des composés cyanogéniques et le ramollissement des racines de tubercules (Agbor-Egbe et Lape Mbome, 2006).

Garification : Pendant les différentes opérations de fabrication de gari, 80 à 95 % des cyanogènes disparaissent. La transformation en certains plats amène une réduction supplémentaire de la teneur restante.

Production de chickwangué : Cette transformation est l'une des plus efficaces en termes de réduction des glucosides cyanogéniques, lesquels sont presque totalement éliminés.

Stockage : Un stockage prolongé des produits transformés contribue à la réduction des cyanogènes. Ce phénomène a été observé sur un gari stocké pendant 4 mois.

I.2.9- Mécanisme de la détérioration physiologique post-récolte du manioc

La détérioration physiologique post-récolte, considérée comme une réponse à un stress abiotique (Beeching *et al.*, 2002), est un ensemble de processus complexe qui se déroulent dans le manioc après la récolte (Salcedo et Siritunga, 2011). Elle débute par une étape primaire qui est physiologique et fait intervenir les enzymes oxydatives générant les phénols, les catéchines,

les leucoanthocyanidines (Zidenga, 2012 ; García *et al.*, 2013). En effet, la blessure du tubercule causée par les manipulations lors de la récolte entraîne un stress oxydatif qui, 15 minutes après, est suivie par la production des espèces oxygénées réactives et 36 heures après du radical hydroxyle (OH⁻) (Zainuddin *et al.*, 2017). En même temps on assiste à l'altération de l'expression de certains gènes et à l'accumulation des métabolites secondaires. Les hydroxycoumarines tels que la scopolétine et son glycoside scopoline s'accumulent majoritairement, contrairement à l'esculétine et son glycoside esculine qui s'accumulent faiblement (Bayoumi *et al.*, 2008).

I.2.10- Aspect physique du processus de détérioration physiologique post-Récolte

Sur le plan physique on observe dès 24 heures après la récolte, l'apparition sur le parenchyme et le cortex de la racine de manioc des stries bleu/noire ou brun qui s'accroissent avec le temps (Figure 11) (Reilly *et al.*, 2004).

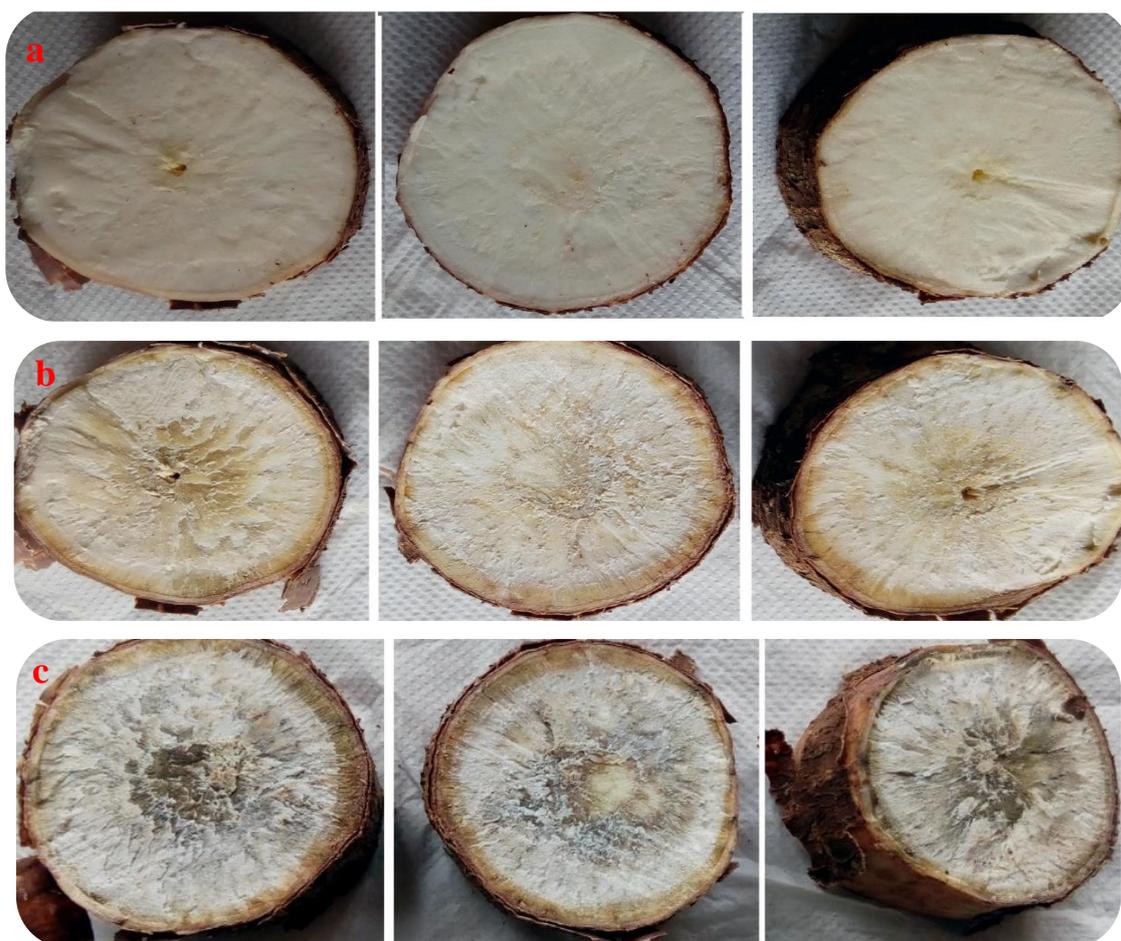


Figure 11 : Photo des tranches de la racine de manioc : a) quelques heures après la récolte ; b) ; deux jours après la récolte ; c) quatre jours après récolte (Njankouo)

La coupe transversale de la racine de manioc est représentée dans la figure 12 ci-dessous.

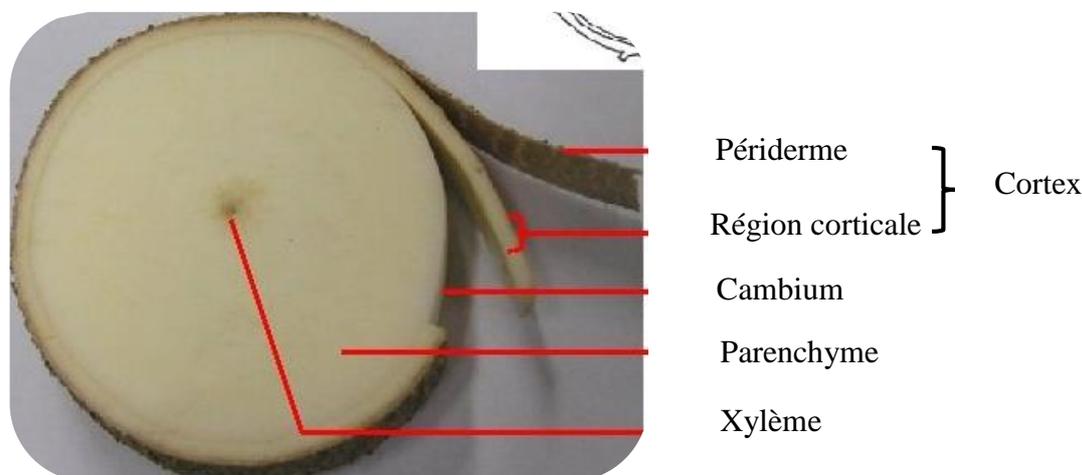
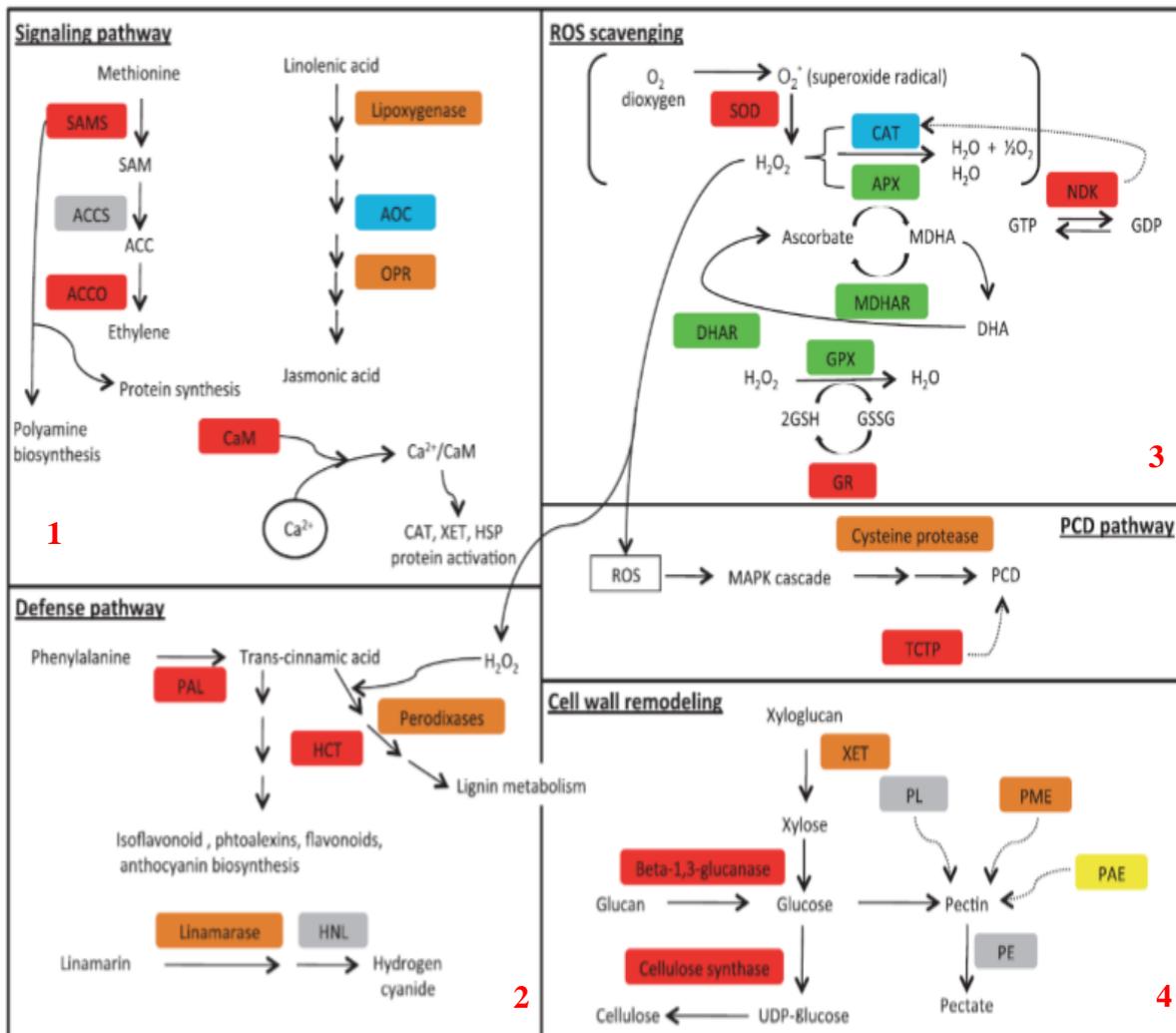


Figure 12 : Structure annotée d'une tranche de la racine de manioc

I.2.11-Facteurs affectants le processus de détérioration physiologique post-récolte

Le mécanisme de détérioration post-récolte est influencé par les facteurs génétiques, environnementaux, la composition du manioc en microéléments, et même la teneur en oxygène dont une baisse retarde l'apparition des premiers symptômes (**Beeching et al., 2002**). Des études réalisées par **Sanchez et al. (2006)** montrent que la teneur élevée d'antioxydant tel que la β -carotène rend la racine de manioc moins vulnérable à la détérioration physiologique post-récolte; due au fait que les propriétés antioxydants des caroténoïdes ont une action inhibitrice sur les espèces oxygénées réactives (EOR) qui sont impliquées dans le stress oxydatif induisant la détérioration physiologique post-récolte. Le déséquilibre entre piégeage et production des EOR entraîne le flux oxydatif qui accélère la détérioration physiologique post-récolte (**Apostol et al., 1989**). De même, les travaux de **Zidenga et al. (2012)** ont montré que le potentiel cyanogénique des racines de manioc a un impact sur la détérioration physiologique post-récolte, car le HCN favorise les flux oxydatifs (Figure 13). D'autres études ont montré qu'une application expérimentale du HCN sur des racines de manioc favorise la production des EOR. Ceci s'explique par le fait que le HCN inhibe le cytochrome C oxydase dans la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie favorisant une production massive et rapide des EOR (**Cooper et Brown, 2008**). Au début de la détérioration physiologique post-récolte le flux oxydatif est déclenché 15 min après la récolte produisant et accumulant une large gamme de EOR. Les EOR majeurs sont les ions superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène qui sont générés par transfert d'électron à l'extérieure par la chaîne de transport d'électron (**Xu et al., 2013**). Cependant, **Ahmed Fathoni, (2017)** et **Shi Liu, (2016)** ont montré

que l'on pouvait limiter la détérioration physiologique post-récolte en ciblant les gènes qui codent pour les enzymes assurant l'interconversion de la scopolétine et de la scopoline (inhibition de la scopolétine glucosyl transférase et la surexpression de la scopoline-B-glycosidase dans le manioc transgénique) et l'enzyme clé de la biosynthèse de la scopolétine (inhibition de la Feruloil coa-6'-hydroxylase) pour limiter l'accumulation des composés phénylpropanoïde et par conséquent le développement de la détérioration physiologique post-récolte du manioc.



Légende : 1. Stimulation des voies de signalisation cellulaires libérant les molécules de signalisation telles que l'acide jasmonique, l'éthylène, l'acide salicylique..., 2. Activation des voies de défense (accumulation des métabolites secondaires et la libération du HCN), 3. Protection des tissus cellulaires par le piégeage des EOR, 4. Réparation des parois cellulaire par la biosynthèse de la cellulose et de la pectine.

Figure 13 : Modèle des voies biologiques affectées pendant la détérioration physiologique post-récolte du manioc (Owiti *et al.*, 2011)

I.3- GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS MYCOTOXINOGENES

I.3.1- Définition et types de champignons

Les champignons formant un règne à part entière, le règne des Fungi ou des Eumycota sont des microorganismes eucaryotes, généralement filamenteux, saprophytes ou parasites, hétérotrophes dépendant d'une source de carbone organique. La colonie fongique est constituée d'un réseau d'hyphes appelé mycélium. Ils produisent un grand nombre de spores leur assurant un pouvoir de contamination considérable. Elles sont susceptibles d'être présentes dans le sol (habitat primaire), l'air atmosphérique, l'eau et notamment sur une large gamme d'aliments variés, végétaux ou animaux, les céréales (maïs, riz, orge, blé, etc.) et leurs produits dérivés, les lentilles, le tournesol, le soja, les fruits frais ou secs, les arachides, les amandes, les noix, les pistaches, le café, les graines de coton, les épices (poivre, paprika, gingembre), les jus de fruits, le cidre, les pâtures, les aliments de bétail et de volailles, les ensilages et les fourrages, le lait et ses dérivés, viande (**Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016**).

En effet, les moisissures peuvent se présenter sur deux facettes :

- Les unes bénéfiques ou utiles dans la transformation de matières premières alimentaires (en particulier lors de la fermentation), la production d'antibiotiques, d'enzymes, de condiments, d'agents de saveurs, de protéines pouvant être utiles à la santé humaine (industrie pharmaceutique, agroalimentaire, biotechnologie) (Figure14). Cependant, une souche utilisée par l'industrie alimentaire n'est pas forcément atoxique et peut devenir toxigène dans certains milieux.
- Les autres nuisibles pour l'homme et les animaux provoquent l'altération des denrées alimentaires avec production de métabolites toxiques (mycotoxines), des mycoses ou des allergies.



Figure 14 : Différentes utilisations des moisissures (**Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016**)

On peut ainsi différencier principalement 2 types de moisissures (Figure 15) :

- Les moisissures hygrophiles ou de « champs » champignons qui se développent lorsque l'activité de l'eau est importante. Principalement *Fusarium* sp et *Alternaria* sp qui contaminent les produits agricoles avant et pendant la récolte. Récemment, des données montrent également que *Pyrenophora tritici-repentis* (agent causal de la tache auréolée du blé) est un champignon phytopathogène et mycotoxinogène hygrophile (Bouras *et al.*, 2009) ;
- Les moisissures xérotolérantes ou «de stockage », les plus redoutables font partie des *Aspergillus* sp et les *Penicillium* sp ;
- On peut citer également un troisième type qui est rare, appartenant aux moisissures xérophiles, et qui se développe lorsque le grain est moins humide (Abbott, 2002 ; Bouras *et al.*, 2016).

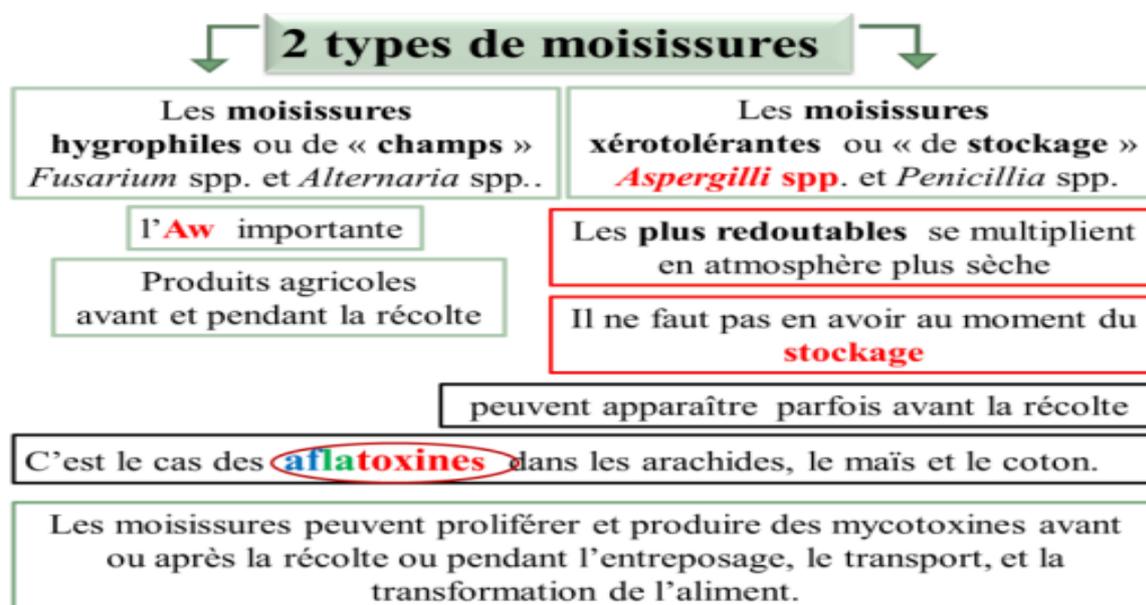


Figure 15 : Propriétés des moisissures toxino-gènes (Bouras *et al.*, 2016)

I.3.2- Isolement et identification des moisissures

I.3.2.1- Isolement des moisissures

La plupart des milieux naturels ; air, sol, eau et matières premières alimentaires peuvent servir de matériel de départ pour l'isolement des moisissures (Karam, 2000 ; Julien, 2002), ces échantillons naturels contiennent aussi plusieurs espèces bactériennes et des levures. L'élimination de ces microorganismes pour l'isolement sélectif des champignons filamenteux est réalisée en combinant le traitement des milieux de cultures par un antibiotique avec le choix et le contrôle des conditions de culture. Il est important de choisir un échantillon aussi important qui permet la mise en évidence du microorganisme désiré (Ulacio *et al.*, 1997).

I.3.2.1.1- Milieux de culture

Les milieux de culture sont peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures, le milieu Czapek permet d'éliminer les bactéries grâce à son acidité, le milieu oxytétracycline glucose agar (OGA) et le milieu Saburraux sont utilisés pour l'isolement des levures et des moisissures (**Botton et al. 1990**). Dans le cas des espèces phytopathogènes, il est préférable d'utiliser des milieux à base de décoction végétale comme le milieu pomme de terre gélosée et le bouillon d'haricot gélosé (**Guiraud, 1998**).

I.3.2.1.2- Addition des antibiotiques

L'isolement des moisissures est réalisé le plus souvent à partir de produits contenant, également, des bactéries et des levures, donc il est nécessaire d'employer des inhibiteurs spécifiques pour les détruire. L'addition d'antibiotiques aux milieux de cultures est utilisée pour empêcher le développement des bactéries. Les antibiotiques utilisés sont : le Chloramphénicol 0, 5 mg/mL, l'Oxytétracycline 0, 1 mg/mL, la Streptomycine 30 à 40 µg/mL, la Colistine 0, 08 mg/mL, la Novobiocine 0, 1 mg/mL ou des colorants (rose Bengale 35 à 67 mg/L, cristal violet 10 mg/L) (**Guiraud, 1998**). En raison de leur stabilité, la Gentamycine et le Chloramphénicol peuvent être stérilisés avec le milieu ; leurs larges spectres d'action en font des antibiotiques très utilisés (**Botton et al., 1999**).

I.3.2.1.3- Choix des milieux de cultures sélectifs

Le choix des milieux de cultures est également déterminant dans l'isolement des moisissures (**Harrigan et Mc Cance, 1976**). Ces milieux sont utilisés pour la détermination de champignons appartenant le plus souvent à des genres difficiles à mettre en évidence, en favorisant la croissance de certains genres ou espèces facilitant ainsi leur caractérisation; comme exemple; *A. flavus* et *A. parasitacus* isolés sur milieu *Aspergillus flavus* et *parasiticus* agar (AFPA) qui permet une caractérisation simple par la couleur jaune orangé de l'envers des colonies, milieu gélose à la créatine (CREA) permet d'identifier, par leur apparence, diverses espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, et de *Fusarium* sur gélose à la Dichloran-chloranphénicol (DCPA) ou sur gélose à l'Iprodione et au Dichlorane (CZID) (**Guiraud, 1998**).

I.3.2.1.4- Techniques d'isolements

Il existe deux types de techniques permettant de détecter la présence des champignons du sol et de les isoler. Avec les techniques directes, on obtient directement le développement de colonies sur un milieu nutritif plus ou moins sélectif, soit par incorporation du sol dans le milieu, soit, plus rarement, par immersion dans le sol du milieu fixé sur un support. Ces

méthodes ne sont utilisables que pour des champignons capables d'un développement saprophyte. Dans le deuxième cas, la technique indirecte consiste à piéger le champignon dans le sol à l'aide de substrats vivants ou inertes, puis à l'isoler à partir de ces substrats lorsque sa biologie le permet (**Davet et Rouxel, 1997**).

I.3.2.2- Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

I.3.2.2.1- Techniques d'identification

Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'observation de critères morphologiques : d'une part par l'observation macroscopique du mycélium (aspect, couleur et odeur des colonies) et d'autre part, par une observation microscopique des structures reproductrices (**Diguta, 2010**).

I.3.2.2.1.1- Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopiques (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores...) (**Cahagnier et Richard-Molard, 1998**).

I.3.2.2.1.1.1- Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

- Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

- La taille des colonies : Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).
- La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).
- Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (**Botton et al., 1990**).

I.3.2.2.1.1.2- Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (**Cahagnier et Richard-Mollard, 1998**).

I.3.2.2.1.1.2.1- Le thalle

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium; le thalle peut être siphonné ou septé :

- Le thalle siphonné ou non cloisonné, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm) est caractéristique des Zygomycètes ;
- Le thalle septé ou cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes (**Badillet et al., 1987**).

I.3.2.2.1.1.2.2- Les spores

Ce sont le produit de la reproduction asexuée pouvant être endogènes ou exogènes :

- **Les spores endogènes** (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les Mucorales, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.
- **Les spores exogènes** (conidies), retrouvées chez les Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell *et al.*, 2013).

I.3.2.2.1.1.2.3- Aspect des spores

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores :

- **Les amérospores** : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium, Aspergillus*)
- **Les didymospores** : spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;
- **Les phragmospores** : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*);
- **Les dictyospores** : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
- **Les scolécospores** : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

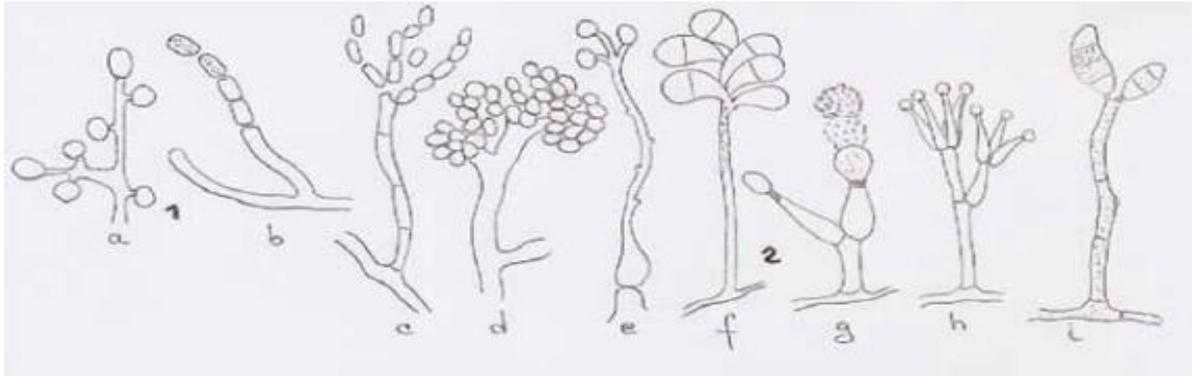
I.3.2.2.1.1.3- Modes de formation des conidies

Le mode thalique : la formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en distingue deux variantes principales (Figure 16):

- ✓ Le type thalique solitaire (*Chrysosporium*) ;
- ✓ Le type thalique arthrique (*Geotrichum*).

Le mode blastique : les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence de bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère. On en distingue plusieurs variantes:

- ✓ Le type blastique acropète, (*Cladosporium, Alternaria*) ;
- ✓ Le type blastique synchrone, (*Botrytis*) ;
- ✓ Le type blastique sympodial, (*Beauveria*) ;
- ✓ Le type blastique régressif (*Trichothecium*) ;
- ✓ Le type blastique percurrent (annellidique), (*Scopulariopsis*) ;
- ✓ Le type blastique phialidique, (*Aspergillus, Penicillium*) ;
- ✓ Le type blastique porique, (*Alternaria, Curvularia*) (**Botton *et al.*, 1990**).



Légende : 1. **Formation thallique :** a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthritique (*Geotrichum*) 2. **Formation blastique :** c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodiale (*Beauveria*), f : régressif (*Trichothecium*), g: annélide (*Scopulariopsis*), h: phialidique (*Penicillium*), i: poric (*Curvularia*).

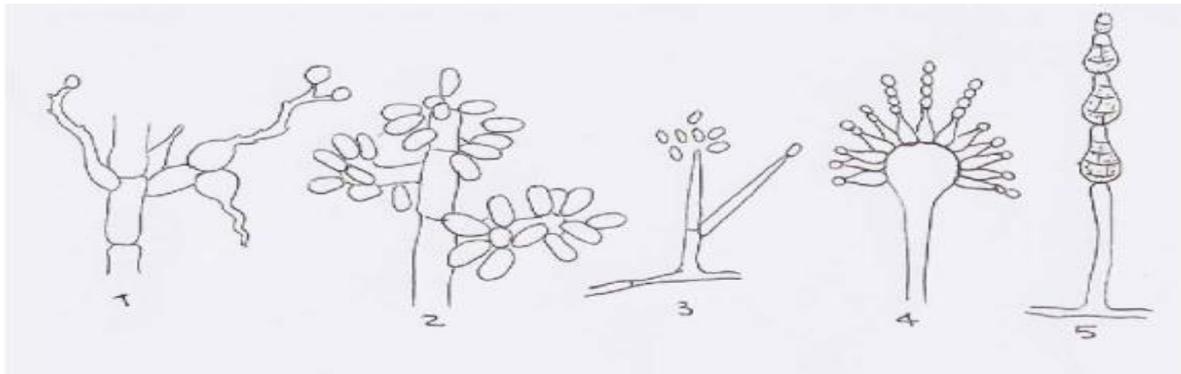
Figure 16 : Modes de formation des conidies (**Botton et al., 1990**)

I.3.2.2.1.1.4- Mode de groupement des conidies

Les conidies sont, en général, regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène. L'organisation de ce regroupement est aussi un facteur d'identification.

Les principaux types sont (Figure 17) :

- ✓ Grappes, (*Beauveria*, *Trichothecium*) ;
- ✓ Masse, (*Botrytis*) ;
- ✓ Têtes ou balles, (*Acremonium*, *Trichoderma*) ;
- ✓ Chaînes basipètes, (*Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*) ;
- ✓ Chaînes acropètes, (*Cladosporium*, *Alternaria*) (**Botton et al., 1990**).



Légende : 1. **Grappes** (*Beauveria*), 2. **Masses** (*Botrytis*), 3. **Têtes** (*Acremonium*), 4. **Chaînes basipètes** (*Aspergillus*), 5. **Chaînes acropètes** (*Alternaria*).

Figure 17 : Modes de groupement des conidies des moisissures (**Botton et al., 1990**)

I.3.2.2.1.1.5- Mode d'implantation des cellules conidiogènes

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces (**De Hoog et**

Guarro, 1995). Les cellules conidiogènes non différenciées sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées dans une position terminale (*Aureobasidium*). Les cellules conidiogènes sont différenciées. Elles peuvent alors être :

- ✓ Directement insérées sur les filaments végétatifs (*Acremonium, Fusarium*) ;
- ✓ Bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :
 - a) Regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (*Aspergillus*);
 - b) Regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (*Penicillium*);
 - c) Disposées en verticille le long du conidiophore (*Verticillium*) ;
- ✓ Bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés ;
- ✓ Conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corémie (*Graphium*) ;
- ✓ Conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (*Myrothecium*).

I.3.2.2.1.1.6- Présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée

Les structures protectrices issues de la reproduction asexuée sont les pycnides et les acervules:

- ✓ Les pycnides sont des nodules mycéliens, creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est tapissée des conidiophores produisant des conidies qui sont libérées à maturité par l'ostiole (*Phoma*).
- ✓ Les acervules sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture.

A l'intérieur, on a une assise de conidiophores produisant les conidies. Sur les milieux de culture seules les pycnides sont visibles, les acervules ne se formant que dans les tissus de l'hôte végétal (**De Hoog et Guarro, 1995**).

Les structures protectrices issues de la reproduction sexuée peuvent être observées chez les Ascomycètes ; l'ascocarpe, qui protège l'asque peut être de plusieurs types :

- ✓ Les apothécies : l'ascocarpe est ouvert, en forme de coupe, portant les asques en surface;

- ✓ Les cléistothèques : l'ascocarpe est arrondi et lisse ; il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques ; il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer les asques sphériques octosporées (*Emericella*);
- ✓ Les périthèces : l'ascocarpe à la forme d'une bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture (ostiole) ; le périthèce renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unitunique) ou à deux membranes (bitunique) et contenant chacun 8 ascospores (*Chaetomium*).

I.3.2.2.1.1.7- Présence des chlamydospores

Les chlamydospores sont des éléments de résistance qui sont formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydospores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien que peu spécifiques puisqu'elles se retrouvent pratiquement chez toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables, elles peuvent cependant constituer une aide dans l'identification lorsqu'elles apparaissent précocement (comme chez certaines espèces de *Fusarium*).

I.3.2.2.1.2- Tests biochimiques

Des tests biochimiques peuvent également être utilisés pour caractériser les moisissures. On a les tests en galerie API (20 C ou ID 32 C) ou les tests en plaque Biolog TM (**Dufresne, 2018**). La technologie Biolog TM utilise des microplaques de 96 puits prêts à l'emploi avec 95 substrats carbonés de 6 à 8 classes différentes pour une meilleure discrimination. La capacité d'un isolat à métaboliser chaque substrat est mesurée par la présence ou l'absence d'une coloration rouge pour les champignons filamenteux. Cette coloration est due à l'oxydation de l'iodonitrotétrazolium par la respiration cellulaire des microorganismes. Le virage de certains puits crée une empreinte phénotypique qui est analysée par le logiciel pour identifier ou caractériser un organisme. Mais l'utilisation de ces tests Biolog s'accompagne souvent d'observations macroscopiques et microscopiques. L'identification conventionnelle ou biochimique des moisissures ne permet pas une identification fiable et nécessite souvent une confirmation d'identification par séquençage. C'est pourquoi, de nombreuses méthodes moléculaires d'identification ont été développées afin de permettre une meilleure spécificité d'identification des moisissures et de diminuer la durée de l'identification sans passer par une étape de séquençage.

I.3.2.2.1.3- Identification génétique

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales et morphologiques, macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (**Feuilhade de Chauvin, 2005**). Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (**Hinrikson et al., 2005**).

I.3.2.2.1.4- Identification des genres par la technique de scotch

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (**Dufresne, 2018**). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements ($G \times 10$, $G \times 40$ et $G \times 100$) à l'aide d'un microscope type (Motic digital microscope DMB série).

I.3.2.2.1.5- Identification des genres par la technique de micro-culture

Décrite par **Haris, (1985)**, la technique de micro-culture consiste à inoculer les spores des moisissures sur une lame menée de petits carrés, de milieu PDA acidifié et les recouvrir par une lamelle. Les spores sontensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubé à $25 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant 3 à 5 jours. Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements ($\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$). Les genres sont déterminés par les caractères culturaux et microscopiques en se référant au manuel de **Barnett et Hunter, (1972)**.

I.3.2.3- Principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus

fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

I.3.2.3.1- Genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure 18) (Raper et Fennell, 1965).

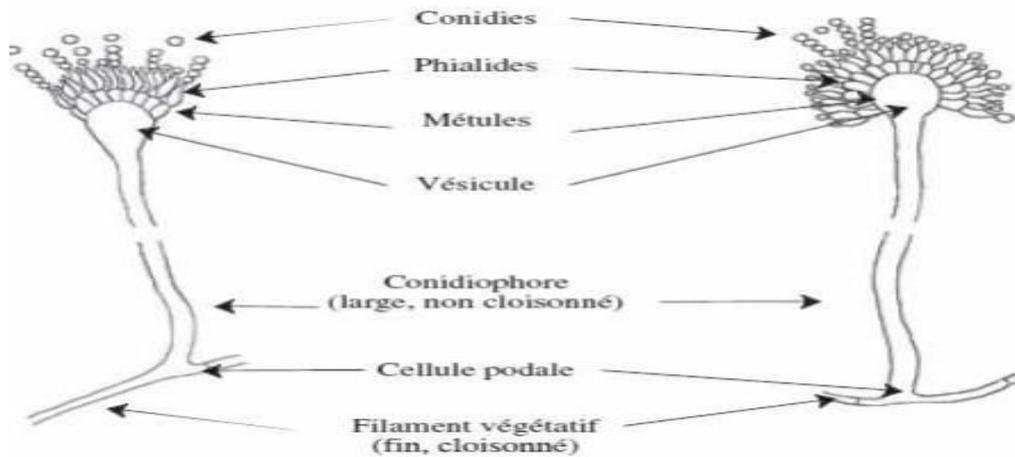


Figure 18 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Raper et Fennell, 1965)

I.3.2.3.1.1- Caractères culturels généraux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noir selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25° C; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40° C et parfois jusqu'à 57° C (Badillet *et al.*, 1987; Morin, 1994). Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces: gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

I.3.2.3.1.2- Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (**Badillet et al., 1987 ; Raper et Fennell, 1965**). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir. L'ensemble vésicule ± métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*. Pour certaines espèces, des formations sexuées apparaissent parfois en culture. Il s'agit de cléistotèques qui contiennent des asques arrondis renfermant chacun 8 ascospores. Les « hülle cells » ou les cellules en noisette, sont des formations arrondies, réfringentes à paroi épaisse qui accompagnent souvent les formes sexuées, mais que l'on peut également observer isolément, indépendamment de la reproduction sexuée.

I.3.2.3.1.3- Pouvoir pathogène

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes ; leur développement nécessite des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer broncho-pulmonaire, bronchopneumopathies chroniques obstructives, emphysèmes, mucoviscidose...) ou générales (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, SIDA...) (**Badillet et al., 1987; Morin, 1994**). Les principales espèces responsables de mycoses (aspergilloses) sont:

- ✓ *A. fumigatus* considéré comme le principal agent d'aspergillose aviaire et humaine (représentant 80-90 % des aspergilloses humaines) (**Morin, 1994**);
- ✓ *A. flavus* responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées principalement chez les patients immunodéprimés (**Baculard et Tournier, 1995**);
- ✓ *A. niger* rarement rencontré chez l'immunodéprimé; chez le sujet non immunodéprimé il peut provoquer des aspergilloses, des otites et des sinusites ; il est aussi à l'origine d'infections cutanées, pulmonaires et généralisées (**Morin, 1994**);
- ✓ *A. sydowi* impliqué dans des cas d'endocardite humaine (**Botton et al., 1990**);

- ✓ *A. terreus* est un agent important d'aspergilloses pulmonaires et cérébrales chez les patients immunodéficients; il est souvent isolé des expectorations chez les patients atteints de mucoviscidose (**Baculard et Tournier, 1995; Khan et al., 1999**); c'est aussi une espèce fréquemment isolée dans des prélèvements de peau et de phanères. Il est considéré comme le principal agent d'onychomycoses (**Morin, 1994**).

I.3.2.3.2- Genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des Ascomycètes. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (**Pitt, 1988**). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales. Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

I.3.2.3.2.1- Caractères culturels généraux

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27° C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces : vert-gris pour *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, vert-jaune pour *P. chrysogenum*, vert sombre pour *P. roquefortii*, *P. fellutatum*, jaune pâle, chamois pour *P. nalgiovense*, jaune vif à rouge pour *P. purpurogenum*, mélange d'orange et verdâtre pour *P. islandicum*, et blanche pour *P. camembertii*. Le revers de colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (**Chermette et Bussieras, 1993**). Les *Penicillium* peuvent former des colonies floconneuses (*P. camembertii*, *P. nalgiovense*), funiculeuses (*P. funiculosum*), granuleuses (*P. expansum*, *P. griseofulvum*), veloutées (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. roquefortii*...) (Figure 19).

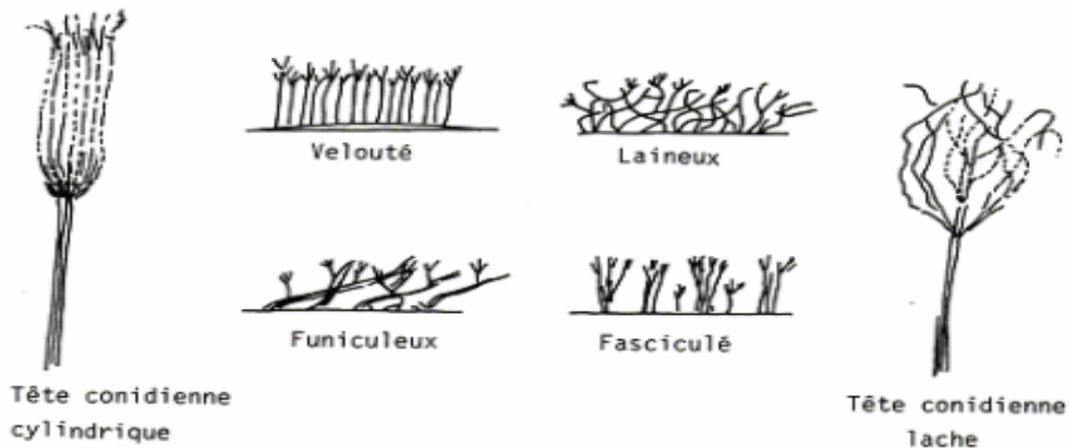


Figure 19 : Caractères du thalle de genre *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990)

Du point de vue morphologique les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un péricille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Figure 20).

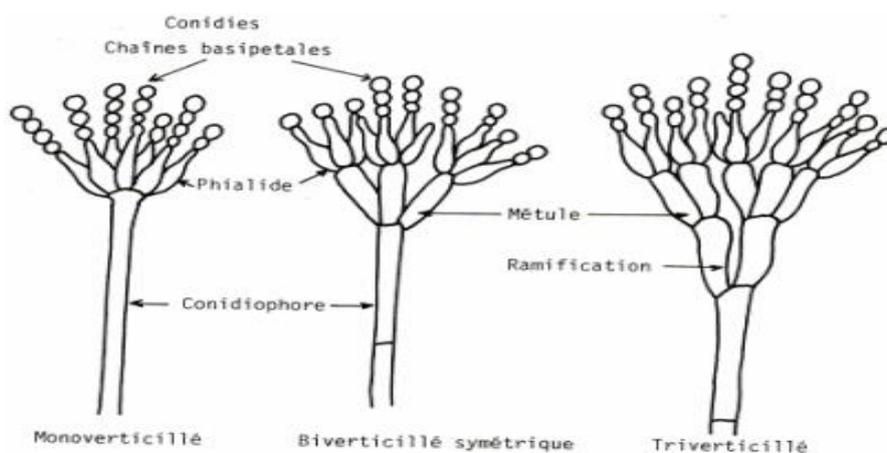


Figure 20 : Caractères morphologiques des *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990)

Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Les phialides peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillé) ; de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillé) ; parfois de trois rangées de métules (*Penicillium* quadriverticillé) sur les conidiophores. Les phialides, ampulliformes ou lancéolées, sont serrées les unes contre les autres donnant à l'ensemble un aspect de pinceau.

Les phialides (cellules conidiogènes) donnent naissance à des conidies disposées en longues chaînes. Les conidies sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (**Botton et al., 1990**). Les caractères des pénicilles servent à la différenciation des groupes et des espèces. Certaines espèces peuvent présenter une reproduction sexuée avec la formation d'ascocarpes.

I.3.2.3.2.2- Pouvoir pathogène

Ces champignons sont des contaminants fréquemment isolés au laboratoire. Par contre les *Penicillium* sont très rarement incriminés en pathologie animale et humaine, parce que la température de croissance de la plupart des espèces est inférieure à 30° C. (**Hennequin et Lavarde, 1998**). Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires. Des espèces de *Penicillium* sont responsables de kératomycose (inflammation de la cornée), d'otomycose (infection de l'oreille externe), d'onychomycose (infection des ongles) et parfois d'infections profondes (**Hennequin et Lavarde, 1998**). Une seule espèce, *P. marneffeii*, rencontrée exclusivement en Asie du Sud-Est (Chine, Thaïlande, Laos, Birmanie) a pu être isolée chez des personnes immunodéprimées, notamment les patients infectés par le VIH ; cette espèce est alors responsable d'infections systémiques touchant la peau et les organes profonds (foie, rate, ganglions, os) (**Rosenthal et al., 2000**).

I.3.2.3.3- Genre *Fusarium*

Ce genre inclus des champignons imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des Ascomycètes (ordre des Hyphocreales, famille des Nectriaceae, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade parfait n'est pas connu. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (**Nelson et al., 1983**). Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

I.3.2.3.1- Caractères culturels généraux

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37° C. Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanc, crème, jaune, rose, rouge, violet ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993).

I.3.2.3.2- Morphologie microscopique

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *Fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau). Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores (Figure 21).

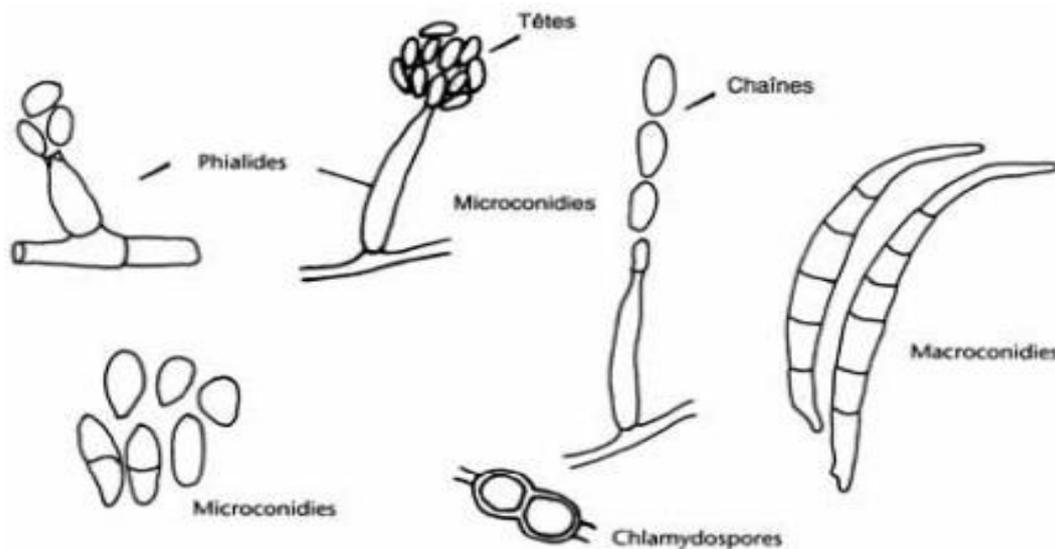


Figure 21 : Caractères morphologiques des *Fusarium* (Chermette et Bussieras, 1993)

Les phialides, plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides). Les phialides produisent deux types de conidies :

- Microconidies, uni ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille ou chaînettes (*F. verticilloides*) ;

- Macroconidies, conidies pluricellulaires à cloisons transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant une sorte de talon plus ou moins visible. Les chlamydospores, sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire (Roquebert, 1998).

I.3.2.3.3- Principales espèces de *Fusarium*

Compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxigène et de leur pouvoir pathogène, les principales espèces de *Fusarium* sont : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. verticilloides* (*F. moniliforme*).

I.3.2.4- Colonisation des denrées alimentaires par les moisissures toxigènes

En atmosphère non contrôlée, la contamination fongique est un risque permanent et pratiquement inévitable. La contamination fongique des plantes et la synthèse de toxines dépendent d'un certain nombre de conditions environnementales : l'état sanitaire de la plante précédant une récolte, conditions météorologiques (pluies, turbulences atmosphériques), techniques de récolte, délais et conditions hydro-thermiques avant la stabilisation pour une bonne conservation (Bennett et Klich, 2003). Les animaux, surtout les insectes et les acariens, sont secondairement les facteurs de dispersion des conidies. Pour croître et se multiplier, la moisissure puise dans le milieu des matières organiques structurales et énergétiques. La cellule fongique est particulièrement riche en dépolymérase. Sous l'action de ces enzymes excrétées dans l'environnement des polymères complexes comme la cellulose, la lignine et les composés pectiques peuvent être digérés par de nombreux champignons. Le saprophytisme de ces micromycètes et par conséquent leur croissance ne peuvent être mis en œuvre que si le milieu renferme de l'eau libre. Arsenal enzymatique puissant et varié, tolérance à des pH acides, à des teneurs en eau très faible, et à des taux d'oxygène bas, croissance de 3° C à 40° C, expliquent que les moisissures puissent coloniser pratiquement tous les aliments. En raison de la croissance strictement apicale et de la ramification subapicale des hyphes, la colonie fongique, contrairement à la colonie bactérienne, ne reste pas localisée au site contaminé. Les hyphes avancent continuellement sur et dans le substrat vers des régions nutritives neuves, occupant grâce aux hyphes mycéliennes latérales toute la surface comestible (Figure 22).

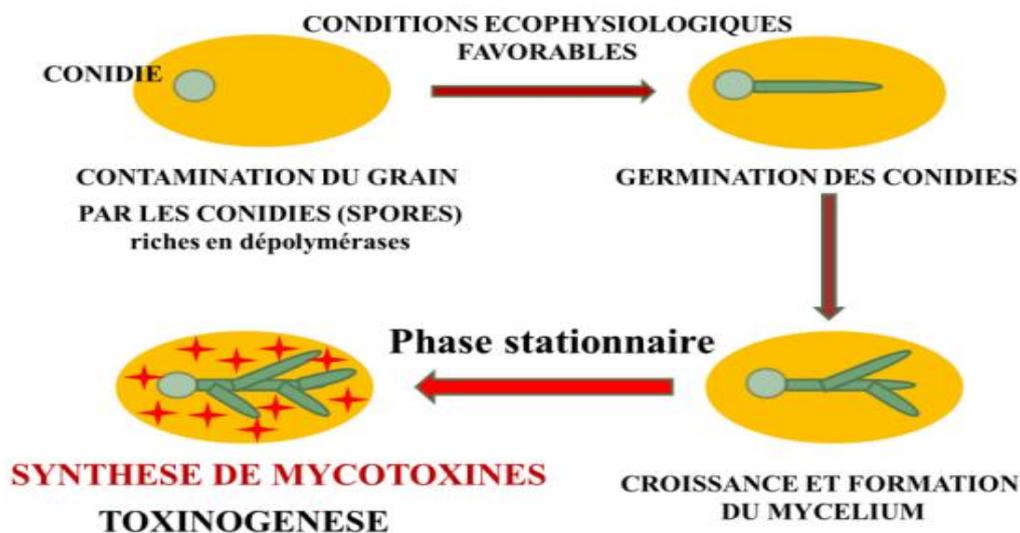


Figure 22 : Colonisation d'une denrée alimentaire (Bennett et Klich, 2003)

I.3.2.4.1- Mycotoxines dans la chaîne alimentaire: la biogénèse

Du grec mukos (champignon) et du latin toxicum (poison), le terme mycotoxines désigne des substances naturelles produites par un métabolisme secondaire des moisissures tout en exerçant un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) une fois ingérées même en faibles concentrations (Eskola, 2002). Les mycotoxines sont dites métabolites secondaires (ou idiolites) car dans la plupart des cas, leur synthèse démarre durant la fin de la période de croissance et le début de la phase stationnaire (idiophase). Les mycotoxines ne sont pas directement nécessaires à la vie du champignon producteur. Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, généralement non dégradables par les organismes vivants et très stables à la chaleur (jusqu'à 250° C) puisque nous pouvons les retrouver dans les aliments après cuisson ou même après stérilisation et aux pH extrêmes. Leur durée de vie dans l'aliment est plus longue que celles des moisissures les ayant synthétisées. Les métabolites secondaires des moisissures ne sont pas tous des mycotoxines. Les mycotoxines ont principalement quatre origines biosynthétiques (selon leur voie de biosynthèse) (Figure 23):

- Les acides aminés: ergotamine, acide aspergillique, acide cyclopiazonique ;
- Les polyacétates (polykétides): aflatoxines, citrinine, ochratoxines, zéaralénone, fumonisine ;
- Les terpènes: tricothécènes, désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol ;
- Et les acides gras.

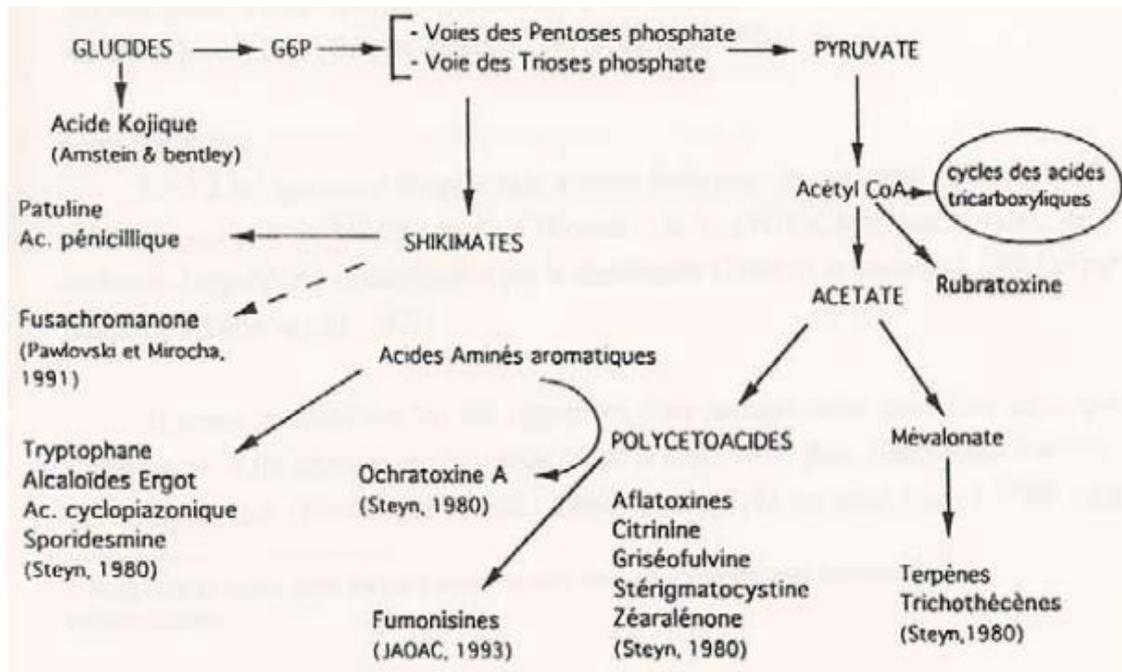


Figure 23 : Voies de biosynthèse des mycotoxines (Yiannikouris et Jouany, 2002)

I.3.2.4.2- Différentes mycotoxines rencontrées dans les aliments

Plus de 2500 mycotoxines ont été répertoriées, mais seule une trentaine possèderait des propriétés toxiques réellement préoccupantes pour l'Homme ou l'animal (Bennett et Klich, 2003). Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les conidies (spores) mais surtout diffusent dans le substrat qu'elles contaminent même après la destruction du champignon responsable de leur production (tableau II). Pour la plupart, elles sont fortement absorbées ou fixées au niveau de la paroi des conidies (comme les aflatoxines). D'autres sont uniquement excrétées dans le milieu extérieur (comme la gliotoxine). Elles peuvent être présentes alors que l'agent responsable (producteur) a disparu, soit du fait de l'évolution de la flore soit du fait des traitements technologiques.

Tableau II : Principales mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (**Bennett et Klich, 2003**)

Mycotoxines	Champignons producteurs	Denrées alimentaires
Aflatoxines B1, B2, G1 et G 2	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> et <i>A. ochraceoroseus</i>	Arachides, céréales graines de coton, épices, fruits, etc.
Ochratoxines A, B et C	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. verrucosum</i> et <i>P. nordicum</i>	Légumes, céréales et graines de café, fromages, poissons, viandes, etc.
Zéaralénone	<i>Fusarium graminearum</i> et <i>F. sporotrichoides</i>	Maïs, blé, orge, etc
Fumonisines	<i>Fusarium moniliforme</i>	Maïs et autres céréales.
Trichothécènes	<i>Fusarium</i> spp.	Maïs et blé.
Patuline	<i>A.</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp.	Fruits (pommes, prunes, Pêches, poires, abricots).
Citrinine	<i>Penicillium rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> <i>A. ochraceoroseus</i> .	Orge, blé, riz, soja et seigle.

I.3.2.4.3- Propriétés toxiques des mycotoxines

Les mycotoxines les plus rencontrées sur les produits agricoles et faisant l'objet d'une réglementation sont principalement les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la fumonisine et la patuline (tableau III). La FAO (Food and Agriculture Organisation) rapporte qu'environ un quart des récoltes de la planète sont susceptibles d'être contaminées par les mycotoxines (**Yiannikouris et Jouany, 2002**). Leurs propriétés toxiques bien établies aujourd'hui, sont carcinogènes, tératogènes, trémorigènes, diabétogènes, hépatotoxiques, néphrotoxiques, hématotoxiques, mutagènes, immunotoxiques, allergiques, neurotoxiques, immunosuppressives, nécrosantes. En effet, l'aflatoxine B1 exerce ses effets toxiques uniquement après métabolisation en époxyde (**Guengerich, 1998**): La forme 8,9-époxyde est hautement réactive et peut se lier de façon covalente avec différentes macromolécules, incluant l'ADN, l'ARN et les protéines. La liaison aux acides nucléiques (formation d'adduits par attaque électrophile de l'azote en position 7 de la guanine (**Guengerich, 1998**)) entraîne des tumeurs hépatiques essentiellement (Figure 24).

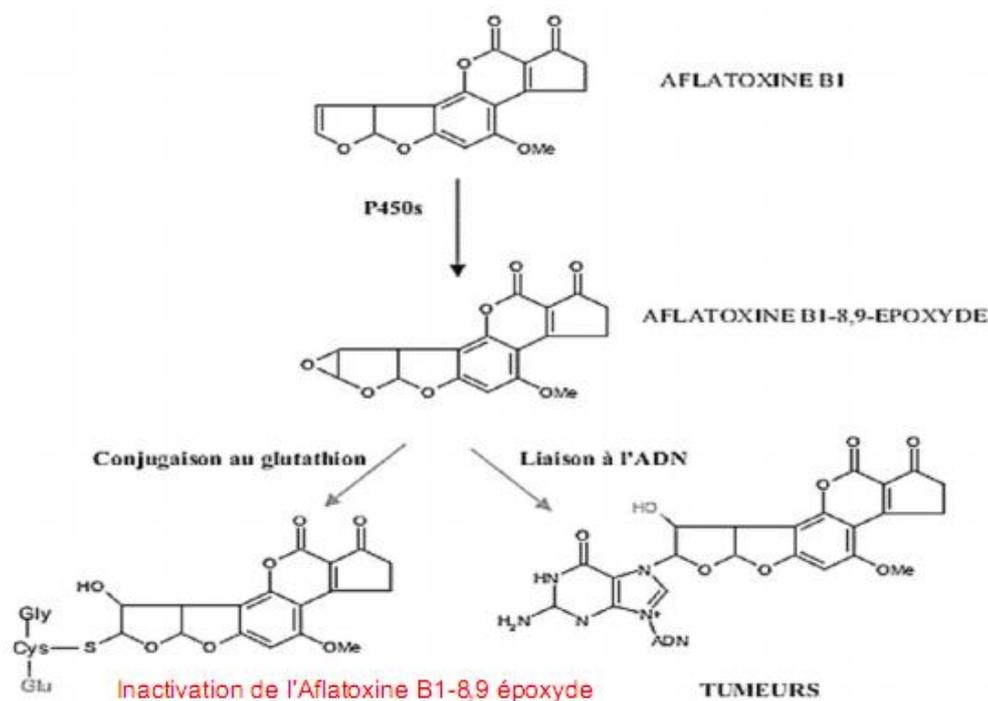


Figure 24 : Mécanisme de toxicité de l’AFB1 (Guengerich, 1998)

Tableau III : Effets suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d’action cellulaires et moléculaires identifiés ou expérimentalement (Belkacem, 2008)

Toxines	Effets	Mécanismes d’action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1+M1	Hépatotoxicité ; Génotoxicité ; Cancérogénicité ; Immunomodulation.	Formation d’adduit à l’ADN ; Peroxydation lipidique ; Bioactivation par cytochromes P450 ; Conjugaison aux GS-tranférase.
Ochratoxine A (OTA)	Néphrotoxicité ; Génotoxicité ; Immunomodulation.	Impact sur la synthèse des protéines ; Inhibition de la production d’ATP ; Détoxification par les peptidases.
Patuline	Neurotoxicité ; Immunosuppresseur.	Inhibition indirecte d’enzymes
Fumonisines	Lésion du système nerveux central ; Hépatotoxicité ; Génotoxicité.	Inhibition de la synthèse de Céramide ; Altération du rapport Sphinganine/Sphingosine ; Altération du cycle cellulaire.
Trichotécène	Hématotoxicité ; Immunomodulation ; Toxicité cutanée.	Induction de l’apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaire ; Altération des immunoglobulines.
Zéaralénone	Fertilité et reproduction	Liaison aux récepteurs Oestrogéniques ; Conjugaison aux glucuronyltransférases.

I.3.2.5- Facteurs favorisant la mycotoxinogénèse

I.3.2.5.1- Facteurs intrinsèques (liés à la souche fongique elle-même)

La nature et la qualité des mycotoxines dépendent des espèces qui les synthétisent. Elles diffèrent selon leur caractère génétique et leur milieu écologique (Belkacem, 2008). Au sein d'une même espèce réputée toxigène, toutes les souches n'ont pas cette propriété. La fréquence des souches toxigènes dépend de l'espèce fongique considérée et pour une même espèce, parfois de la région et de la nature du substrat d'origine. Certaines mycotoxines peuvent être élaborées par plusieurs espèces appartenant à des genres différents. Nombreuses souches fongiques peuvent sécréter plusieurs mycotoxines. La présence à un moment donné d'une moisissure toxigène est nécessaire pour qu'il y ait éventuellement production de mycotoxines. L'existence d'une moisissure même toxigène n'implique pas obligatoirement la présence de mycotoxines et l'absence de moisissures n'implique pas obligatoirement la perte de mycotoxines (Figure 25).

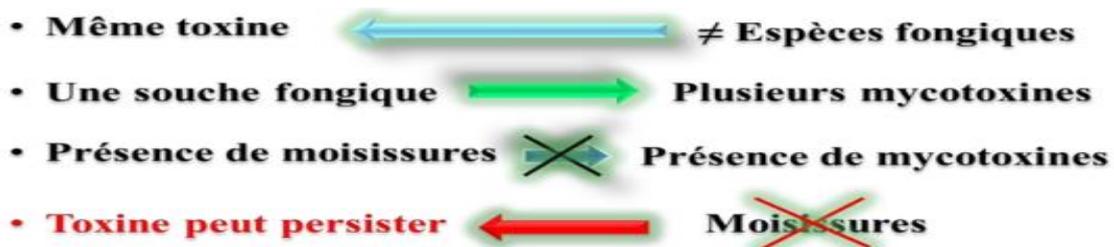


Figure 25 : Mycotoxinogénèse et moisissures (Belkacem, 2008)

I.3.2.5.2- Facteurs extrinsèques (ensemble des conditions écologiques)

Ils sont physiques, physico-chimiques et chimiques. Les facteurs qui contribuent au premier chef à la biodétérioration c'est-à-dire multiples modifications biochimiques et organoleptiques d'un écosystème sont la température, le pH, l'humidité et les ravageurs.

I.3.2.5.2.1- Température

Les champignons sont généralement mésophiles. Leur croissance hyphale est optimale entre 20 et 25° C, elle est souvent faible à 5 et 35° C. Les conidies des espèces mésophiles ne germent pas en dessous de 5° C mais restent viables très longtemps, et des températures inférieures à -20° C ne tuent pas les conidies. Nombreuses moisissures nuisibles notamment *P. expansum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* sont psychrotrophes. Elles peuvent se développer lentement à des températures inférieures à 4° C. Ces champignons sont fréquemment impliqués dans l'altération d'aliments conservés au froid. Les carcasses de

viandes fraîches stockées trop longtemps en chambre froide sont recouvertes de colonies fongiques polychromes parmi lesquelles *Cladosporium herbarum* est l'espèce prédominante (Pitt et Hocking, 1985).

I.3.2.5.2.2- pH des aliments

Concernant le pH, les champignons sont encore beaucoup plus tolérants que les bactéries alors que ces dernières exigent souvent des pH compris entre 7 et 8. La plupart des champignons se développent normalement à des pH compris entre 3 et 8, leur croissance optimale étant généralement obtenue pour des pH compris entre 5 et 6. En raison de leur acidité ($\text{pH} < 6$) de nombreux aliments tels que les légumes, les fruits et la viande sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne.

I.3.2.5.2.3- Tension d'oxygène

Sans exception, les moisissures ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Mais pour beaucoup d'entre elles, le développement n'est pas ou peu affecté par des teneurs 10 fois plus faibles (2,1 %) que celles de l'atmosphère. *Byssochlamys fulva* et *B. nivea* peuvent même pousser avec 0,27 % d'oxygène. Les denrées conditionnées sous faible tension d'oxygène ne sont donc pas à l'abri des moisissures (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

I.3.2.5.2.4- Disponibilité en eau

L'humidité favorise le développement des moisissures. Pour son maintien et sa croissance, le mycélium doit trouver de l'eau libre (disponible). Dans les graines, les moisissures utilisent la vapeur d'eau présente dans les interstices entre les grains dont la concentration est déterminée par l'équilibre entre l'eau libre contenue dans le grain (la teneur en eau du grain) et l'eau présente sous forme de vapeur autour du grain. La concentration de l'eau interstitielle est désignée par l'activité de l'eau (a_w). Sans eau libre il ne peut y avoir diffusion des exo-enzymes fongiques dans l'environnement jusqu'au substrat; ensuite, après la dépolymérisation du substrat, il peut y avoir diffusion des molécules simples à l'intérieur de la cellule fongique. Ce paramètre peut varier de 0 (pour des substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour des substrats dont toute l'eau est disponible). Les valeurs caractéristiques de ce facteur permettant le développement des moisissures s'échelonnent de 0,70 à 0,99. Les activités en eau inférieures à 0,60 ne sont pas compatibles avec la croissance fongique mais elles ne tuent pas les conidies. Le chocolat, les épices, les aliments déshydratés (ou peu hydratés), les laits en poudre protégés de la réhydratation sont théoriquement à l'abri d'une altération fongique (Ramirez *et al.*, 2006).

I.3.2.5.2.5- Substrat

La composition qualitative et quantitative du substrat peut influencer l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines (**Reboux, 2006**). Un taux élevé de sucres et/ou de lipides est favorable à la toxinogénèse. En effet, les céréales et les oléagineux, plus riches en sucres et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines. La production des aflatoxines par *Aspergillus flavus* est favorisée par certains sucres comme le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose. Le fer, le zinc et le cuivre ont été testés sur la production d'aflatoxines et d'ochratoxines. Ils favorisent tous la production de ces deux toxines à des concentrations inférieures à 10 mg/L de milieu mais le zinc est celui qui a le plus d'effet sur la production d'aflatoxines. L'effet du fer et du cuivre peut être dû à leur rôle de catalyseurs de la peroxydation des lipides (**Aziz et al., 1997**).

I.3.2.5.2.6- Facteurs biologiques

I.3.2.5.2.6.1- Prédateurs

Les insectes et les acariens interviennent indirectement dans la production de mycotoxines en étant des vecteurs de spores de moisissures ; ils les font pénétrer dans les zones internes des graines par les blessures qu'ils occasionnent. Ainsi, la contamination de l'arachide, de coton et de maïs par *A. flavus* et/ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Au cours de la conservation, des grains hébergeant des charançons révèlent une population fongique importante et parfois des mycotoxines (**Murphy et al., 2006**). Les oiseaux et les rongeurs agissent de manière similaire sur des réserves de céréales non protégées (**Le Bars, 1988**).

I.3.2.5.2.6.2- Interactions entre microorganismes

La présence simultanée de microorganismes (bactéries et champignons) module la production de mycotoxines; il y a compétition entre différents champignons. La production d'aflatoxines par *A. flavus* est inhibée lorsqu'*A. niger* est présent dans le même milieu. La présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet inhibiteur sur la production de toxines. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine produite (**Pfohl-Leskowicz, 2001**).

I.3.2.5.2.7- Facteurs chimiques

L'emploi d'insecticides réduit l'apparition des mycotoxines, soit par action antifongique directe sur le champignon, soit en prévenant les lésions au niveau des graines dues aux

insectes et aux acariens. Il convient toutefois d'être prudent dans l'emploi de ces substances. En effet, certaines études ont montré qu'à concentration sub-létale, la production des mycotoxines est favorisée (Le Bars, 1988). Des concentrations de 6 à 8 ppm du fongicide systémique tridémorphe favorisent la croissance de *Fusarium sporotrichoides* et diminuent la synthèse de la toxine T-2. Cependant, des concentrations de 30 à 50 ppm inhibent fortement la croissance du champignon et augmentent considérablement la production de la toxine (Moss et Frank, 1985). L'exposition des *black Aspergilli* à certaines concentrations en fongicide constitue un agent de stress pour ces champignons, et en réponse, ils se mettent à produire plus d'OTA. Ainsi, la production de mycotoxines peut protéger les champignons producteurs d'un agent de stress (Jennings, 1993). De la même manière, la citrinine est un agent de protection solaire pour *P. verrucosum* (Stormer, 1998). Il ne faut pas négliger non plus l'intervention d'autres facteurs (climatiques, culturels) pour expliquer l'effet non attendu de ces fongicides (Figure 26). Il reste tout de même à garder à l'esprit que l'espèce *A. carbonarius* par exemple est décrite comme étant un champignon agressif (Battilani et al, 2003) qui n'a besoin d'aucun facteur extérieur pour coloniser les baies de raisin saines et pour y produire de l'OTA.

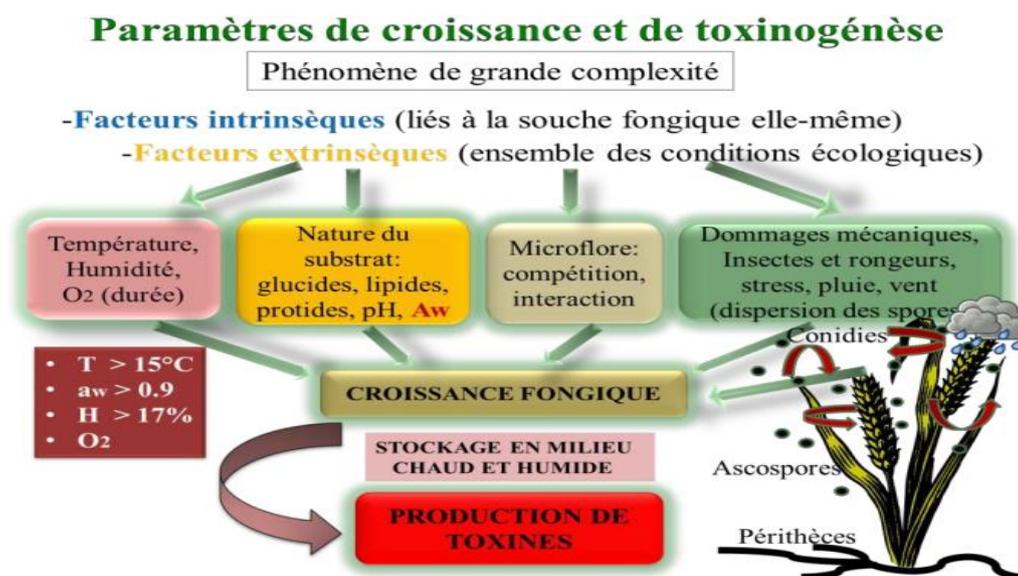


Figure 26 : Les paramètres responsables de la mycotoxinogénèse (Galindo, 2008)

I.4- GENERALITES SUR LE MAÏS

I.4.1- Production et consommation du maïs au Cameroun

Le maïs joue un rôle important dans la sécurité alimentaire au Cameroun, il est consommé sous plusieurs formes non seulement par la quasi-totalité de la population, mais aussi par les animaux. Il constitue également une matière première de choix pour les industries

agroalimentaires et des textiles. Malgré son importance, sa production demeure très faible du fait de l'enclavement des bassins de production, la difficulté d'accès au foncier et aux semences améliorées, le coût élevé d'engrais et des pesticides et une faible mécanisation. En effet, avec quelques 700.000 exploitations familiales, artisanales et modernes la production nationale du maïs s'élevait à 2.200.000 tonnes en 2019, soit un déficit de 600.000 tonnes par rapport à la demande évaluée à 2.800.000 tonnes (MINADER, 2019). Cependant, le Cameroun pour répondre au besoin de sa population est obligé d'importer le maïs et le coût alloué à cette importation est de 150 milliards de FCFA chaque année (MINADER, 2019).

I.4.2- Pertes post-récoltes du maïs en stockage

Alors que l'offre peine à satisfaire la demande, l'autre obstacle à l'autosuffisance alimentaire du maïs est la perte post-récolte. Environ 30 % de la quantité de maïs produite connaissent les pertes post-récolte chaque année (FAO, 2013). Ceci étant le résultat de la non adoption des systèmes de conservation adéquat par les producteurs (Fandohan *et al.*, 2006). Les producteurs stockent leurs récoltes dans des structures traditionnelles dont le type varie suivant le climat, les groupes ethniques et certaines conditions socioéconomiques. Ces structures sont en général précaires, rudimentaires et peu efficaces. Elles sont construites avec des matériaux végétaux disponibles dans le milieu et ne durent souvent pas plus de trois campagnes agricoles (Hinnou *et al.*, 2011). Les pertes post-récolte enregistrées sont non seulement de nature physique (insectes et rongeurs), mais aussi chimiques causés par les moisissures toxigènes.

I.4.2.1- Pertes physiques du maïs

Les Pertes physiques du maïs sont principalement causées par des insectes, ainsi que des rongeurs. Les insectes constituent de toute évidence le groupe le plus important (FAO, 1992).

➤ Ravageurs des grains stockés

La plupart des insectes des grains stockés appartiennent à deux ordres biologiques : les coléoptères et les lépidoptères. Les principaux insectes ravageurs sont représentés dans le tableau IV ci-dessous :

Tableau IV : Les principaux insectes ravageurs des gains stockés (**Fandohan et al., 2006**)

Insectes ravageurs	Symptômes	Méthodes de lutte
<p>Le charançon</p> 	<p>Le charançon du maïs (<i>Sitophilus zeamais</i>) détruit les grains de céréales stockés. La femelle ronge un petit orifice dans l'amande d'une graine et y pond un œuf. Au bout de quelques jours, la larve sort de l'œuf et se nourrit de l'intérieur du grain.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Exposer le maïs en couches minces au soleil. • Utiliser des plantes répulsives, ou mélanger aux grains des plantes insectifuges telles que le neem. • Utiliser la lutte mécanique, telle que le transilage, secouage et passage au tarare pour éliminer une partie des insectes. • Faire la fumigation des vapeurs insecticides mises au contact du maïs pour détruire rapidement toutes les formes.
<p>La teigne</p> 	<p>La teigne des grains (<i>Nemapogon granella</i>) trahit sa présence par un fil de soie qui se manifeste par un enchevêtrement de fils blancs sur le dessus du tas de grain.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tenir les greniers propres et boucher les fissures des parois. • Traiter par le sulfure de carbone (phostoxin). • Battre et faire moudre le plus tôt possible après la moisson, désinfecte le grenier.
<p>Les alucites</p> 	<p>Les alucites des céréales (<i>Sitotroga cerealella</i>) infestent le stock en se nourrissant du germe, puis de l'intérieur du grain. Les fortes attaques entraînent une perte de pouvoir germinatif.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Procéder le plus tôt possible au battage à la machine après la moisson. • Faire le pelletage des tas de grains dans les greniers.

I.4.2.2- Pertes chimiques du maïs

Les pertes de nature chimiques sont occasionnées par la présence des moisissures productrices de mycotoxines (Figure 27). La propagation et la dispersion des conidies de ces dernières sont facilitées par les animaux, surtout les insectes et les acariens. Cette contamination peut survenir à tout moment avant, pendant et après la récolte, au cours du séchage ou du stockage. Elle conduit alors à une perte de la valeur nutritive du produit, une diminution du pouvoir germinatif des grains, à la décoloration et à la production d'odeurs nauséabondes (**Magan et al., 2003**).



Figure 27 : Maïs infectés par les moisissures toxigènes a) Epi de maïs frais infecté ; b) moisissure d'épi *Fusarium* (champignon blanc recouvrant les grains); c) moisissure *Gibberella*, l'infection commence pour la plupart des cas par le haut (couleur rose foncée à rouge) (Bennett et Klich, 2003)

I.5- GENERALITES SUR LES METHODES DE LUTTE MYCOTOXIQUE

La lutte contre la présence des mycotoxines dans l'alimentation passe d'abord par la mise en œuvre de tous les moyens visant à empêcher la colonisation des denrées par les champignons. Le meilleur moyen de prévenir l'installation des moisissures nuisibles sur les denrées est d'empêcher la contamination des produits par les conidies (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016). Aujourd'hui, l'industrie agroalimentaire a une ambition raisonnable mais souvent onéreuse ; la technologie moderne (filtration, stérilisation de l'air, secteurs en surpression, désinfection des atmosphères et des surfaces) permet de produire des aliments en conditions aseptiques (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016).

I.5.1- Prévention par la manutention pré-récolte

Les méthodes de la manutention pré-récolte en vue d'éviter la contamination par les mycotoxines comprennent l'utilisation des agents de lutte biologique, qui instituent un processus de déplacement compétitif à l'aide des souches atoxinogènes, la rotation des techniques agricoles, et développant de races de maïs plus forts ou plus résistantes aux infections. Dans la prévention des mycotoxines, les méthodes de bio contrôle peuvent être appliquées avant la récolte ou dans les champs lorsque les plantes se développent pour devenir matures (Reddy *et al.*, 2009).

I.5.2- Prévention par la manutention post-récolte

Malgré l'efficacité démontrée par la lutte biologique et d'autres méthodes de contrôle pré-récolte, la contamination par les mycotoxines reste endémique en Afrique. Plusieurs stratégies impliquant l'utilisation post-récolte ont été décrit pour éliminer ou limiter la

propagation de la contamination par les mycotoxines tout au long de la récolte (Hell *et al.*, 2011). Ces interventions comprennent la transformation des aliments, les stratégies de stockage telles que le séchage, l'amélioration des conditions et des mesures appropriées et bien adaptées dépendamment de la zone agro-écologique (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016) (Figure 28).



Figure 28 : Structure de séchage moderne et de conservations traditionnelles a) séchoir moderne, b) séchoir traditionnel, c) structure de stockage de type cribs (Cardwell, 2004)

I.5.3- Manutention des produits contaminés

Lorsque les aliments sont contaminés, il existe des alternatives à jeter les denrées alimentaires, telles que les procédures de transformation résumées plus haut. D'autres alternatives incluent le traitement des cultures contaminées avec des agents de liaison ou d'autres substances pour éliminer les mycotoxines ou trouver d'autres utilisations pour les cultures qui sont autres que la consommation. Ainsi, diverses techniques ont été conçues pour détruire ou supprimer la toxicité des mycotoxines dans les aliments lorsqu'une moisissure s'est développée sur une denrée.

I.5.3.1- Méthodes physiques

Ces techniques incluent l'élimination physique des portions contaminées des denrées alimentaires, le traitement par la chaleur et le rayonnement afin de convertir les toxines dans les composés relativement inoffensifs ou l'ajout d'adjuvants pour supprimer ou autrement masquer les effets néfastes des toxines (Park *et al.*, 2005). D'autres méthodes physiques comme le chauffage par microondes et les traitements à l'ozone (ozonation) ont été également recommandées pour la détoxification de l'aflatoxine des aliments contaminés (Igawa *et al.*, 2007).

I.5.3.2- Méthodes chimiques

Parmi les solutions, certains composés chimiques ont été mis sur pieds pour inhiber la production des mycotoxines par inhibition de la croissance des champignons. Au nombre de

ces composés, nous avons l'acide propionique (0,1-0,5%), l'ammoniac (0,5%), le coppersulphate (0,5-1%) et l'acide benzoïque (0,1-0,5%) qui inhibent complètement la croissance de *A. parasiticus* (Nyandieka *et al.*, 2009); le benzoate de sodium quant à lui, a un effet antimicrobien sur la croissance de *A. niger*, *A. flavus* et *A. fumigatus* et la production des aflatoxines dans des garis emballés (2 kg/pack) au cours du stockage à température ambiante (30 ± 2 ° C) (Ogiehor *et al.*, 2004). L'hypochlorite de sodium (0,1-0,5 %) expose une propriété antifongique (68-84%). L'urée (0,1-0,5%), l'acide citrique (0,5 %) et le propionate de sodium (0,1-0,5 %) inhibent la croissance des champignons (Gowda *et al.*, 2004).

I.5.4- Limites de quelques méthodes de conservation des aliments

Les substances antifongiques lorsque leur utilisation est autorisée, doivent être choisies en fonction des espèces fongiques à éliminer et appliquées en respectant les doses. En effet, la plupart des antifongiques sont des poisons non seulement de la cellule fongique mais aussi des cellules animales et végétales. En alimentation humaine, l'utilisation des additifs antifongiques (propionate, sorbate de calcium, natamycine, etc.) n'est autorisée que pour les emballages (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016). Le coût élevé de ces produits limite souvent son utilisation. De plus, certains producteurs utilisent des structures de stockage rudimentaires favorisant la propagation des moisissures. Ces quelques limites sont de nature à nous inciter à la recherche d'autres moyens de lutte antifongique utilisant des techniques moins coûteuses et dont la mise en œuvre par les producteurs sera moins contraignante. Cependant, le manioc du fait de ses propriétés antifongiques dues à la scopolétine constitue une alternative prometteuse face aux méthodes de conservations conventionnelles qui ont présentées des limites.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1- DESCRIPTION DU SITE D'ÉCHANTILLONNAGE DES VARIÉTÉS DE MANIOC

Le site d'Ongot (N 03° 51' 292", E 011° 22' 568", altitude : 794 m), de la localité de Mbankomo, représenté dans la figure 29 suivante est situé dans la zone agro-écologique de la forêt humide à pluviométrie bimodale, à environ 18 km de Yaoundé (Région du Centre). La température moyenne journalière de l'air varie de 23 à 24° C (IRAD, 2008). Il est caractérisé par des précipitations de 1617 mm par an. Ongot est également caractérisé par des sols ferrallitiques (ferralsols), généralement acides. La zone est régie par un climat de type Équato-guinéen avec quatre saisons : une grande saison de pluie de Septembre à Novembre, une longue saison sèche de Décembre à Février, une courte saison de pluie de Mars à Juin et une courte saison sèche de Juillet à Août (Ngome *et al.*, 2013). Ce site a été choisi comme unique site d'échantillonnage pour la disponibilité des plusieurs variétés de manioc et aussi pour s'affranchir de l'influence des facteurs environnementaux.

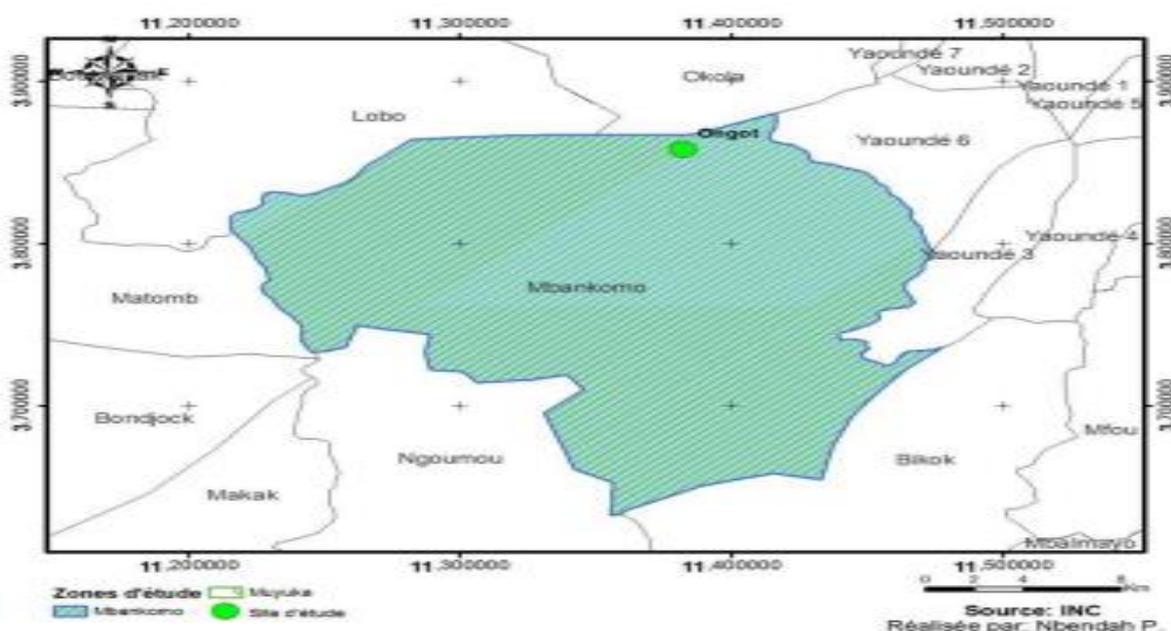


Figure 29 : Localisation géographique du site d'échantillonnage (IRAD, 2008)

II.2- MATERIEL

II.2.1- Matériel végétal

Les racines des vingt différentes variétés de manioc dont dix locales et dix améliorées de douze mois d'âge ont été identifiées, caractérisées morphologiquement et récoltées (tableau V). Ces variétés ont été choisies sur la base de leurs performances agronomiques (résistance aux maladies, rendement de production élevé, durée de stockage sur terre) et la caractérisation

morphologique a porté sur la couleur du pétiole, la tige du plant et la peau de la racine (tableau V). L'échantillon de maïs (CHH 105) en stockage quant à lui a été choisi sur la base de son rendement de production (9 à 10 T/ha) et de son adaptation à toutes les cinq zones agro écologiques du Cameroun (Figure 30). C'est une variété améliorée hybride à cycle de production court (100 à 120 Jours) qui a été mise sur pieds et distribuée par l'IRAD.

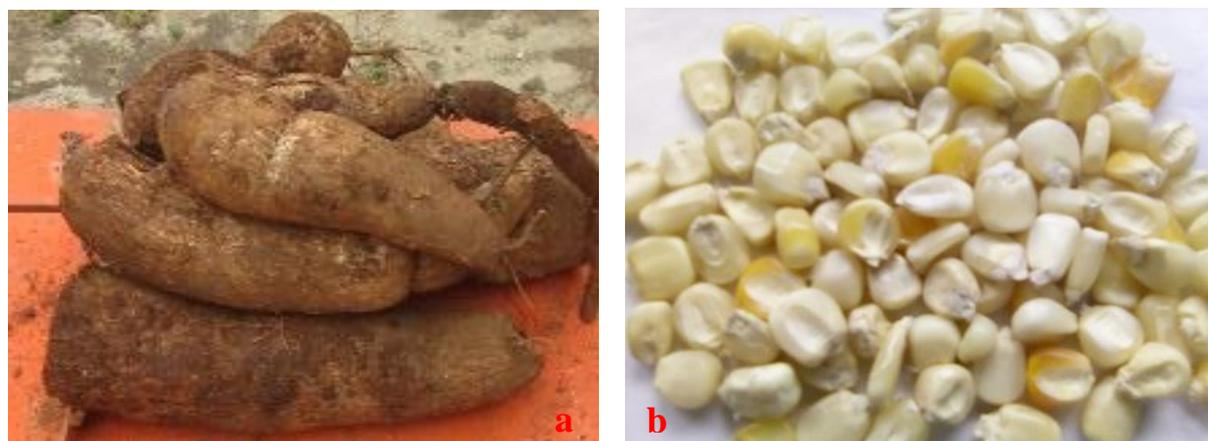


Figure 30 : Photos matériel végétal : a) Racines de manioc, variété « 0110 »; b) Grain de maïs (variété hybride CHH 105 en stockage à l'IRAD de Yaoundé) (Njankouo)

Tableau V : Caractéristiques morphologiques des différentes variétés de manioc utilisées

Variétés	Caractérisation morphologique			
	Codes	Tiges	Feuilles/ pétiole	Peau tubercule
Champion 0110	A ₁	Blanche	Verte	Blanche
	A ₂	Blanche/verte	Verte	Rouge
92/0326	A ₃	Marron + traits verticaux	Rouge	Blanche
961414	A ₄	Marron+ petit traits	Rouge	Blanche
040	A ₅	Blanchâtre/verte	Rouge	Rouge
95109	A ₆	Violette	Rouge	Blanche
8034	A ₇	Marron	Verte	Blanche
Fonctionnaire	A ₈	Marron+ petit traits	Verte	Rouge
8017	A ₉	Marron	Verte	Blanche
8061	A ₁₀	Marron	Verte	Blanche
Pola rouge beul	L ₁	Blanche	Verte-jaunâtre	Rouge
Madaga	L ₂	Marron	Rouge	Blanche
Mbida et mbani	L ₃	Marron + traits verticaux	Verte	Rouge
Minbourou	L ₄	Marron	Verte	Rouge
Le blanc (ntanghe)	L ₅	Blanche	Rouge pale	Blanche
Macoumba	L ₆	Marron	Rouge	Rouge
Man Mbong	L ₇	Blanche	Rouge-verte	Blanche
Ngon ezele	L ₈	Blanche	Rouge	Blanche
Owona ekani	L ₉	Marron	Verte	Rouge
Mnom ewondo	L ₁₀	Marron + traits verticaux	Rouge-verte	Blanche

II.2.2- Matériel microbiologique

Les isolats constitués de *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp* et un isolat non identifié ont été isolés du maïs au Laboratoire Régional de Microbiologie Appliquée et de Lutte Biologique de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) à Yaoundé au Cameroun, pour l'évaluation des tests d'activités antifongiques. Ce maïs avait été stocké à température ambiante sur une période de 3 mois dans de grands sacs de polyéthylène posés sur des palettes au magasin de semences, le taux d'humidité de ce maïs pris à l'humidimètre était inférieur à 14 %.

II.2.3- Matériel animal

Pour le test de toxicité aigüe de l'extrait issu du cortex de la variété de manioc améliorée « 0110 » et contenant de la scopolétine, le modèle animal choisie était les rats de laboratoire de souche Wistar de 8 semaines d'âge et de masse corporelle de 100 ± 10 g fourni par le Laboratoire de Science Alimentaire et de Métabolisme de l'Université de Yaoundé I. Pour l'étude de la toxicité subaigüe, les poulets de chairs (*Gallus gallus domesticus*) fournis par la ferme expérimentale de l'IRAD de Yaoundé ont été utilisés (Figure 31). Les animaux ont été traités conformément aux règles et réglementations établies par l'Union Européenne pour la Sécurité Animal (Conseil CEE 86/609) et qui a été adopté par le Comité Institutionnel du Ministère de la Recherche Scientifique et de l'Innovation du Cameroun.

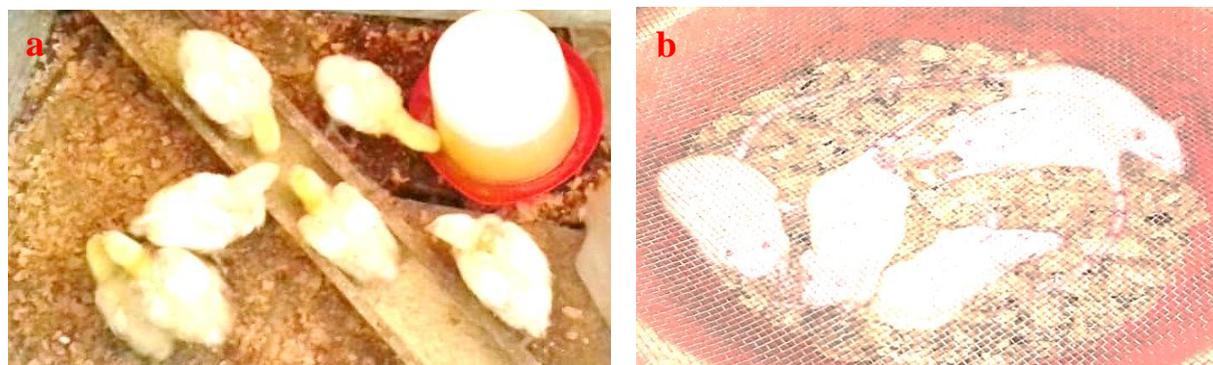


Figure 31 : Matériel animal. a) Poulets de chairs (*Gallus gallus domesticus* ; b) Rats albinos de souche Wistar (Njankouo)

II.2.4- Réactifs et équipements

Pour la quantification du HCN et de la scopolétine dans les différents échantillons les réactifs utilisés étaient constitués de tampon phosphate pH 8 préparé à partir des poudres de Na_2HPO_4 et de KH_2PO_4 (Sigma–Aldrich CAS7664-38-2), éthanol pur (Sigma-Aldrich). Du cyanure de potassium (KCN) (Fluka Bioche-mika, CAS 151-50-8 ($\geq 98\%$)), d'acide picrique

humidifié (BDH, Laboratories, ($\geq 99\%$)), de carbonate de sodium 5% (Sigma–Aldrich CAS7664-38-2) et du standard de scopolétine (Sigma- Aldrich ($\geq 99\%$)). Tous fournis par les Laboratoires Pharmacologie et de Toxicologie de l’Université de Yaoundé I et d’Analyse des Sols de l’Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) de Yaoundé.

Pour ce qui est de l’isolement, de l’identification, des tests de sensibilité des isolats fongiques, de la détermination des paramètres d’inhibition (CMI, CMF) et du test de conservation du maïs, les milieux de culture étaient constitués du *Potato Dextrose Agar* (PDA), Czapeck (Cz), *Malt Extract Agar* (MEA), *Czapek Yeast extract Agar* (CYA) et le Bouillon Nutritif, tous préparés conformément au protocole du fabricant (voir annexe 6). Le Fluconazole (comprimé) 200 mg/Kg (Indian, Mumbai-2, Naman pharma drug) servait de référence pour le test d’activité antifongique. Un humidimètre numérique de type GM640 a été utilisé pour la prise du taux d’humidité du maïs. Ces milieux de culture ont été fournis par le Laboratoire Régional de Microbiologie Appliquée et de Lutte Biologique de l’Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) de Yaoundé.

Pour l’étude de la toxicité, la solution de Bouin a été préparée avec de l’Acide acétique glacial (Laboratoire MAG Quebec ; 99%), le formol (PubChem 712, N° CE 200-001-8) et de l’acide picrique (BDH, Laboratories, ($\geq 99\%$)) et le dosage des paramètres Biochimiques (ASAT, ALAT, Créatinine, HDL-Cholestérol, Cholestérol total, Malone dialdéhyde et Triglycéride) avec les kits commerciaux acquis de Biolabo et dont les protocoles des dosages y sont bien décrits.

La quantification de la scopolétine dans les échantillons a été réalisée à l’Ecole Normale Supérieure de l’Université de Yaoundé I, en utilisant un appareil de type LC/MS de marque Ultimate 3000 (Thermo Fisher, USA). Le spectrophotomètre de marque WTW photolab S12 a été utilisé pour la lecture des densités optiques, la centrifugeuse de marque 90-1 a été utilisée pour la centrifugation, l’incubateur (Cellxpert, C170-CO2), l’autoclave (Midmark B18) ont été utilisés et les coupes histologiques d’organes de poulets (foie, reins et cerveau) ont été réalisées au Laboratoire de Physiologie Animal de l’Université de Yaoundé I.

II.3- METHODES

II.3.1- Organigramme méthodologique

La figure 32 ci-dessous représente l’organigramme de la méthodologie expérimentale permettant de comprendre l’ensemble du travail. Après la visite au champ semencier de la station IRAD de Ntui où les informations sur les différentes variétés de manioc et maïs ont été récoltées, un stage a été effectué à l’IRAD de Yaoundé sur la fiche technique et les traitements

post-récoltes du maïs et du manioc. Vingt principales variétés de manioc ont été choisies sur la base de leurs performances agronomiques. Elles ont été récoltées, transformées en produits dérivés du manioc, traitées pour doser le HCN et puis l'extraction à l'éthanol absolu pour la quantification de la scopolétine afin de cibler la variété et le produit dérivé qui a la teneur la plus élevée en scopolétine. Ensuite les activités antifongiques des extraits bruts issus du cortex et du parenchyme de la variété de manioc ciblée ont été évaluées sur les moisissures isolées du maïs. Et enfin pour justifier de l'innocuité de la dose antifongique efficace, une étude de toxicité aiguë et subaiguë a été menée chez les rats et chez les poulets de chair respectivement.

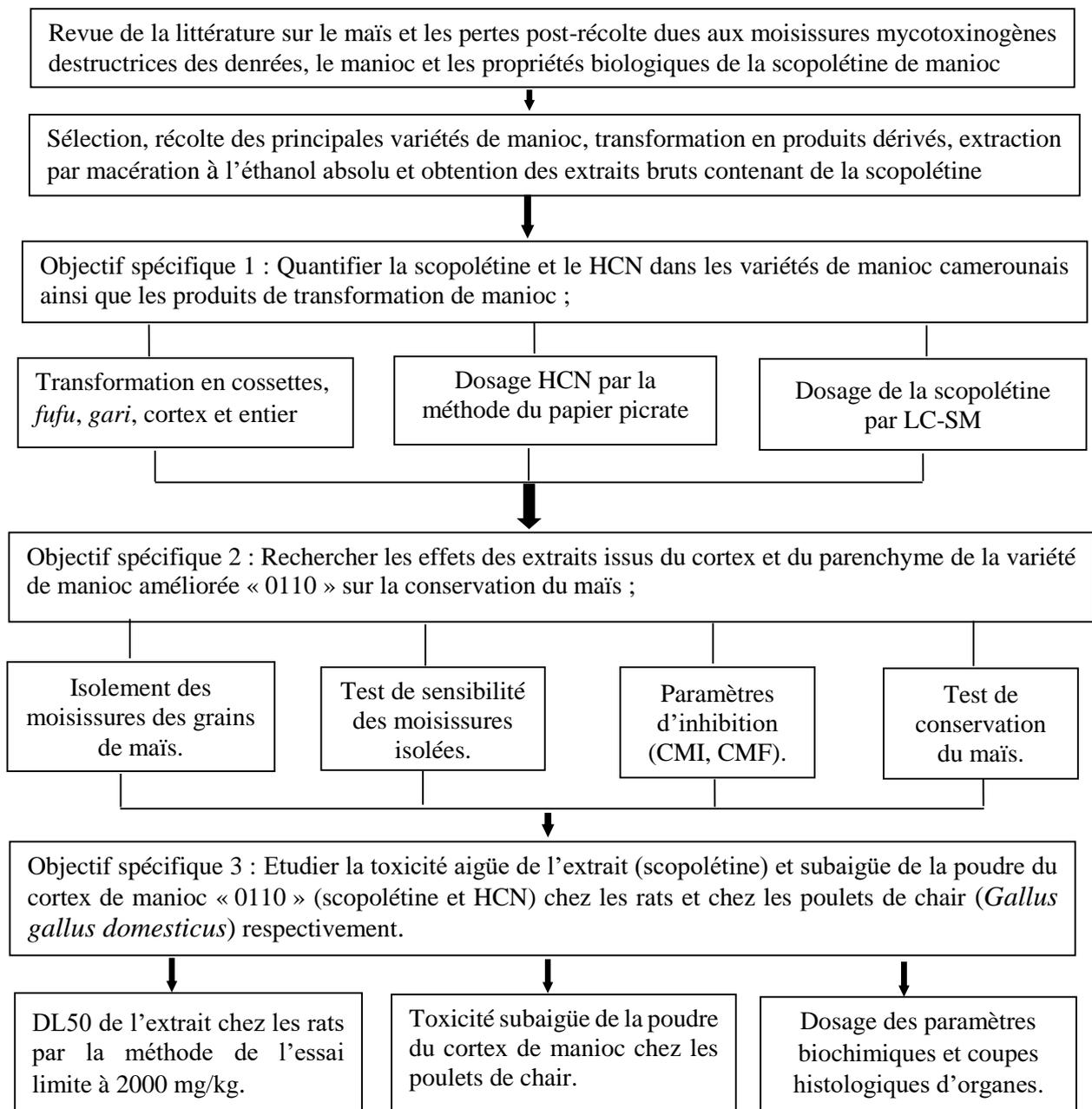


Figure 32 : Schéma de l'organigramme de la méthodologie expérimentale

II.3.2-Transformation des tubercules de manioc en quelques produits dérivés

La transformation des échantillons s'est faite suivant le protocole traditionnel décrit par (USAID/CORAF/SONGHAI, 2010). Il est basé sur l'agencement d'un ensemble de traitements unitaires spécifiques conduisant à un produit de transformation. Ces produits ont été choisis afin de mieux observer l'influence des traitements unitaires sur la teneur en HCN et l'accumulation de la scopolétine. Deux jours après récolte, les racines des différentes variétés de manioc préalablement lavées ont été épluchées, ensuite transformées en *gari*, *fufu* et cossettes.

➤ Préparation des cossettes

Les racines de manioc lavées et épluchées (1 kg) ont été découpées en morceaux d'environ 5 cm à l'aide d'un couteau de cuisine bien limé, pour chaque variété, une partie a été découpée entièrement avec la peau et l'autre après épluchage et le cortex de chaque variété a été aussi collectée. L'ensemble a alors été séché sur grille pendant 06 jours (figure 32).

➤ Préparation du *gari*

Les racines de manioc (1 kg) épluchées et lavées, ont été râpées à la main à l'aide d'un grattoir pour obtenir une pulpe fine. Celle-ci a été introduite dans des sacs à mailles grossiers qui ont été pressés pendant 4 jours afin d'éliminer l'excès d'eau. La masse de pâte obtenue a été concassée, tamisée grossièrement et mise à sécher. La semoule ainsi obtenue a été légèrement grillée (sans ajout d'huile), à feu doux pendant 15 minutes.

➤ Préparation du *fufu*

Les racines de manioc (1 kg) épluchées et lavées, ont été trempées dans de l'eau pendant 03 jours. Après ramollissement, la pâte a été pressée et séchée au soleil sur grille pendant 06 jours (Figure 33).



Figure 33 : Photo de l'aire de séchage des échantillons (cortex, *fufu*, *gari*; cossettes de parenchyme et racine entière) obtenus des racines de manioc (**Njankouo**)

II.3.3- Dosage de l'acide cyanhydrique par la méthode du papier picrate

II.3.3.1- Principe

La méthode au papier picrate alcalin communément employée implique l'hydrolyse enzymatique du glycoside cyanogénique dans un tube scellé et la détection de l'acide cyanhydrique élaboré par réaction avec le picrate alcalin imprégné du papier suspendu au-dessus du mélange de la réaction, afin de mesurer la phase gazeuse de l'acide cyanhydrique au Spectrophotomètre à 510 nm (**Bradbury et al., 1999**).

II.3.3.2- Mode opératoire

➤ Préparation du papier picrate

1, 4 g d'acide picrique humide a été pesé et 100 mL d'une solution de carbonate de sodium, obtenu en dissolvant 2,5 g de carbonate de sodium dans 100 mL d'eau a été ajouté. Utilisant le papier filtre Whatman N° 3, 10 cm x 10 cm de papier carré ont été coupés et placé dans la solution de picrate jaune dans un plateau pendant 20 secondes puis laissé à sécher à température ambiante. Les sections de papier irrégulièrement colorées ont été éliminées pour avoir les papiers rectangulaires de 30 mm x 10 mm.

➤ Dosage des cyanures d'hydrogène

Pour l'essai, 1 g de chaque échantillon broyé a été introduit dans des bocaux. Pour le témoin, 1 mL d'eau distillée a été introduit. Dans chaque bocal, 1 mL de la solution de tampon phosphate pH 8 a été ajouté. A la fermeture de chaque bocal a été collé du papier picrate. Les bocaux ont été hermétiquement fermés, homogénéisés délicatement et laissés au repos à température ambiante pendant 24 h (Figure 34). Ensuite, les papiers Whatman ont été retirés des bocaux et mis dans des tubes à centrifugeuse. Cinq (5) mL d'eau distillée ont été ajoutés. Les tubes ont été remués énergiquement au vortex. Après 20 minutes d'attente, les tubes ont été à nouveau remués au vortex. La lecture de la densité optique de chaque solution obtenue a été faite au spectrophotomètre (WTW photolab S12) à 510 nm (**Mburu, 2013**). Une courbe d'étalonnage d'absorbance et de la teneur en HCN a été obtenue à partir d'une solution aqueuse stock de Cyanure de Potassium (KCN) avec des teneurs allant de 1 à 100 µg. Selon le guide de **Nambissan, (2011)**, les variétés de manioc étudiées ont été considérées comme « inoffensives » pour des teneurs en HCN comprises entre 0 et 50 mg/kg, « modérément toxiques » pour des teneurs comprises entre 50 et 100 mg/kg et « hautement toxiques » pour des teneurs supérieures à 100 mg/kg.



a) Séchage des papiers picrate b) mise en solution c) après 24 heures

Figure 34 : Photo de la procédure de dosage du HCN par la méthode du papier picrate (Njankouo)

II.3.4- Quantification de la scopolétine dans les extraits issus des échantillons par LC-MS

Les échantillons d'extraits éthanoliques de différentes variétés de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) ont été analysés pour leur teneur en scopolétine par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS) utilisant la méthode de **Buschmann et al., (2000)** modifiée et décrite par **Gnonlonfin et al. (2011)**.

II.3.4.1- Préparation des extraits bruts

L'extraction a été faite par la méthode décrite par **Buschmann et al. (2000)**. 2 g de farine obtenus par broyage des échantillons de différents produits de transformations ont été homogénéisés dans 10 mL d'éthanol absolu (Sigma Aldrich) au moyen d'un agitateur et macéré pendant 48 H. Après filtration à travers un papier filtre (Whatman, n°. 1), le filtrat a été évaporé pour avoir un volume final de 3 mL et stocké à -18° C jusqu'à utilisation.

II.3.4.2- Préparation des échantillons

Des aliquotes d'échantillons (3 mL) des extraits éthanoliques issus des échantillons de *gari*, *fufu*, cossettes, racines entières et cortex des 20 variétés de manioc ont été filtrés et mis dans des flacons de 2 mL, pour l'analyse LC-MS. 5 µL de chaque échantillon ont été injectés dans l'appareil.

II.3.4.3- Préparation du standard

Une solution aqueuse stock de scopolétine concentrée à 1mg/mL a été préparée à partir du standard de scopolétine pure (Sigma Aldrich ; pureté ≥ 99 %). Des concentrations de 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL ont été obtenues de cette solution par dilution.

II.3.4.4- Principe de dosage de la LC-MS

C'est une méthode d'identification et de quantification des constituants d'un mélange même très complexe. Elle utilise un fluide appelé phase mobile qui parcourt une colonne contenant la phase stationnaire. Le mélange à analyser est prélevé et injecté dans l'appareil. Ses constituants sont drainés par la phase mobile au travers de la colonne chromatographique. Ils sont ensuite élués suivant leur affinité avec les différentes phases et caractérisés qualitativement par le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté). Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplée à un enregistreur permet d'obtenir un chromatogramme qui caractérise qualitativement une substance. L'amplitude des pics, ou l'aire limitée par les pics permettent de déterminer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté (Wu *et al.*, 2004).

II.3.4.5- Procédure expérimentale de la LC-MS

Les spectres de masse de plus hautes résolutions étaient obtenus avec un spectrophotomètre Q-TOF (Bruker, Allemagne) équipé d'une source d'ionisation (HESI). Le spectrophotomètre était fonctionnel en mode positif (plage de masse : 100-1000, avec une vitesse de scan de 1.00 Hz) avec un gain de contrôle automatique pour fournir la plus haute précision de mesure de masse dans les limites de déviation de 0,40 ppm utilisant le Formate de Sodium comme agent d'étalonnage. Les paramètres suivants étaient utilisés pour l'expérimentation : tension de bombardement de 4,5 KV, température de capillaire de 200 °C. L'azote était utilisé comme gaine gazeuse (10 L/min). Le spectrophotomètre était relié à un système LC Ultimate 3000 (Thermo Fisher, USA) constitué d'une pompe LC, un détecteur à barrette de Diode (DAD) (λ : 260 nm), un échantillonneur automatique (volume d'injection 5 μ L) et un four à colonne (50° C). Les analyses MS ont été effectuées en mode de surveillance des réactions multiples (MRM) en mesurant les produits de fragmentation des ions pseudo moléculaires protonés des extraits éthanoliques issus des échantillons de *gari*, *fufu*, cossettes, cossettes entières et cortex des 20 variétés de manioc. La phase mobile isocratique était composée du système solvant H₂O (+ 0,1 % HCOOH) (A)/acétonitrile (+ 0,1 % HCOOH) (B). Les échantillons étaient analysés en utilisant un gradient programmé comme suit : 98 % de (A) pendant 0,5 min, un gradient linéaire de 98 % de (B) pendant 4 min, après 98 % de (B) pendant 0,5 min, puis retour du système dans sa condition initiale (98 % de A) à la limite de 1 min, et s'équilibre pendant 1 min.

II.3.4.6- Quantification et screening de la variété et du produit de transformation de manioc ayant la teneur la plus élevée en scopolétine

Une courbe d'étalonnage d'Aire en fonction de la teneur en scopolétine ($A = f(C_{\text{scopolétine}} \text{ pure})$) a été obtenue à partir de ces dilutions et les teneurs en scopolétine des différents échantillons ont été ainsi déterminées. Le screening a porté sur les 20 variétés et les différents produits de transformation de manioc afin de cibler la variété et le produit de transformation de manioc (*fufu*, *gari*, cossettes, racines entières et cortex) qui aurait favorisé une meilleure accumulation de la scopolétine.

II.3.5- Évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine sur les moisissures isolées du maïs

II.3.5.1- Isolement et identification des moisissures des grains de maïs

✓ Ensemencement des grains

Les grains de maïs ont été placés dans les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA et incubés à $28 \pm 4^\circ \text{C}$ (Figure 35) (Sreenivasa *et al.*, 2010).

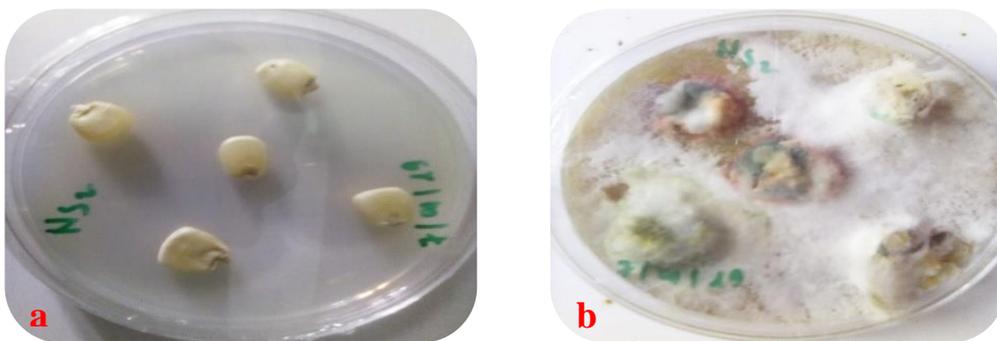


Figure 35 : Photo d'ensemencement des grains de maïs sur milieu PDA (a); Photo du milieu PDA envahit par les moisissures du maïs (b) (Njankouo)

✓ Isolement, purification et identification des isolats

Dès l'apparition des colonies, une portion d'hyphe terminal de chaque mycélium présentant des caractères spécifiques a été repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA, puis incubé à $28 \pm 4^\circ \text{C}$ pendant 4 jours. Cette opération a été effectuée plusieurs fois avec un matériel préalablement stérilisé et sous hôte à flux laminaire. L'identification des isolats purs obtenus a porté sur l'examen macroscopique et microscopique après culture de ceux-ci sur les milieux spécifiques Czapeck (Cz), MEA (*Malt Extract Agar*) et CYA (*Czapeck Yeast extract Agar*) telle que décrite par Dufresne, (2018).

Les caractères macroscopiques observés étaient :

- ✓ Vitesse de croissance ;
- ✓ Texture de thalle (duveteuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse) ;
- ✓ Couleur de thalle (pigmentation du mycélium, couleur des conidies) ;
- ✓ Couleur de revers de la culture et présence d'un pigment diffusible ;
- ✓ Odeur ;
- ✓ Exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien).

Quant aux caractères microscopiques, un fragment de mycélium à observer a été déposé sur une lame porte objet. L'ensemble a été recouvert par une lamelle et porté au microscope optique. Les critères microscopiques ont reposé sur :

- ✓ La taille du conidiophore ;
- ✓ La taille et la forme de la vésicule ;
- ✓ L'aspect général de la tête aspergillaire (**Dufresne, 2018**).

II.3.5.2- Test in vitro de l'activité antifongique des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine

L'activité antifongique des extraits issus du cortex et du parenchyme de la variété de manioc améliorée « 0110 », qui a présenté la teneur la plus élevée en scopolétine a été investiguée sur cinq isolats de moisissures (*A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp et un isolat non identifié) isolés du maïs en stockage. Les isolats fongiques ont été identifiés suivant les critères morphologiques (observation macroscopique et microscopique) de **Dufresne, (2018)**.

➤ Préparation du milieu de culture PDA

Le milieu de culture gélosé PDA a été préalablement préparé en dissolvant 39 g de PDA synthétique dans 1 L d'eau distillée. Le mélange a été autoclavé à 121° C pendant 15 minutes.

➤ Préparation des solutions d'extraits

100 mL d'extrait brut issus du cortex et du parenchyme ont été dilués dans 1000 mL de milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) préalablement préparé et refroidi à environ 50° C afin d'obtenir les concentrations maximales de 0,6 µg/mL et 5 µg/mL respectivement. Puis chaque mélange initial a été dilué 05 fois pour l'extrait issu du parenchyme et 03 fois pour l'extrait issu du cortex afin d'obtenir les concentrations minimales de 1 µg/mL et 0,2 µg/mL respectivement. Par la suite 10 mL des différents mélanges ont été coulés dans les boîtes de Pétri de 6 mm de diamètre. Le Fluconazole (0,1 mg/mL), un antifongique de référence a été également mélangé au PDA dans les mêmes conditions et utilisé comme témoin positif. Tandis que l'éthanol pur (10 mL/L de PDA) a été utilisé comme témoin négatif. Après mélange, la

concentration était de 0,01 mL/mL, VV. Toutes les solutions ont été préparées dans les conditions stériles sous une hôte à flux laminaire.

➤ Préparation de l'inoculum fongique

A partir d'une culture de 07 jours sur milieu PDA des isolats purs préalablement obtenus, une colonie de chaque boîte de Pétri (contenant l'isolat) a été introduite respectivement dans 100 mL d'eau distillée stérile. Le mélange a été vortexé afin d'homogénéiser l'inoculum ; les conidies ont ainsi été comptées.

➤ Comptage des spores de l'inoculum fongique

Le comptage des conidies a été fait en utilisant la cellule de Malassez (Germany ; PO. 2000 mm ; S 0,0025 mm²). La suspension a été homogénéisée puis 1 mL de chaque inoculum fongique a été prélevé et passé au vortex. Après montage de la cellule de Malassez, la suspension fongique a été prélevée, grâce à une pipette pasteur, et introduit dans la chambre de comptage par capillarité. Le dispositif a été porté à l'observation au microscope optique, objectif 40×. Ceci a permis de compter dans 10 µL de suspension fongique 2,5×10⁴ spores et 2,5×10⁵ spores dans 100 µL de suspension fongique.

➤ Ensemencement de l'inoculum et incubation

Après polymérisation de l'agar, 100 µL de chaque inoculum fongique ont été respectivement déposés au centre de chaque boîte de Pétri contenant le milieu PDA + extrait parenchyme/cortex, PDA + témoin positif/négatif, PDA simple. Les tests ont été effectués en triplicate et les boîtes de Pétri ont été incubées à 28 ± 4° C. Après 5 jours d'incubation le diamètre mycélien a été mesuré. Le Pourcentage d'Inhibition (PI) était estimé en utilisant la méthode décrite par **Dohou et al. (2004)**. Il a été calculé relativement au contrôle de croissance par la méthode de **Kumar et al. (2007)** dont la formule est la suivante :

$$\text{PI} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Légende : PI = Pourcentage d'Inhibition ; A = Diamètre du mycélium sur le milieu témoin et B = Diamètre du mycélium en présence de l'extrait testé.

Lorsque le Pourcentage d'Inhibition se situe entre 75 et 100 %, l'extrait est très actif et la souche fongique est dite très sensible. Pour un pourcentage compris entre 50 et 75 %, l'extrait est actif et la souche fongique est dite sensible. Entre 25 et 50 %, l'extrait est modérément actif et la souche est moins sensible ; l'extrait est soit petit ou non actif quand le Pourcentage

d’Inhibition est entre 0 et 25 % ; dans ce cas la souche est considérée comme insensible ou résistante (Reyes *et al.*, 1997).

II.3.5.3- Détermination des paramètres d’inhibition des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine

II.3.5.3.1- Principe

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration d’antimicrobien capable d’inhiber toute croissance microbienne. La CMI a été déterminée par la méthode décrite par la CLSI, (2012). Le principe est basé sur l’observation visuelle du développement mycélien d’un microorganisme dans les cupules d’une microplaque contenant le bouillon nutritif et une substance antimicrobienne.

II.3.5.3.2- Préparation des microplaques

Un volume de 100 µL de bouillon nutritif stérile a été distribué dans les 96 puits de la microplaque. Ensuite, 100 µL des différents extraits et témoins ont été ajoutés en triplicate à la première ligne. Soit l’extrait issu du cortex de manioc contenant de la scopolétine concentré à 0,6 µg/mL, l’extrait issu du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine concentré à 5 µg/mL, la solution de scopolétine pure à la concentration de 0,1 µg/mL et celle de Fluconazole à la concentration de 0,1 mg/mL. Après homogénéisation une série de dilution (1/2 à 1/64) a été réalisée jusqu’au puits 11 en prélevant après homogénéisation 100 µL du puits précédent et déposer dans le puits suivant. La même opération a été répétée jusqu’à la ligne 11 des puits où les 100 µL prélevés dans ce puits ont été jetés. La ligne 12 des puits a été considérée comme témoin de croissance composé de bouillon nutritif et inoculum fongique uniquement. Ensuite 100 µL d’inoculum fongique ($2,5 \times 10^5$ spores) ont été ajoutés dans tous les puits. Les microplaques ont été recouvertes et incubées à $28 \pm 4^\circ$ C pendant 72 heures. La CMI de l’extrait ou de la substance de référence correspond à la plus faible concentration du puits où aucune croissance mycélienne n’est observable à l’œil nu.

II.3.5.3.3- Détermination de la Concentration Minimale Fongicide (CMF) des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine

La CMF est la plus faible concentration de l’antifongique qui tue 99,99 % de germes dans l’inoculum initial. Elle a été déterminée suivant le protocole décrit par Canton *et al.* (2013). Exactement 20 µL ont été prélevés des deux puits précédents celui correspondant à la CMI et ayant des concentrations d’extraits strictement supérieures à la CMI. Ils ont été ensemencés par la méthode d’étalement, dans les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les

boîtes ont été incubées à $28 \pm 4^\circ \text{C}$ pendant 48 heures. La CMF correspond à la concentration de la boîte de Pétri ayant un nombre de colonies inférieur ou égal à 2 (**Majoras et al, 2005**). L'extrait testé est dit fongistatique si le rapport CMF/CMI est supérieur à 4 et fongicide si ce rapport est inférieur ou égal à 4 (**Nyegue et al., 2006**).

II.3.5.3.4- Application des formulations poudreuses à base de la farine du cortex de manioc « 0110 » dans la conservation de maïs

L'application des formulations poudreuses à base de la farine du cortex de manioc « 0110 » dans la conservation de maïs a été réalisée suivant le protocole modifié de **Tamgno et al. (2018)**. 100 g de maïs bien séché (taux d'humidité mesuré à l'aide d'un humidimètre numérique inférieur à 12 %) contenus dans des pots ont été enrobés avec 2, 4 et 8 mg de poudre de cortex de manioc « 0110 » contenant 0,07 ; 0,14 et 0,28 μg de scopolétine ; 2,8 ; 5,6 et 11,2 μg de HCN et correspondant respectivement à CMI, 2 CMI et 4 CMI. Le pot témoin contenait 100 g de maïs sans poudre. Après homogénéisation, les pots ont été laissés au laboratoire à température ambiante dans un espace sec et bien aéré pendant 30 jours avec agitation périodique. A la fin de cette période, les grains de maïs ont été tamisés dans les conditions stériles pour éliminer l'excès de poudre et ensemencés en triple dans les boîtes de Pétri sur milieu PDA. L'efficacité antifongique des formulations poudreuses du cortex de manioc « 0110 » a été évaluée en observant la croissance du mycélium fongique dans les boîtes de Pétri après 07 jours d'incubation à $28 \pm 4^\circ \text{C}$.

II.3.6- Etude toxicologique de l'extrait contenant de la scopolétine) et de la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN

Cette étude a été conduite chez les rats de laboratoire de souche Wistar pour ce qui est de la toxicité orale aiguë et chez les poulets de chair suivant une exposition subaiguë pendant 30 jours de la dose antifongique.

II.3.6.1-Toxicité orale aiguë de l'extrait issu du cortex de manioc « 0110 » et contenant de la scopolétine

La toxicité orale aiguë de l'extrait brut issu du cortex de manioc et contenant de la scopolétine a été évaluée chez le rat par la méthode d'ajustement (essai limite) conformément à la ligne directrice n° 425 de l'OCDE pour les essais des substances chimiques adoptée le 03 Octobre 2008.

II.3.6.1.1- Préparation des solutions d'essai

L'extrait brut issu du cortex de manioc contenant de la scopolétine a été dissout dans de l'eau distillée à la concentration de 100 mg/mL, puis le mélange a été homogénéisé par agitation (5-10 mn) à l'aide d'un agitateur magnétique. Le volume de solution à administrer aux animaux a été calculé par la formule ci-après :

$$V = \frac{D \times P}{C}$$

Légende : **V** = volume de solution à administrer (mL) ; **D** = dose (mg/kg) ; **P** = poids de l'animal (kg) ; **C** = concentration de la solution à administrer (mg/mL).

II.3.6.1.2- Principe de l'essai limite à 2000 mg/kg

Ce test consiste en l'administration de la dose expérimentale à un animal. S'il meurt, on réalise l'essai principal afin de déterminer la DL₅₀. Si l'animal survit, on traite quatre animaux supplémentaires suivant une séquence, de telle sorte qu'un total de cinq animaux soit testé. Cependant, si trois animaux meurent, l'essai limite s'achève et on entame l'essai principal. La DL₅₀ est supérieure à 2 000 mg/kg si au moins trois animaux survivent. Si un animal meurt de façon inattendue à un moment tardif de l'étude, et si d'autres survivent, il convient d'arrêter le traitement et d'observer tous les animaux afin de voir si d'autres animaux vont également mourir au cours d'une période d'observation similaire. Les morts tardives sont comptabilisées de la même façon que les autres morts.

II.3.6.1.3- Justification du choix de la méthode de l'essai limite

Des informations concernant la toxicité de la scopolétine pure étant connu (composé faiblement toxique, DL₅₀ 3800 mg/kg chez le rat par voie orale, classé dans la catégorie de danger 5 du SHG (Système de Classement Globalement Harmonisé)) (**Cayman Chemical Company, 2016**) et compte tenu de l'usage du cortex de manioc dans l'alimentation des êtres vivants (**Olaifa et al., 2015**), l'essai limite à 2000 mg/kg a été choisie pour estimer la DL₅₀ de l'extrait brut issu du cortex de la racine de manioc contenant de la scopolétine qui est un composé majoritairement formé dans les racines de manioc pendant la période de détérioration physiologique post-récolte (**Bayoumi et al., 2010**). Seuls les rats femelles de 8 semaines d'âge ont été utilisés pour ce test (**OCDE, 2008b**). L'analyse des publications sur les essais classiques de détermination de la DL₅₀ montre en effet que, bien que la différence de sensibilité entre les

deux sexes soit généralement faible, dans les cas où l'on constate une différence, les femelles sont généralement un peu plus sensibles (OCDE, 2000).

II.3.6.1.4- Administration de la substance d'essai

Les animaux ont été privés de nourriture, mais pas d'eau pendant la nuit précédant l'essai. Après le jeun, les animaux ont été pesés et la substance d'essai administrée oralement par gavage à l'aide d'une sonde œsophagienne. Après administration de la substance, les animaux ont été à nouveau privés de nourriture, pendant 3 à 4 heures. L'intervalle de temps entre l'administration de chaque niveau de dose a été fixé à 48 heures au cas où on passait à l'essai principal. En effet, le premier animal reçoit une dose immédiatement inférieure à la meilleure estimation préliminaire de la DL_{50} . Si l'animal survit, le deuxième animal reçoit une dose plus forte. Si le premier animal meurt ou paraît moribond, le deuxième animal reçoit une dose plus faible. Le facteur de progression entre les doses doit équivaloir à l'antilogarithme de 1/ (la pente estimée de la courbe dose-effet) et demeurer constant tout au long de l'essai (une progression de 3,2 correspond à une pente de 2). À défaut d'informations sur la pente de la courbe de la substance d'essai, on applique un facteur de progression de 3,2. Néanmoins, cette période pourra varier en fonction du moment de l'apparition d'effets toxiques éventuels, de leur durée et de leur sévérité. Le cas échéant, l'administration de la dose inférieure devra être retardée jusqu'à ce qu'on ait obtenu la certitude que les animaux précédemment soumis au traitement meurent. L'administration des doses se poursuit en fonction des résultats obtenus sur tous les animaux traités jusqu'à ce moment-là, suivant une séquence d'intervalles fixes (par exemple 48 heures).

L'essai prend fin dès qu'un des critères d'arrêt suivants est rempli :

- a) trois animaux en série survivent à la dose la plus forte ;
- b) cinq inversions de résultat se produisent dans une série de six animaux traités successivement ;
- c) au moins 4 animaux ont suivi la première inversion et les rapports de probabilité spécifiés dépassent la valeur critique.

II.3.6.1.5- Observations

Après traitement, les animaux ont été observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière pendant les premières 4 heures. Ils ont ensuite été observés quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance. Les observations ont

porté sur les modifications de la peau, des poils, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention a porté en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

II.3.6.1.6- Poids corporels

Le poids individuel de chaque animal a été déterminé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai, puis tous les 2 jours après administration de la substance d'essai pendant 14 jours. Les gains pondéraux sur 2 jours ont été calculés, enregistrés et comparés le 2^e, 8^e et 14^e jour après le traitement. La formule ci-dessous a été utilisée pour le calcul :

$$GP = \frac{P_n - P_{n-1}}{P_{n-1}} \times 100$$

Légende : GP = gain pondéral (%) ; P_n = n^{ième} mesure du poids corporel ; P_{n-1} = (n-1)^{ième} mesure du poids corporel ; n est une valeur entière.

II.3.6.2- Test de toxicité subaigüe de la poudre issue du cortex de manioc « 0110 » contenant la scopolétine et le HCN

Ce test a été mené chez les poulets de chair soumis à un régime alimentaire incorporé à la poudre du cortex de manioc donc la dose équivaut à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) obtenue lors du test d'activité antifongique sur les moisissures isolées du maïs en stockage. Ceci conformément à la ligne directrice n° 407 de l'OCDE pour les essais de produits chimiques adoptée le 3 Octobre 2008 avec quelques modifications.

II.3.6.2.1- Préparation de l'aliment

La poudre du cortex de la variété améliorée « 0110 » contenant respectivement 46,37 mg/kg de scopolétine et 142,33 mg/kg de poids sec de HCN a été utilisée pour préparer l'aliment des animaux d'étude. 2 mg de poudre ont été ainsi mélangé de façon homogène à 100 g d'aliment. Cette quantité de poudre contenant respectivement 0,07 µg de scopolétine et 2,8 µg de HCN correspond à une proportion d'une CMI/100g d'aliment. La dose intermédiaire de 2 CMI/100 g (0,14 µg de scopolétine et 5,6 µg HCN) et maximale de 4 CMI/100 g (0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN) d'aliment ont été obtenu en multipliant la CMI par 2 puis par 4 respectivement.

II.3.6.2.2- Groupage des poulets et alimentation

28 poulets de 03 semaines d'âge ont été pesés, marqués, groupés par lot de 7 dans une salle respectant les normes prescrites pour l'élevage des poulets à la ferme expérimentale de l'IRAD et traités aux mêmes quantités d'aliment tous les jours, matin et soir aux mêmes heures pendant 30 jours ainsi qu'il suit :

- ✓ Le lot T, considéré comme témoin était soumis à un régime alimentaire constitué de la provende non incorporé à la poudre de cortex de manioc « 0110 » et de l'eau du robinet;
- ✓ Les lots I, II et III quant à eux étaient soumis aux régimes alimentaires incorporés à la poudre du cortex de manioc de la variété améliorée « 0110 » aux doses de CMI/100g, 2 CMI/100g et 4 CMI/100g d'aliment soit 2 mg, 4 mg et 8 mg/100 g d'aliment respectivement, correspondant aux teneurs de 0,07 µg de scopolétine et 2,8 µg de HCN pour les lots I ; 0,14 µg de scopolétine et 5,6 µg de HCN pour le lot II et 0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN pour le lot III.

II.3.6.2.3- Observations

La période d'observation avait duré 30 jours. Deux fois par jour au minimum, au début et à la fin de chaque journée, un examen de tous les animaux avait lieu, afin d'y déceler des symptômes de morbidité et de mortalité. Des observations ont été faites sur tous les animaux au moins une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même animal), et ensuite une fois par semaine. Les symptômes relevés incluaient, de façon non limitative, les changements affectant la plume, la respiration, la démarche, des stéréotypes (soins corporels excessifs, automutilation, marche à reculons). A partir de la quatrième semaine d'alimentation, la réactivité sensorielle à des stimuli auditifs et l'activité motrice ont été évaluées quotidiennement :

- L'audition a été évaluée en appréciant la réaction des poulets à un claquement brusque des mains ;
- L'activité motrice en appréciant leur réactivité à l'approche de la main.

II.3.6.2.4- Poids corporels

Tous les animaux ont été pesés peu de temps avant le début du traitement, puis tous les 7 jours, et enfin le jour du sacrifice. Les variations pondérales hebdomadaires ont été calculées et enregistrés. La formule utilisée pour le calcul était :

$$GP = \frac{P_n - P_{n-1}}{P_{n-1}} \times 100$$

Légende : GP = gain pondéral (%); P_n = $n^{\text{ième}}$ mesure du poids corporel; P_{n-1} = $(n-1)^{\text{ième}}$ mesure du poids corporel; n est une valeur entière.

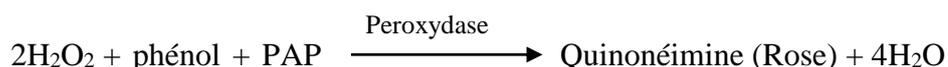
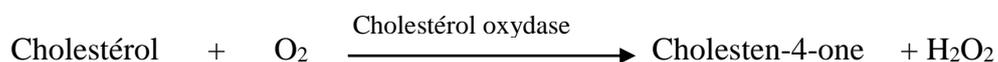
II.3.6.2.5- Biochimie clinique

A la fin de la période d'essai, les animaux ont été mis à jeun durant toute une nuit puis des échantillons de sang artéroveineux ont été prélevés au cours du sacrifice dans des tubes secs de 5 mL. Le sang contenu dans ces derniers a été centrifugé à 3000 trs/min pendant 15 min. Le sérum obtenu a été utilisé pour des dosages biochimiques, conformément aux protocoles fournis avec les kits commerciaux Biolabo. Il s'agissait : du Cholestérol total, des Triglycérides, du HDL-Cholestérol, du Malone dialdéhyde (MDA) (Ononogbu, 1988a ; Ononogbu *et al.*, 1988b), de la Créatinine, de l'Alanine Aminotransférèse (ALAT) et de l'Aspartate Aminotransférèse (ASAT).

❖ Dosage du Cholestérol total

➤ Principe du test

Le Cholestérol est présent dans le sérum sous la forme d'esters de Cholestérol et de Cholestérol libre. Les esters de Cholestérol présents dans le sérum sont hydrolysés par la Cholestérol-estérase puis le Cholestérol est mesuré en l'oxydant avec la Cholestérol-oxydase pour produire du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène à son tour réagit avec le phénol et le 4-amino-antipyrine en présence de la peroxydase pour produire la quinonéimine à coloration rose. L'intensité de la coloration produite est directement proportionnelle à la concentration de Cholestérol dans l'échantillon.



➤ Réactifs

Précipitant : Acide phosphotungstique 0,55 mmol/L; Chlorure de Magnésium 25 mmol/L

Standard : Cholestérol 1,29 mmol/L (50 mg/dL).

Tableau VI : Procédure manuelle de dosage du Cholestérol total

Le Pipetage a été fait dans les tubes à essai comme suit :			
	Macro	Semi Micro	
Échantillon	500 mL	200 mL	
Précipitant HDL	1000 mL	-	
Précipitant dilué	-	500 mL	
Les préparations ont été homogénéisées puis incubées pendant 10 minutes à température ambiante, ensuite centrifugées à 4000 trs/mn. Le contenu en cholestérol a été déterminé dans le surnageant clair dans les 2 heures qui suivaient, par la méthode CHOD-PAP.			
PROCEDURE DU CHOD-PAP CHOLESTEROL : Un seul réactif blanc a été utilisé par série. Le Pipetage a été fait dans les tubes à essai comme suit :			
	Réactif blanc	Standard	Echantillon
Eau distillée	100 mL	-	-
Surnageant	-	-	100 mL
Standard	-	100 mL	-
Réactif	1 mL	1 mL	1 mL
Les préparations ont été homogénéisées puis incubées 10 minutes à température ambiante. Puis l'absorbance du standard et des échantillons a été lue contre celle du réactif blanc.			

➤ **Calcul de la concentration de cholestérol :**

$$[\text{Cholestérol}]_e = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs standard}} \times [\text{Cholestérol}]_s$$

Légende : - $[\text{Cholestérol}]_e$: Concentration de cholestérol dans l'échantillon

- $[\text{Cholestérol}]_s$: Concentration de cholestérol dans le standard

- abs : mesure de l'absorbance

❖ **Dosage du HDL-cholestérol**

➤ **Principe du test :**

Les LDL sont précipités par addition de l'acide phosphotungstique en présence des ions magnésium. La fraction HDL reste dans le surnageant et est déterminée par le dosage du cholestérol.

➤ **Réactifs :**

Tampon : 50 mmol/L, Cholestérol oxydase : > 100 UI, Cholestérol Estérase :> 150 UI ; 4-aminoantipyrine : 0,3 mmol/L ; Peroxydase : > 800 UI; Phénol : 6,0 mmol/L ; Standard Cholestérol : 200 mg/dL.

Tableau VII : Procédure manuelle de dosage du HDL-Cholestérol

Le Pipetage a été fait dans les tubes à essai comme suit :		
	Réactif blanc	Standard/Echantillon
Eau distillée	10 mL	-
Standard/Echantillon	-	10 mL
Réactif	1000 mL	1000 mL

Les préparations ont été homogénéisées puis incubées pendant 10 minutes à 20-25° C. Puis l'absorbance des standard et échantillons a été lue contre celle du réactif blanc.

➤ **Calcul de la concentration de HDL :**

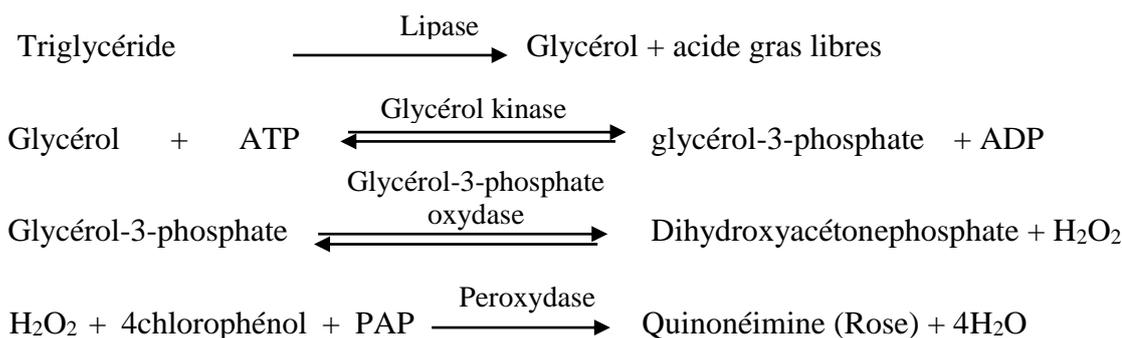
$$[\text{HDL}]_{\text{su}} = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs standard}} \times [\text{HDL}]_{\text{s}}$$

Légende : - $[\text{HDL}]_{\text{su}}$: Concentration de HDL dans le sérum
- $[\text{HDL}]_{\text{s}}$: Concentration de HDL dans le standard
- Abs : mesure de l'absorbance

❖ **Dosage des Triglycérides**

➤ **Principe du test**

Les Triglycérides sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase pour donner le glycérol et des acides gras. Puis, par l'action successive du glycérol kinase en présence de Mg^{2+} et du glycérol phosphatase en présence d'ATP, le glycérol est convertit en dihydroxyacétone phosphate et peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène à son tour réagit avec le chlorophénol et le 4-amino-antipyrine en présence de la peroxydase pour produire le 4-(p-benzoquinone-monoïmino)-phénazone coloré. L'intensité de la coloration produite est directement proportionnelle à la concentration de Triglycérides dans l'échantillon.



➤ **Réactifs**

Tampon : Tampon pH 7,8 50 mmol/L ; P-chlorophénol 2 mmol/L ; Lipoprotéine Lipase 150000 U/L ; Glycérolkinase 800 U/L ; Glycérol-3-P-oxydase 4000 U/L ; Peroxydase 440 U/L ; 4-aminoantipyrine 0,7 mmol/L ; ATP 0,3 mmol/L ; Mg²⁺ 40 mmol/L ; Na-cholate 0,20 mmol/L ; Potassium-Hexacyanoferrate (II) 1 µmol/L.

Standard : Concentration de triglycérides de 200 mg/dL (2,24 mmol/L).

Tableau VIII : Procédure manuelle de dosage des triglycérides

Le Pipetage a été fait dans les tubes à essai comme suit :		
	Réactif blanc	Standard/échantillon
Eau distillée	10 mL	-
Standard/Echantillon	-	10 mL
Réactif	1000 µL	1000 µL

Les préparations ont été homogénéisées puis incubées pendant 10 minutes à 20-25° C. Puis l'absorbance des standard et échantillons a été lue contre celle du réactif blanc.

➤ **Calcul de la concentration de triglycérides**

$$[\text{Triglycérides}]_e = \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs standard}} \times [\text{Triglycérides}]_s$$

Légende : - [Triglycérides]_e : Concentration des triglycérides dans l'échantillon

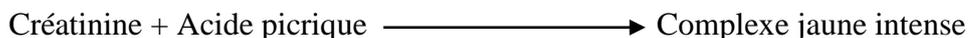
- [Triglycérides]_s : Concentration des triglycérides dans le standard

- Abs : mesure de l'absorbance

❖ Dosage de la Créatinine

➤ Principe du test

La Créatinine réagit avec l'acide picrique en milieu alcalin pour former un complexe jaune intense. La quantité de complexe formé est directement proportionnelle au taux de Créatinine dans l'échantillon.



➤ Réactifs

Hydroxyde de sodium : 0,32 mol/L ; Acide picrique : 35 mmol/L ; Standard: 177 $\mu\text{mol/L}$ (2 mg/dL).

Tableau IX : Procédure manuelle de dosage de la Créatinine

Le Pipetage a été fait dans les tubes à essai comme suit :	
	Standard/échantillon
Standard/échantillon	100 mL
Réactif de travail	1 mL
Les préparations ont été homogénéisées. Puis l'absorbance des standard et échantillons a été lue après 30 secondes puis encore après exactement 120 secondes.	

➤ Calcul de la concentration de créatinine

Le changement dans l'absorbance de l'échantillon/standard (Δabs) = abs. à 150 secondes - abs. à 30 secondes.

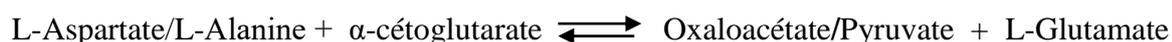
$$[\text{Créatinine}]_e = \frac{\Delta\text{abs échantillon}}{\Delta\text{abs standard}} \times 2$$

Légende : - $[\text{Créatinine}]_e$: Concentration de créatinine dans l'échantillon (mg/dL) ;
- abs : mesure de l'absorbance.

❖ Dosage de l'ALAT/ASAT (Reitman et Frankel, 1957)

➤ Principe du test

Le dosage repose sur le transfert enzymatique médié par L'ALAT/ASAT d'un groupement amine de la L-alanine/L-aspartate au α -cétoglutarate pour obtenir la L-glutamate et le pyruvate/l'oxaloacétate.



➤ Réactifs

Tampon: Tampon phosphate 100 mmol/L; L-alanine/ L-aspartate 200 mmol/L; α -oxoglutarate 2,0 mmol/L;

Réactif coloré : 2,4-dinitrophenyl hydrazine 2,0 mmol/L ;

Standard pyruvate : Pyruvate 2,0 mmol/L ; Hydroxyde de sodium 4,0 mol/L.

Tableau X : Procédure manuelle de dosage de l'ALAT/ASAT

Le Pipetage a été fait dans les tubes à essai comme suit (37 °C):		
	Réactif blanc	Test
Echantillon	-	100 μ L
Tampon ALAT/ASAT (R1)	500 μ L	500 mL
Eau distillée	100 mL	-
Les préparations ont été homogénéisées et incubées pendant exactement 30 minutes à 37°C dans un bain-marie.		
Réactif coloré ALAT/ASAT (R2)	500 μ L	500 mL
Les préparations ont été homogénéisées et incubées pendant exactement 20 minutes à température ambiante.		
NaOH (dilué)	5,0 mL	5,0 mL
Les solutions ont été homogénéisées puis l'absorbance a été lue contre le réactif blanc après 5 minutes. L'activité de l'ALAT/ASAT correspondante à la densité optique lue a été faite via la courbe d'étalonnage.		

❖ Dosage des Aldéhydes Maloniques (MDA)

➤ Principe

Au cours de la phase finale de l'oxydation, les peroxydes se décomposent en divers composés volatiles responsables de l'odeur de rance. Il y a notamment formation d'aldéhydes dont le Malone Dialdéhyde (MDA) qui, en milieu acide et à chaud (pH 2 à 3 et 90° C), réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose qui a un maximum d'absorption à 532 nm et dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de Malone Dialdéhyde formée (**Fernandes et al., 1997**).

➤ **Préparation des solutions**

✓ **Tampon de Mc-Even**

Pour la préparation de la solution de Mc-Even, 8,6 g de NaCl ; 0,42 g de KCl ; 0,109 g de NaH_2PO_4 ; 1 g de CO_3NaH ; 0,03 g de MgCl_2 et 2 g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ont été dissous dans de l'eau distillée pour un volume de 500 mL (solution A). Ensuite, 0,28 g de CaCl_2 ont été dissous dans de l'eau distillée pour un volume de 50 mL (solution B). Les solutions A et B ont été mélangées et le volume complété à 1000 mL par ajout d'eau distillée.

✓ **Solution d'acide trichloroacétique 20 %**

La solution d'acide trichloroacétique (TCA) 20 % a été obtenue en dissolvant 20 g de TCA dans de l'eau distillée pour un volume total de 100 mL.

✓ **Solution d'acide thiobarbiturique 0,67 %**

La solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % a été obtenue en dissolvant 0,67 g de TBA dans 50 mL d'eau distillée. Le volume a ensuite été complété à 100 mL par ajout d'eau distillée.

Tableau XI : Procédure manuelle de dosage des Aldéhydes Maloniques (MDA)

	Blanc réactif	Echantillon
Tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4/ tampon Mc-Even (μL)	250	-
Sérum (μL)	-	250
TCA 20 % (μL)	125	125
TBA 0,67 % (μL)	250	250

Les tubes ont été bouchés par de billes de verre, chauffés à 90° C au bain-marie pendant 10 minutes, refroidis à l'eau de robinet et centrifugés à 3000 tours/min à température ambiante pendant 15 minutes. Le surnageant a été pipeté et l'absorbance lue à 530 nm contre le blanc.

➤ **Calcul de la concentration du MDA**

$$[\text{MDA}] = \frac{\Delta\text{DO}}{\epsilon \times L \times v}$$

Légende : -[MDA] = Concentration de MDA ($\text{mol}/\mu\text{L}$) ;

- ΔDO = DO essai - DO blanc ;

-L = Trajet optique (1 cm) ;

- ϵ = Coefficient d'extinction molaire ($15600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ;

-m = volume sérum (μL).

II.3.6.2.6- Coupes histologiques

Autopsie générale : Tous les animaux de l'étude ont fait l'objet d'une autopsie générale. Le foie, les reins et le cerveau de tous les poulets ont été débarrassés de tout tissu adhérent, lavés à l'eau physiologique et pesés à l'état frais aussitôt après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation. Après la pesée, ces organes ont été conservés dans du liquide de Bouin aqueux fort pour les examens histopathologiques (**Rigalli et Veronica, 2009**). Le poids relatif du foie, des reins, du cerveau, a été déterminé par la formule ci-contre:

$$\text{Poids relatif de l'organe(\%)} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe(g)}}{\text{Poids corporel de l'animal(g)}} \times 100$$

Histopathologie : Les organes d'intérêts ont été conservés dans du liquide de Bouin aqueux fort pour y être fixés. Le liquide de Bouin aqueux fort a été obtenu après mélange homogénéisé des substances suivantes : Acide acétique glacial (1 volume), Formol pur du commerce (5 volumes), Acide picrique à saturation dans l'eau (15 volumes). Le mode opératoire suivant a été ensuite employé pour la réalisation des coupes histologiques :

1)- « **Trimming** » : des tranches fines et régulières de chaque organe fixé ont été prélevées à l'aide d'un bistouri, puis rangées dans des cassettes.

2)- « **Déshydratation** » : les cassettes ont ensuite été passées dans des bains d'éthanol de concentration croissante : éthanol 50° (1h) ; éthanol 70° (1h) ; éthanol 95° n°1 (1h) ; éthanol 95° n°2 (1h30mn) ; éthanol 100° n°1 (1h) ; éthanol 100° n°2 (1h30mn) ; éthanol 100° n°3 (2h) ; les cassettes ont ensuite été passées dans 2 bains de xylènes respectivement 1h et 2h ; les cassettes ont enfin été passées dans 3 bains de paraffine à 60 ° C respectivement 1h, 1h30 et 2h.

3)- « **Inclusion** » : les tissus ont ensuite été placés dans des moules remplis de paraffine en fusion qui a ensuite été mise à solidifier sur une surface froide après orientation appropriée du tissu dans le bloc.

4)- « **Coupes** » : des coupes de 5 µm des blocs ont été réalisées à l'aide d'un microtome. Une fois coupées, les sections ont été mises à déplier dans un bain-marie (environ 40° C) puis récupéré sur des lames. Les lames ont ensuite été laissées 24h à l'étuve (45° C) avant la coloration.

5)- « **Coloration** »: les coupes ont ensuite été passées dans une batterie de déparaffinage constituée d'une série de bains de 5 à 10 mn chacun selon la séquence suivante : xylène n°1 ; xylène n°2 ; xylène n°3 ; éthanol à 100° n°1 ; éthanol à 100° n°2 ; éthanol à 100° n°3 ; éthanol

à 95° ; éthanol à 70° ; eau distillée. Les coupes ont ensuite été immergées 10 mn dans un bac contenant de l'hématoxyline de Mayer, puis rincées pendant 10 mn à l'eau du robinet courante. Les coupes ont ensuite été passées dans un bain d'éthanol 95° pendant 5 mn, puis elles ont été immergées 5 mn dans de l'éosine alcoolique 0,5 % + 40 µL d'acide acétique par 100 mL de solution. Les coupes ont ensuite été déshydratées dans de l'éthanol 100° (3 × 5 mn), éclaircies dans du xylène (3 × 5 mn).

6)- « Montage » : une fois sortie du xylène, quelques gouttes de résine ont été déposées sur les coupes, puis ces dernières ont été recouvertes d'une lamelle de verre pour l'observation au microscope.

II.3.6.3- Analyse statistique

Les données ont été analysées statistiquement par les logiciels SPSS pour Windows version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) et GraphPad Prism 7 pour comparer les moyennes des teneurs en HCN et en scopolétine dans les différents échantillons et les moyennes des taux de paramètres biochimiques dans les sera sanguin de poulets de chairs (*Gallus gallus domesticus*). Toutes les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± erreur standard (ES). L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour comparer les teneurs de HCN et de scopolétine dans les différentes variétés et produit de transformation de manioc et le test t de Student quant à lui pour comparer le taux des paramètres biochimiques, les poids de poulets et les poids relatifs d'organes des poulets entre les groupes traités et témoins. Les différences étaient considérées comme significatives pour $p < 0,05$. Les représentations graphiques ont été obtenues en utilisant le Tableur Windows Microsoft Excel 2013.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- Quantification du HCN et de la scopolétine dans les variétés et produits de transformation de manioc

III.1.1- Teneur en HCN du parenchyme des principales variétés de manioc

Le tableau XII donne la teneur en HCN des 20 variétés de manioc. Il ressort de ce tableau que le taux de HCN varie de $61,03 \pm 9,44$ à $118,04 \pm 7,16$ ppm pour les variétés améliorées et de $79,34 \pm 3,58$ à $181,33 \pm 0,48$ ppm pour les variétés locales. Au vu des résultats obtenus, les variétés de manioc étudiées peuvent être classées semi-quantitativement selon le guide de **Nambissan *et al.* (2011)** en deux classes en fonction de la teneur en HCN total :

- Manioc « modérément toxiques » : Pola Rouge Beul, Macoumba, Man Mbong, Ngon Ezele, Owona Ekani, Mnom Ewondo, 040, 95109, 8034, 8017 et 8061.

- Manioc « hautement toxiques » : Madaga, Mbida et Mbani, Minbourou, le Blanc (ntanghe), Champion, 0110, 92/0326, 961414 et fonctionnaire.

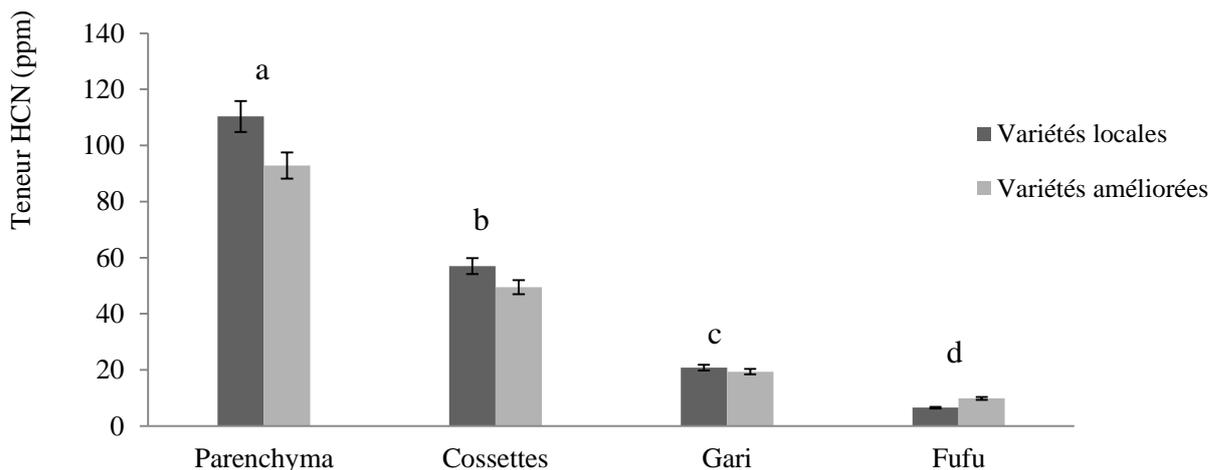
Tableau VI : Teneur en HCN pour chacune des 20 variétés de manioc (10 locales et 10 améliorées) à l'état frais obtenu après dosage par la méthode d'analyse au papier picrate

Variétés	Codes	Teneur en HCN (ppm)
Champion	A1	$102,69 \pm 4,07^{cdef}$
0110	A2	$116,43 \pm 3,75^f$
92/0326	A3	$96,77 \pm 15,15^{bcdef}$
961414	A4	$118,04 \pm 7,16^f$
040	A5	$84,79 \pm 6,84^{bc}$
95109	A6	$94,47 \pm 10,5^{bcde}$
8034	A7	$61,37 \pm 12,06^a$
Fonctionnaire	A8	$116,43 \pm 7,17^{ef}$
8017	A9	$61,03 \pm 9,45^a$
8061	A10	$86,70 \pm 2,93^{bc}$
Pola Rouge Beul	L1	$90,78 \pm 9,29^{bcd}$
Madaga	L2	$181,33 \pm 0,49^h$
Mbida et Mbani	L3	$158,37 \pm 9,61^g$
Minbourou	L4	$112,30 \pm 10,43^{def}$
Le Blanc (Ntanghe)	L5	$104,53 \pm 19,23^{cdef}$
Macoumba	L6	$97,84 \pm 3,26^{bcdef}$
Man Mbong	L7	$97,00 \pm 2,44^{bcdef}$
Ngon ezele	L8	$79,34 \pm 3,58^{ab}$
Owona Ekani	L9	$85,48 \pm 0,98^{bc}$
Mnom Ewondo	L10	$91,70 \pm 3,42^{bcd}$

Légende : Les données sont exprimées par moyenne \pm SE, (n=3); les différentes lettres (a, b, c...) indiquent la Significativité à $P < 0.05$. A1, A2,... et A10 = variétés améliorées ; L1, L2,... et L10 = variétés locales. A1 = Champion, A2 = 0110, A3 = 92/0326, A4 = 961414, A5 = 040, A6 = 95109, A7 = 8034, A8 = Fonctionnaire, A9 = 8017, A10 = 8061, L1 = Pola Rouge Beul, L2=Madaga, L3=Mbida et Mbani, L4 = Minbourou, L5 = Le Blanc (Ntanghe), L6 = Macoumba, L7 = Man Mbong, L8 = Ngon Ezele, L9 = Owona Ekani, L10 = Mnom Ewondo.

III.1.2- Impact de la transformation sur la teneur initiale du HCN dans le parenchyme de manioc

La figure 36 montre l'influence de quelques procédés de transformation du manioc sur la teneur initiale en HCN des parenchymes des différentes variétés de manioc. Il ressort de cette figure que la toxicité du manioc baisse avec les opérations unitaires mises en œuvre durant la transformation. Avec le découpage des parenchymes et le séchage au soleil pendant 06 jours qui sont les opérations prépondérantes dans la production des cossettes, la teneur en HCN résiduelle a baissé de 48,37 % pour les variétés locales et 46,71 % pour les variétés améliorées. Cette baisse a été beaucoup plus importante lorsque les parenchymes subissaient une fermentation sèche (*gari*) car la toxicité a été réduite à 81,13 % et 79,14 % respectivement pour les variétés locales et améliorées. Le *fufu* qui résulte d'une fermentation humide a présenté le plus fort taux de réduction de toxicité (94,08 % et 89,42 % pour les variétés locales et améliorées respectivement).

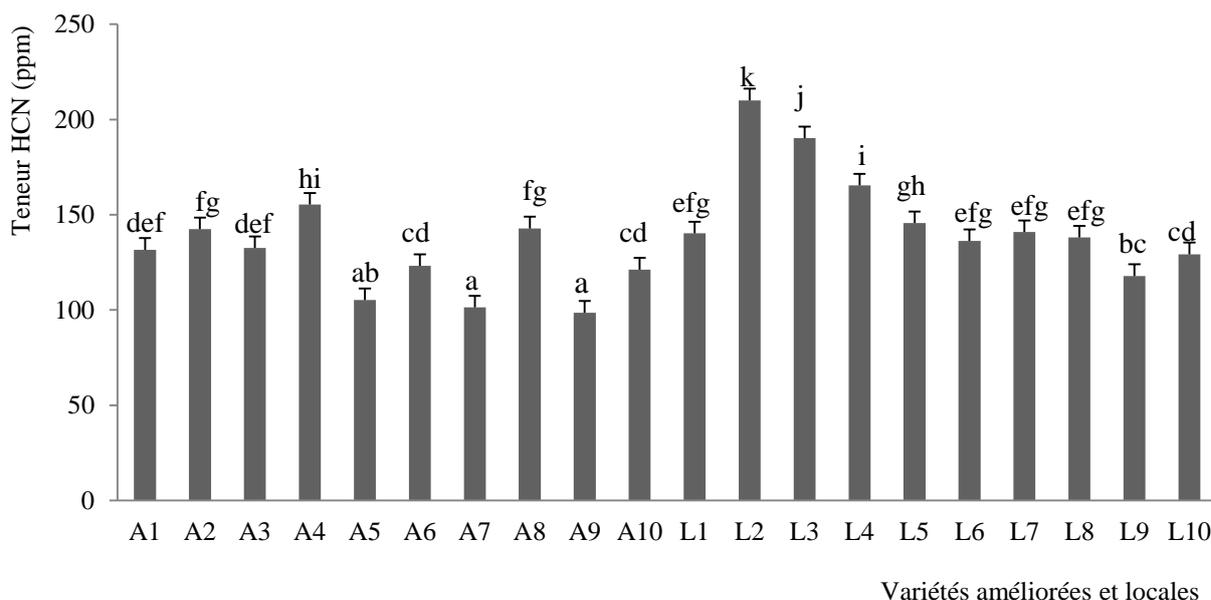


Légende : Les données sont exprimées par moyenne \pm ES, (n = 20); les différentes lettres (a, b, c) indiquent la Significativité à $P < 0,05$.

Figure 36 : Moyenne des teneurs d'acide cyanhydrique (HCN) résiduel dans les différents produits de transformation du manioc

III.1.3- Teneur en HCN du cortex

La figure 37 montre les teneurs en HCN totale des cortex des différentes variétés, qui sont des sous-produits de transformation du manioc. Il ressort de cette figure que les teneurs en HCN totale des cortex des différentes variétés ont été plus importantes que celles obtenues dans les parenchymes. Celles-ci varient de $117,80 \pm 11,32$ à $210,07 \pm 9,15$ ppm et de $98,43 \pm 15,49$ à $155,44 \pm 12,11$ ppm pour les variétés locales et améliorées respectivement.



Légende : Les données sont exprimées par moyenne \pm SE, (n=3) ; les différentes lettres (a, b, c...) indiquent la Significativité à $P < 0,05$. A1, A2, ... et A10 = variétés améliorées ; L1, L2, ... et L10 = variétés locales. A1 = Champion, A2 = 0110, A3 = 92/0326, A4 = 961414, A5=040, A6 = 95109, A7 = 8034, A8=Functionnaire, A9 = 8017, A10 = 8061, L1 = Pola Rouge Beul, L2 = Madaga, L3 = Mbida et Mbani, L4 = Minbourou, L5 = Le Blanc (Ntangahe), L6 = Macoumba, L7 = Man Mbong, L8 = Ngon Ezele, L9 = Owona Ekani, L10 = Mnom Ewondo.

Figure 37 : Teneurs en acide cyanhydrique (HCN) totale des cortex des différentes variétés de manioc

III.1.4-Teneurs en scopolétine dans les 20 variétés de manioc

Les chromatogrammes obtenus par LC- MS du dosage des extraits issus du parenchyme des différentes variétés de manioc après 06 jours de séchage, indiquent que ces extraits contiennent de la scopolétine. Les chromatogrammes des échantillons et celui du standard de scopolétine présentent des pics qui sortent au même temps de rétention égale à 2,1 (Figure 38). Les spectres de masse de ces extraits à ce temps de rétention ont permis de confirmer qu'il s'agit bien de la molécule de scopolétine (Figure 39, 40). Toutes les variétés de manioc étudiées contiennent donc de la scopolétine (Tableau XIII) à des teneurs significativement différentes ($p < 0,05$). Les variétés améliorées ont des teneurs de scopolétine les plus importantes variant de $51,53 \pm 0,11$ mg/kg à $155,32 \pm 0,42$ mg/kg de poids sec. Les variétés améliorées telles que 0110, 961414, 92/0326 se démarquent avec les teneurs plus importantes respectivement $155,32 \pm 0,42$ mg/kg ; $123,48 \pm 0,08$ mg/kg et $99,23 \pm 0,15$ mg/kg de poids sec. Les variétés locales quant à elles ont les teneurs les moins importantes avec une teneur maximale de $96,85 \pm 2,35$ mg/kg de poids sec obtenue avec la variété *Mbida et mbani* et comme teneur minimale $33,48 \pm 0,02$ mg/kg obtenue avec la variété *Pola rouge beul*.

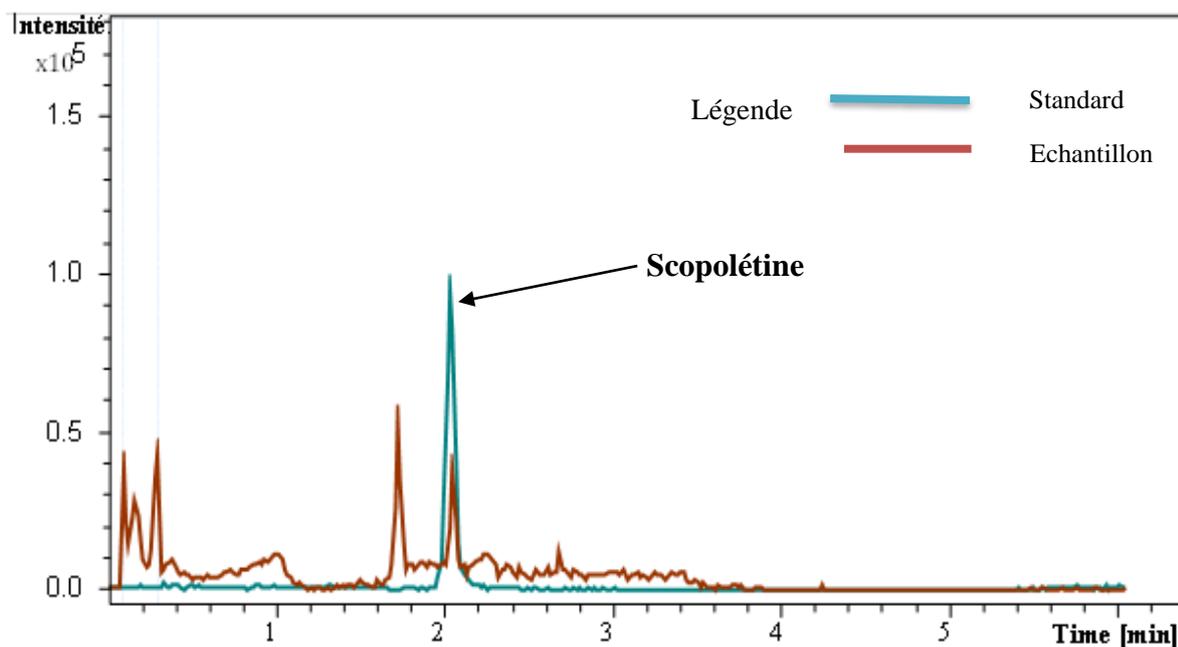


Figure 38 : Chromatogramme du standard scopolétine de référence et du parenchyme de la variété « 0110 »

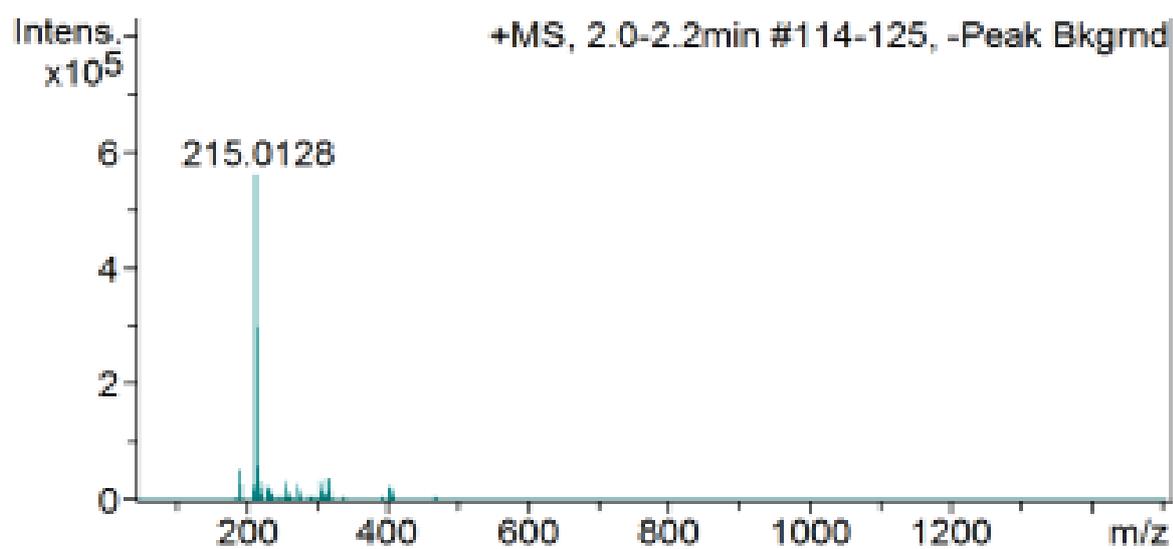


Figure 39 : Spectre de masse de la scopolétine ($m/z=215$)

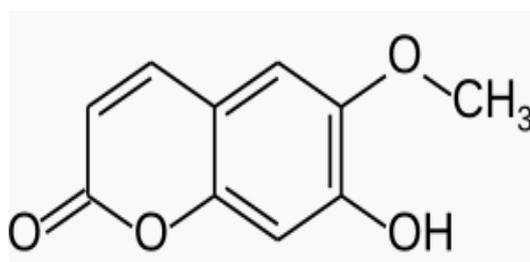


Figure 40 : Structure chimique de la scopolétine

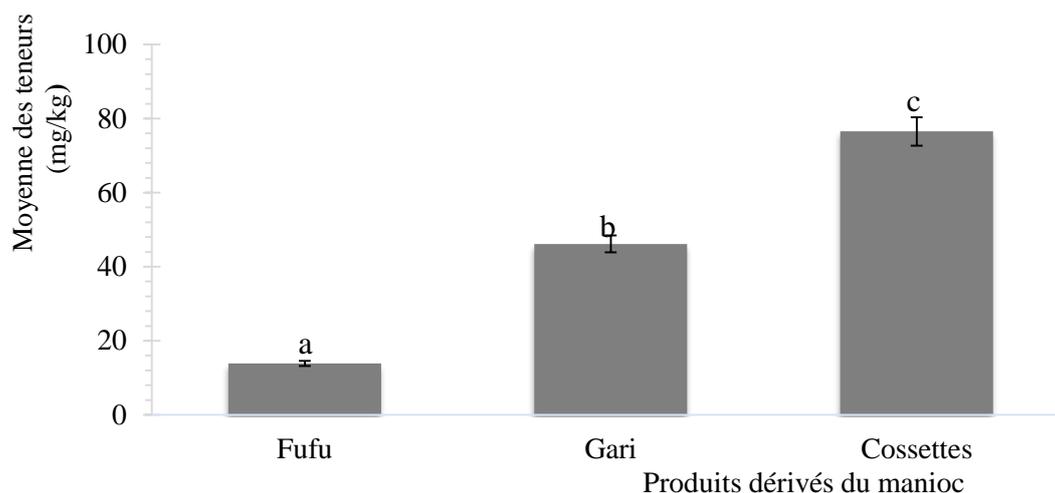
Tableau VII : Teneurs en scopolétine dans le parenchyme des différentes variétés de manioc

Variétés	Codes	Teneurs en scopolétine (mg/kg)
Champion	A1	93,66 ± 0,05 ^d
0110	A2	155,32 ± 0,42 ^a
92/0326	A3	99,23 ± 0,15 ^c
961414	A4	123,48 ± 0,08 ^b
040	A5	88,87 ± 0,11 ^e
95109	A6	68,17 ± 0,02 ^k
8034	A7	77,66 ± 1,76 ^g
Fonctionnaire	A8	70,80 ± 0,08 ⁱ
8017	A9	57,09 ± 0,07 ^m
8061	A10	51,53 ± 0,11 ^o
Pola rouge beul	L1	33,48 ± 0,02 ^r
Madaga	L2	43,73 ± 0,05 ^q
Mbida et mbani	L3	96,85 ± 2,35 ^c
Minbourou	L4	72,57 ± 0,42 ^h
Le blanc (Ntanghe)	L5	68,39 ± 0,05 ^l
Macoumba	L6	50,27 ± 0,17 ^p
Man Mbong	L7	56,16 ± 0,04 ⁿ
Ngon ezele	L8	82,19 ± 0,04 ^f
Owona ekani	L9	78,47 ± 0,4 ^s
Mnom ewondo	L10	70,35 ± 0,09 ^j

Légende : Les données sont exprimées par moyenne ± SE, (n=3) ; les différentes lettres (a, b, c....) indiquent la Significativité à $P < 0.05$. A1, A2, et A10 = variétés améliorées ; L1, L2,... et L10 = variétés locales. A1 = Champion, A2 = 0110, A3 = 92/0326, A4 = 961414, A5 = 040, A6 = 95109, A7 = 8034, A8 = Fonctionnaire, A9 = 8017, A10 = 8061, L1 = Pola Rouge Beul, L2 = Madaga, L3 = Mbida et Mbani, L4 = Minbourou, L5 = Le Blanc (Ntanghe), L6 = Macoumba, L7 = Man Mbong, L8 = Ngon Ezele, L9 = Owona Ekani, L10 = Mnom Ewondo.

III.1.5- Teneurs moyennes en scopolétine dans quelques produits de transformations du manioc

Les teneurs en scopolétine des extraits issus des produits dérivés du manioc que sont le *fufu*, le *gari* et la cossette sont représentées dans la figure 41 ci-dessous. Il ressort de cette figure que quel que soit la variété (locale ou améliorée), les cossettes constituent le produit de transformation qui a favorisé une meilleure accumulation de la scopolétine comparée au *gari* et au *fufu*. La teneur moyenne en scopolétine obtenue a été de $76,53 \pm 28,29$ mg/kg dans les cossettes, $46,6 \pm 29,13$ mg/kg dans le *gari* et $13,9 \pm 29,2$ mg/kg dans le *fufu*. Ces valeurs ont été toutes significativement différentes ($p < 0,05$).

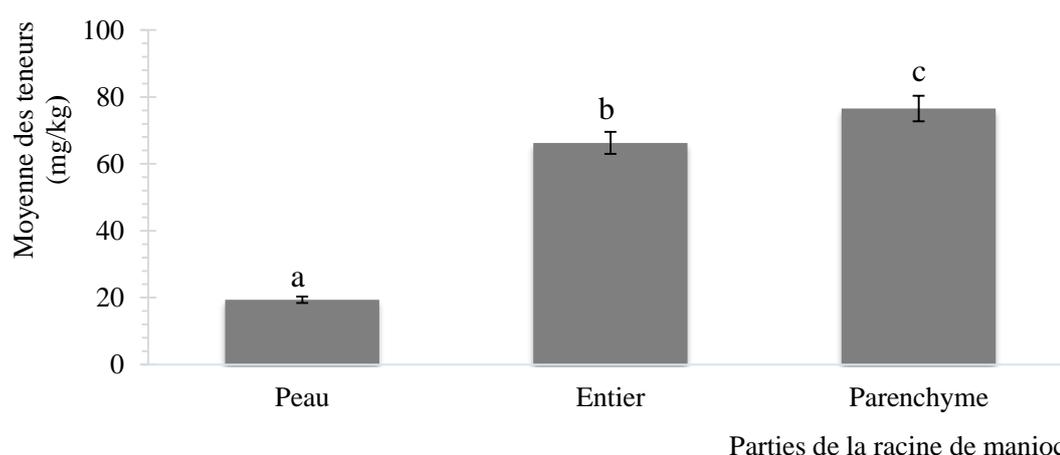


Légende : Les données sont exprimées par moyenne \pm SE, (n=20) ; les différentes lettres (a, b, c) indiquent la Significativité à $P < 0, 05$.

Figure 41 : Teneurs moyennes en scopolétine dans quelques produits dérivés du manioc

III.1.6-Teneurs moyennes en scopolétine dans les différentes parties de la racine

Le résultat du dosage de la scopolétine dans l'extrait issu du cortex, du parenchyme et des racines entières (racines découpées entièrement avec le cortex) après 06 jours de séchage est représenté dans la figure 42 ci-contre. Il ressort de cette figure que la scopolétine s'accumule différemment dans toutes les parties de la racine du manioc. Mais elle s'accumule préférentiellement au niveau du parenchyme car les plus hautes concentrations y sont retrouvées, suivie de la racine entière et enfin du cortex. Les teneurs moyennes en scopolétine sont de $76,53 \pm 28,29$ mg/kg dans les extraits issus du parenchyme, $66,27 \pm 34,03$ mg/kg dans les extraits issus de la racine entière et $19,34 \pm 16,41$ mg/kg dans les extraits issus de cortex.

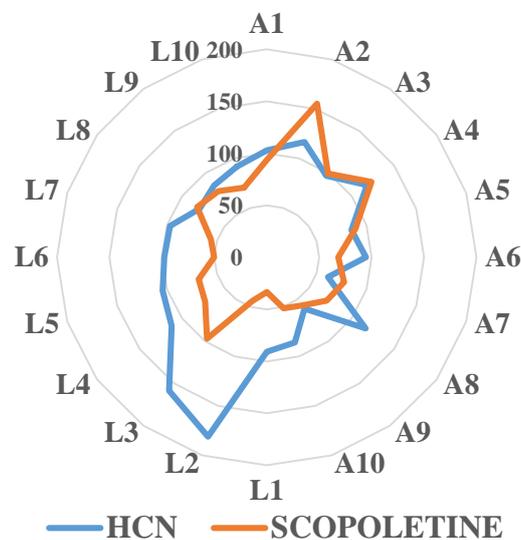


Légende : Les données sont exprimées par moyenne \pm SE, (n = 20); les différentes lettres (a, b, c) indiquent la Significativité à $P < 0.05$.

Figure 42 : Teneurs moyennes en scopolétine dans les différentes parties de la racine de manioc

III.1.7- Influence de la teneur en HCN sur l'accumulation de la scopolétine dans le parenchyme de manioc

La figure 43 ci-dessous présente la répartition des teneurs en scopolétine et en HCN dans le parenchyme des différentes variétés de manioc étudiées. Il ressort de cette figure que ces teneurs ont une répartition aléatoire. Néanmoins, dans les variétés améliorées on note un rapprochement entre les teneurs en scopolétine et en HCN, soit un rapport de corrélation de 0,617. Contrairement aux variétés locales où l'écart entre ces teneurs a été plus important avec une corrélation de 0,006. En effet, dans les variétés améliorées « 0110 » et « 961414 » les teneurs en scopolétine et en HCN ont été les plus importantes, soient $155,32 \pm 0,42$ et $123,48 \pm 0,08$ mg/kg ; $116,43 \pm 3,75$ et $118,04 \pm 7,16$ mg/kg respectivement. Les variétés locales *Madaga* et *Mbida et Mbani* ont montré les taux de HCN les plus élevés ($181,33 \pm 0,49$ et $158,37 \pm 9,61$ mg/kg) alors que la variété *Madaga* est l'une des variétés qui a présenté la teneur la plus faible en scopolétine ($43,73 \pm 0,05$ mg/kg) et la variété *Mbida et Mbani* est celle qui accumule plus de scopolétine ($96,85 \pm 2,35$ mg/kg). Ces résultats ont permis de constater que dans les variétés améliorées, en plus du taux de HCN, il existe d'autres éléments qui accentueraient l'accumulation de la scopolétine.



Légende : A1, A2, ... et A10 = variétés améliorées ; L1, L2, ... et L10 = variétés locales. A1=Champion, A2 = 0110, A3 = 92/0326, A4 = 961414, A5 = 040, A6 = 95109, A7 = 8034, A8 = Fonctionnaire, A9 = 8017, A10 = 8061, L1 = Pola Rouge Beul, L2 = Madaga, L3 = Mbida et Mbani, L4 = Minbourou, L5 = Le Blanc (Ntanghe), L6 = Macoumba, L7 = Man Mbong, L8 = Ngon Ezele, L9 = Owona Ekani, L10 = Mnom Ewondo.

Figure 43 : Répartition des teneurs en cyanure d'hydrogène et en scopolétine dans les variétés de manioc étudiées

III.1.8- Discussion partielle numéro 1

Les variétés de manioc étudiées présentent des fortes teneurs en HCN. Quelle que soit la variété, les teneurs en HCN des parenchymes frais sont supérieures au seuil toxique qui est de 50 ppm (**Brauman et al., 1992**). Selon les recommandations de l'OMS, (2012), les variétés avec une teneur élevée en HCN sont recommandées uniquement pour les produits de transformation comme l'amidon et la farine. Elles sont en plus appropriées pour la production d'éthanol puisqu'une teneur élevée en HCN correspond généralement à une teneur élevée en amidon (**Jansson et al., 2009**).

Les teneurs en HCN obtenues dans les variétés de manioc cultivées au Cameroun cadrent parfaitement avec la gamme de concentration retrouvée dans d'autres pays producteurs du manioc. Les études antérieures ont montrées que ces teneurs sont généralement comprises entre 1 et 2000 ppm (**Cardoso et al., 2005, CIAT, 2007**). En Tanzanie des teneurs en HCN totale variant de 1090 à 1550 ppm ont été rapportées, celles cultivées en Inde ont des valeurs moyennes de 1100 ppm (**Nambisan, 1994**), tandis que les variétés cultivées en Amazonie ont une teneur moyenne de 454 ppm (**Dufour, 1994**). Bien plus, certains scientifiques sont allés jusqu'à reporter le caractère acyanogénique de certaines racines (**De Bruijn, 1983**), assertion qui n'a jamais été confirmé jusqu'aujourd'hui. Les racines contenant une teneur très réduite de HCN (seulement 1–2 ppm) ont été rapporté (**Bourdoux et al., 1982**). Des nombreuses études ont montré que la teneur en HCN des racines a une distribution continue allant de 1 à 500 ppm, avec une prépondérance de teneur comprise entre 30–50 ppm (**Bokanga, 1994a**). Ces variations des teneurs en HCN nous permettent de confirmer avec **Ojo et al. (2013); Ubwa et al. (2015)** que celles-ci sont fortement influencées par l'altitude, le site géographique, les conditions saisonnières de production et la variété cultivée.

La fabrication des cossettes qui met essentiellement en exergue l'épluchage, le découpage et le séchage a moyennement contribué à réduire la toxicité du manioc (environ 47 %), quelle que soit la variété. Ces résultats ne corroborent pas ceux de **Nambisan et al. (2011)** qui ont obtenu jusqu'à 80 % de réduction par séchage au soleil. De même, **Montagnac et al. (2009)** en investiguant sur des racines de manioc des variétés amères, donc les teneurs initiales en glycoside cyanogénique étaient comprises entre 500 et 667 ppm ont montré que les opérations d'épluchage suivit du grattage sont les premières étapes substantielles de la détoxification avec un taux moyen maximal de réduction de $75,2 \pm 7,14$ %. Toutefois, on a constaté que les différentes variétés de manioc affichaient différents profils d'élimination de HCN après séchage au soleil. Ceci aurait été le fait des tranches de manioc qui n'avaient pas

forcement la même taille, d'autant plus qu'il a été démontré que lorsque les tranches de manioc sont petites et étalés finement pour le séchage, le HCN s'échappe plus aisément dans l'atmosphère (**Falade et Akingbala, 2008**). Lorsque le séchage au soleil n'est pas suffisant, l'enzyme peut se dénaturer ou être piégé dans la matrice du manioc séché et empêcher la conversion des glucosides cyanogéniques en HCN qui est volatil (**Falade et Akingbala, 2008**). Le séchage solaire des parenchymes découpés semble être un moyen moins efficace dans la libération du HCN car il ne favorise pas le contact intime entre l'enzyme d'hydrolyse (linamarase) et son substrat (linamarine) qui se décompose en HCN susceptible de s'échapper dans la nature à une température de 28° C. En effet, les parenchymes sont généralement coupés longitudinalement et beaucoup de cellules végétales restent intact, avec la linamarine emprisonnée dans la vacuole, tandis que la linamarase est localisée au niveau de la paroi cellulaire (**Orjiekwe et al., 2013**). Pour ainsi faciliter la détoxification dans ce processus de transformation, **Yéoh et al. (2001)** ont montré que le traitement des parenchymes de manioc coupés en tranches avec la linamarase ou la cellulase pendant une nuit permettrait une bonne détoxification des produits alimentaires à base de manioc.

Le procédé de fabrication du *gari* met en exergue les opérations unitaires telles que l'épluchage, le râpage, la fermentation sèche, le séchage et la torréfaction. Ces opérations unitaires sont très efficaces dans la libération du HCN à cause du contact intime entre la linamarine et l'enzyme d'hydrolyse, la linamarase dans le parenchyme mouillée et finement divisée, qui favorise la décomposition rapide de la linamarine en HCN. Ce procédé a contribué à réduire la toxicité d'environ 80 % quelle que soit la variété. **Séri et al. (2013)** a obtenu le même résultat en montrant que ce processus de détoxification peut être effectif dans la réduction du taux de HCN à un niveau acceptable (< 50 ppm). Néanmoins, nos résultats ne corroborent pas à ceux d'**Agbor-Egbe et Lupe Mbome, (2006)** et de **Falade et Akingbala, (2008)** qui ont obtenu un taux de détoxification plus important : en effet, l'épluchage, le râpage de la structure interne de la racine, suivi du séchage puis de la torréfaction ont contribué à réduire le taux de HCN d'environ 95 %. Ce taux d'élimination relativement faible (80 %) obtenu s'expliquerait par les conditions environnementales et les conditions de fermentation (**Bradbury, 2006; Cumbana et al., 2007**) ; les échantillons ayant subi une fermentation semi-aérobie, le HCN n'a pas pu s'échapper plus aisément dans l'atmosphère. Cette fermentation sèche utilisée dans ce processus n'est pas de nature à faciliter le contact entre l'enzyme de détoxification et le substrat, contrairement à la fermentation humide où le contact est plus intime (**Bradbury, 2006 ; Cumbana et al., 2007**). D'ailleurs, le *gari* blanc comme celui utilisé dans cette étude a

généralement des teneurs en cyanure plus élevées que le *gari* jaune. **Chiedozie et al. (2018)** ont rapporté que l'addition de l'huile rouge lors de la fabrication du *gari* jaune serait à l'origine de la plus faible teneur en HCN constatée.

Les teneurs résiduelles en HCN des échantillons de *gari* sont de l'ordre de 20 ppm en moyenne. Bien que ce processus de transformation permette une élimination de HCN jusqu'à une valeur acceptable (< 50 mg/kg) (**Séri et al., 2013**), le **Codex STAN 176-1989** recommande que la teneur en HCN total n'excède pas une valeur de 2 mg/kg dans le *gari* puisqu'il est un produit de consommation humaine directe. Néanmoins, les teneurs obtenues restent plus faibles comparées aux résultats de **Djouldé et al. (2007)** sur les échantillons de *gari* provenant de 25 localités du Cameroun (dont la teneur moyenne est de 114 ± 16 ppm), aux teneurs en HCN totales des échantillons de *gari* vendus dans les marchés de Port-Hacourt au Nigeria qui atteignent une valeur moyenne de 30 ppm (**Adindu et al., 2003**). A cause de la forte demande du *gari* dans les marchés locaux, les producteurs raccourcissent certaines étapes dans le processus de production. Ces différences de profil d'élimination reportées dans le *gari* par **Adindu et al. (2003)**, **Djouldé et al. (2007)** et **Séri et al., (2013)** s'expliqueraient par le raccourcissement des procédés de transformation et le non-respect du temps requis pour la fermentation par certains producteurs (**Akande et al., 2017**).

La transformation du manioc en *fufu* a permis d'avoir une teneur moyenne en HCN résiduelle de $6,54 \pm 7,22$ ppm et $9,8 \pm 6,95$ ppm pour les variétés locales et améliorées respectivement. Ces valeurs sont en conformité avec la législation de l'OMS qui fixe le niveau de sécurité pour le HCN à 10 ppm. Les pourcentages d'élimination du HCN obtenus sont respectivement de 94,08 % et 89,42 %. Ces résultats corroborent ceux d'**Iwuoha et al. (2013)** qui ont montré qu'un trempage de 5 à 6 jours dans des conditions de pH du milieu favorable (4-4,5) réduit jusqu'à 94,7 % de HCN. **Agbor-Egbe et Lupe Mbome, (2006)** ont obtenu un taux de réduction de HCN de 90 % après un trempage de 72 h. Le rouissage augmente le processus d'élimination car les racines complètement submergées dans l'eau favoriseraient la croissance bactérienne responsable de la production de la linamarase (**Kobawila et al., 2005**). De plus, le HCN étant soluble dans l'eau et volatil, les opérations de rouissage, suivi de l'émiettement manuel et le séchage au soleil ont permis l'obtention des teneurs en HCN résiduel les plus faibles dans le *fufu* (**Nambisan et al., 2011**). Par contre, des teneurs en HCN les plus importantes ont été relevés dans les échantillons de *fufu* obtenus de certains villages du Cameroun (**Djouldé et al., 2007**), et de certains marchés du Nigeria (**Adindu et al., 2003**). Ceci toujours à cause de la forte demande de ce produit dans nos marchés locaux, poussant les

producteurs à négliger l'étape de fermentation, qui selon eux, est considérée comme une perte de temps et n'aurait qu'une petite influence sur la détoxification du manioc (**Akande et al., 2017**). Cependant, une méthode de transformation standardisée pour les racines blanches amères avec des teneurs en HCN > 400 ppm, consistant en l'épluchage, le grattage de la couche externe du parenchyme, la fermentation et le séchage à l'étuve à 60° C a été testé avec succès au Burundi (**Milena et al., 2014**). De plus, **Toummou et al. (2017)** ont rapporté en comparant les effets de la transformation traditionnelle et améliorée du manioc en produits dérivés que la teneur en cyanure dans le *fufu* issu de la transformation améliorée (épluchage + fermentation + séchage) est significativement faible que la teneur dans la transformation traditionnelle où le trempage se fait généralement avec le cortex.

Le cortex a montré des teneurs en HCN les plus élevées dans toutes les variétés de manioc étudiées que celles du parenchyme. Ces résultats corroborent ceux de **Montagnac et al. (2009)** qui ont montré que les cortex de manioc ont généralement des teneurs en glycoside cyanogénique les plus élevées comparé à celles des parenchymes. Le cortex étant utilisé en alimentation animale du fait que leur valeur alimentaire soit assez proche de celle du parenchyme (**Akinfala et al., 2002**). Compte tenu des teneurs en HCN relativement faibles obtenues avec les cortex des principales variétés de manioc cultivés dans la localité d'Ongot comparées à celles rapportées par la littérature, un bon séchage solaire accompagné d'un broyage permettrait d'obtenir des taux d'élimination de HCN acceptable qui n'excéderont pas le niveau de sécurité prévue par l'OMS qui est de 10 ppm, afin de valoriser ces dernières dans l'élevage.

Les plantes réagissent aux stress biotiques ou abiotiques en mettant en place un système de défense physique voir biochimique qui crée des perturbations métaboliques allant de la modification de l'expression de certains gènes jusqu'à la sécrétion des métabolites secondaires, c'est le cas de la scopolétine qui résulte de la détérioration physiologique post-récolte dans les racines de manioc. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse corroborent ceux de **Bayoumi et al. (2008)** qui ont montré que, suite au stress causé par les actions mécaniques liées à la récolte, il y a une accumulation des hydroxycoumarines plus précisément la scopolétine et ses dérivés sous l'action du processus de la détérioration physiologique post-récolte. Ces résultats révèlent que les teneurs en scopolétine des différentes variétés ne suivent pas la distribution normale et les variances ne sont pas homogènes à $p < 0,05$, ce qui montre que l'effet variété impacte sur la teneur en scopolétine. Ces teneurs varient de $51,53 \pm 0,11$ mg/kg à $155,32 \pm 0,42$ mg/kg de poids sec dans les variétés améliorées et de $33,48 \pm 0,02$ mg/kg à

96,85 ± 2,35 mg/kg de poids sec dans les variétés locales. Les mêmes résultats ont été obtenus lors d'une étude préliminaire conduite au Bénin sur quatre variétés avec des teneurs variant de 23,3 ± 0,1 à 242,5 ± 0,2 mg/kg de poids sec après les mêmes traitements post-récolte (**Gnonlonfin et al., 2011**). Ceci a permis de constater que toutes les variétés de manioc accumulent la scopolétine. Mais, les différences des teneurs observées pourraient être dues d'une part au facteur génétique qui est spécifique à chaque variété et d'autre part à la composition nutritionnelle intrinsèque différente des tubercules (**Beeching et al., 1998**). De plus, l'amélioration génétique aurait apporté à ces variétés, des éléments qui les permettent de synthétiser des substances qui stimulent l'accumulation des métabolites secondaires. En revanche, en étudiant l'influence de l'acide salicylique sur la synthèse de la phénylalanine ammonia-lyase (enzyme clé de la biosynthèse de la scopolétine), des polyphénoloxydases et l'accumulation des composés phénoliques dans le manioc en Côte d'Ivoire, **Denézon et al. (2008)** ont montré que le traitement du manioc avec de l'acide salicylique stimule l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et des polyphénoloxydases (PPO) induisant une augmentation significative de la synthèse des composés phénoliques totaux éthano-solubles dans toutes les variétés de manioc. **Temagne et al., (2015)** ont également montré que les variétés améliorées sont généralement plus riches en éléments minéraux (N, Ca, Mg, K, P, Fer et Zn) et produisent significativement plus de biomasse fraîche totale que les variétés locales. Elle donne également un rendement en tubercule significativement plus élevé que celles des variétés locales. Ce résultat souligne l'efficacité des travaux d'amélioration du manioc réalisés par l'IRAD et l'IITA du Cameroun dont les variétés utilisées dans cette étude ont montré les preuves. En effet, ces variétés de manioc améliorées ont un potentiel de rendement se situant entre 30 et 40 t/ha contre 10 à 12 t/ha seulement pour les variétés traditionnelles cultivées dans les conditions locales du Cameroun (**IRAD, 2008**). Par contre, du fait de ses propriétés antioxydantes, une teneur élevée en β -carotène dans les tubercules ralentit le processus de la détérioration physiologique post-récolte et par conséquent la biosynthèse des composés phénoliques telle que la scopolétine car inhibent l'action des EOR qui sont sécrétés dans les 4 heures qui suivent le stress subi par la racine (**Sanchez et al., 2006 ; Zainuddin et al., 2017**). En outre, la longueur du tubercule et la présence des pédoncules et l'abondance des fibres semblent également influencer l'accumulation de la scopolétine (**Salcedo et Siritunga., 2011**).

La transformation a permis une accumulation différentielle de la scopolétine dans les cossettes, le *gari* et le *fufu*. La teneur en scopolétine varie en fonction du produit transformé et le séchage solaire des tranches de parenchyme favorise l'accumulation de la scopolétine, alors

que les opérations comme le rouissage, le râpage manuel contribuent à la réduction de l'accumulation de la scopolétine dans le *fufu* et le *gari*. **Gnonlonfin et al. (2011)** ont également obtenu une meilleure accumulation de la scopolétine dans les cossettes de manioc cultivé au Bénin après 06 jours de séchage. Les produits de transformation cossettes, *gari*, *fufu* ont été obtenus après que les racines de manioc aient été soumises à plusieurs traitements unitaires. Le rouissage est le traitement unitaire spécifique au *fufu* et le râpage au *gari*. Les teneurs variables de scopolétine dans ces différents produits seraient dues à l'impact des traitements unitaires qu'ils ont subis. Le rouissage est le traitement unitaire durant lequel, il y a acidification du milieu, production des métabolites telles que l'acide lactique, l'acide acétique. On y observe également une baisse du taux d'oxygène (**Brauman et al., 1995**). Alors que, la biosynthèse de la scopolétine est influencée par la teneur en oxygène donc une baisse retarde le processus (**Beeching et al., 1998**). Les faibles teneurs obtenues dans ce traitement seraient probablement dues à cette baisse d'oxygène lors du rouissage. Le traitement unitaire spécifique à la transformation en *gari* est le râpage. Durant ce procédé, il y a rupture des membranes cellulaires qui pourraient influencer l'ensemble des mécanismes de biosynthèse de la scopolétine. De même, la perte hydrique pendant le pressage aurait entraîné avec elle les molécules clés impliquées dans la biosynthèse de la scopolétine. De façon générale, l'élimination rapide du HCN lors de la transformation du manioc en *fufu* et en *gari* limite significativement la production des EOR et par conséquent l'accumulation des métabolites secondaires. En effet, le HCN lorsqu'il n'est pas éliminé rapidement du parenchyme de manioc, inhibe le cytochrome C oxydase dans la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie favorisant ainsi une production massive et rapide des EOR qui stimulent l'accumulation des métabolites secondaires tels que la scopolétine et ses dérivés dans les racines de manioc (**Cooper et Brown, 2008**).

On remarque également que la scopolétine s'accumule dans toutes les parties de la racine de manioc, mais majoritairement dans le parenchyme. Contrairement à **Ba et al. (2017)** qui ont montré qualitativement par Chromatographie sur Couche Mince que la scopolétine s'accumulait dans toutes les parties (premier et deuxième cortex, parenchyme et la racine entière) de la racine de manioc cultivées au Bénin, nous avons pu quantifier la scopolétine dans toutes ces parties. L'écart observé entre les teneurs en scopolétine des extraits issus du cortex et ceux issus du parenchyme serait due à la composition intrinsèque différente de ces parties. Le parenchyme est plus riche en métabolites primaires (amidon, glucoses), en acides aminés tels que l'arginine, l'acide glutamique et aspartique (**Gil et Buitrago, 2002 ; Djuikwo et al.,**

2011) qui pourraient être des activateurs de la biosynthèse de la scopolétine induisant ainsi sa forte accumulation dans le parenchyme. De plus, la teneur élevée en scopolétine dans le parenchyme plutôt que dans la racine découpée entièrement serait due au fait que lors de la transformation, le parenchyme subit un stress généralisé causé par l'épluchage et le découpage alors que ce stress est localisé dans la racine découpée entièrement qui ne subit que l'opération de découpage.

Les teneurs en HCN et en scopolétine des différentes variétés de manioc ont une répartition aléatoire. Néanmoins, l'étude de la corrélation a montré qu'il existe un lien entre le taux de HCN et l'accumulation de la scopolétine dans les variétés améliorées ($r=0,617$) ce qui a permis de constater que dans ces variétés plus le taux de HCN est élevé, plus la teneur en scopolétine est importante, contrairement aux variétés locales ($r= 0,006$), qui, malgré les teneurs élevées en HCN ont des teneurs en scopolétine moins importantes. La sélection variétale portée sur les variétés améliorées aurait apportée d'autres éléments tels que les micronutriments (Zn, Ca, Mg, Fe, vitamines), qui en plus de la teneur élevée en HCN accentuerait l'accumulation de la scopolétine dans les racines de ces variétés (**Beeching *et al.*, 1998 ; Cooper et Brown, 2008**).

En effet, la biosynthèse du HCN se fait dans les feuilles par N-hydroxylation de la valine ou d'isoleucine, suivi de leur distribution dans la tige et les racines où il est stocké dans les vacuoles cellulaires sous forme de glucosides cyanogéniques (linamarine) (**Orjiekwe *et al.*, 2013**). La libération du HCN est occasionnée par des blessures engendrées sur les racines de manioc qui détruisent les cellules favorisant la libération de la linamarase située dans la paroi cellulaire, qui entre en contact avec la linamarine pour libérer le HCN par hydrolyse. Le HCN joue un rôle crucial dans le développement du processus de la détérioration physiologique post-récolte. Les travaux de **Zidenga *et al.* (2012)** ont montré que la détérioration physiologique post-récolte dans le manioc est influencé par le potentiel cyanogénique des racines, car le HCN favorise le flux oxydatifs. Il inhibe le cytochrome C oxydase dans la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie favorisant une production massive et rapide des EOR (**Cooper et Brown, 2008**). Au début de la détérioration physiologique post-récolte le flux oxydatif est déclenché 15 min après la récolte produisant et accumulant une large gamme de EOR et par conséquent les composés coumariniques et phénoliques. Les EOR majeures sont les ions superoxydes, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène qui sont générés par transfert d'électron à l'extérieure par la chaîne de transport d'électron (**Xu *et al.*, 2013**).

Quant à la scopolétine, sa biosynthèse a lieu dans les racines de manioc toujours en réponse aux blessures, par le métabolisme des phénylpropanoïdes dont la voie majeure est celle

de la PAL. Cette voie métabolique assure la biosynthèse d'une large gamme de composés impliquée dans le processus de la détérioration physiologique post-récolte, incluant non seulement les composés coumariniques et phénoliques, mais aussi d'autres classes à savoir les phytostéroles, les acides gras (acide palmitique, acide linoléique, et acide oléique), ainsi que leur dérivés (Sakai *et al.*, 1986). Cependant, c'est l'hydroxycoumarine qui s'accumule majoritairement pendant la détérioration physiologique post-récolte (Bayoumi *et al.*, 2010). Les plus significatifs de ces hydroxycoumarines sont la scopolétine et son glucoside scopoline. D'autres métabolites liés à la détérioration physiologique post-récolte incluent les leucoanthocyanines, les delphynidines, les flavon-3-ols, les catéchines et les galloanthocyanines (Buschman *et al.*, 2000b ; Sakai *et al.*, 1986). Ces métabolites secondaires peuvent agir comme antioxydant ou antimicrobien (Buschman *et al.*, 2000b). Dans le tabac la scopolétine agit comme un agent de piégeage majeur du H₂O₂ après le flux oxydatif déclenché par les blessures et contribue à la formation de la lignine pour cicatrifier la blessure (Dorrey, 1999). Elle peut piéger les EOR avec son groupe hydroxyle. Ceci montre que la scopolétine est impliquée dans la réponse de défense des plantes comme le manioc, le tabac et la tomate (Sun *et al.*, 2014). Généralement, la molécule d'oxygène est convertie en radical superoxyde lequel est transformé en H₂O₂ moins nocifs catalysé par la SOD. Le H₂O₂ est décomposé en molécule d'eau et Oxygène par la catalase (CAT) ou l'ascorbate peroxydase (APX) avec l'oxydation de la scopolétine (Owiti *et al.*, 2011).

III.1.9- Conclusion partielle numéro 1

La quantification de la scopolétine par LC/SM et du HCN par la méthode du papier picrate dans les extraits bruts et les produits de transformations issus des différentes variétés de manioc utilisées dans cette étude ont révélé une accumulation différentielle de la scopolétine et du HCN. Ces teneurs variaient entre $33,48 \pm 0,02$ et $155,32 \pm 0,42$ mg/kg pour ce qui est de la scopolétine et de $61,03 \pm 9,44$ à $181,33 \pm 0,48$ ppm pour ce qui est du HCN. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la plupart des variétés améliorées avaient les teneurs les plus importantes en scopolétine contrairement aux variétés locales qui ont des teneurs plus importantes en HCN. La variété améliorée « 0110 » est celle qui accumule plus de scopolétine avec une teneur de $155,32 \pm 0,42$ mg/kg. La cossette du parenchyme est le produit qui favorise une meilleure accumulation avec une teneur moyenne de $76,53 \pm 28,29$ mg/kg, suivi du *gari* ($46,16 \pm 29,13$ mg/kg) et enfin du *fufu* ($13,9 \pm 29,2$ mg/kg). Le parenchyme est la partie de la racine où s'accumule majoritairement la scopolétine avec une teneur moyenne de $76,53 \pm 28,29$ mg/kg, $66,27 \pm 34,03$ mg/kg dans l'entier et $19,34 \pm 16,41$ mg/kg dans le cortex. Bien que la

teneur en scopolétine soit fortement corrélée à la teneur du HCN dans les variétés améliorées (0,617), cette corrélation est d'autant plus faible dans les variétés locales qui ont des teneurs les plus élevées en HCN (0,006). Cela a permis de constater que dans les variétés améliorées, la sélection variétale du manioc influence aussi l'accumulation de la scopolétine par l'apport des éléments nutritifs. Ces résultats confortent les données existantes et justifient l'accumulation de la scopolétine dans le manioc camerounais. La variété améliorée « 0110 » étant celle qui a accumulée plus de scopolétine (avec une teneur de 155,32 et 46,37 mg/kg dans le parenchyme et dans le cortex respectivement) a été retenue pour les tests d'activité antifongique.

III.2- Evaluation de l'activité antifongique des extraits issus du parenchyme et du cortex de manioc « 0110 » sur les moisissures isolées du maïs

III.2.1- Identification macroscopique et microscopique des moisissures isolées du maïs

Les moisissures isolées des grains de maïs sont représentées dans la figure 44 ci-dessous. L'identification de ces isolats a été effectuée après culture de 7 jours sur les milieux PDA, CYA, MEA et Cz. L'observation des caractères macroscopiques et microscopiques en référence à la clé d'identifications de **Dufresne, (2018)** a permis de montrer que les cinq isolats appartiennent à trois genres fongiques, soit deux isolats appartenant au genre *Aspergillus*, un du genre *Fusarium*, un du genre *Penicillium* et un isolat ayant un mycélium stérile (non identifié).

Isolat 1 :

Il révèle une colonie poudreuse donc la couleur du recto et verso de la boîte de Pétri varie suivant le milieu de culture. Sur milieu MEA on a observé une colonie jaune-verte avec les bordures blanches, le revers de la boîte de Pétri a une couleur pâle et présente quelques stries. Le milieu CYA révèle une couleur jaune avec un vert qui tend à disparaître et des bordures blanches. Quant au milieu Cz on observe un mycélium jaune vert qui devient tout vert avec l'âge et un revers de boîte de Pétri jaune crémeux. Le milieu PDA présente au début de la croissance un mycélium blanc qui prend la couleur verte olive suivant la durée d'incubation.

Isolat 2 :

Sur milieu PDA, on observe un mycélium noir avec des filaments aérien un revers de boîte de Pétri brun crémeux. Sur milieu Cz, il a un mycélium noir avec des bordures blanches neiges, le revers de la boîte de Pétri est jaune crémeux. Le milieu MEA présente une colonie noire qui prend la couleur blanche avec l'âge jusqu'à devenir tout blanc ; le revers est de couleur beige et présente des stries. Dans le milieu CYA, la colonie a une couleur blanche noire, des bords blancs et le revers de la boîte de Pétri est crémeux avec des stries.

Isolat 3 :

Le mycélium sur CYA est blanc, avec le temps il passe au bleu au centre, avec des exsudats jaune clair, le revers est orangé, la colonie est cotonneuse. Sur MEA, le mycélium est blanc brun et bleu, le revers est jaune foncé, la colonie est cotonneuse. Sur PDA, le mycélium est vert-bleuté avec beaucoup de pigmentation et sur CZ le mycélium est vert-bleuté avec un contour blanchâtre et caractériser par une vitesse de croissance lente.

Isolat 4 :

Le mycélium sur CYA est blanc crémeux, le revers est blanc pâle, la colonie est cotonneuse. Sur MEA, le mycélium est brun, le revers est jaune foncé, la colonie est cotonneuse. Sur PDA, le mycélium est blanc laiteux et sur Cz le mycélium est noir avec un contour blanchâtre et caractérisé par une vitesse de croissance lente.

Isolat 5 :

Le mycélium sur CYA est blanc laiteux, le revers est blanc. Sur MEA, le mycélium est blanc rosâtre avec pigmentation centrale. Sur PDA, le mycélium est blanc rosé et sur CZ le mycélium est blanchâtre et caractériser par une vitesse de croissance lente.

Les principaux caractères généraux de culture des moisissures isolées du maïs en stockage sont consignés dans le tableau XIV suivant.

Tableau VIII : Description des principaux isolats fongiques isolés des grains de maïs

Genres/ espèces	Colonies	Mycélium (hyphe)	Conidies et spores
<i>A. flavus</i>	Jaunâtre puis jaune vert	Cloisonné perpendiculaire à la cellule de base	Tête conidienne unisériées ou bisériées de conidiophores hyalins, Conidies globuleuses
<i>A. niger</i>	Noire brunâtre/noire	Cloisonné	Tête conidienne unisériées ou bisériées se scindant généralement en plusieurs colonnes Vésicules globuleuses
<i>Penicillium sp</i>	Verte/bleutée	Cloisonné	Spores très nombreuses, claires, sphériques ou ovales
Non identifié	Blanc-crème	Cloisonné	Mycélium stérile
<i>Fusarium sp</i>	Blanc rose	Cloisonné	Conidies fusiformes, incurvée, atténuées aux extrémités allongées, cloisonnées

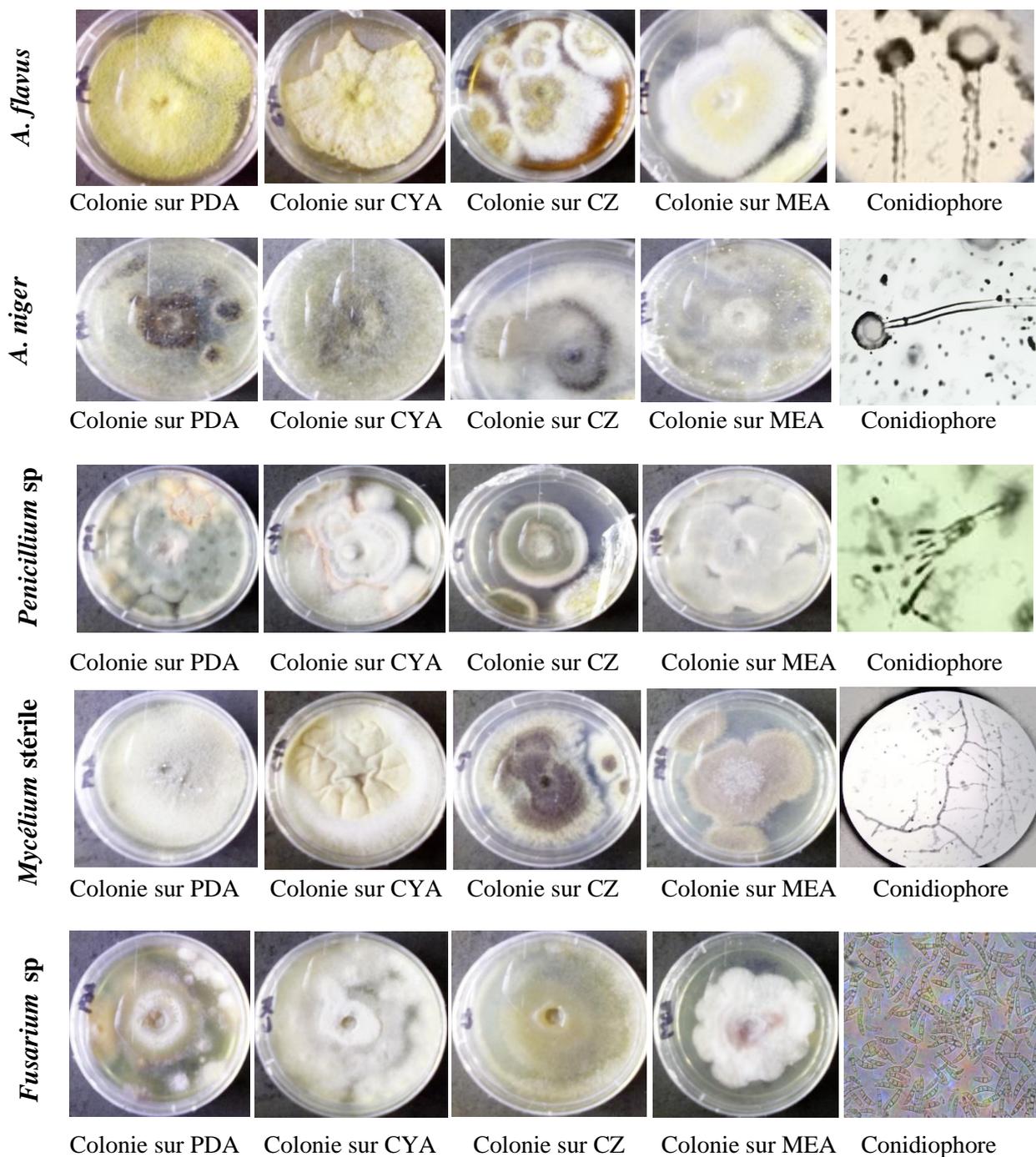


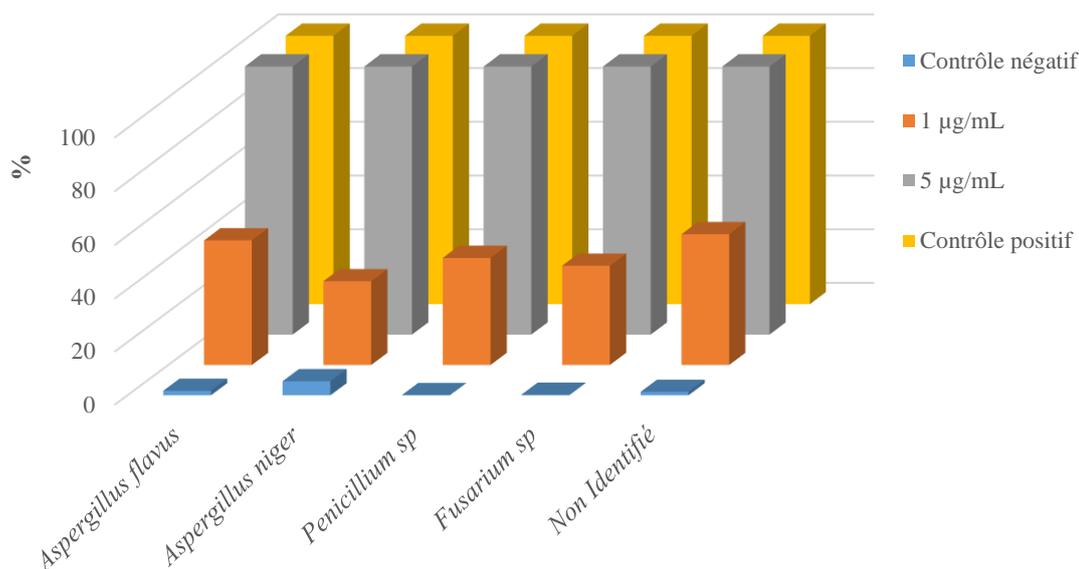
Figure 44 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des différents isolats de moisissures isolés du maïs après 7 jours d'incubation à $28 \pm 4^\circ \text{C}$

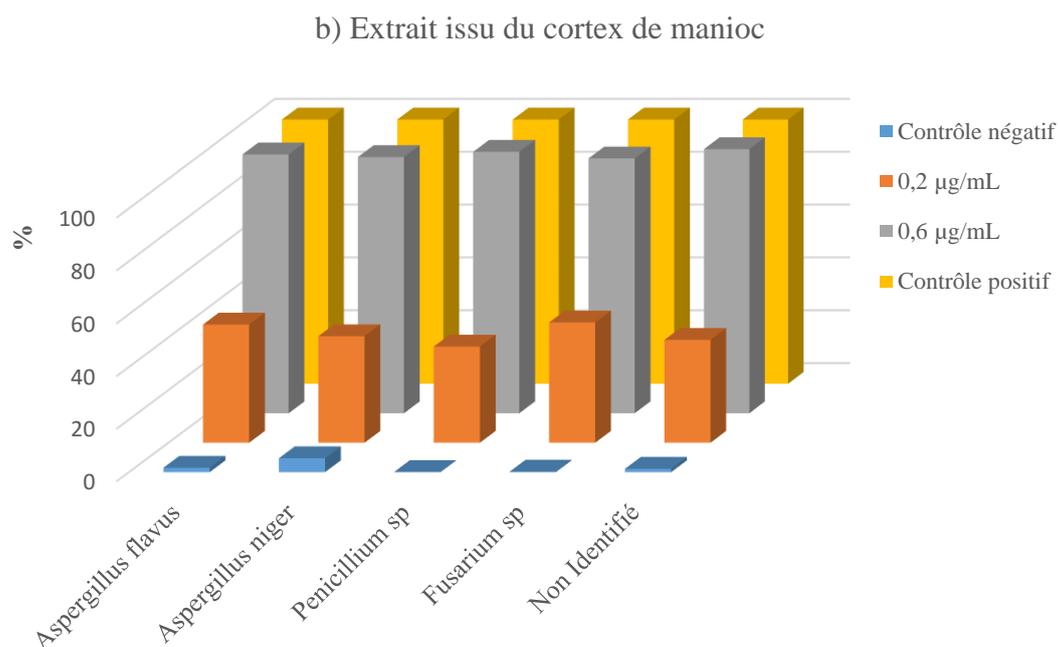
III.2.2- Pourcentage d'Inhibition des isolats de moisissures isolées des grains de maïs par les extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine

Le Pourcentage d'Inhibition des moisissures isolées des grains de maïs en stockage par les extraits issus du cortex et du parenchyme du manioc de la variété « 0110 » contenant de la scopolétine est présenté dans la figure 45(a, b) ci-dessous. Après 05 jours d'incubation à $28 \pm$

4° C, toutes les séries d'expériences ont montré une inhibition considérable de la croissance mycélienne comparativement au contrôle négatif. Les deux extraits ont montré une activité variable sur les isolats fongiques testés. Avec l'extrait de scopolétine issu du parenchyme à la concentration de 1 µg/mL, les pourcentages d'inhibition ont été de $46,73 \pm 0,38 \%$; $31,51 \pm 0,49 \%$; $40,20 \pm 0,15 \%$; $37,28 \pm 0,21\%$ et $49,03 \pm 0,32 \%$ sur *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp, isolat Non Identifié et *Fusarium* sp respectivement. Avec le même extrait, à une concentration maximale de 5 µg/mL, une inhibition totale à 100 % de tous les isolats testés a été obtenue (Figure 44a). Tandis qu'avec l'extrait de scopolétine issu du cortex à la concentration de 0,2 µg/mL, les pourcentages d'inhibitions ont été de $44,86 \pm 0,37 \%$; $40,44 \pm 0,49 \%$; $36,52 \pm 0,21 \%$; $45,62 \pm 0,43 \%$ et $39,06 \pm 0,32 \%$ respectivement sur les mêmes isolats. Il a fallu une concentration maximale de 0,6 µg/mL avec l'extrait issu du cortex pour avoir en moyenne 98 % d'inhibition sur tous les isolats testés (Figure 44b). Le contrôle positif constitué de Fluconazole à 0,1 mg/mL a également permis une inhibition totale (100 %) de ces isolats. Il se dégage ainsi visiblement de ces résultats que bien qu'ayant les teneurs en scopolétine les plus faibles, l'extrait issu du cortex contenant de la scopolétine a une meilleure activité inhibitrice sur les isolats fongiques testés (voir tableau XV).

a) Extrait issu du parenchyme de manioc

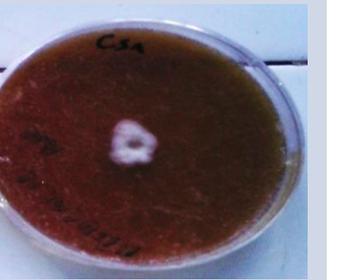
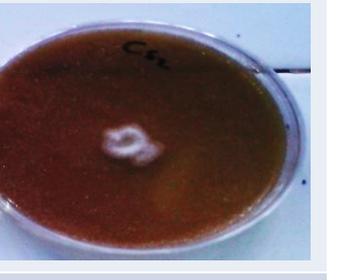
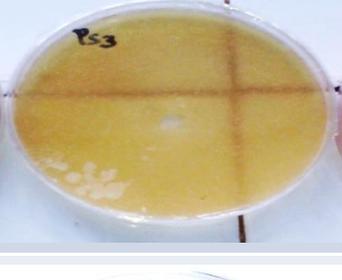
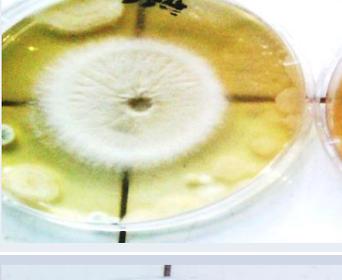
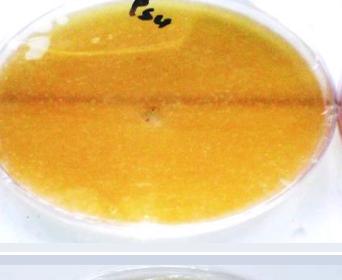
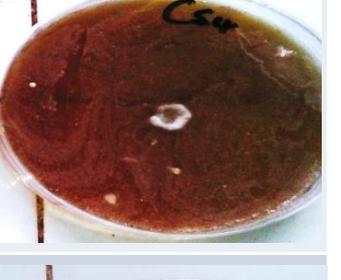
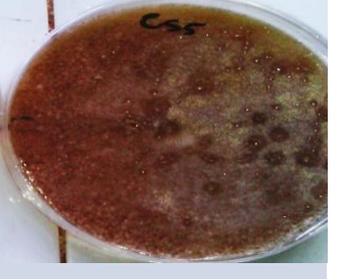




Légende : Contrôle Positif (Fuconazole 0, 1 mg/mL) ; Contrôle Négatif (0, 01 mL d'éthanol /mL de PDA, VV).

Figure 45 : Pourcentage d'Inhibition de moisissures isolées des grains de maïs : extraits issus du parenchyme (a) et du cortex (b) de manioc de la variété « 0110 » contenant de la scopolétine

Tableau IX: Illustration du résultat des tests d'activité antifongique d'extrait du cortex et du parenchyme de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine sur les moisissures isolées du maïs

	Milieu PDA sans extraits	Milieu PDA+ extrait parenchyme (5 µg/mL)	Milieu PDA+ extrait cortex (0,6 µg/mL)
<i>A. flavus</i>			
<i>A. niger</i>			
<i>P. sp</i>			
N.I			
<i>F. sp</i>			

Légende : *A. flavus* = *Aspergillus flavus* ; *A. niger* = *Aspergillus niger* ; *P. sp* = *Penicillium sp* ; N.I = Non Identifié ; *F. sp* = *Fusarium sp*.

III.2.3- Paramètres d'inhibition (CMI - CMF)

Les résultats de la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrice (CMI) et Fongicide (CMF) des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine sont consignés dans le tableau XVI ci-contre. Les résultats obtenus confirment que ces extraits inhibent la croissance des isolats de moisissures (*A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp, Mycélium stérile et *Fusarium* sp) isolées du maïs en stockage. Les CMI obtenues varient entre 0,07 µg/mL et 0,30 µg/mL pour l'extrait issu du cortex et de 0,31 µg/mL à 2,50 µg/mL pour l'extrait issu du parenchyme. Il convient de signaler que les CMI les plus faibles étaient obtenues avec les isolats de *A. flavus* et *Fusarium* sp et les plus élevées avec *A. niger* et l'isolat non identifié que ce soit avec l'extrait de scopolétine issu du cortex ou du parenchyme. Ces activités sont comparables à celles de la scopolétine pure et 1000 fois plus faibles que celles du Fluconazole, l'antibiotique de référence. En outre, les rapports CMF/CMI de tous les extraits, standard de scopolétine et de Fluconazole varient entre 1 et 4. Ces extraits exercent donc une activité fongicide sur les moisissures testées. Cependant, du fait de son activité inhibitrice intéressante, la poudre du cortex de manioc a été appliquée dans la conservation du maïs.

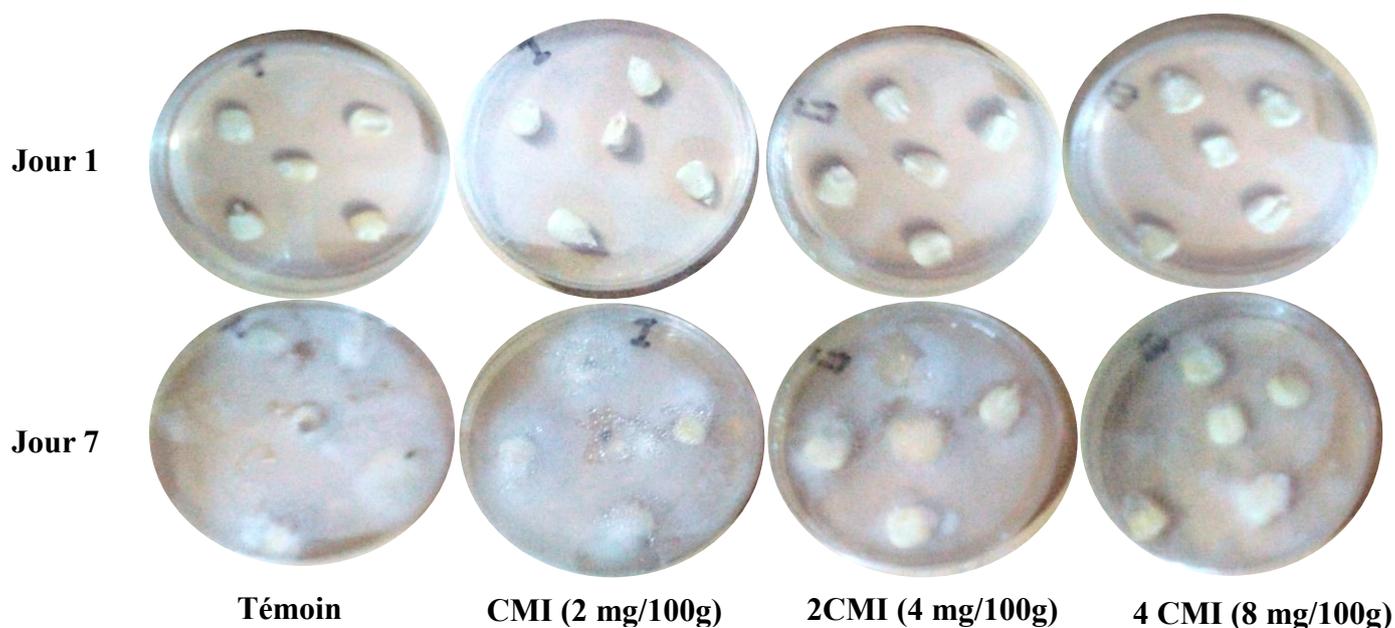
Tableau X: Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Fongicide (CMF) des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc « 0110 » contenant la scopolétine sur les isolats de moisissures isolées des grains de maïs

Extraits	Paramètres	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. sp</i>	<i>N.I</i>	<i>F. sp</i>
Cortex (µg/mL)	CMI	0,07	0,15	0,30	0,30	0,07
	CMF	0,15	0,30	0,60	0,60	0,30
	CMF/CMI	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
Parenchyme (µg/mL)	CMI	0,62	1,25	0,62	2,50	0,30
	CMF	1,25	2,50	1,25	5,00	1,25
	CMF/CMI	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00
Scopolétine (µg/mL)	CMI	0,01	0,03	0,03	0,01	0,01
	CMF	0,03	0,10	0,05	0,03	0,03
	CMF/CMI	3,00	3,33	2,00	3,00	3,00
Fluconazole (mg/mL)	CMI	0,03	0,03	0,01	0,03	0,01
	CMF	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03
	CMF/CMI	2,00	2,00	3,00	1,00	3,00

Légende : *A. flavus* =*Aspergillus flavus* ; *A. niger*=*Aspergillus niger* ; *P. sp*=*Penicillium sp* ; *N.I*=Non Identifié ; *F. sp*=*Fusarium sp*.

III.2.4- Application des formulations poudreuses à base de la farine du cortex de manioc « 0110 » dans la conservation de maïs

L'efficacité antifongique des formulations poudreuses à base de la farine du cortex de manioc « 0110 » montre que la croissance mycélienne est fonction de la concentration en scopolétine des différents traitements appliqués: on a observé que plus la concentration en scopolétine dans la poudre appliquée est importante, plus la croissance mycélienne est faible (figure 46). Une absence totale de croissance mycélienne visible à l'œil nu a été observée sur le maïs traité à la dose de 8 mg de poudre (0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN) pour 100 g de maïs. Une légère croissance a été observée sur le maïs à la dose de 4 mg de poudre pour 100 g de maïs (c'est-à-dire 0,14 µg de scopolétine, 5,6 µg de HCN). Cette croissance était plus importante à la dose de 2 mg de poudre pour 100 g de maïs (0,07 µg de scopolétine et 2,8 µg de HCN) et dans le milieu témoin (non traité) un envahissement total de la boîte de Pétri par le mycélium a été observé après 07 jours d'incubation.



Légende : Témoin = pas de traitement ; CMI = Concentration Minimale Inhibitrice ; 2 mg/100 g = 2 mg de poudre du cortex de manioc « 0110 » pour 100 g de maïs ; 4 mg/100 g = 4 mg de poudre du cortex de manioc « 0110 » pour 100 g de maïs ; 8 mg/100 g = 8 mg de poudre du cortex de manioc « 0110 » pour 100 g de maïs.

Figure 46 : Efficacité antifongique de la poudre de cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine

III.2.5- Discussion partielle numéro 2

Les résultats du test d'activité antifongique révèlent que les extraits issus du cortex et du parenchyme de la racine de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine à des teneurs connues exercent une inhibition sur la croissance mycélienne. Ces résultats corroborent ceux de **Ba et al. (2017)** qui ont montré que les extraits contenant de la scopolétine issus des différentes parties de la racine d'une variété de manioc non décrite « Ben 86052 » ont un effet inhibiteur sur quelques isolats fongiques isolés du maïs en stockage au Bénin. **Rodriguez et al. (2000)** ont également montré que l'activité antifongique obtenue est parmi les activités biologiques de la scopolétine. Dans le même ordre d'idée **Nguefack et al. (2004)** ont montré l'efficacité antifongique des huiles essentielles extraites de cinq plantes aromatiques (*Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris*, *Zinger officinale*) camerounais sur *A. flavus*, *A. fumigatus* et *F. moniliforme*. Cette activité inhibitrice serait due à la présence dans ces extraits de plantes des métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, terpenoïdes, alcaloïdes ainsi que les polyphénols et polypeptides (**Rani et al., 2017**). Cependant, le rôle capital que joue la PAL dans les réactions de défense de la plante a fait l'objet de nombreux travaux. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de la scopolétine et d'autres composés phénoliques comme les lignines intervenant dans le renforcement des parois pectocellulosiques (**Shirasu et al., 1997 ; Chen & Mc Clure, 2000**). Les PPO interviennent dans la défense des plantes contre les agents pathogènes par diverses actions. Par leur activité protéolytique, elles accélèrent l'apoptose des cellules et limitent la progression des agents pathogènes dans les organes infectés (**Kuwabara & Katoh, 1999**). En outre, certains phénols comme la scopolétine et l'esculétine deviennent toxiques pour les champignons lorsqu'ils sont oxydés par les PPO (**Gomez Vásquez et al., 2004**). Ce rôle des PPO dans la défense des plantes contre les agents pathogènes a été confirmé par **Wititsuwannakul et al. (2002)** qui a mis en évidence une forte activité de ces enzymes dans le latex du clone GTI de l'hévéa le plus résistant aux maladies. En général, la scopolétine étant une coumarine, a des effets inhibiteurs sur les enzymes et des interactions avec l'ADN des cellules fongiques (**Ojala et al., 1999**). En plus, bien que la teneur en scopolétine dans l'extrait issu du cortex soit très faible que celle issue du parenchyme, cet extrait a montré une meilleure activité sur les isolats testés. Ceci s'expliquerait par le fait que l'extrait issu du cortex et celui du parenchyme contenant de scopolétine n'ont pas la même composition ; il y aurait des constituants dans l'extrait du cortex qui agiraient en synergie avec la scopolétine augmentant ainsi son activité. Dans ce sens, les travaux de **Hahn, (1997)** ont montré que les racines de

manioc contiennent de l'acide tannique dont les teneurs sont comprises entre 0,05 et 0,20 mg/100g dans le cortex et 0,04 à 0,05 mg/100g dans le parenchyme elle-même. Ceci donne la couleur terne des produits transformés, lequel affecte leur valeur marchande. Les tannins peuvent cependant jouer un rôle important de la plante de manioc contre les maladies, les ravageurs et même les animaux. Ils agissent alors comme facteurs de croissance déprimant par diminution de la digestibilité protéique. En outre le rapport CMF/CMI de ces extraits montre qu'ils exercent une activité fongicide sur les isolats fongiques isolés du maïs (Nyegue *et al.*, 2006).

Les plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes. Le plus souvent, ces substances actives sont des métabolites secondaires qui, à l'origine, protègent les végétaux des herbivores. L'huile de neem est restée longtemps le biopesticide d'origine végétale le plus utilisé, un insecticide extrait des graines d'*Azadirachta indica* (Schmutterer, 1990). A nos jours les preuves scientifiques sont nombreuses pour faire des extraits issus du manioc contenant de la scopolétine l'un de ces composés naturels efficaces. En effet, l'étude des phytoalexines du tournesol à savoir la scopolétine et l'ayapine, a permis de montrer que ces deux dérivés coumariniques sont spécifiques dans l'inhibition importante de la croissance du champignon *Phomamac donaldii* responsable de la maladie des tâches noires du tournesol avec comme IC₅₀ égale à 0,15 mmole/L pour l'ayapine et 0,13 mmole/L pour la scopolétine (Marion, 2006). L'effet inhibiteur de la scopolétine sur la croissance du champignon a été observé après 24 heures d'incubation. De ces mêmes études, le dosage de la scopolétine dans la plante, à différents temps après contamination par le *Phomamac donaldii*, a prouvé que la molécule présentait un niveau de synthèse et d'accumulation jusqu'à deux fois plus élevé chez le génotype tolérant étudié par rapport au génotype sensible et ceux dès 72 heures. Par ailleurs, la scopolétine tout en s'accumulant différenciellement dans les cellules de *Ulmus pumila* et *Ulmus campestris* infectées avec les spores de *Ophiostomaulmi*, manifeste une activité antifongique (Teresa Valle *et al.*, 1997). Aussi, Gomez-Vasquez *et al.* (2004) ont prouvé l'effet fongistatique et fongicide de la scopolétine induisant une inhibition de la production de mycotoxines. L'accumulation rapide de la scopolétine entre 24 et 48 heures suite à la blessure des cellules des cossettes de manioc a permis d'observer l'absence de quelques mycotoxines dont l'aflatoxine sur les échantillons de manioc prélevés dans les villages au Ghana (Wareing *et al.*, 2001) d'une part et d'autre part sur les échantillons de manioc prélevés au Bénin par Gnonlonfin *et al.* (2011). Dans cette même plante infectée par *Mycrocyclus ulei* et

Colletotrichum gloeosporioides, Garcia et al. (1995) ont montré l'accumulation de la scopolétine dans les clones de résistances de ces agents pathogènes. De plus, l'efficacité de l'extrait issu du cortex de la racine de manioc contenant de la scopolétine sur cinq isolats de moisissures (*A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* sp, Mycélium stérile et *Fusarium* sp.) obtenue dans le cadre de cette étude confirme son utilisation comme biopesticide pour la lutte antifongique.

III.2.6- Conclusion partielle numéro 2

L'étude de l'activité antifongique *in vitro* des extraits issus du cortex et du parenchyme de manioc contenant de la scopolétine ainsi que le test de conservation du maïs par les formulations à base de la poudre du cortex de manioc « 0110 » permettent de conclure que :

✚ Ces extraits exercent une activité inhibitrice sur les moisissures isolées du maïs en stockage (*A. flavus*, *A. niger fusarium* sp, *Penicillium* sp et isolat non identifié). Les concentrations minimales inhibitrices varient entre 0,30 et 2,50 µg/mL avec l'extrait issu du parenchyme et de 0,07 à 0,30 µg/mL avec l'extrait issu du cortex. En outre, le rapport CMF/CMI de ces extraits montre qu'ils exercent une activité fongicide. Bien que la teneur en scopolétine dans l'extrait issu du cortex soit la plus faible, celui-ci a montré une bonne activité antifongique sur ces isolats.

✚ La poudre du cortex de manioc « 0110 » à la dose de 8 mg pour 100 g de maïs correspondant à 4 CMI, contenant 0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN a montré une bonne efficacité dans la conservation du maïs.

III.3- Etude toxicologique

III.3.1- Toxicité orale aiguë de l'extrait issu du cortex de manioc « 0110 » chez les rats Wistar

III.3.1.1- Effets de l'extrait sur l'aspect général, le comportement, et la mortalité des rats

Le résumé des observations faites sur les animaux en essai aiguë est présenté dans le tableau XVII. Les observations portant sur chacun des rats 1, 2, 4 et 5 ont montré une fatigue générale du corps et une somnolence pendant les 30 premières minutes qui suivaient le gavage et aucun changement dans l'apparence physique générale et dans la somatomotricité durant la période d'observation de 14 jours. Ce sommeil était fugace chez les témoins, mais n'était réversible qu'après quelques heures chez les traités. Une léthargie transitoire s'observait chez les animaux traités quelques heures après le gavage. Aucune manifestation de tremblements, convulsions, salivation, diarrhée, coma, ou de comportements anormaux tels que

l'automutilation ou la marche à reculons n'a été observé et la prise alimentaire était effective à l'issu des quatre premières heures. Seul le rat 3 était resté allongé après le gavage montrant un signe de morbidité élevé caractérisé par une paralysie des membres, redressement des poils, léthargie profonde, perte d'appétit, faiblesse, respiration laborieuse, accélération du rythme cardiaque. A l'issu des 48 premières heures l'animal avait repris le mouvement et la prise alimentaire. Aucune autre modification liée au traitement, ni aucune morbidité/mortalité, n'a été observée chez l'ensemble des animaux sur la période de 14 jours suivant l'administration orale de la dose unique d'extrait de 2000 mg/kg. La DL₅₀ a donc été estimée supérieure à 2000 mg/kg comme décrit dans le schéma de l'annexe 10.

Tableau XI : Observations des rats en essai aigüe avec l'extrait du cortex de manioc (0110)

Temps d'observation	Groupe d'animaux	Témoins (eau distillée)	Essais (2000 mg/kg)
0-1h	R1	Sommeil fugace	Léthargie transitoire
	R2	Sommeil fugace	Léthargie transitoire
	R3	Sommeil fugace	Léthargie profonde
	R4	Sommeil fugace	Léthargie transitoire
	R5	Sommeil fugace	Léthargie transitoire
1h-4h	R1	Aucun changement	Sommeil fugace
	R2	Aucun changement	Sommeil fugace
	R3	Aucun changement	Léthargie profonde
	R4	Aucun changement	Sommeil fugace
	R5	Aucun changement	Sommeil fugace
4h-48h	R1	Aucun changement	Aucun changement
	R2	Aucun changement	Aucun changement
	R3	Aucun changement	Léthargie + maigreur
	R4	Aucun changement	Aucun changement
	R5	Aucun changement	Aucun changement
48h-14jrs	R1	Aucun changement	Aucun changement
	R2	Aucun changement	Aucun changement
	R3	Aucun changement	Aucun changement
	R4	Aucun changement	Aucun changement
	R5	Aucun changement	Aucun changement

III. 3.1.2. Effets de l'extrait sur le poids corporel de rats

La figure 47 présente l'évolution des poids corporels des animaux d'essai pendant la période d'observation. Il ressort que les rats R1, R2, R4 et R5 du groupe test et les cinq rats du groupe témoin avaient une croissance normale. Le poids a augmenté de façon graduelle durant les 14 jours d'observation. Pour ce qui est du rat 3 du groupe test, les premières 48 heures étaient marquées par une baisse brutale de poids. Cependant, la prise alimentaire avait favorisé une reprise de la croissance normale jusqu'à la fin de la période d'observation de 14 jours.

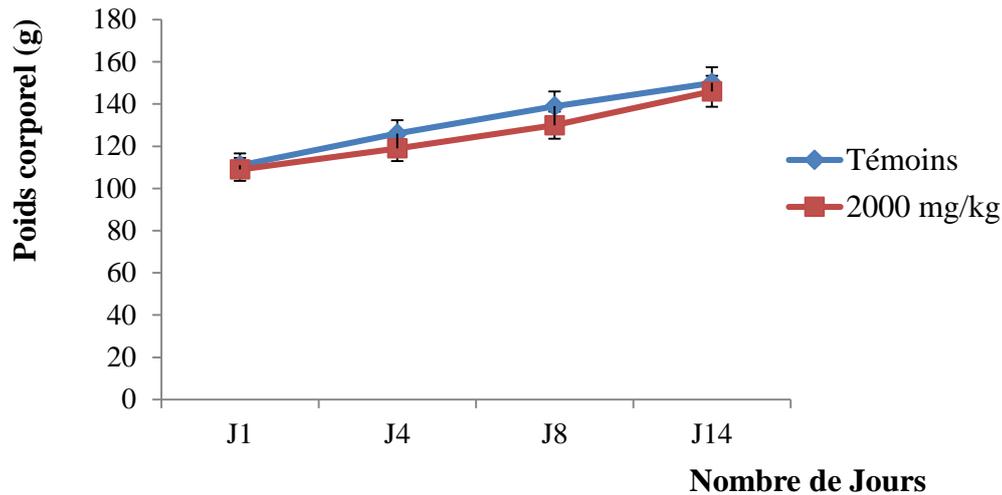


Figure 47 : Variations des poids corporels de rats en essai aiguë

III.3.2- Etude de la toxicité subaiguë de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » chez les poulets de chair

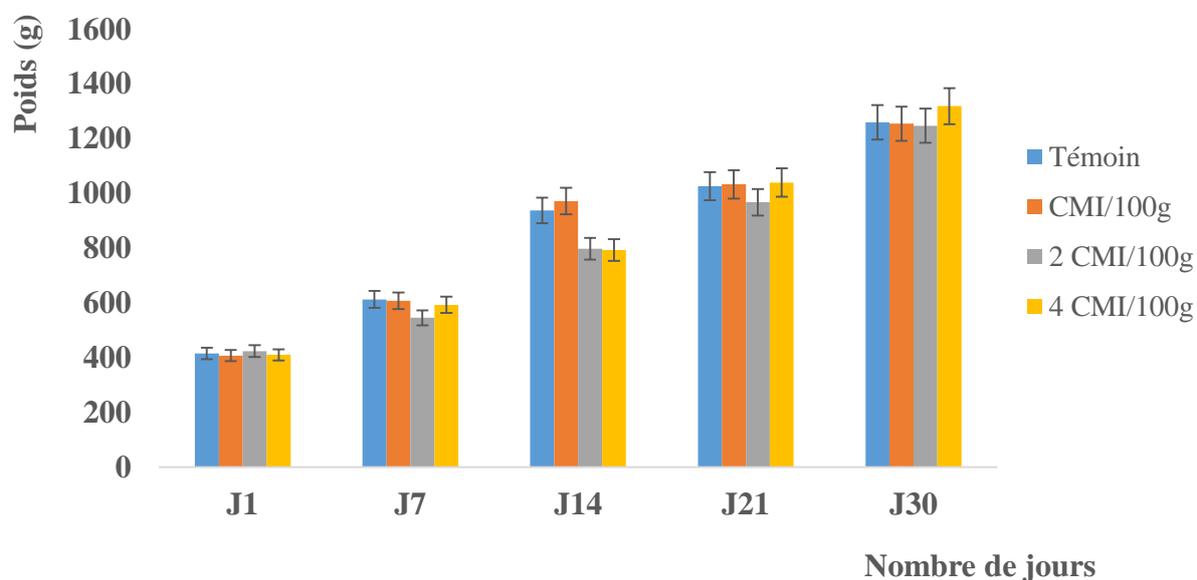
III.3.2.1- Signes généraux

Dans la présente étude, aucun mort n'a été observé pendant l'expérience. Pour ce qui est de leur comportement général, les poulets n'ont présenté aucun signe visuel évoquant le caractère toxique dû à l'alimentation. Par ailleurs, on avait plutôt observé une croissance rapide des poulets dans les groupes nourris aux doses de 4 mg et 8 mg de poudre de cortex de manioc par 100 g d'aliment pendant la troisième et la quatrième semaine par rapport au groupe témoin.

III.3.2.2- Effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN sur le poids corporel des poulets de chairs

Le suivi de la variation du poids des poulets au cours de l'étude de la toxicité subaiguë par l'incorporation de la poudre du cortex de manioc « 0110 » dans leur ration alimentaire aux doses de 2 mg, 4 mg et 8 mg de poudre par 100 g d'aliment est représenté dans la figure 48. Celle-ci montre que la croissance était normale dans tous les groupes (témoin et tests). Aucune perte de poids n'a été enregistrée. Cette croissance était plus prononcée dans le groupe témoin et le groupe I (2 mg de poudre/100g d'aliment) pendant la première et la deuxième semaine, soient des gains de poids moyenne de 197,13 g et 202,14 g pour la première semaine et 325,43 g et 364,57 g pour la deuxième semaine respectivement contre 121,71 g et 182,86 g seulement la première semaine, 252,00 g et 199,71 g la deuxième semaine pour les groupes II (4 mg/100g d'aliment) et III (8 mg/100g d'aliment) respectivement. Ces gains de poids redevenaient plus important dans les groupes II et III (4 mg et 8 mg de poudre/100g d'aliment) pendant la

troisième et la quatrième semaine de l'étude, soient 170,57 g et 247, 14 g, 279, 43 g et 279, 43 g respectivement dans lesdits groupes. Contre 88,00 g et 61,14 g la troisième semaine, 233,57 g et 221,64 g la quatrième semaine pour les groupes témoin et I respectivement. Ces différences de croissance enregistrées au cours de l'étude montrent que l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc de la variété « 0110 » a un impact positif sur la croissance des poulets.



Légende : Les données sont exprimées par moyenne \pm SE, (n = 7). Témoin = 0 mg de poudre pour 100 g d'aliment ; CMI/100g = 2 mg de poudre pour 100 g ; 2CMI/100g = 4 mg de poudre pour 100 g et 4CMI/100g= 8 mg de poudre pour 100 g d'aliment standard (provende).

Figure 48: Variation du poids corporel des poulets au cours de l'étude de la toxicité subaiguë de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN

III.3.2.3- Effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » sur quelques paramètres biochimiques

Les effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc de la variété améliorée « 0110 » sur quelques paramètres biochimiques aux doses de 2 mg, 4 mg et 8 mg pour 100 g d'aliment standard sont présentés dans le tableau XVIII. Il ressort de ce tableau que, de tous les paramètres dosés, aucune différence significative ($P < 0,05$) n'a été enregistré quel que soit le régime alimentaire considéré. Néanmoins des légères variations dans les teneurs sériques des paramètres dosés (ALAT, ASAT, Cholestérol total, Créatinine, HDL-Cholestérol, Aldéhyde Malonique, Triglycéride) ont été enregistrées dans tous les groupes comparativement au groupe témoin. Ces résultats montrent que les doses testées n'étaient pas suffisantes pour induire le désordre métabolique, voire les dommages cellulaires chez les poulets.

Tableau XII : Taux de quelques paramètres biochimiques dans le sérum des poulets soumis à l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant la scopolétine et du HCN

Groupes				
Paramètres	Témoin	CMI/100 g	2CMI/100g	4CMI/100g
ALAT^a (U/L)	2,31±0,62	2,64±0,92 ^{ns}	2,22±0,37 ^{ns}	2,67±0,79 ^{ns}
ASAT^b (U/L)	38,40±0,69	37,63±0,59 ^{ns}	40,37±0,56 ^{ns}	40,57±2,77 ^{ns}
Chol total^c (g/L)	1,13±0,03	1,11±0,08 ^{ns}	1,36±0,33 ^{ns}	1,15±0,09 ^{ns}
Créa^d (g/L)	10,82±0,75	10,13±0,45 ^{ns}	10,67±0,92 ^{ns}	9,77±1,04 ^{ns}
HDL-Chol^e (g/L)	0,69±0,05	0,69±0,09 ^{ns}	0,67±0,01 ^{ns}	0,71±0,06 ^{ns}
MDA^f (g/L)	0,14±0,01	0,12±0,01 ^{ns}	0,15±0,01 ^{ns}	0,14±0,02 ^{ns}
Trig^g (g/L)	0,57±0,14	0,33±0,04 ^{ns}	0,40±0,03 ^{ns}	0,33±0,04 ^{ns}

Légende : Les données sont exprimées par moyenne ± ES, (n = 7); ns (non Significative), P < 0,05) ; a: Alanine amino transférase (U/L); b: Aspartate amino transférase (U/L); c: Cholestérol totale (g/L); d: Créatinine (g/L); e: HDL-Cholestérol (g/L) ; f : Aldéhyde Malonique (g/L) ; g : Triglycéride (g/L). Témoin = 0 mg de poudre pour 100g d'aliment ; CMI/100g = 2 mg de poudre pour 100 g d'aliment ; 2CMI/100g = 4 mg de poudre pour 100 g d'aliment et 4CMI/100g = 8 mg de poudre pour 100 g d'aliment standard (provende).

III.3.2.4- Effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc « 0110 » sur le poids relatif des organes

Le tableau XIX présente les effets de l'aliment enrichi à la poudre du cortex de manioc de la variété améliorée « 0110 » sur le poids relatifs (%) de quelques organes vitaux (foies, reins et cerveau) de poulets traités aux doses de 2 mg, 4 mg et 8 mg de poudre pour 100 g d'aliment comparativement au témoin. Celui-ci montre que le poids relatifs des foies des poulets du groupe I avait baissé significativement par rapport à celui du groupe témoin (P < 0,05). Aucune autre différence significative n'a été obtenu avec d'autres organes bien que des légères variations aient été enregistrées dans tous les groupes comparativement au groupe témoin.

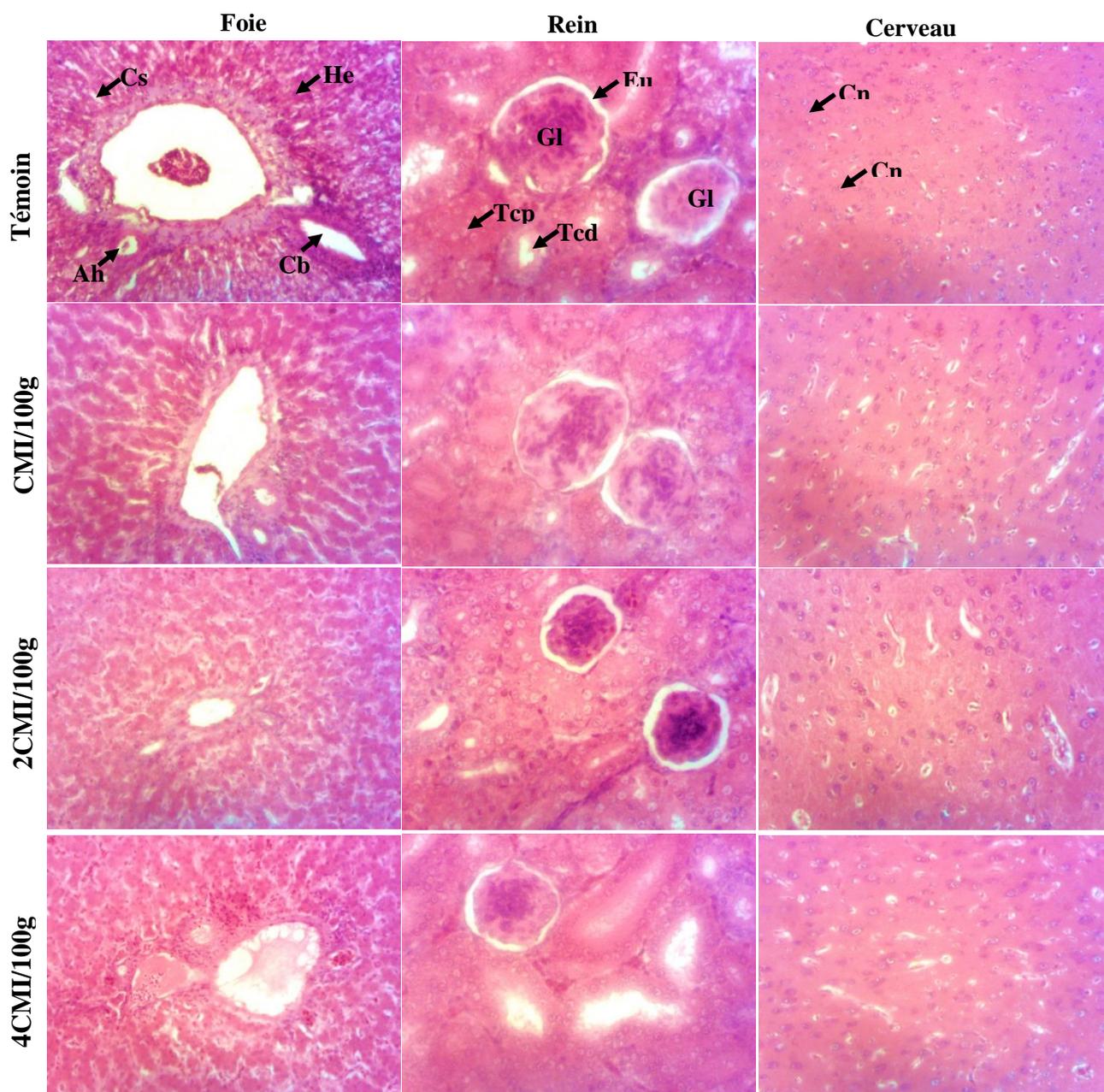
Tableau XIII: Poids relatifs des organes de poulets soumis à l'aliment enrichi de la poudre du cortex de manioc de la variété améliorée « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN

Groupes	Témoin	CMI/100g	2CMI/100g	4CMI/100g
Organes				
Foie (g)	2,69±0,11	2,16±0,06**	2,38±0,05 ^{ns}	2,51±0,04 ^{ns}
Cerveau (g)	0,77±0,05	0,71±0,06 ^{ns}	0,72±0,08 ^{ns}	0,76±0,04 ^{ns}
Reins (g)	0,25±0,01	0,22±0,01 ^{ns}	0,23±0,02 ^{ns}	0,20±0,01 ^{ns}

Légende : Les données sont exprimées par moyenne ± ESM, (n = 7); *(significativité, P < 0.05) ; ns (non Significative), Témoin = 0 mg de poudre pour 100g; CMI/100g = 2 mg de poudre pour 100 g; 2CMI/100g = 4 mg de poudre pour 100 g d'aliment et 4CMI/100g = 8 mg de poudre pour 100 g d'aliment standard (provende).

III.3.2.5- Histopathologie

La figure 49 présente des microphotographies de coupes de foies, reins et cerveaux obtenues de poulets témoins (T) alimentés avec l'aliment standard (provende) et groupes tests (I) (II) (III) nourris avec l'aliment standard supplémenté à la poudre du cortex de manioc de la variété « 0110 », aux doses respectives de 2 mg, 4 mg et 8 mg pour 100 g d'aliment standard. Ces doses correspondent respectivement à CMI/100g, 2 CMI/100g et 4 CMI/100g d'aliment standard. Aucune anomalie n'a été observée dans tous les organes quel que soit le régime alimentaire considéré, comparativement au groupe témoin (T). Les observations faites au niveau des foies ont montré les sinusoides étroites, les hépatocytes normaux sans dilatations et sans congestions de la veine Centro lobulaire. Au niveau des reins, les glomérules sont normaux et entourés de l'espace urinaire, les tubules contournés proximaux et distaux sont également normaux. Quant aux cerveaux, les cellules neuronales étaient aussi normales, aucune nécrose n'a été observée.



Légende : Témoïn = 0 mg de poudre pour 100g d'aliment ; CMI/100g = 2 mg de poudre pour 100 g d'aliment ; 2CMI/100g = 4 mg de poudre pour 100 g d'aliment et 4CMI/100g = 8 mg de poudre pour 100 g d'aliment correspondant respectivement à, 2 CMI et 4 CMI/100 g d'aliment standard (provende). **Foie :** Vp = Veine porte hépatique ; He = Hépatocyte ; Cs = Capillaire sinusoïde ; Ah = Artère hépatique ; Cb = Canalicule biliaire ; **Rein :** Gl = Glomérule ; Eu = Espace urinaire ; Tcd = Tubule contourné distal ; Tcp = Tubule contourné proximal ; **Cerveau :** Cn = Cellules neuronales.

Figure 49: Microphotographies des foies (X100), des reins (X200) et des cerveaux de poulets (X100) (Coloration Hématoxylène-Eosine (HE))

III.3.3- Discussion partielle numéro 3

Les données obtenues après un essai de toxicité orale aiguë chez l'animal peuvent être utilisées pour satisfaire à des besoins de classification du danger par le biais de la DL₅₀, et pour l'évaluation des risques pour la santé humaine et/ou pour l'environnement (OCDE, 2008a). C'est sur cette base qu'une évaluation de la toxicité orale aiguë chez le rat de l'extrait issu du cortex de manioc contenant de la scopolétine ayant montré une bonne efficacité antifongique *in vitro* sur les moisissures isolées du maïs a été réalisée. Une DL₅₀ orale supérieure à 2000 mg/kg a été obtenu. Cette valeur de DL₅₀ a permis de classer la toxicité de cet extrait dans la catégorie 5 du Système de Classification Globalement Harmonisé (SGH) des substances chimiques, catégorie caractérisant les substances faiblement toxiques (OCDE, 2008a).

L'exposition des poulets au régime alimentaire constitué de la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant 0,07 µg et 2,8 µg (CMI) ; 0,14 µg et 5,6 µg (2 CMI) ; 0,28 µg et 11,2 µg (4 CMI) de scopolétine et de HCN respectivement, incorporé à l'aliment standard pendant 30 jours n'a présenté aucun signe de toxicité dû à l'aliment au niveau de l'évolution pondérale, des paramètres biochimiques dosés (ASAT/ALAT, Cholestérol total, Triglycérides, Créatinine, Malondialdéhyde, HDL-cholestérol), des poids relatifs et des coupes histologiques d'organes (foie, reins et cerveau).

En effet, lors de l'étude de toxicité, la baisse de croissance est utilisée comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques (Hilaly *et al.*, 2004). Elle est corrélée à l'état physiologique de l'animal. Cette baisse de croissance peut être expliquée par une réduction de la consommation des aliments, mais aussi par les possibilités d'interactions dose/absorption et par la diminution de la quantité de nourriture absorbée (Hilaly *et al.*, 2004). Dans le cadre de cette étude le suivi de l'évolution pondérale des volailles montre que pendant la première et deuxième semaine, la croissance était plus importante dans le groupe témoin, nourri à l'aliment standard et le groupe I, nourri à l'aliment standard incorporé de 2 mg de poudre de cortex de manioc/100g d'aliment, alors que celle-ci était ralentie dans les groupes II et III, nourris de l'aliment standard incorporé de 4 mg et 8 mg de poudre de cortex de manioc/100g d'aliment standard respectivement. Pendant la troisième et quatrième semaine, c'est plutôt l'effet inverse qui était observé. Le retard de croissance enregistré la première et deuxième semaine dans les groupes II et III serait considéré comme une période d'adaptation au nouveau régime alimentaire incorporé à la poudre du cortex de manioc, par contre la croissance rapide enregistrée dans les mêmes groupes la troisième et quatrième semaine s'expliquerait par le fait que le cortex de la racine de manioc aurait augmenté le potentiel

énergétique de l'aliment favorisant ainsi un gain rapide de poids. En effet, **Fajemisin et al. (2012)** ont rapporté que le potentiel énergétique du manioc est comparable à celui des céréales notamment le maïs. Ces résultats corroborent ceux d'**Olaifa et al. (2015)** qui ont montré que la substitution du maïs dans le régime standard à 25 % avec la poudre du cortex de manioc enrichi en protéine donne les résultats similaires à ceux des volailles nourries avec un régime standard. Alors que les régimes où le pourcentage de substitution était de 50 % et 75 % avaient plutôt favorisé une perte de poids de la volaille après 28 jours d'exposition. Ceci suggère que dans ces proportions de substitution, ils existent des constituants autres que le HCN dans la poudre de cortex de manioc fermenté, entraînant des effets néfastes chez les poulets. En revanche, **Jérôme et André, (2004)** ont montré qu'il est possible de remplacer le maïs dans les rations complètes distribuées aux porcs, aux volailles et aux lapins par de la farine de cossettes de manioc à hauteur de 20, 30 et 40 % respectivement, sans observer d'effet négatif sur les performances des animaux. Il en va de même pour les bovins, les ovins et les caprins. Les concentrés contenant 40 % de manioc au lieu du maïs donnent d'excellents résultats chez ces espèces animales (**FAO, 1991**). Par ailleurs, le principal inconvénient inhérent à l'utilisation du manioc est la présence du HCN. Celle-ci est plus ou moins importante selon la variété (douce ou amère) et la préparation des tubercules (pelage, rouissage, cuisson, séchage ou ensilage). Les acides aminés soufrés jouent un rôle majeur dans la détoxification du cyanure ingéré. Pour limiter les effets chroniques néfastes du cyanure sur la croissance et la reproduction des animaux, il faut donc veiller à l'équilibre protéique des rations distribuées, surtout en ce qui concerne les acides aminés soufrés (**Jérôme et André, 2004**). Ces effets sont relativement importants chez les monogastriques, tandis que chez les ruminants, le manioc est partiellement détoxifié dans le rumen.

Contrairement à nos résultats, **Ezeanyika et al. (1999)** en étudiant les effets comparatifs de la scopolétine et du HCN sur le cerveau de rats soumis à un régime alimentaire standard contenant 0,07 µg de scopolétine et 1,8 mg de HCN pendant 12 mois ont montré que ce régime n'avait entraîné aucune peroxydation lipidique et que seuls les signes cliniques propre à la neuropathie étaient observés. D'où l'implication de la scopolétine dans la cause de la neuropathie chez les populations consommant le manioc. Dans le même ordre d'idée, **Gloria et al. (2014)** ont montré lors d'une étude sur les porcs soumis à un régime constitué de la farine de manioc bouillie pendant 24 mois que 43 porcs avaient trouvé la mort. Les signes ayant conduit à la mort étaient l'écoulement nasal du sang, les vomissements, la faiblesse musculaire, les difficultés de déplacement et le retard de croissance. Ces signes cliniques n'étaient pas

causés par l'effet toxique du HCN, mais probablement par l'effet toxique des coumarines (scopolétine), lequel est trouvé à des teneurs élevées dans les produits de transformation de manioc même après traitement à la chaleur.

L'examen histopathologique des organes (foies, reins et cerveaux) de volailles n'a montré aucun signe évident de toxicité suite à une exposition à un régime alimentaire constitué d'un mélange d'aliment standard et de poudre du cortex de manioc « 0110 » pendant 30 jours. Ceci vient confirmer ce qui a été constaté avec les paramètres biochimiques dosés. Ce résultat ne corrobore pas ceux de **Chilaka et al., (1985)** qui ont montré que la scopolétine suite à une exposition prolongée initie les dommages toxiques du foie à des très faibles concentrations induisant la nécrose hépatocytaire résultant à l'ictère chez les porcs. Les examens histologiques d'organes avaient montré la nécrose des muscles cardiaques et squelettiques, la nécrose hépatocytaire et les œdèmes des organes dépendant. Dans le même ordre d'idée, **Ojewole et al., (1983)** présente la scopolétine comme un agent de blocage neuromusculaire, ce qui serait à l'origine de la paralysie chez les porcs. De plus, les signes de la toxicité due au HCN étant le goitre, la neuropathie et le foie gras (**Abuye et al., 1998**), **Gloria et al., (2014)** rapportent qu'aucun de ces signes cliniques n'a été observé, donc la toxicité constaté était due à la scopolétine.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude s'expliqueraient par le fait que la teneur en scopolétine contenue dans l'aliment ne serait pas suffisante pour induire la toxicité, étant donné que cette dernière est un composé dont la teneur dans les produits de transformation de manioc n'est ni affectée par le séchage solaire, la réfrigération, le stockage ou la préparation (**Obidoa et Obasi, 1991**). Alors que le HCN est un composé hautement volatile, la préparation de l'aliment aurait permis son échappement, réduisant considérablement sa teneur dans le mélange aliment/poudre de cortex de manioc (**Falade et Akingbala, 2008**). La différence observée peut être également attribué à l'exposition prolongée et répétée (12 à 24 mois) des animaux d'étude à ces régimes par ces auteurs (**OCDE, 1979**).

III.3.4- Conclusion partielle numéro 3

L'étude de la toxicité aigüe de l'extrait chez les rats Wistar ainsi que de la toxicité subaigüe de la poudre issue du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine chez les poulets de chair ont permis de conclure que :

- ✚ La DL_{50} est supérieure à 2000 mg/kg, faisant de cet extrait une substance faiblement toxique, pouvant être classé dans la catégorie 5 du Système de classification Globalement Harmonisé (SGH) de l'OCDE.

✚ Dans le cadre de la toxicité subaigüe, l'ensemble des résultats obtenus partant de la prise des poids des poulets et le poids relatif des organes, les paramètres biochimiques et les coupes histologiques d'organes n'ont montré aucun signe évoquant le caractère toxique de la poudre de cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine et du HCN à la dose antifongique efficace maximale constituée de 8 mg de poudre pour 100 g d'aliment standard correspondant à 4 CMI et contenant 0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN.

III.4- Discussion générale

Le Cameroun dispose de plusieurs variétés de manioc le plus souvent importées ou mise sur pied localement par l'IRAD ou l'IITA. Toutes ces variétés ont été décrites tant morphologiquement que par des modifications subies lors de la sélection variétale. Les objectifs principaux de la sélection variétale concernent non seulement l'amélioration du rendement, mais aussi la qualité nutritionnelle (teneur élevée en micronutriments, amidon, caroténoïdes) et la résistance aux maladies. A ceux-ci s'ajoute la réduction du temps de culture. D'où la notion de précocité de la récolte, liée aux facteurs intrinsèques (physiologiques/génétiques) du cultivar et aux facteurs environnementaux (**Tan et al., 1985**). De toutes les manières, on peut classer toutes les variétés de manioc en deux grands groupes : le manioc doux et le manioc amer. La différence fondamentale entre ces deux groupes étant la teneur en acide cyanhydrique plus élevée dans les variétés amères comparées à celles dites douces. Par ailleurs, le manioc du fait de sa teneur élevée en eau constitue une denrée hautement périssable due à la détérioration physiologique post-récolte initiée après la récolte affectant la qualité organoleptique du manioc et favorisant aussi l'accumulation des composés bioactifs, notamment la scopolétine ayant des propriétés antifongiques (**Gnonlonfin et al., 2011 ; Zidenga et al., 2017**). L'ambition de cette thèse a été motivée par l'étude du potentiel en scopolétine dans les racines de manioc cultivées au Cameroun, l'impact de principales opérations unitaires sur la teneur résiduelle en scopolétine lors de la transformation du manioc en produit dérivés et ses propriétés antifongiques qui font d'elle une alternative prometteuse contre la contamination par les moisissures destructrices des denrées alimentaires, afin de réduire les pertes post-récoltes et garantir la sécurité sanitaire et nutritionnelle.

La quantification du HCN par la méthode du papier picrate a montré des teneurs différentes dans les vingt variétés de manioc étudiées. Ces teneurs ont été relativement faibles dans les variétés améliorées que les variétés locales. Selon le guide de **Nambisan, (2011)** douze variétés, soit six locales et six améliorées ont été classé dans la catégorie des variétés

«modérément toxique» et huit autres, dont quatre locales et quatre améliorées dans la catégorie des variétés «hautement toxiques». La transformation du manioc en *gari*, *fufu* et cossettes a favorisée une réduction différentielle du HCN en fonction du traitement technologique subit. Ainsi, dans les cossettes le procédé de transformation qui est le séchage solaire du parenchyme découpé en tranche ne favorise pas le contact intime entre l'enzyme d'hydrolyse et son substrat (**Orjiekwe et al., 2013**). Dans le *gari* la fermentation sémi-aérobie n'a pas permis au HCN de s'échapper complètement dans l'air (**Cubana et al., 2007**). Quant au *fufu*, le HCN étant volatil et soluble dans l'eau, l'opération de rouissage suivit du séchage au soleil sont à l'origine de la forte réduction du HCN (**Nambisan et al., 2011**). Les teneurs en HCN dans le cortex sont relativement plus élevées que dans le parenchyme. Ces résultats corroborent ceux de **Montagnac et al. (2009)** qui ont montré que le cortex de manioc a des teneurs en glycoside cyanogénique plus élevées que celles du parenchyme. Son utilisation en alimentation animale du fait de leur valeur alimentaire assez proche de celle du parenchyme suppose qu'un bon séchage solaire suivi du broyage permettrait d'obtenir des taux d'élimination de HCN acceptable n'excédant pas le niveau de sécurité prévue par l'OMS (10 mg/kg) (**Akinfala et al., 2002**).

La connaissance du taux de HCN a permis non seulement de connaître le niveau de toxicité de chaque variété de manioc, mais aussi d'établir le lien entre le taux de HCN et l'accumulation de la scopolétine.

La LC-SM a permis d'identifier et de quantifier la scopolétine dans vingt variétés de manioc camerounais (dix locales et dix améliorées) ainsi que dans les produits de transformation du manioc (*gari*, *fufu*, cossettes) et les parties de la racine de manioc (cortex, parenchyme et racine découpée entièrement). Les résultats obtenus montrent que la scopolétine s'accumule différemment dans toutes ces variétés avec des teneurs variant entre $33,48 \pm 0,02$ et $155,32 \pm 0,42$ mg/kg ; cette accumulation est plus prononcée dans les variétés améliorées que locales et la variété améliorée « 0110 » est celle qui accumule plus de scopolétine avec une teneur de $155,32 \pm 0,42$ mg/kg. Ces résultats corroborent ceux de **Gnonlonfin et al. (2011)** qui ont montré une accumulation différentielle de la scopolétine dans quatre variétés de manioc Béninois, à la seule différence que les caractéristiques de ces variétés n'ont pas été décrites, contrairement aux variétés de manioc camerounais dont les caractéristiques morphologiques et les modifications subies lors de la sélection variétale sont bien connus. L'étude de corrélation a montré qu'il existe un lien entre le taux de HCN et l'accumulation de la scopolétine dans les variétés améliorées ($r=0,617$) ce qui a permis de

constater que dans ces variétés plus le taux de HCN est élevé plus la teneur de scopolétine est importante, contrairement aux variétés locales ($r = 0,006$), qui, malgré les teneurs élevées en HCN ont des teneurs en scopolétine moins importantes. La sélection variétale portée sur les variétés améliorées aurait apportée d'autres éléments tels que les micronutriments (Zn, Ca, Mg, Fe, vitamines), qui en plus de la teneur élevée en HCN accentuerait l'accumulation de la scopolétine dans les racines de manioc. En effet, le HCN lorsqu'il est libéré suite aux blessures initiées sur la racine de manioc, inhibe le cytochrome C oxydase dans la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie favorisant une production massive et rapide des EOR à travers le flux oxydatif déclenché 15 min après la récolte et par conséquent l'accumulation des composés coumariniques et phénoliques notamment la scopolétine indispensable à leur piégeage (**Cooper et Brown, 2008**). Les produits de transformation de manioc ont également montré une accumulation différentielle, la teneur en scopolétine étant fonction du traitement technologique subit par le parenchyme de manioc. La cossette est le produit qui accumule plus de scopolétine soit une teneur moyenne de $76,53 \pm 28,29$ mg/kg, $46,16 \pm 29,13$ mg/kg pour le *gari* et $13,9 \pm 29,2$ mg/kg pour le *fufu*. La transformation du manioc en cossettes met en exergue les opérations unitaires telles que l'épluchage, le découpage et le séchage solaire. Cependant, le séchage solaire des parenchymes découpés semble être un moyen moins efficace dans la libération du cyanure car il ne favorise pas le contact intime entre l'enzyme d'hydrolyse (linamarase) et son substrat (linamarine) qui se décompose en HCN susceptible de s'échapper dans la nature à une température de 28° C (**Orjiekwe et al., 2013**). Ainsi, la faible réduction du HCN dans les cossettes serait à l'origine de la teneur élevée en scopolétine obtenue. Le rouissage est le traitement unitaire spécifique au *fufu* et le râpage au *gari*. Les teneurs variables de scopolétine dans ces différents produits seraient dues à l'impact des traitements unitaires qu'ils ont subi. Le rouissage est le traitement unitaire durant lequel, il y a acidification du milieu, production des métabolites telles que l'acide lactique, l'acide acétique. On y observe également une baisse du taux d'oxygène (**Brauman et al., 1995**). Alors que, la biosynthèse de la scopolétine est influencée par la teneur en oxygène donc une baisse retarde le processus (**Beeching et al., 1998**). Les faibles teneurs obtenues dans ce traitement seraient probablement dues à cette baisse d'oxygène lors du rouissage. Le traitement unitaire spécifique à la transformation en *gari* est le râpage. Durant ce procédé, il y a rupture des membranes cellulaires qui pourraient influencer l'ensemble des mécanismes de biosynthèse de la scopolétine. De même, la perte hydrique pendant le pressage aurait entraîné avec elle les molécules clés impliquées dans la biosynthèse de la scopolétine. De façon générale, l'élimination rapide du HCN lors de la transformation du

manioc en *fufu* et en *gari* limite significativement la production des EOR et par conséquence l'accumulation des métabolites secondaires. De plus, contrairement à **Ba et al. (2017)** qui ont montré qualitativement par Chromatographie sur Couche Mince que la scopolétine s'accumule dans toutes les parties de la racine de manioc (parenchyme, premier cortex, deuxième cortex), nous avons pu quantifier ces teneurs en scopolétine dans les parties de la racine de manioc. Ces teneurs ont été de $76,53 \pm 28,29$ mg/kg dans les extraits issus du parenchyme, $66,27 \pm 34,03$ mg/kg dans les extraits issus de la racine entière (racine découpée entièrement avec le cortex) et $19,34 \pm 16,41$ mg/kg dans les extraits issus du cortex. La différence obtenue s'expliquerait par le fait que lors de la transformation le parenchyme subit un stress généralisé causé par l'épluchage et le découpage alors que la racine entière subit un stress localisé causé par le découpage uniquement.

La variété de manioc améliorée « 0110 » ayant la teneur la plus élevée en scopolétine, les extraits issus du parenchyme et du cortex de cette variété ont été utilisés pour l'évaluation du test antifongique sur les moisissures destructrices des denrées alimentaires isolées du maïs.

Les tests antifongiques des extraits issus du cortex et du parenchyme de la variété de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine ont montré qu'ils inhibent la croissance des moisissures isolées du maïs dont *A. flavus*, *A. niger*, *fusarium sp*, *Penicillium sp* et un isolat non identifié. L'extrait issu du cortex bien qu'ayant une teneur en scopolétine moindre que le parenchyme a montré une bonne efficacité antifongique. Ces résultats corroborent ceux de **Ba et al. (2017)** qui ont montré que les extraits issus des différentes parties de la racine de manioc contenant de la scopolétine sans teneurs précises inhibent la croissance des moisissures isolées du maïs au Bénin. En effet, les propriétés antifongiques de la scopolétine ont été révélées antérieurement par les travaux de **Buschmann et al. (2000)** ; **Gomez-Vasquez et al. (2004)**. Tout comme l'alizarine, l'aspéroloside, l'acubine et les anthraquinones tous actifs sur des bactéries comme *Pseudomonas pneumoniae*, *Proteus morgani*, *staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Shigella*, la scopolétine inhibe l'action de *Escherichia coli* et *Helicobacter pylori* (**Duncan et al., 1998**). L'étude des phytoalexines du tournesol à savoir la scopolétine et l'ayapine, a permis de montrer que ces deux dérivés coumariniques sont spécifiques dans l'inhibition importante de la croissance du champignon *Phomamac donaldii* responsable de la maladie des tâches noires du tournesol avec comme IC_{50} 0,15 mmole/L pour l'ayapine et 0,13 mmole/L pour la scopolétine (**Marion, 2006**). L'effet inhibiteur de la scopolétine sur la croissance du champignon a été observé après 24 heures d'incubation. De ces mêmes études, le dosage de la scopolétine dans la plante, à différents temps après contamination

par le *Phomamac donaldii*, a prouvé que la molécule présentait un niveau de synthèse et d'accumulation jusqu'à deux fois plus élevé chez le génotype tolérant étudié par rapport au génotype sensible et ceux dès 72 heures. Par ailleurs, la scopolétine tout en s'accumulant différemment dans les cellules de *Ulmus pumila* et *Ulmus campestris* infectées avec les spores de *Ophio stomaulmi*, manifeste une activité antifongique (Teresa Valle *et al.*, 1997). Aussi, Gomez-Vasquez *et al.* (2004) ont prouvé l'effet fongistatique et fongicide de la scopolétine induisant une inhibition de la production de mycotoxines. L'accumulation rapide de la scopolétine entre 24 et 48 heures suite à la blessure des cellules des racines de manioc a permis d'observer l'absence de quelques mycotoxines dont l'aflatoxine sur les échantillons de manioc prélevés dans les villages au Ghana (Wareing *et al.*, 2001) d'une part et d'autre part sur les échantillons de manioc prélevés au Bénin par Gnonlonfin *et al.* (2011). Les propriétés antifongiques à large spectre de la scopolétine de manioc nous ont permis d'envisager son utilisation comme biopesticide dans la conservation du maïs.

Le parenchyme de manioc constitue une ressource alimentaire importante, pour éviter les concurrences alimentaires avec l'Homme, seule la poudre issue du cortex de manioc « 0110 » du fait de son activité antifongique remarquable sur les moisissures isolées a été utilisé pour le test de conservation du maïs.

L'efficacité antifongique des formulations poudreuses à base de la farine du cortex de la racine de manioc « 0110 » montre que la croissance mycélienne est fonction de la concentration en scopolétine des différents traitements appliqués: on a observé que plus la concentration en scopolétine dans la poudre appliquée est importante, plus la croissance mycélienne est faible. Cependant, une absence de la croissance mycélienne a été observé à la dose maximale de 4 CMI/100g de maïs, soit 8 mg de poudre du cortex pour 100 g de maïs et contenant 0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN après 7 jours d'incubation des grains issus d'un maïs de 30 jours de conservation. Ceci traduit son efficacité antifongique vis à vis des moisissures destructrices des denrées alimentaires. En effet, les plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes. Le plus souvent, ces substances actives sont des métabolites secondaires qui, à l'origine, protègent les végétaux des herbivores. L'huile de neem est restée longtemps le biopesticide d'origine végétale le plus utilisé, un insecticide extrait des graines d'*Azadirachta indica* (Schmutterer, 1990). A nos jours les preuves scientifiques sont nombreuses pour faire des extraits issus du manioc contenant de la scopolétine l'un de ces composés naturels efficaces. D'ailleurs, l'étude des phytoalexines du tournesol à savoir la

scopolétine et l'ayapine, a permis de montrer que ces deux dérivés coumariniques sont spécifiques dans l'inhibition importante de la croissance du champignon *Phomamac donaldii* responsable de la maladie des tâches noires du tournesol avec comme IC₅₀ égale à 0,15 mmole/L pour l'ayapine et 0,13 mmole/L pour la scopolétine (Marion, 2006).

L'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite la connaissance non seulement de ses effets bénéfiques mais aussi des complications graves que peut engendrer son utilisation non contrôlée.

Les renseignements tirés à partir de l'ensemble des résultats présentés dans ce travail sur les données expérimentales de la toxicité aiguë chez les rats femelles Albinos Wistar suggèrent de classer l'extrait brut contenant la scopolétine issu de la poudre du cortex de manioc « 0110 » dans la catégorie des substances faiblement toxiques par voie orale avec une DL50 supérieure à 2000 mg/kg (OCDE, 2008a). Aucun mort n'a été enregistré parmi les animaux traités à la dose unique de 2000 mg/kg de cet extrait après le temps d'expérimentation de 14 jours. Seul un rat du groupe test présentait une léthargie accompagnée de maigreur pendant les première 48 heures d'observation, lequel rat avait repris sa croissance normale avant la fin de la période d'observation. Toutefois la toxicité subaiguë démontre que la poudre du cortex de manioc incorporé à l'aliment de la volaille à la dose antifongique efficace n'est pas toxique. Aucune différence significative n'a été obtenue au niveau des paramètres biochimiques liés à la fonction hépatique, rénale et du métabolisme lipidique, l'observation histologique n'a montré aucune altération structurale du foie, du rein et du cerveau à toutes les doses testées comparativement au groupe témoin. Les résultats ainsi obtenus pourront servir de preuve d'innocuité pour la formulation d'un biopesticide à base de la poudre du cortex de manioc « 0110 » avec une teneur en scopolétine de 46,37 mg/kg et en HCN de 142,33 mg/kg pour la conservation du maïs.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le rôle joué par les extraits de plantes est connu depuis fort longtemps, or, la recherche apporte les preuves scientifiques de leur efficacité, mais aussi de leur toxicité, reposant sur des données résultant de l'expérimentation *in vitro* et *in vivo*. Parmi les extraits de plantes il y en a ceux qui peuvent être toxiques à de fortes doses ou après administration prolongée, en même temps qu'ils sont une source de molécules naturelles actives douées de propriétés biologiques diverses.

Notre étude était basée sur l'extrait brut issu de la racine de manioc contenant de la scopolétine, une phytoalexine de la classe des hydroxycoumarines, biosynthétisée dans les racines de manioc pendant la période de détérioration physiologique post-récolte ; processus complexe lié aux attaques microbiennes et aux autres stress incluant les lésions physiques et la déshydratation, impliquant des changements dans l'expression des gènes, la synthèse de protéine. Elle est douée de propriété anticancéreuse, hépato protectrice, antidiabétique et antimicrobienne, mais son emploi continu peut entraîner des effets secondaires pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu. Le risque causé étant en corrélation étroite avec la dose administrée et la durée d'exposition.

Dans ce présent travail, la scopolétine a été étudiée sur plusieurs niveaux: la quantification dans les extraits issus de la racine des variétés de manioc, les produits de transformation (*gari*, *fufu* et cossette) et les parties de la racine de manioc (cortex, parenchyme) afin d'évaluer l'influence de quelques facteurs (teneur en HCN, variétés et traitements technologiques post-récoltes) sur son accumulation, l'activité antifongique de ces extraits bruts contenant la scopolétine sur les moisissures isolées des grains de maïs, le test de conservation du maïs ainsi que l'évaluation de la toxicité aigüe de l'extrait (scopolétine) et subaigüe de la poudre (scopolétine et HCN) chez les rats et poulets de chairs respectivement.

La quantification de la scopolétine dans les différents échantillons a montré que celle-ci s'accumule différemment dans toutes les variétés de manioc camerounais avec des teneurs variant entre $33,48 \pm 0,02$ et $155,32 \pm 0,42$ mg/kg ($p < 0,05$). Cette accumulation a été plus prononcée dans la plupart des variétés améliorées que locales. La variété améliorée « 0110 » est celle qui accumule plus de scopolétine avec une teneur de $155,32 \pm 0,42$ mg/kg, le produit de transformation qui favorise une bonne accumulation a été la cossette issue du parenchyme. Toutes les parties de la racine de manioc accumulent la scopolétine et le parenchyme est la partie qui accumule plus. Bien que la teneur en HCN des variétés de manioc influence l'accumulation de la scopolétine, la sélection variétale et les traitements

technologiques sont aussi étroitement impliqués dans cette accumulation. Ainsi, la variété améliorée « 0110 » est celle qui a accumulé plus de scopolétine avec une teneur de 155,32 et 46,37 mg/kg et une teneur en HCN de 116,43 mg/kg et 142,33 mg/kg dans le parenchyme et le cortex respectivement.

Les extraits issus du parenchyme et du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine inhibent les moisissures isolées du maïs (*A. flavus*, *A. niger*, *fusarium* sp, *Penicillium* sp et isolat non identifié). Les CMI variant entre 0,30 et 2,50 µg/mL avec l'extrait issu du parenchyme et de 0,07 à 0,30 µg/mL avec l'extrait issu du cortex. Malgré la faible teneur en scopolétine de l'extrait issu du cortex, celui-ci a montré une bonne efficacité antifongique sur ces isolats. La poudre du cortex de manioc « 0110 » à la dose de 8 mg pour 100 g de maïs correspondant à 4 CMI et contenant 0,28 µg de scopolétine et 11,2 µg de HCN a montré une bonne efficacité dans la conservation du maïs.

Les renseignements tirés à partir de l'ensemble des résultats présentés dans ce travail sur les données expérimentales de la toxicité aiguë chez les rats femelles Albinos Wistar suggèrent de classer l'extrait brut contenant la scopolétine de manioc « 0110 » dans la catégorie des substances faiblement toxiques par voie orale avec une DL₅₀ supérieure à 2000 mg/kg. Toutefois, l'étude de la toxicité subaiguë de la poudre du cortex de manioc incorporé à l'aliment des poulets de chair à la dose antifongique efficace a montré que cette poudre n'est pas toxique. Aucune différence significative n'a été obtenue au niveau des paramètres biochimiques liés à la fonction hépatique, rénale et du métabolisme lipidique, l'observation histologique n'a montré aucune altération structurale du foie, du rein et du cerveau quel que soit le régime alimentaire considéré, comparativement au groupe témoin. L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* nous a permis d'envisager l'utilisation du cortex du manioc « 0110 » avec une teneur en scopolétine de 46,37 mg/kg et en HCN de 142,33 mg/kg) comme biopesticide pour la conservation du maïs.

Ainsi, la réalisation de ce travail définit les bases solides de l'efficacité de la poudre du cortex de manioc « 0110 » contenant de la scopolétine sur l'inhibition des moisissures isolées du maïs ainsi que leur niveau de toxicité. Afin d'approfondir ce travail, nous envisageons de :

- ✚ Evaluer l'influence de l'agro-écologie et rechercher les conditions d'optimisation de l'accumulation de la scopolétine dans le manioc ;
- ✚ Tester l'effet cumulé des extraits issus des cortex de plusieurs variétés de manioc sur les moisissures ;

- ✚ Appliquer le biopesticide à base de la poudre du cortex de manioc dans la conservation du maïs en milieu réel afin de vulgariser son utilisation ;
- ✚ Effectuer les tests sensoriels et de germination du maïs après conservation ;
- ✚ Déterminer le profil phytochimique pour identifier les différents groupes de composés et faire un fractionnement bioguidé des extraits bruts issus de la poudre de cortex de manioc ;
- ✚ Etudier l'action de la scopolétine sur les mycotoxines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdellah Z. and Larbi I. 2007. Présence et réglementation des mycotoxines dans les aliments aux Maroc : Situation actuelle et perspectives. 7, 5-6.

Abbott S.P. 2002. Mycotoxins and indoor molds. *Indoor Environment Connections*. 3, 14-24.

Abuye C., Kelbessa U. and Wolde-Gebriel S. 1998. Health effects of cassava consumption in South Ethiopia. *East African Medical Journal*. 3, 166-170.

Achidi A.U., Ajayi O.A., Bokanga M. and Maziya-Dixon. 2015. The use of cassava leaves as food in Africa. *Ecology of Food and Nutrition*. 6, 423-435.

Adindu M.N., Olayemi F.F. and Nze-Dike O.U. 2003. Cyanogenic potential of some cassava products in Port Harcourt markets in Nigeria. *Journal of Food Composition and Analysis*. 16, 21-24.

Agbor-Egbe and Mbome L.I. 2006. The effects of processing techniques in reducing cyanogen levels during production of some Cameroonian cassava foods. *Journal of food Composition and Analysis*. 4, 354-363.

Ahmad F. 2017. The Role of Interconversion of Scopoletin and Scopolin in Cassava Postharvest Physiological Deterioration (PPD). A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy; *University of Bath*; Department of Biology and Biochemistry. P 164.

Ahn Y.O., Shimizu B., Sakata K., Gantulga D., Zhou C. and Esen A. 2010. Scopolin-hydrolysing beta-glucosidases in roots of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*. 1, 132-143.

Akande S.A., Onyegbula F.A., Salawu A.R., Oladipo A.K. and Adetunji C.O. 2017. Effects of post-harvest handling on hydrogen cyanide content of cassava products obtained from Ilorin-West urban markets, Nigeria. *African Journal of Food Science*. 11, 362-368.

Akinfala E.O., Aderibigde A.O. and Matanmi O. 2002. Evaluation of the nutritive value of whole cassava plant as replacement for maize in the starter diets for broiler chicken. *Livestock Research for Rural Development*. 14, 1- 6.

Akanji A.O., Adeyefa I., Charles D.M. and Osotimehin B.O. 1990. Plasma glucose and thiocyanate responses to different mixed cassava meals in non-diabetic Nigerians. *European Journal of Clinical Nutrition*. 44, 71-77.

Apostol I., Heinstejn P.F. and Low P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant physiology*. 90, 109-116.

Aubertot J.n., Barbier J.m., Carpentier A., Gril J.j., Guichard L., Lucas P., Savary S., Savini I. and Voltz M. 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref (France).

Aziz N.H., El-Fouly M.Z., Abu-Shady M.R. and Moussa L.A.A. 1997. Effect of Gamma radiation on the Survival of Fungal and Actinomycetal Florae contaminating Medicinal Plants. *Applied Radiation and Isotopes*. 48, 71-76.

Ba R., Teou A., Fernand G., Kosi M.N., Kokouvi D., Koffi K., Ursula H., Marcel T.D., Hounsode, Kossi H.K., Yaovi A. and Lamine B.M. 2017. Maize Fungal Growth Control with Scopoletin of Cassava Roots Produced in Benin. *International Journal of Microbiology*. ID 5671942. P. 11.

Ba R., Gbaguidi F., Houngbeme G.A., Kohoude J., Gbemenou J.B., Gnonlonfin, F.T., and Lamine B.M. 2016. Influence of the drying on the scopoletin induction of cassava chips produced in Benin. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2, 235-242.

Baculard A. and Tournier G. 1995. Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose. *Revue de Pneumologie Clinique*. 51, 159-162.

Badillet G., de Briève C. and Guého E. 1987. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*. vol II, Ed VARIA, Paris.

Barnett H.L. and Hunter B.B. 1972. Illustrated genera of Imperfect fungi. 3th Ed, *Burgess publishing company, Minnesota*. 162-197.

Bata A. and Lasztity R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*. 10, 223-228.

Battilani P., Giorni P., A. and Pietri. 2003. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*. 109, 715-722.

Bayoumi S.A., Rowan M.G., Beeching J.R. and Blagbrouh I.S. 2008. Investigation of biosynthetic pathways to hydroxycourmarins during post-harvest physiological in Cassava roots by using isotope labelling. *Chembiochem*. 8, 3013-3022.

Bayoumi S.A., Rowan M.G., Beeching J.R. and Blagbrough I.S. 2010. Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. *Phytochemistry*. 71, 598-604.

Beeching J.R., Gomez-Vasquez R.D. and Cooper R.M. 1998. Wound and defense responses in cassava as related to post-harvest physiological deterioration. *Phytochemical Signals and Plant Microbe Interactions*. 32, 231-248.

Beeching J.R., Reilly K., Gomez-Vasquez R., Li H., Han Y., Rodriguez M.X., Buschman H., Taylor N., Fauquet C. and Tohme J. 2002. Post-harvest physiological deterioration of cassava. In: Nakatani M, Komaki K. (eds). Symposium of the international society for tropical root crops (12, 2000, Tsukuba, Japan). Potential of root crops for food and industrial resources. *Proceedings International Society for Tropical Root Crops*. 60-66.

Belkacem N. 2008. Les mycotoxines: production et voie de biosynthèse. Master II. Institut national polytechnique de Toulouse. France. P. 23.

Bennett J. and Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16, 497- 516.

Bennett F., Morgan O., Golden M.H. and Stennett D.M. 1987. Plasma thiocyanate and free radicals in Jamaican neuropathy. *West Indian Medical Journal*. 36, 163-165.

Betiku E. and Alade O.S. 2011. Investigation of effects of different cassava cultivars with respect to hydrogen cyanide content on their starch hydrolysis. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 6, 2362-2370.

Bokanga M. 1994a. Distribution of cyanogenic potential in the cassava germplasm. *Acta Horticulturae*. 375, 117-123.

Bokanga M. 1994b. Processing of cassava leaves for human consumption. *Acta Horticulturae*. 375, 203-207.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. and Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. *Collection Biotechnologies*. 34-428.

Bouras N., Holtz M.D., Aboukhaddour R. and Strelkov S.E. 2016. Influence of nitrogen sources on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. *The Crop Journal*. 4, 119-122.

Bouras N., Kim Y.M. and Strelkov S.E., 2009.- Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. *International Journal of Food Microbiology*. 131, 251-255.

Bourdoux P., Seghers P., Mafuta M., Vanderpas J., Vanderpas-Rivera M., Delange F. and Ermans A.M. 1982. Cassava products: HCN content and detoxification processes. In:

Delange, F., Iteke, F.B., Ermans, A.M. (Eds.), Nutritional Factors Involved in the Goitrogenic Action of Cassava, IDRC-184e. IDRC, Ottawa Canada. 51-58.

Bradbury J.H. 2006. Simple wetting method to reduce cyanogen content of cassava flour. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 388-393.

Bradbury M.G., Egan and Bradbury J.H. 1999. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 4, 593-601.

Brauman A., Kelele S., Mavoungou O., Ampe F. and Miambi E. 1995. Etude cinétique du rouissage traditionnel des racines de manioc en Afrique Centrale (Congo). *Transformation Alimentaire du Manioc*. 288-305.

Buschmann H., Reilly K., Rodriguez M.X., Tohme J. and Beeching J.R. 2000a. Hydrogen peroxide and flavan-3-ols in storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) during postharvest deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 5522-5529.

Buschman H., Rodriguez M.X., Tohmes J. and Beeching J.R. 2000b. Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Annal of Botanic*. 6, 1153-1160.

Cahagnier B. and Richard-Molard D. 1998. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés. *Edition Tec & Doc*. 140-158.

Cairns-Fuller V., Aldred D. and Magan N. 2005. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology*. 99, 1215-1221.

Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M. and Warnock D.W. 2013. Identification of pathogenic fungi, *Wiley-Blackwell; 2nd edition*. P. 350.

Canton E., Peman J., Viudes A., Quindos G., Gobernado M. and Espinel I.A. 2003. Minimum fungicidal concentration of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 3, 203-206.

Cardoso P.A., Mirione E., Ernesto M., Fernando M., Julie C., Rezaul H.M. and Bradbury J.H. 2005. Processing of cassava roots to remove cyanogens. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18, 451-460.

Cardwell K. and Henry S. 2004. Risque d'exposition et l'atténuation d'effet de l'aflatoxine sur la santé humaine: un exemple de l'Afrique de l'Ouest. *Toxin Review*. 23, 217-247.

Castanet A.S., Colobert F. and Broutin P.E. 2002. Mild and regioselective iodination of electron-rich aromatics with N-iodosuccinimide and catalytic trifluoroacetic acid. *Tetrahedron Letters*. 43, 5047-5048.

Cayman 2016. Safety data sheet Scopoletin. *Cayman Chemical Company* 1180 E. Ellsworth Rd. P. 6.

Chen M. and Mc Clure J.W., 2000. Altered lignin composition in phenylalanine ammonia-lyase inhibited radish seedlings: implication for seed-derived sinapoyl esters as lignin precursors. *Phytochemistry*. 53, 365-370.

Chermette R. and Bussieras J. 1993. Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort. P.179.

Chiedozie O.I. and Paul C.C. 2018. Comparative Proximate Composition and Cyanide Content of Peeled and Unpeeled Cassava Roots Processed into Gari by Traditional Methods. *Research Journal of Food and Nutrition*. 2, 1-13.

Chilaka F.C., Anosike E. and Obidoa O. 1985. Effect of prolonged gari diets on some microsomal enzyme activities of rat liver. *Plant Food for Human Nutrition*. 2, 159-164.

Chun-Long L., Xian-Cheng H., Hong Z., Jin-Sheng W. and Bao L. 2015. Effect of Scopoletin on Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Prostate Cancer Cells *In vitro*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 4, 611-617.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2007. Improved Cassava for the developing world. Annual report. P. 39.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacterie that grow aerobically; *approved standard- ninth edition*. 2, 10-45.

CMA/AOC (Conference des Ministres de l'Agriculture de l'Afrique de l'Ouest et du Centre). 2004. Note technique sur le manioc dans la zone de l'Afrique de l'Ouest et du Centre.; 5-11. http://www.hubrural.org/cmaaoc_manioc.pdf.

Cock J.H. 1985. Cassava: new potential for a neglected crop. Boulder, Etats-Unis, Westview Press, IADS-CIAT-GTZ Series. P. 191.

Codex Alimentarius Commission. 2013. Proposed draft maximum levels for hydrocyanic acid in cassava and cassava products. <http://www.codexalimentarius.org>.

Conn HF. 1979. Current therapy. ed W.B Saunders Company. P. 950.

Cooper C.E. and Brown G.C. 2008. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical

mechanism and physiological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 40, 533-539.

CTA (Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation). 2016. Etude Bibliographique de la chaîne de valeur du manioc en Afrique Centrale. *Final Draft*. 2-19.

Cumbana A., Mirione E., Cliff J. and Bradbury J.H. 2007. Reduction of cyanide content of cassava flour in Mozambique by the wetting method. *Journal of Food Chemical*. 3, 894-897.

Davet P. and Rouxel F. 1997. Detection et isolation des champignons du sol. INRA. Paris. 17-54.

De Bruijn G.H. 1983. Toward lower levels of cyanogenesis in cassava. In: Delange, F., Ahluwalia, R. (Eds.), *Cassava Toxicity and Thyroid: Research and Public Health Issues*, IDRC-207e. IDRC, Ottawa. 119-122.

De Hoog G.S. and Guarro J. 1995. Atlas of clinical fungi, Centralbureau voor de Magister en Microbiologie. *Université Badji Mokhtar. Annaba*. 39, 7-8.

Denézon O., Dogbo J.A., Mamyrbekova B., Yves-Alain B., Raoul S.S., Gogbeu S.J. and Abdoulaye T. 2008. Influence de l'acide salicylique sur la synthèse de la phénylalanine ammonia-lyase, des polyphénoloxydases et l'accumulation des composés phénoliques chez le manioc (*Manihot esculenta* Crantz). *Sciences & Nature*. 1, 1-13.

Diguta F.C. 2010. Écologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse de doctorat en sciences de l'alimentation. Université de Bourgogne. P. 219.

Djoulde R.D., Essia N.J.J. and Etoa F.X. 2007. Nutritive value, Toxicological and Hygienic Quality of Some Cassava Based Products in Cameroon. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4, 404-408.

Djuikwo V.N., Aba R.E., Gouado I., Mbofung C.M. and Tanumohardjo S.A. 2011. Determination of major carotenoids in processed tropical leafy vegetables indigenous to Africa. *Food and Nutrition Sciences*. 8, 793-802.

Dohou N., Yamni K., Gmira N. and Idrissi H.L.M. 2004. Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Acta Botanica Malacitana*. 29, 233-239.

Dorey S. 1999. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiology*. 121, 163-172.

Dufour D.L. 2006. “Bitter” cassava: Toxicity and detoxification, In: N. Nassar & R. Ortiz (eds.), First International Meeting on Cassava Breeding, *Biotechnology and Ecology*. Brasilia. 171-184.

Dufour D.L. 1994. Cassava in Amazonia: lessons in utilization and safety from native peoples. *Acta Horticulturae*. 375, 175-182.

Dufresne P. 2018. Identification des moisissures d'intérêt médicale. Laboratoire de santé publique Quebec. P. 59.

Duncan S.H., Flint H.J. and Stewart C.S. 1998. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* O157 mediated by dietary plant metabolites. *Federation of European Microbiological Societies*. 2, 283-288.

El-Sharkawy M.A. 2012. Stress-tolerant cassava: the role of integrative ecophysiology breeding research in crop improvement. *Open Journal of Soil Science*. 2, 162-186.

Emmanuel T. 2013. Amélioration de la commercialisation et de la transformation du manioc au Cameroun : contraintes et perspectives de la chaîne de valeur. *Dans, reconstruire le potentiel alimentaire de l'Afrique de l'Ouest* Elbehri (Ed.). 551-583.

Eskola M. 2002. Ochratoxin A in cereals: Foodstuffs and human plasma. *European Journal of plant pathologie*. 108, 631- 637.

Essers A.J. and Alsen P. 1992. Paralytic disease Konzo in a rural area of Mozambique. *Ecology of Food Nutrition*. 27, 17-27.

Ezeanyika L.U.S., Obidoa O. and Shoyinka V.O. 1999. Comparative effects of scopoletin and cyanide on rat brain, 1: Histopathology. *Plant Foods for Human Nutrition*. 53, 351-358.

Ezekiel C.N., Abia W.A., Ogara I.M., Sulyok M., Warth B. and Kruska R. 2015. Fate of mycotoxins in two popular traditional cereal-based beverages (kunu-zaki and pito) from rural Nigeria. *LWT-Food Science and Technology*. 60, 137-141.

Fajemisin A.N., Omotoso O.B., Fadiyimu A.A. and Shuaibu A.Y. 2012. Nutrient intake and utilization by West African Dwarf goats fed cassava peels substituted with *Cajanus cajan* hay. In: Agricultural Transformation Strategies and Policies for Livestock Development in Nigeria. ASAN-NIAS Proceedings of the 17th Annual Conference held at the International Conference Centre, Opposite Radio House, Area 8, Abuja. 9th - 13th September, 2012. 636-639.

Falade K.O. and Akingbala J.O. 2008. Improved Nutrition and National Development Through the Utilization of Cassava in Baked Foods. University of Ibadan, Nigeria. Chapter 10 from *Using Food Science and Technology to Improve Nutrition and Promote National*

Development, Robertson G.L. & Lupien J.R. (Eds), © *International Union of Food Science & Technology*. P. 12.

Fandohan P., Gnonionfin B., Hell K., Marasas W.F. and Wingfield M.J., 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin. *International Journal of Food Microbiology*. 99, 173-183.

FAO (Food and Agriculture Organisation). 2014. Champs-écoles paysans sur le manioc ressources à l'intention des facilitateurs d'Afrique sub-saharienne. <http://www.fao.org>.

FAO (Food and Agriculture Organisation). 2013. Bimestriel de la représentation de la FAO au Cameroun (Mai-Juin 2013), Food and Agriculture Organization of the United Nations: Cameroon. 1-16.

FAO (Food and Agriculture Organisation). 1992. Le système de stockage du maïs en milieu paysan béninois : bilan et perspectives, par Y.-S. Fiagan. Rome. Chapitre 2.

FAO (Food and Agriculture Organisation). 2011. Produire plus avec moins. Guide à l'intention des décideurs sur l'intensification durable de l'agriculture paysanne. Rome.

FAO (Food and Agriculture Organisation). 1991. Racines, tubercules, plantains et bananes dans la nutrition humaine. Rome, Italy: FAO.

FAOSTAT. 2014. (Food and Agriculture Organisation).<http://www.faostat.fao.org/>.

FAOSTAT. 2015. (Food and Agriculture Organisation). FAO Statistical pocketbook <http://faostat.fao.org/>.

Ferdandez C., Stack M.E. and Musser S.M. 1997. Determination of the deoxynivalenol in 1991 US winter and spring wheat by high performance thin layer chromatography. *Journal- Association of Official Analytical Chemists*. 3, 628-630.

Ferrer J.L., Austin M. and Noel J. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*. 3, 356-370.

Feuilhade C.M. 2005. New diagnostic techniques, *Journal of the European Academy Dermatology and Venereology*. 19, 20-24.

Fokunang C.N., Tomkins P.T., Dixon A.G.O., Tembe EA., Salwa B., Nukenine E.N. and Horan I. 2001. Cyanogenic potential in food crops and its implication in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) production. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4, 926-930.

Friedman P.A. 1980. Common poisons. In: Isselbacher *et al.*, eds. Harrison's principles of internal medicine. 9th ed. London: *McGraw-Hill International Student Edition*. 953-965.

Galindo S. 2008. Les mycotoxines. Etat des connaissances, réglementation. Le risque des mycotoxines. CIRAD. SupAgro. Montpellier. 2-10.

Garcia J.A., Sanchez T., Ceballos H. and Alonso L. 2013. Non-destructive sampling procedure for biochemical or gene expression studies on post-harvest physiological deterioration of cassava roots. *Postharvest Biology Technology*. 86, 529-535.

Garcia V.V., Lapitan O.B., Flores D.M. and Uritani I. 1984. Changes in coumarin and phenol content and peroxidase activity as affected by drying methods for cassava root slices and their relation to food quality. *Tropical Root Crops: Post harvest physiology and processing*. 7, 299-309.

Gil J.L. and Buitrago A.J.A. 2002. La yuca en la alimentacion animal. In: Ospina B, Ceballos H, editors. La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producci´on, procesamiento, utilizaci´on y comercializaci´on. Cali, Colombia. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*. 527-569.

Gloria D.I. 2014. Hepatic Necrosis and Degenerative Myopathy Associated with Cassava Feeding in Pigs. *Journal of Veterinary Medicine*. P. 3.

Gnonlonfin G.L.B., Adjovi Y., Gbaguidi F., Gbenou J., Katerere D., Brimer L. and Sanni A. 2011. Scopoletin in cassava products as an inhibitor of aflatoxin production. *Journal of Food Safety*. 4, 1745-4565.

Gomez-Vasquez R., Day R., Buschmann H., Beeching J.R. and Cooper R.M. 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta Crantz*) suspension cells and leaves. *Annal of Botanic*. 1, 87-97.

Gong Y.Y., Hounsa A., Egal S., Sutcliffe A. E., Hall A. J., Cardwell K. F. and Wild C. P. 2004. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin. *West Africa. Environ. Health Pers.* 112, 1334-1338.

Gowda N.K.S., Malathi V. and Suganthi R.U. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology*. 116, 281-291.

Grayson J. 2020. Bien manger peut contribuer à éloigner la Covid-19 (et d'autres maladies). *University of Southern California Dornsife College of Letters, Arts and Sciences*. The conversation. Com.

Gruhnert C., Böle B. and Dirk S. 1994. Compartmentation of cyanogenicglucosides and their degrading enzymes. *Planta*. 195, 36-42.

Guengerich F.P., Johnson W., Shimada T., Ueng Y.F., Yamazaki H. and Langouet S. 1998. Activation et detoxication of aflatoxin B1. *Mutation Research*. 402, 121-128.

Guezlane T.N., Bouras N.O. and Mohamed D. 2016. Les mycotoxines: un danger de santé public. *Algerian journal of arid environment*. 32, 32-49.

Guiraud J. 1998. Microbiologie alimentaire. *Edition Donod*, Paris. 8, 101-330.

Hahn K.S. 1997. Traditional processing and utilization of cassava in Africa. IITA Research, Guide 41. P. 25.

Harayama T. 2006. Synthtic studies on aromatic heterocyclic compounds. *Pharmaceutical Socceity of Japan*. 126, 543-564.

Haris C. 1985. The estimation of microbial biomass. *Biosensors*. 1, 17-84.

Harrigan W.F. and McCance M.E. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. *Academic press*. London. 21-277.

Hell K. and Mutegi C. 2011. Lutte contre les aflatoxines et les stratégies de prévention dans les principales cultures de l’Afrique sub-saharienne. *African Journal of Microbiology Research*. 5, 459-466.

Hennequin C. and Lavarde V. 1998. Infections à Penicillium, *Encyclycopédie de la Médedecine Chirurgicale* (Elsevier, Paris). Maladies Infectieuses. 850-A-11.

Hilaly J.E., Israili Z.H. and Lyouss B. 2004. Acute and chronic toxicological studies of Ajuva Iva in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 91, 43-50.

Hillocks R.J. and Threch J.M. 2000. Cassava mosaic and cassava brown streak virus diseases in Africa: a comparative guide to symptoms and aetologies. *Roots*. 1, 2-5.

Hinnou C.L. and Aloukoutou M.A. 2011. Stockage et conservation du maïs au Bénin: techniques efficaces et stratégies d’adoption. P. 9.

Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L. and Morrison C.J. 2005. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. 43, 129-137.

Igawa T., Takahashi-Ando N., Ochiai N., Ohsato S., Shimizu T., Kudo T., Yamaguchi I. and Kimura M. 2007. Reduced contamination by the Fusarium mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene. *Applied Environmental and Microbiology*. 73, 1622-1629.

IRAD. 2008. Rapport national sur l’état des ressources phylogénétiques pour l’alimentation et l’agriculture. IRAD: Yaoundé. P. 83.

IRAD. 2013. Diffusion des nouvelles technologies agricoles en Afrique DONATA (composante II de PSTAD) Cameroun. *Rapport annuel d’activités*. 4-11.

Iwuoha G.N., Ubeng G.G. and Onwuachu U.I. 2013. Detoxification Effect of Fermentation on Cyanide Content of Cassava Tuber. *Journal of Applied Science and Environmental Management*. 4, 567-570.

Jansson C., Westerbergh A., Zhang J.M., Hu X.W. and Sun C.X. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Applied Energy*. 86, 95-99.

Jennings D.H. 1993. Understanding tolerance to stress: laboratory culture versus environmental actuality. Mycology Series, 10 (Stress Tolerance of Fungi). Marcel Dekker, New York: 1-11.

Jérôme B. and André B. 2004. Utilisation des plantes à tubercules ou à racines tubéreuses en alimentation animale. *Troupeaux et Cultures des Tropiques*. 4, 47-50.

Julien R. 2002. Les moisissures parlons-en. Objectif prevention. 4, 7-8.

Kai K., Masaharu M., Naohiro K., Ryotaro Y., Michiko T., Hikaru Y., Kanzo S. and Buni S. 2008. Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl Coa by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 6, 989-999.

Karam H. & Karam N.E. 2000. Isolement et identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle. XIIèmes Journées Nationales de Microbiologie. Constantine. P. 1.

Karla C.L., Livia M.F.C., Luane F.G., Stefani G.R., Jeronimo R.O.N, Flavio M.L, Telma A.G., Rodrigo M.V., Wallans T.P. and Eric S.G. 2015. Electrochemical characterization of scopoletin, a 7-hydroxy-6-methoxy-coumarin. *International Journal of Electrochemical Science*. 10, 5714-5725.

Khan Z., Kortom M., Marouf R., Jamal W. and Chandy R. 1999. Fatal pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*, *Journal of Medical Mycology*. 9, 166-169.

Konaté G. and Traoré O. 1992. «Les hôtes réservoirs du virus de la striure du maïs (MSV) en zone soudano-sahélienne: identification et distribution spatio-temporelle ». *Phytoprotection*. 73, 111-117.

Kobawila S.C., Louembe D.S., Keleke J. and Gamba C. 2005. Reduction of the cyanide content during fermentation of cassava roots and leaves to produce bikedi and Ntoba mbodi, two food products from Congo. *African Journal of Biotechnology*. 7, 689-696.

Kraus G.A., Cui W. and Seo Y.H. 2002. The reaction of Aryl triflates and Aryl pivalates with electrophiles. The triflate as a meta-directing group. *Tetrahedron Letters*. 43, 7077-7078.

Kumar R., Kamra D.N., Agarwal N. and Chaudhary C. 2007. *In vitro* methanogenesis and fermentation of feeds containing oil seed cakes with rumen liquor of buffalo. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 8, 1196-1200.

Kuwabara T. and Katoh Y. 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiology*. 40, 1029-1035.

Le Bars J. 1988. Toxicogenesis as a function of the ecological conditions of the grain: micro-organisms system. In "Preservation and storage of grains, seeds and their products". *Multon J. L., Lavoisier pub, New York, USA: 347-366.*

Liu Y. and Wu F. 2010. La charge mondiale du carcinoma hépatocellulaire induite par l'Aflatoxine: Une évaluation des risques. *Environ Health Perspect*. 118, 818-824.

Magan A., Mylona L., Ayodele M., Akoa A., Foko J., Filtenberg O. and Olemba S. 2009. *Aspergillus spp.* Produisant l'aflatoxine et les niveaux d'aflatoxine dans les pièces de manioc stockées comme touché par les pratiques de traitement. *Food Control*. 20, 648-654.

Majoras L., Kardos G., Szabo B. and Sipicki M. 2005. Caspofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation of different methods with the minimal fungicidal *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 8, 3486-3488.

Marion A. 2006. Phoma du tournesol: déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie. *Trends in Food Science and Technology*. 10, 223-227.

Mburu F.W., Swaleh S. and Njue W. 2013. Potential toxic levels of cyanide in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) grown in Kenya. *African Journal of Food Science*. 6, 416- 420.

Milena L. and Maria D. 2014. Food technologies and developing countries: a processing method for making edible the highly toxic cassava, *Italian Journal of Agronomy*. 573, 79-83.

MINADER 2019. Agriculture, le Cameroun gros importateur de produits agricoles; présentation de la filière maïs au Cameroun, le 28 février à Yaoundé par le ministre en charge de l'Agriculture (Minader), lors du conseil de cabinet du mois. Par Deudjui Carine, Cameroun tribune.cm.

Montagnac J.A., Davis C.R. and Tanumihardjo S.A. 2009. Processing techniques to reduce toxicity and antinutrients of cassava for use as a staple food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 8, 17-27.

Morin O. 1994. *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques, Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.

Moss M.O. and Frank J.M. 1985. The Influence on mycotoxin production of interactions between fungi and their environment. In Trychothecenes and other mycotoxins (ed., Lacey J.). *Chichester*, John Wiley. 257-268.

Mouafor B.I., Temegne N.C., Ngo me A.F. and Malaa D. 2016. Farmer's adoption of improved cassava varieties in the humid forest agro-ecological zone of Cameroon. *Greener Journal of Agricultural Sciences*. 10, 276-284.

Mvogo E.S.M. and Liang D. 2012. Cassava sector development in Cameroon: Production and marketing factors affecting price. *Agricultural Sciences*. 5, 651-657.

Murphy P.A., Hendrich S., Landgren C. and Bryant C.M. 2006. Food Mycotoxins: An Update.. *Journal of Food Science*. 71, 51-65.

Nambisan B. 1994. Evaluation of the effect of various processing techniques on cyanogen content reduction in cassava. *Acta Horticulturae*. 375, 193-201.

Nambisan B. 2011. Strategies for elimination of cyanogens from cassava for reducing toxicity and improving food safety. *Food and Chemical Toxicology*. 49, 690-693.

Nassar N.M.A., Hashimoto D.Y.C. and Fernandes. 2008. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution an economic value. *Genetics and Molecular Research*. 1, 16-28.

Nelson P.E., Toussoun T.A. and Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Editor. P. 193.

Ngamo T.L.S., Tamgno B.R. and Gandebe M. 2016a. Bioactivity of flours of seeds of leguminous crops *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* used as botanical insecticides against *Sitophilus oryzae* Linnaeus (*Coleoptera*: Curculionidae) on sorghum grains. *International Journal of Biology and Chemistry Science*. 10, 919-927.

Ngome A.F., Amougou M.F.C., Tata I., Ndingend S.A., Mfopou M.Y.C., Mapiemfu L.D. and Njeudend T.S. 2013. Effects of cassava cultivation on soil quality indicators in the humid forest zone of Cameroon. *Greener Journal of Agricultural Sciences*. 6, 451-457.

Nguefack J., Leth V., Amvan Zollo P.H. and Mathur S.B. 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Microbiology*. 3, 329-334.

Njukwe E., Hanna R., Kirsch H. and Araki S. 2013. Farmer's perception and criteria for cassava variety preference in Cameroon. *African Study Monographs*. 4, 221-234.

Nyandieka H.S., Maina J.O. and nyamwange C. 2009. Désintoxication d'aflatoxines dans les cultures de maïs artificiellement contaminés par les procédures d'ammoniation. *Discovery and Innovation*. 21, 1-2.

Nyegue M.A. 2006. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun : évaluation de leurs activités antiradicalaires, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Thèse de doctorat des universités de Montpellier II et Yaoundé I. P.194.

Obidoa O. and Uzoka G.U. 1985. Inhibition of hepatic microsomal NADPH-cytochrome C (P450) reductase activity in gari-fed rats. *Plant for Human Nutrition*. 35, 63-72.

Obidoa A. and Obasi S.C. 1991. Coumarin compounds in cassava diets: 2 health implications of scopoletin in gari. *Plant for Human Nutrition*. 3, 283-289.

OCDE. 1979. Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la toxicologie à court et à long terme. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. OCDE, Paris. 4, 1-15.

OCDE. 2000. Guidance Document on Acute Oral Toxicity . Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24.

OCDE. 2008a. Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. OCDE, Paris. 4, 1-14.

OCDE. 2008b. Toxicité orale aiguë - Méthode de l'ajustement des doses. In *Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. OCDE, Paris. 4, 1-29.

Ogiehor I.S. and Ikenebomeh M.J. 2004. Antimicrobial effects of sodium benzoate on the growth, survival and aflatoxin production potential of some species of *Aspergillus* in gari during storage. *Pakistan Journal of Nutrition*. 3, 300-303.

Ojala T., Vuorela P., Kiviranta J., Vuorela H. and Hiltunen R. 1999. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Medica*. 8, 715–718. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14049>.

Ojewole J.A.O. and Adesina S.K. 1983, “Cardiovascular and neuromuscular actions of scopoletin from fruit of *Tetrapleura tetrapetra*,” *Planta Medica*. 2, 99-102.

Ojo R.T., Obi N.P., Akintayo C.O. and Adebayo-Gege. 2013. Evaluation of Cyanogen contents of cassava and cassava based food products in Karu, Nasarawa State, North-Central Nigeria. *Journal of Environmental Science Toxicology and Food Technology*. 6, 47-50.

Olaifa R.O., Adeyeni O.A., Oleyede S.T., Sogunle O.M., Agunbiade J.A. and Okunbajo A.O. 2015. Performance and carcass characteristics of broiler chickens fed graded levels of cassava peel meal based diets. *Malaysia Journal of Animal Science*. 2, 103-112.

OMS. 2012. Cyanogenic glycosides, In: Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva, Organisation Mondiale de la Santé, 74th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Food Additives Series 65).

Ononogbu I.C. 1988a. The effect of gari feeding on the changes in lipid levels and lipoprotein lipase activity in adipose tissue. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 4, 197-201.

Ononogbu I.C. 1988b. Effect of gari and cocoyam on plasma and liver cholesterol and fatty acid concentrations of rats. *Nigerian Journal of Nutrition Sciences*. 2, 92-106.

Orjiekwe C.L., Solola A., Iyen E. and Imade. 2013. Determination of Cyanogenic glycosides in Cassava products sold in Okada, Edo State, Nigeria. *African Journal of Food Science*. 7, 468-472.

Owiti J., Grossman J., Gehrig P., Dessimoz C., Laloi C. and Hansen M. 2011. iTRAQ-based analysis of changes in the cassava root proteome reveals pathways associated with post-harvest physiological deterioration. *The Plant Journal*. 1, 145-156.

Panda S. and Kar A. 2006. Evaluation of the antithyroid, antioxidative and antihyperglycemic activity of scopoletin from *Aegle marmelos* leaves in the hyperthyroid rats. *Phytotherapy Research*. 12, 1103-1105.

Park J.W., Choi S.Y., Hwang H.J. and Kim Y.B. 2005. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*. 103, 305-314.

Peterson S.W. 2006. Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* species, *Revista Iberoamericana de Micologia*. 23, 134-138.

Pfohl-Leskowicz A. 2001. Définition et origine des mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. *Tec & doc*. 3-14.

Pitt J.I. 1988. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology*. 65, 1135-1157.

PNDRT (Programme National de Développement des Racines et Tubercules). 2013. Rapport d'achèvement PNDRT, République du Cameroun. P. 32.

Qazi J.I. and Fayyaz Z. 2006. Aflatoxin contaminated foods and health risk perspective for Pakistani population. *Mycopathology*. 4, 27-34.

Rahimi E., Bonyadian M. and Kazemeini H. R. 2010. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. *Food Chemistry and Toxicology*. 48, 129-131.

Ramirez M., Chulze S. and Magan N. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxinivalenol production by two Argentinian strains of *F. graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*. 106, 291-296.

Rani A., Kumar P. and Shukla G. 2017. Pros and Cons of fungicides: An overview. *International Journal of Engineering Sciences and Research Technology*. 1, 112-117.

Raper K. and Fennell D. 1965. The genus *Aspergillus*. *Food Microbiology*. 5, 163-176.

Reboux G. 2006. Mycotoxines: effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie*. 46, 208-212.

Reddy K.R.N., Reddy C.S. and Muralidharan K. 2009. Potentiel des agents botaniques et de lutte biologique sur la croissance et la production d'aflatoxine par *Aspergillus flavus* infectant les grains de riz. *Food Control*. 20, 173-178

Reilly K., Gomez-Vasquez R., Buschman H., Tohme J. and Beeching R. 2004. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology*. 53, 669-685.

Reitman S. and Frankel S.A. 1957. Colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic acid, glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. 28, 56-58.

Reyes S.R., Quiroz V.R.I., Jimenez E.M., Navarro-ocana A. and Cassani J. 1997. Antifungal activity of selected plant secondary metabolites against *Coriolus versicolor*. *Journal of Tropical Forest Product*. 1, 110-113.

Rigalli A. and Verónica E.D.L. 2009. Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat. *International Standard Book*. 978, 4200-9326.

Rodriguez M.X., Buschmann H., Iglesias C. and Beeching J.R. 2000. "Production of antimicrobial compounds in cassava (*Manihot esculenta Crantz*) roots during post-harvest physiological deterioration," in Proceedings of the 4th International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network. Cassava Biotechnology, Carvalho LJB, Thro AM, and Vilarinho AD, Eds, Brazil. 320-328.

Roquebert M.F. 1998. Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”. Ed. Tec & Doc. 39-95.

Rosenthal D.M. and Ort D.R. 2012. Examining cassava's potential to enhance food security under climate change. *Tropical Plant Biology*. 1, 30-38.

Rosenthal E., Marty P., Ferrero C., Fichoux Y. and Cassuto J.P. 2000. Infection à *Penicillium marneffei* chez un patient infecté par le HIV. *Presse Médicale*. 29, 363-364.

Sakai T., Nakagawa Y., Uritani I. and Data E.S. 1986. Occurrence of various kinds of metabolites in physiologically and microbially damaged cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50, 2905-2907.

Salcedo A. and Siritunga D. 2011. Insights into the physiological biochemical and molecular basis of post-harvest deterioration in cassava (*Manihot esculenta*) roots. *American Journal of Experimental Agriculture*. 4, 414-431.

Sánchez T., Chávez A.L., Ceballos H., Rodriguez-Amaya D.B., Nestel P. and Ishitani M. 2006. Reduction or delay of post-harvest physiological deterioration in cassava roots with higher carotenoid content. *Journal of Science and Food Agriculture*. 4, 634-639.

Schmutterer H. 1990. Properties and potentials of natural pesticides from neem tree. *Annual Review Entomology*. 35, 271-298.

Scudamore K.A. 2008. Fate of fusarium mycotoxins in the cereal industry: Recent UK studies. *World Mycotoxin Journal*. 1, 315-323.

Séri S.G., Souleymane T. and Kouakou B. 2013. Assessment of cyanide content in cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) varieties and derived products from Senegal. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 5, 225-231.

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S. and Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. 2012, 1-26.

Shi L. 2016. The role of scopoletin in cassava post-harvest physiological deterioration. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy; *University of Bath*; Department of Biology and Biochemistry.

Shirasu K., Nakajima V.K., Dixon R.A. and Lamb C. 1997. Salicylic acid potentiates an agonistdependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*. 2, 261-270.

Silva W.P.K., Deraniyagala S.A., Wijesundera R.L., Karunanayake E.H. and Priyanka U.M. 2002. Isolation of scopoletin from leaves of *Hevea brasiliensis* and the effect of scopoletin on pathogens of *H. brasiliensis*. *Mycopathologia*. 4, 199-202.

Sreenivasa M.Y., Dass R.S. and Janaerdhana G.R. 2010. Survey of post-harvest fungi associated with sorghum grains produced in Karnataka (INDIA). *Journal of Plant Protection Research*. 3, 336-339.

Sseruwagi P., Sserubombwe W.S., Legg J.P., Ndunguru J. and Thresh J.M. 2004. Methods of surveying the incidence and severity of cassava mosaic disease and whitefly vector populations on cassava in Africa: A Review. *Virus Research*. 1, 129-142.

Stormer F.C., Sandven P., Huitfeldt H.S., Edward W. and Skogstad A. 1998. Does the mycotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from *Penicillium verrucosum*? *Mycopathologia*. 142, 43-47.

Sun H., Wang L., Zhang B., Ma J., Hettenhausen C., Cao G., Sun G., Wu J. and Wu J. 2014. Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany*. 65, 4305-4315.

Tamgno B.R. and Tinkeu L.S.N. 2018. Potentiel insecticide des formulations poudreuses à base des farines de graines de *Pisum sativum* et *Phaseolus vulgaris* avec la cendre de tiges de mil sur *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera : Curculionidae). *International Journal of Biology and Chemistry Science*. 1, 90-100.

Tan S. 1985. Selection for yield potential in cassava. In: Hershey ed. Cassava breeding: a multidisciplinary review. *Proceedings of a workshop held in the Philippines*. 7, 67-88.

Tanaka Y., Data E.S., Hirose E.S., Taniguchi T. and Uritani I. 1983. Biochemical changes during deterioration of cassava roots. In Tropical Root Crops, *Post harvest Physiological and Processing*, ed. BS. Uritani and E.D. Reyes. 79-81.

Temegne N.C., Ngome A.J. and Fotso K.A. 2015. Influence de la composition chimique du sol sur la teneur en éléments nutritifs et le rendement du manioc (*Manihot esculenta* Crantz, *Euphobiaceae*) dans deux zones agro-écologiques du Cameroun. *International Journal of Biological and Chemical Science*. 6, 2776-2788.

Teresa Valle J.L., Lopez J. and Hernandez M. 1997. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. *Plant Science*. 1, 97-101.

Thresh J.M. and Otim-Nape G.W. 1994. Strategies for controlling African cassava mosaic geminivirus. *Advances in Disease Vector Research*. 10, 251-236.

Toumno L.A., Kosh-Komba E., Semboli O., Zinga I., Touckia G.I., Nguerepande O., Konguere E., Semballaand S. and Ndjouenkeu R. 2017. Effect of Traditional and Improved Cassava Processing on Cassava Derivative Products in Central African Republic. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. 20, 1-11.

Tricoche B., David-Benz H. and Songo J.E. 2008. L'organisation de la filière manioc au Cameroun : des modes de coordination pour régir les incertitudes du marché. Atelier de Renforcement des Partenariats dans la Recherche Agronomique au Cameroun (REPARAC). Yaoundé Cameroun. P. 13.

Turner P.C., Sylla A., Gong Y.Y., Diallo M.S., Sutcliffe A.E., hall A.J., Wild C.P., Wu F. and Khlangwiset P. 2010. Impacts sur la santé économique et le rapport coût-efficacité Des stratégies de réduction de l'aflatoxine en Afrique: études de cas dans la lutte biologique et les interventions post-récolte. *Food Additives and Contaminants. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 27, 496-509.

Ubwa S.T., Otache M.A., Igbum G.O. and Shambe T. 2015. Determination of cyanide content in three sweet cassava cultivars in three Local Government Areas of Benue State, Nigeria. *Food Nutrient Science*. 6, 1078-1085.

Ulacio D., Perez C. and Pineda Y.J. 1997. Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state. *Venezuela. Bioagro*. 1, 3-11.

USAID/CORAF/SONGHAI. 2011. Manuel de formation - Transformation du manioc en gari et en farine panifiable de haute qualité en Afrique de l'Ouest, CORAF/WECARD, Dakar, Sénégal, P.40. <http://usaid.coraf.org/documents/manioc.pdf>.

Wang G.L, Tian J.G. and Chen D.C. 1997. Study on chemical composition of *Rubia cordifolia* L and *R. tinctorum*. II. Quantitative determination of alizarin and lucidin by reversed phase HPLC. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 4, 219-221.

Wareing P.W., Westby A., Gibbs J.A., Allotey T. and Halm M. 2001. Consumer preferences and fungal and mycotoxin contamination of dried cassava products from Ghana. *International Journal of Food Science and Technology*. 1, 1-10.

Wen-Chang C., Wu S.C., Xu K.D., Liao B.C., Wu J.F. and Cheng A.S. 2015. Scopoletin Protects against Methylglyoxal-Induced Hyperglycemia and Insulin Resistance Mediated by Suppression of Advanced Glycation Endproducts (AGEs) Generation and Anti-Glycation. *Molecules*. 20, 2786-2801.

Whyte J. 2012. Cassava: Lessons from investments since 2000. Document préparé pour la FAO. (mimeo). 2, 336-350.

Wilson D.M., Mubatanhema W. and Jurjevic Z. 2002. Biology and ecology of mycotoxigenic: *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Advance in Experimental. Medicine and Biology*. 504, 3-17.

Wititsuwannakul D., Chareonthiphakorn N., Pace M. and Wititsuwannakul R. 2002. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry*. 6, 115-121.

Wobeto C., Correa A.D., Abreu C.M.P., Santos C.D. and Abreu J.R. 2006. Nutrients in the cassava (*Manihot esculenta Cranz*) leaf meal at three ages of the plant. *Food Science and Technology*. 4, 865-869.

Wu Q., Wang M., Sciarappa W.J. and Simon J.E. 2004. LC/UV/ESI/MS Analysis of Isoflavones in Edamame and Tofu Soybeans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 2763-2769.

Xu J., Duan X., Yang J., Beeching J. R. and Zhang P. 2013. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. *Plant Physiology*. 161, 1517-1528.

Yang D. and Fu H. 2010. A simple and practical copper-catalyzed approach to substituted phenols from Aryl halides by using water as the solvent. *Chemistry; A European Journal*. 16, 2366-2370.

Yeoh H.H. and Sun F. 2001. Assessing cyanogen content in cassava-based food using the enzyme-dipstick method. *Food and Chemical Toxicology*. 7, 649-653.

Yiannikouris A. and Jouany J.P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review, *Animal Research*. INRA, EDP Sciences. 51, 81-99.

Younoussa D., Momar T.G., Mama S.P., Gbaguidi D., Amadou K., Jean P.B. and Georges L. 2013. Le Point sur: Importance nutritionnelle du manioc et perspectives pour l'alimentation de base au Sénégal. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 17, 634-643.

Zainuddin I.M., Fathoni A., Sudarmonowati E., Beeching J.R., Gruissem W. and Vanderschuren H. 2017. Cassava post-harvest physiological deterioration from triggers to symptoms. *Postharvest Biology and Technology*. 142, 115-123.

Zidenga T., Leyva-Guerrero E., Moon H., Siritunga D. and Sayre R.T. 2012. Extending cassava root shelf life via reduction of reactive oxygen species production. *Plant Physiology*. 159, 1396-1407.

Zidenga T., Siritunga D. and Sayre R.T. 2017. Cyanogen metabolism in cassava roots: impact on protein synthesis and root development. *Frontiers in Plant Science*. 8, 1-12

ANNEXES

Annexe 1 : Caractérisation des variétés de manioc étudiées (améliorées et locales)

Variétés	Institut d'origine	Caractérisation morphologique			Autres caractéristiques	Spécificités
		Pétiole	Tige	Peau et taille de la racine		
0110 	IRAD	Verte	Blanche	Blanche / longue	Résistance aux maladies, ramification tardive, variétés précoces, épluchage facile, durée de stockage en sol longue, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de consommation (feuilles, racines), teneur élevée en amidon, riche en caraténoïde, fer et zinc
961414 	IITTA	Verte	Blanche/verte	Blanche/ longue	Résistance aux maladies, fibreuses, ramification tardive, variétés précoces, tolérance à la sécheresse, floraison, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de transformation, (fabrication du gari) riche en caraténoïde, fer et zinc,
920326 	IITA	Rouge	Marron + traits verticaux	Blanche/ longue	Résistance aux maladies, ramification tardive, variétés précoces, foliation, tolérance à la sécheresse, floraison, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de transformation, teneur élevée en amidon riche en caraténoïde, fer et zinc,
Champion 	IRAD	Rouge	Marron+ petit traits	Blanche / courte	Résistance aux maladies, ramification tardive, variétés précoces, foliation, tolérance à la sécheresse, floraison, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de transformation, teneur élevée en amidon

Fonctionnaire 	IRAD	Rouge	Blanche/verte	Rouge /longe	Résistance aux maladies, ramification tardive, variétés précoces, foliation, tolérance à la sécheresse, floraison, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de consommation, teneur élevée en amidon
8034 	IRAD	Rouge	Violette	Blanche / longue	Résistance aux maladies, ramification rapide, variétés précoces, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de consommation / transformation, teneur élevée en amidon, riche en micronutriments
8017 	IRAD	Verte	Marrone	Blanche / longue	Résistance aux maladies, ramification rapide, variétés précoces, foliation, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de consommation/ transformation, teneur élevée en amidon, riche en micronutriment
8061 	IRAD	Verte	Marron+ petit traits	Rouge / longue	Résistance aux maladies, ramification rapide, variétés précoces, foliation, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de transformation, riche en caraténol, fer et zinc
040 	IITA	Verte	Marrone	Blanche / courte	Résistance aux maladies, ramification tardive, variétés précoces, foliation, tolérance à la sécheresse, floraison, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de transformation, riche en caraténol, fer et zinc
95109 	IITA	Verte	Marrone	Blanche / longue	Résistance aux maladies, ramification tardive, variétés précoces, foliation, tolérance à la sécheresse, floraison, rendement (35-45 tonnes/ha)	Améliorée de transformation, rendement élevé

<p>Pola rouge beul</p> 	Locale	Verte-jaunâtre	Blanche	Rouge / courte	Susceptibilité aux maladies, Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Consommation et transformation
<p>Madaga</p> 	Locale	Rouge	Marrone	Blanche / longue	Susceptibilité aux maladies, Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Transformation
<p>Mbida et Mbani</p> 	Locale	Verte	Marron + traits verticaux	Rouge / longues	Susceptibilité aux maladies, Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Transformation
<p>Tagne</p> 	Locale	Verte	Marrone	Blanche / courtes	Susceptibilité aux maladies Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Transformation
<p>Ngon ezele</p> 	Locale	Rouge pale	Blanche	Blanche / courtes	Susceptibilité aux maladies Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Consommation, transformation
<p>Man mbon</p> 	Locale	Rouge	Marrone	Blanche / courtes	Susceptibilité aux maladies Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Consommation/ transformation

<p>Macoumba</p> 	Locale	Rouge-verte (face-dos)	Blanche	Rouge / longues	Susceptibilité aux maladies, Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Consommation/ transformation
<p>Mindourou</p> 	Locale	Rouge	Blanche	Rouge / courtes	Susceptibilité aux maladies, Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Consommation/ transformation
<p>Owona Ekani</p> 	Locale	Verte	Marron	Rouge / courtes	Susceptibilité aux maladies, Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Consommation/ transformation
<p>Mnom Ewondo</p> 	Locale	Rouge-verte	Marron + traits verticaux	Blanche / courtes	Susceptibilité aux maladies Faible rendement (12-15 tonnes/ha)	Consommation transformation

Annexe 2 : Aire de séchage des produits de transformation du manioc (cossette, *fufu*, *gari*, entier, cortex)



Annexe 3 : Préparation du tampon phosphate 0,1M et pH 8

- Solution A (acide): $V_f = 250 \text{ mL}$
 - KH_2PO_4 : 3,4g
 - H_2O distillée qsp 250 mL
- Solution B (Basique): $V_f = 250 \text{ mL}$
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$: 8,96g
 - H_2O distillée qsp 250 mL

Titrer la solution B (Basique) par la solution A (Acide) jusqu'au pH 8.

Annexe 4 : Composition alimentaire d'aliment de rats

Mais.....	15 kg
Blé.....	2 kg
Poisson	2 kg
Soja.....	2 kg
Arachide.....	2 kg
Palmiste.....	1,5 kg
Os.....	0,5kg

Annexe 5 : Composition alimentaire des différents régimes de la volaille

Ingrédients	Aliment standard	Régime I	Régime II	Régime III
Maïs	62,91	62,91	62,91	62,91
Coque de palmiste	12,59	12,59	12,59	12,59
Son de blé	8,39	8,39	8,39	8,39
Poudre poisson	3,33	3,33	3,33	3,33
Soja	7,78	7,78	7,78	7,78
Farine d'os	4,00	4,00	4,00	4,00
Premix	0,50	0,50	0,50	0,50
Sel de table	0,50	0,50	0,50	0,50
Scopolétine (µg)	0	0,07 (2 mg de poudre)	0,14 (4 mg de poudre)	0,28 (8 mg de poudre)
Cyanure (µg)	0	2,8 (2 mg de poudre)	5,6 (4 mg de poudre)	11,2 (8 mg de poudre)

Annexe 6: Composition des milieux de culture

➤ Composition du Milieu Malt Extract Agar (MEA)

Extrait de malt	20 g
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 L

➤ Composition du Milieu Czapeck (Cz)

K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
NaNO ₃	3 g
Agar	15 g
Sucrose	30 g
Eau distillée	1 L

➤ Composition du Milieu Czapeck Yeast Extract Agar (CYA)

K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
NaNO ₃	3 g
Agar	15 g
Extrait de levure	5 g
Eau distillée	1 L

➤ Composition du Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Infusion de pomme	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 L

➤ Composition du bouillon nutritif

Peptone	5 g
Glucose	20 g
NaCl	5 g
Eau distillée	1 L

➤ Préparation des milieux

Les différents constituants de chaque milieu ont été pesés et introduits dans une fiole jaugée stérile d'un litre. Après homogénéisation, le volume a été complété jusqu' au trait de jauge avec de l'eau distillée et le mélange a été autoclavé à 121° C pendant 15 minutes.

Annexe 7 : Chromatogramme et spectre de masse du dosage de la scopolétine de référence et des différents échantillons de la variété de manioc améliorée A2 « 0110 » ayant favorisé une bonne accumulation de la scopolétine

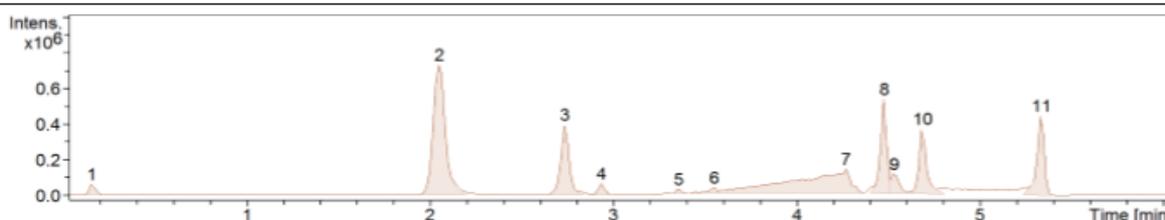
a) Standard scopolétine

Compound Spectrum List Report

Analysis Info
 Analysis Name: \\Compact-20125\lc-ms data\Dr Mounjouenpou\Data-Quanti-Scopol\Std-1ng_GA2_01_1205.d
 Method: MS Method HPLC.m
 Sample Name: Std-1ng
 Comment:
 Acquisition Date: 23/03/2018 12:09:29
 Operator: BDAL@DE
 Instrument: compact
 8255754.20125

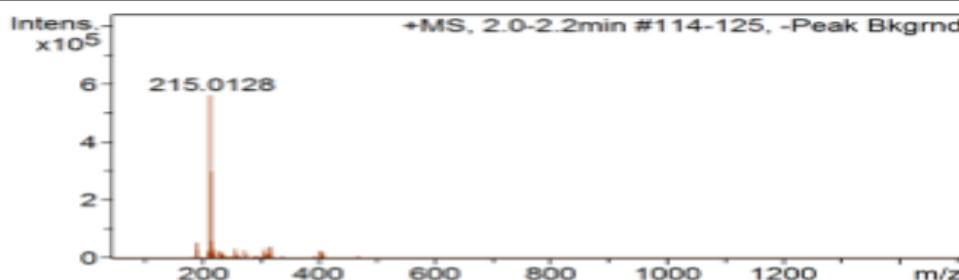
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.2 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Waste
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



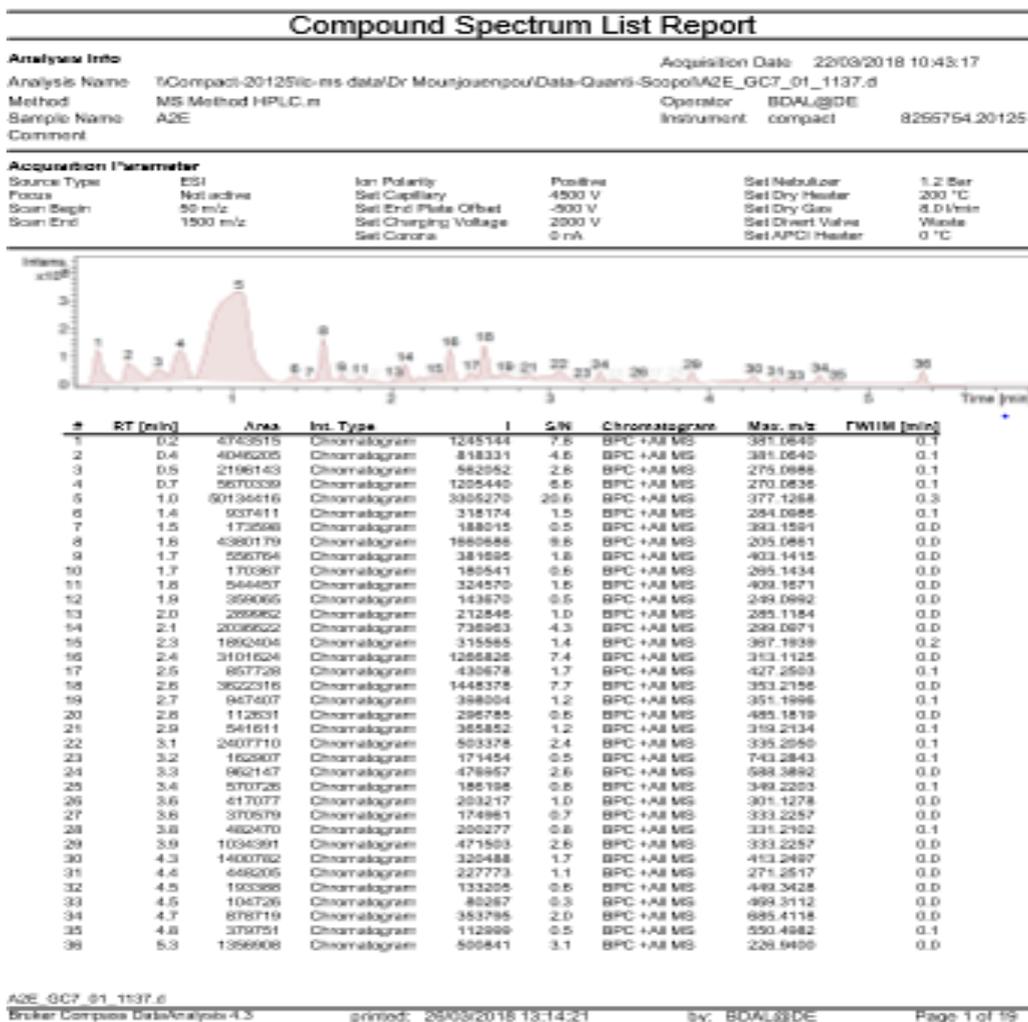
#	RT [min]	Area	Int. Type	I	S/N	Chromatogram	Max. m/z	FWHM [min]
1	0.2	139630	Chromatogram	66312	15.9	BPC +All MS	203.0343	0.0
2	2.1	3452218	Chromatogram	731708	201.7	BPC +All MS	215.0128	0.1
3	2.7	1260642	Chromatogram	397989	107.4	BPC +All MS	247.1585	0.0
4	2.9	155906	Chromatogram	69861	17.8	BPC +All MS	274.2534	0.0
5	3.4	43071	Chromatogram	39289	5.9	BPC +All MS	361.1728	0.0
6	3.5	96004	Chromatogram	48395	8.8	BPC +All MS	301.1184	0.0
7	4.3	2754324	Chromatogram	151607	37.6	BPC +All MS	434.2005	0.3
8	4.5	1247001	Chromatogram	538805	145.8	BPC +All MS	449.3304	0.0
9	4.5	345948	Chromatogram	124390	30.0	BPC +All MS	469.2975	0.1
10	4.7	1079311	Chromatogram	373743	98.1	BPC +All MS	685.3967	0.0
11	5.3	1267728	Chromatogram	446004	121.2	BPC +All MS	226.9323	0.0

Cmpd 2, 2.1 min

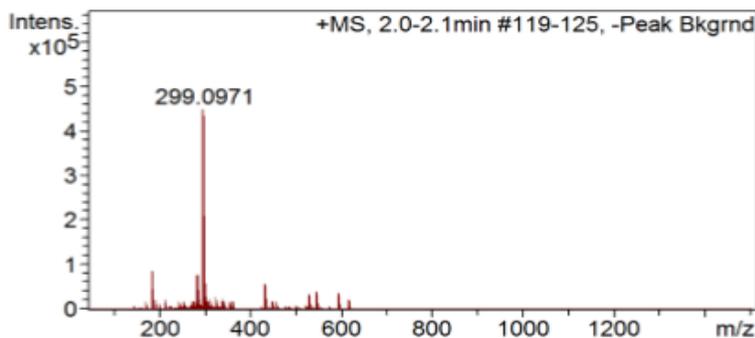


#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM
1	193.0314	10971	1728.3	56556	10.1	0.0176
2	215.0128	10334	14398.9	561290	100.0	0.0208
3	216.0160	11230	1622.4	63537	11.3	0.0192
4	221.0093	12192	553.2	22467	4.0	0.0181
5	230.0142	12273	487.7	21013	3.7	0.0187
6	233.0222	10970	500.1	21905	3.9	0.0212
7	258.0273	11780	402.7	19828	3.5	0.0219
8	308.0214	12051	344.0	20934	3.7	0.0256
9	317.0260	12205	658.7	41326	7.4	0.0260
10	404.0380	12220	298.3	22912	4.1	0.0331

b) Racine entière « A2E » (découpé en tranche sans enlever la peau)



Cmpd 14, 2.1 min



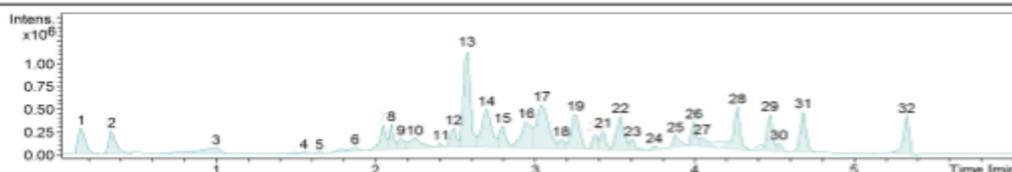
#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM
1	185.1042	10119	1948.7	88204	19.7	0.0183
2	285.1184	10647	939.3	79969	17.9	0.0268
3	287.0432	11299	266.6	22915	5.1	0.0254
4	299.0971	10346	4920.0	447858	100.0	0.0289
5	300.1002	10834	666.2	60878	13.6	0.0277
6	433.1878	11015	456.6	58227	13.0	0.0393
7	531.2221	11249	242.7	36045	8.0	0.0472
8	547.1949	10969	272.7	41224	9.2	0.0499
9	595.1451	10997	243.6	38408	8.6	0.0541
10	617.1262	11445	143.0	22941	5.1	0.0539

c) *Fufu* « A2F » (Parenchyme de manioc rouit et séché au soleil)

Compound Spectrum List Report

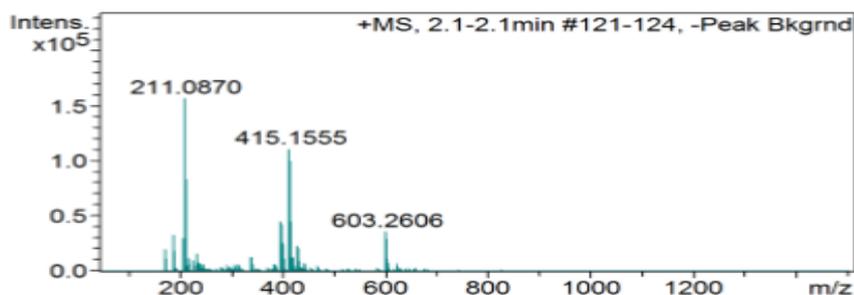
Analysis Info Acquisition Date 21/03/2018 14:31:00
 Analysis Name \\Compact-20125\lc-ms data\Dr Mounjouenpou\Data-Quant\Scopol\A2F_GC8_01_1091.d
 Method MS Method HPLC.m Operator BDAL@DE
 Sample Name A2F Instrument compact 8255754.20125
 Comment

Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 1.2 Bar
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 8.0 l/min
 Scan End 1500 m/z Set Charging Voltage 2000 V Set Divert Valve Waste
 Set Corona 0 nA Set APCI Heater 0 °C



#	RT [min]	Area	Int. Type	I	S/N	Chromatogram	Max. m/z	FWHM [min]
1	0.2	915094	Chromatogram	300905	5.9	BPC +All MS	221.0352	0.1
2	0.3	865211	Chromatogram	272695	5.2	BPC +All MS	205.0611	0.0
3	1.0	763627	Chromatogram	85626	1.5	BPC +All MS	377.1342	0.1
4	1.6	103566	Chromatogram	39410	0.5	BPC +All MS	391.1499	0.0
5	1.6	40443	Chromatogram	33752	0.3	BPC +All MS	223.0867	0.0
6	1.9	287861	Chromatogram	91096	0.9	BPC +All MS	271.1085	0.0
7	2.0	745586	Chromatogram	329725	5.6	BPC +All MS	285.1241	0.0
8	2.1	486401	Chromatogram	339580	5.7	BPC +All MS	211.0870	0.0
9	2.2	297455	Chromatogram	185875	2.3	BPC +All MS	269.1301	0.1
10	2.2	676532	Chromatogram	188989	2.3	BPC +All MS	195.0921	0.1
11	2.4	65646	Chromatogram	137738	1.1	BPC +All MS	249.1028	0.0
12	2.5	558693	Chromatogram	298117	4.3	BPC +All MS	427.2586	0.0
13	2.6	3177452	Chromatogram	1153523	21.5	BPC +All MS	353.2225	0.0
14	2.7	1887052	Chromatogram	503453	8.7	BPC +All MS	351.2070	0.1
15	2.8	669944	Chromatogram	321505	4.9	BPC +All MS	347.1756	0.0
16	2.9	1340043	Chromatogram	373086	5.9	BPC +All MS	335.2120	0.1
17	3.0	2539375	Chromatogram	553927	9.9	BPC +All MS	335.2120	0.1
18	3.2	242951	Chromatogram	174299	2.1	BPC +All MS	333.1971	0.1
19	3.3	1414813	Chromatogram	452925	7.5	BPC +All MS	333.1961	0.1
20	3.4	357224	Chromatogram	227633	3.3	BPC +All MS	703.3772	0.0
21	3.4	486272	Chromatogram	268191	4.0	BPC +All MS	703.3765	0.0
22	3.5	1237331	Chromatogram	425523	7.6	BPC +All MS	319.2167	0.1
23	3.6	314133	Chromatogram	175418	2.4	BPC +All MS	541.3253	0.0
24	3.7	94419	Chromatogram	103461	0.8	BPC +All MS	377.2582	0.0
25	3.9	373702	Chromatogram	222703	2.8	BPC +All MS	333.2326	0.0
26	4.0	551565	Chromatogram	369130	5.5	BPC +All MS	508.3156	0.0
27	4.0	354433	Chromatogram	197963	2.1	BPC +All MS	283.2565	0.0
28	4.3	1349492	Chromatogram	528108	9.5	BPC +All MS	413.2582	0.0
29	4.5	964358	Chromatogram	448057	8.2	BPC +All MS	449.3521	0.0
30	4.5	220163	Chromatogram	136535	1.9	BPC +All MS	469.3193	0.0
31	4.7	1139135	Chromatogram	480817	9.3	BPC +All MS	685.4267	0.0
32	5.3	1105376	Chromatogram	428737	8.7	BPC +All MS	226.9444	0.0

Cmpd 8, 2.1 min



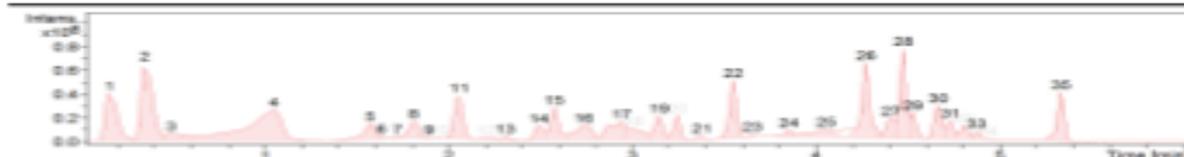
#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM
1	171.0946	11150	498.2	20364	13.0	0.0153
2	189.1051	10688	731.9	33583	21.4	0.0177
3	208.0786	11659	593.0	30593	19.5	0.0178
4	211.0870	10398	2971.9	156672	100.0	0.0203
5	399.1782	11042	460.2	45701	29.2	0.0362
6	401.1693	10582	269.8	26867	17.1	0.0379
7	415.1555	10810	1085.4	110629	70.6	0.0384
8	416.1583	11277	217.0	22153	14.1	0.0369
9	431.1281	11082	225.3	23437	15.0	0.0389
10	603.2606	11789	298.3	36481	23.3	0.0512

d) Gari « A2G » (gratage du parenchyme, fermentation sèche puis torrefaction)

Compound Spectrum List Report

Analysis Info Acquisition Date 23/03/2018 09:00:24
 Analysis Name T:\Compact-201251c-ms_data\Dr Mounjouenpou\Data-Quant-Scopol\A2G_GA4_01_1184.d
 Method MS Method HPLC.m Operator BDAL@DE
 Sample Name A2G Instrument compact 8255754.20125
 Comment

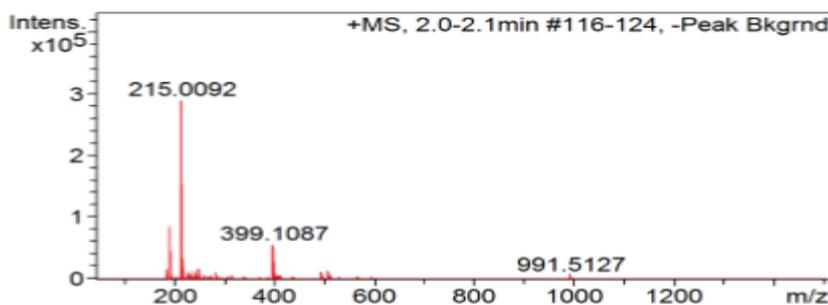
Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 1.2 Bar
 Poses Not active Set Capillary -4500 V Set Dry Heater 200 °C
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 8.0 l/min
 Scan End 1500 m/z Set Charging Voltage 2500 V Set Divergent Valve Waste
 Set Corona 0 nA Set APC Heater 0 °C



#	RT [min]	Area	Int. Type	I	S/N	Chromatogram	Max. m/z	FWHM [min]
1	0.2	1870222	Chromatogram	407673	8.4	BPC +AE MS	295.0462	0.1
2	0.3	2064694	Chromatogram	657948	13.0	BPC +AE MS	221.0194	0.1
3	0.5	494173	Chromatogram	72855	1.4	BPC +AE MS	247.0245	0.2
4	1.1	3676040	Chromatogram	273115	5.5	BPC +AE MS	377.1111	0.2
5	1.6	692268	Chromatogram	166010	2.7	BPC +AE MS	205.0763	0.1
6	1.6	42223	Chromatogram	53733	0.5	BPC +AE MS	285.1366	0.0
7	1.7	43272	Chromatogram	51256	0.4	BPC +AE MS	217.0745	0.0
8	1.8	595921	Chromatogram	176761	3.1	BPC +AE MS	277.0602	0.1
9	1.9	28360	Chromatogram	48879	0.3	BPC +AE MS	186.0223	0.0
10	1.9	12507	Chromatogram	44968	0.2	BPC +AE MS	387.0666	0.0
11	2.1	1167532	Chromatogram	362814	7.3	BPC +AE MS	215.0092	0.1
12	2.2	78609	Chromatogram	40062	0.4	BPC +AE MS	775.0270	0.1
13	2.3	91112	Chromatogram	53720	0.7	BPC +AE MS	333.1766	0.0
14	2.5	377539	Chromatogram	136655	2.5	BPC +AE MS	351.1839	0.1
15	2.6	891189	Chromatogram	291581	5.7	BPC +AE MS	353.2005	0.0
16	2.7	781116	Chromatogram	142045	2.6	BPC +AE MS	353.1999	0.1
17	2.9	881317	Chromatogram	177055	3.3	BPC +AE MS	335.1696	0.1
18	3.0	546901	Chromatogram	117138	2.1	BPC +AE MS	467.1576	0.1
19	3.1	654999	Chromatogram	222330	4.3	BPC +AE MS	315.1650	0.0
20	3.2	530713	Chromatogram	222713	4.3	BPC +AE MS	379.1960	0.0
21	3.4	80907	Chromatogram	55380	0.7	BPC +AE MS	321.2113	0.0
22	3.6	1283480	Chromatogram	515293	10.1	BPC +AE MS	381.1140	0.0
23	3.7	42189	Chromatogram	70399	0.5	BPC +AE MS	485.0754	0.0
24	3.9	135398	Chromatogram	104255	1.1	BPC +AE MS	589.0600	0.0
25	4.1	619276	Chromatogram	110231	1.5	BPC +AE MS	633.1053	0.1
26	4.3	1991544	Chromatogram	664967	13.3	BPC +AE MS	413.2330	0.0
27	4.4	622405	Chromatogram	200610	3.6	BPC +AE MS	441.2631	0.1
28	4.5	1716457	Chromatogram	780214	15.8	BPC +AE MS	449.3253	0.0
29	4.5	525319	Chromatogram	247432	4.6	BPC +AE MS	489.2552	0.0
30	4.7	789698	Chromatogram	305843	5.9	BPC +AE MS	610.1420	0.0
31	4.7	645264	Chromatogram	181710	3.3	BPC +AE MS	684.1671	0.1
32	4.8	340949	Chromatogram	141948	2.4	BPC +AE MS	758.1705	0.0
33	4.9	153521	Chromatogram	65813	1.5	BPC +AE MS	832.1666	0.0
34	4.9	16850	Chromatogram	34183	0.3	BPC +AE MS	998.2007	0.0
35	5.3	1115038	Chromatogram	418015	8.6	BPC +AE MS	226.0284	0.0

A2G_GA4_01_1184.d
 Broker Composite DataAnalysis-4.3
 printed: 25/03/2018 14:28:55
 by: BDAL@DE
 Page 1 of 15

Cmpd 11, 2.1 min



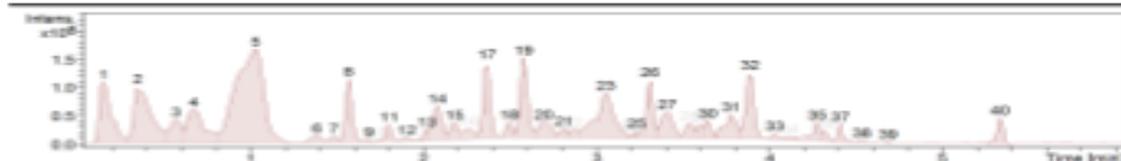
#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM
1	185.0943	10051	418.4	18173	6.3	0.0184
2	193.0281	10935	1853.6	86411	30.0	0.0177
3	215.0092	10471	5000.7	288224	100.0	0.0205
4	216.0120	11223	573.9	33371	11.6	0.0192
5	251.1379	10861	224.7	17246	6.0	0.0231
6	399.1087	11339	383.9	55444	19.2	0.0352
7	400.1113	11079	83.5	12116	4.2	0.0361
8	401.1229	10951	81.3	11827	4.1	0.0366
9	496.2581	13041	74.3	12623	4.4	0.0381
10	507.2479	12568	83.6	14372	5.0	0.0404

e) Cossette A2P (Parenchyme découpé en tranche puis séchage au soleil)

Compound Spectrum List Report

Analysis Info Acquisition Date 22/03/2018 08:05:20
 Analysis Name T:\Compact-20125\lc-ms data\Dr Mounjoenpou\Data-Quant-Scoop\A2P_GA3_01_1115.d
 Method MS Method HPLC.m Operator BDAL@DE
 Sample Name A2P Instrument compact 8255754.20125
 Comment

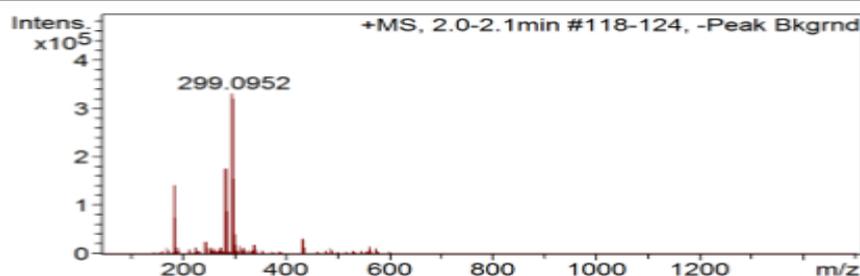
Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 1.2 Bar
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 8.0 l/min
 Scan End 1500 m/z Set Charging Voltage 2000 V Set Diverter Valve Waste
 Set Corona 0 mA Set APCD Heater 0 °C



#	RT [min]	Area	Int. Type	I	S/N	Chromatogram	Max. m/z	FWHM [min]
1	0.2	5308399	Chromatogram	1155212	6.6	BPC +A8 MS	381.0619	0.1
2	0.3	6972295	Chromatogram	1027782	6.0	BPC +A8 MS	381.0619	0.1
3	0.6	1971221	Chromatogram	448376	2.6	BPC +A8 MS	289.0744	0.1
4	0.7	4306515	Chromatogram	620119	3.7	BPC +A8 MS	270.0813	0.1
5	1.0	18932666	Chromatogram	1680182	16.3	BPC +A8 MS	377.1242	0.2
6	1.4	8586333	Chromatogram	185588	6.8	BPC +A8 MS	284.0862	0.1
7	1.5	3580992	Chromatogram	160651	6.8	BPC +A8 MS	343.1564	0.0
8	1.8	29534556	Chromatogram	1153138	7.0	BPC +A8 MS	205.0842	0.0
9	1.7	106855	Chromatogram	99854	0.3	BPC +A8 MS	403.1385	0.0
10	1.7	57044	Chromatogram	83390	0.2	BPC +A8 MS	439.1380	0.0
11	1.8	717401	Chromatogram	383789	1.9	BPC +A8 MS	409.1650	0.0
12	1.9	238324	Chromatogram	133940	0.4	BPC +A8 MS	257.1234	0.1
13	2.0	401582	Chromatogram	275214	1.3	BPC +A8 MS	285.1186	0.0
14	2.1	2279785	Chromatogram	822218	3.8	BPC +A8 MS	289.0852	0.1
15	2.2	1019941	Chromatogram	396970	1.6	BPC +A8 MS	299.1228	0.1
16	2.3	759675	Chromatogram	282578	1.1	BPC +A8 MS	195.0864	0.1
17	2.4	3793464	Chromatogram	1481260	7.9	BPC +A8 MS	313.1191	0.0
18	2.5	7143258	Chromatogram	400169	1.8	BPC +A8 MS	427.2479	0.0
19	2.6	6174200	Chromatogram	1531301	8.9	BPC +A8 MS	353.2133	0.0
20	2.7	1437735	Chromatogram	400862	1.8	BPC +A8 MS	351.1876	0.1
21	2.8	473630	Chromatogram	287362	1.0	BPC +A8 MS	485.1797	0.1
22	2.9	889427	Chromatogram	272339	1.0	BPC +A8 MS	387.2288	0.1
23	3.1	8844133	Chromatogram	911559	5.0	BPC +A8 MS	335.2029	0.1
24	3.2	126182	Chromatogram	199320	0.6	BPC +A8 MS	743.2825	0.0
25	3.2	192881	Chromatogram	246296	0.8	BPC +A8 MS	574.3706	0.0
26	3.3	2816616	Chromatogram	1142819	6.3	BPC +A8 MS	688.3870	0.0
27	3.4	2368880	Chromatogram	580763	2.9	BPC +A8 MS	349.2186	0.1
28	3.5	908658	Chromatogram	385786	1.8	BPC +A8 MS	319.2685	0.1
29	3.6	637084	Chromatogram	352826	1.5	BPC +A8 MS	347.2625	0.1
30	3.6	777716	Chromatogram	424762	2.0	BPC +A8 MS	333.2237	0.0
31	3.8	20864851	Chromatogram	833039	3.7	BPC +A8 MS	331.2680	0.1
32	3.9	3984185	Chromatogram	1277120	7.0	BPC +A8 MS	333.2240	0.1
33	4.0	323624	Chromatogram	201678	0.7	BPC +A8 MS	335.2394	0.0
34	4.1	163863	Chromatogram	153049	0.4	BPC +A8 MS	315.2128	0.0
35	4.3	872174	Chromatogram	386721	2.1	BPC +A8 MS	413.2473	0.0
36	4.3	387914	Chromatogram	244038	1.2	BPC +A8 MS	409.3381	0.0
37	4.4	604686	Chromatogram	386438	2.0	BPC +A8 MS	271.2494	0.0

ASP_GA3_01_1115.d
 Broker Composite DataAnalysis-4.3 printed: 28/03/2018 16:59:58 by: BDAL@DE Page 1 of 21

Cmpd 14, 2.1 min



#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM
1	185.1026	10184	3355.1	141653	42.8	0.0182
2	227.1141	10880	244.5	14554	4.4	0.0209
3	245.1252	10459	390.5	25690	7.8	0.0234
4	277.1129	10991	181.5	14169	4.3	0.0252
5	285.1167	10483	2162.1	175339	53.0	0.0272
6	286.1204	10972	283.4	23095	7.0	0.0261
7	299.0952	10538	3847.8	330955	100.0	0.0284
8	300.0983	11019	499.8	43161	13.0	0.0272
9	341.1411	11184	210.3	20726	6.3	0.0305
10	433.1856	11371	263.4	31854	9.6	0.0381

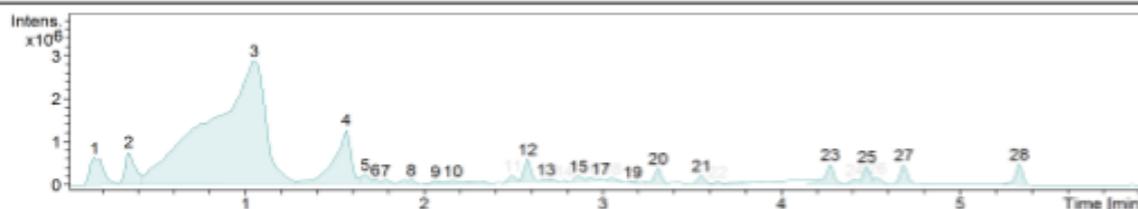
f) Peau de la racine de manioc « A2Pe »

Compound Spectrum List Report

Analysis Info		Acquisition Date	22/03/2018 13:21:02	
Analysis Name	\\Compact-20125\lc-ms data\Dr Mounjouenpou\Data-Quanti-Scopol\A2Pe_GA4_01_1159.d			
Method	MS Method HPLC.m	Operator	BDAL@DE	
Sample Name	A2Pe	Instrument	compact	8255754.20125
Comment				

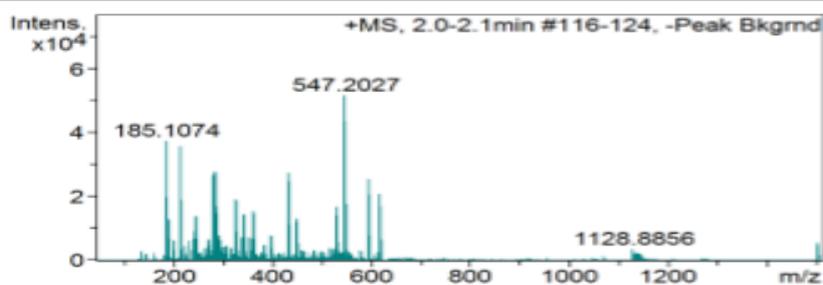
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.2 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Waste
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



#	RT [min]	Area	Int. Type	I	S/N	Chromatogram	Max. m/z	FWHM [min]
1	0.2	3388535	Chromatogram	645040	8.7	BPC +All MS	266.1527	0.1
2	0.4	3069258	Chromatogram	785628	10.0	BPC +All MS	393.1058	0.1
3	1.1	62276316	Chromatogram	2874647	39.1	BPC +All MS	377.1320	0.3
4	1.6	8373406	Chromatogram	1284029	17.0	BPC +All MS	391.1477	0.1
5	1.7	683089	Chromatogram	255976	3.0	BPC +All MS	403.1476	0.1
6	1.7	250182	Chromatogram	139042	1.4	BPC +All MS	285.1474	0.0
7	1.8	241991	Chromatogram	124157	1.1	BPC +All MS	409.1728	0.0
8	1.9	433052	Chromatogram	132915	1.4	BPC +All MS	431.1790	0.1
9	2.1	317573	Chromatogram	104095	1.0	BPC +All MS	547.2027	0.1
10	2.2	676935	Chromatogram	111516	1.0	BPC +All MS	367.1991	0.2
11	2.5	486011	Chromatogram	233220	2.4	BPC +All MS	427.2564	0.0
12	2.6	1399166	Chromatogram	609927	7.3	BPC +All MS	353.2210	0.0
13	2.7	227933	Chromatogram	144433	0.7	BPC +All MS	351.2052	0.1
14	2.8	45749	Chromatogram	115297	0.5	BPC +All MS	343.2160	0.0
15	2.9	408460	Chromatogram	225302	1.9	BPC +All MS	341.2001	0.1
16	2.9	243163	Chromatogram	173931	1.1	BPC +All MS	409.2460	0.1
17	3.0	72961	Chromatogram	163067	0.9	BPC +All MS	343.2154	0.0
18	3.0	303824	Chromatogram	162338	0.9	BPC +All MS	335.2099	0.1
19	3.2	133816	Chromatogram	93279	0.5	BPC +All MS	393.2510	0.1
20	3.3	939982	Chromatogram	399462	4.9	BPC +All MS	588.3975	0.0
21	3.6	574586	Chromatogram	236220	2.9	BPC +All MS	301.1328	0.0
22	3.8	222766	Chromatogram	87568	0.8	BPC +All MS	333.2313	0.0
23	4.3	1581208	Chromatogram	482014	6.2	BPC +All MS	413.2562	0.0
24	4.4	348831	Chromatogram	137614	1.5	BPC +All MS	441.2876	0.1
25	4.5	989900	Chromatogram	440483	5.6	BPC +All MS	449.3498	0.0
26	4.5	416969	Chromatogram	173608	1.9	BPC +All MS	469.3173	0.1
27	4.7	1198713	Chromatogram	471841	5.9	BPC +All MS	685.4221	0.0
28	5.3	1348307	Chromatogram	495455	6.6	BPC +All MS	226.9445	0.0

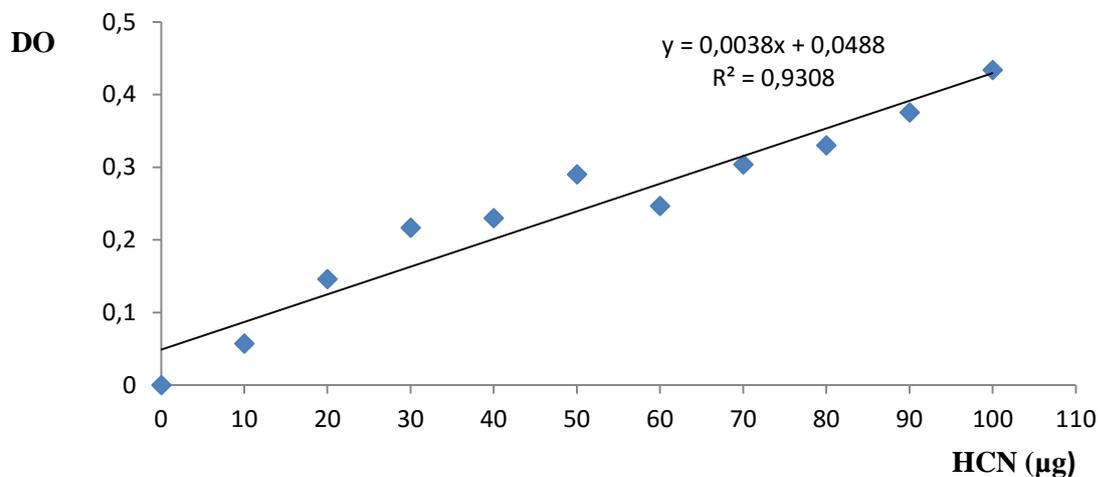
Cmpd 9, 2.1 min



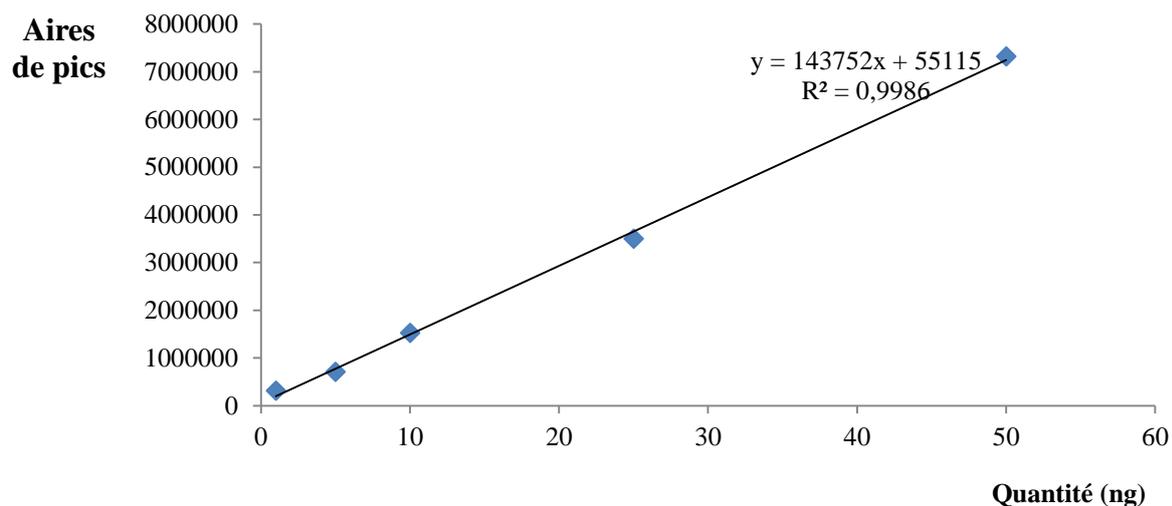
#	m/z	Res.	S/N	I	I %	FWHM
1	185.1074	10931	1193.2	37216	72.2	0.0169
2	215.0240	10897	895.1	35663	69.2	0.0197
3	282.0862	12616	464.5	26818	52.0	0.0224
4	285.1234	11110	474.1	27707	53.7	0.0257
5	327.1500	11203	280.9	19314	37.5	0.0292
6	433.1945	11328	310.9	27510	53.4	0.0382
7	531.2286	10721	168.9	16992	33.0	0.0495
8	547.2027	11346	503.1	51549	100.0	0.0482
9	595.1542	10993	237.8	25360	49.2	0.0541
10	617.1354	11483	193.5	20920	40.6	0.0537

Annexe 8 : Courbes d'étalonnages des différents dosages

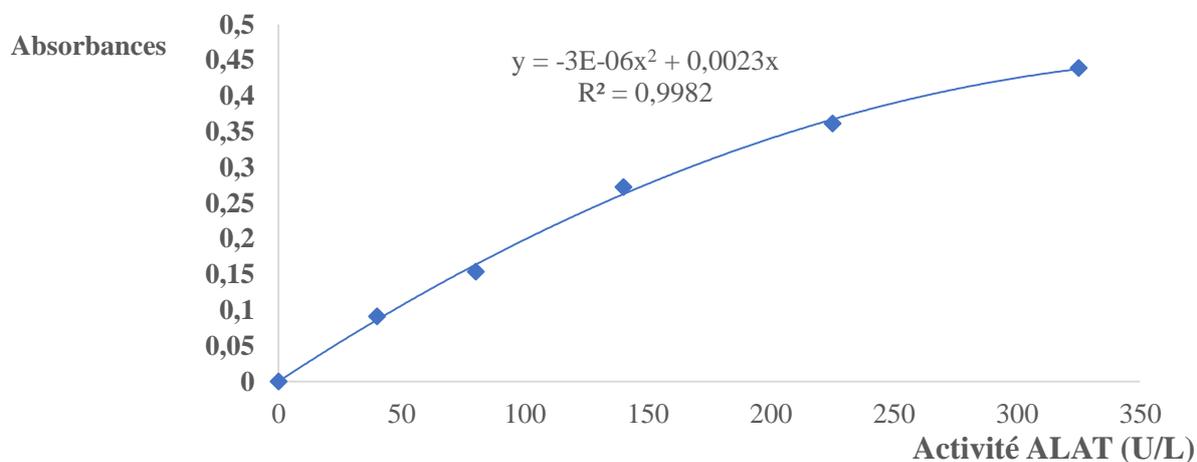
a) Dosages du HCN $f(\text{HCN})=D$



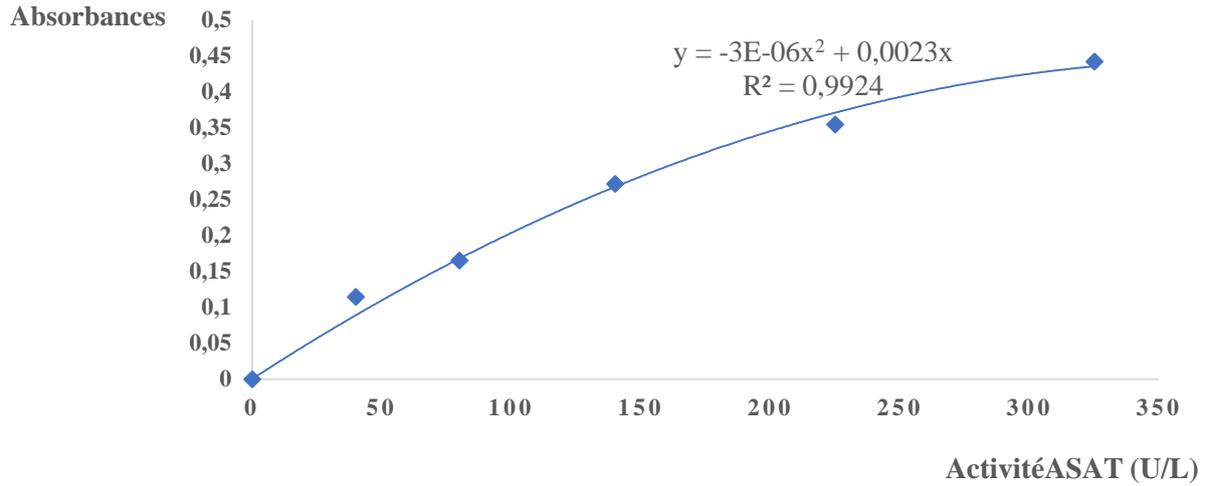
b) Dosage de la scopolétine $f(\text{scopolétine})= \text{aire de pic}$



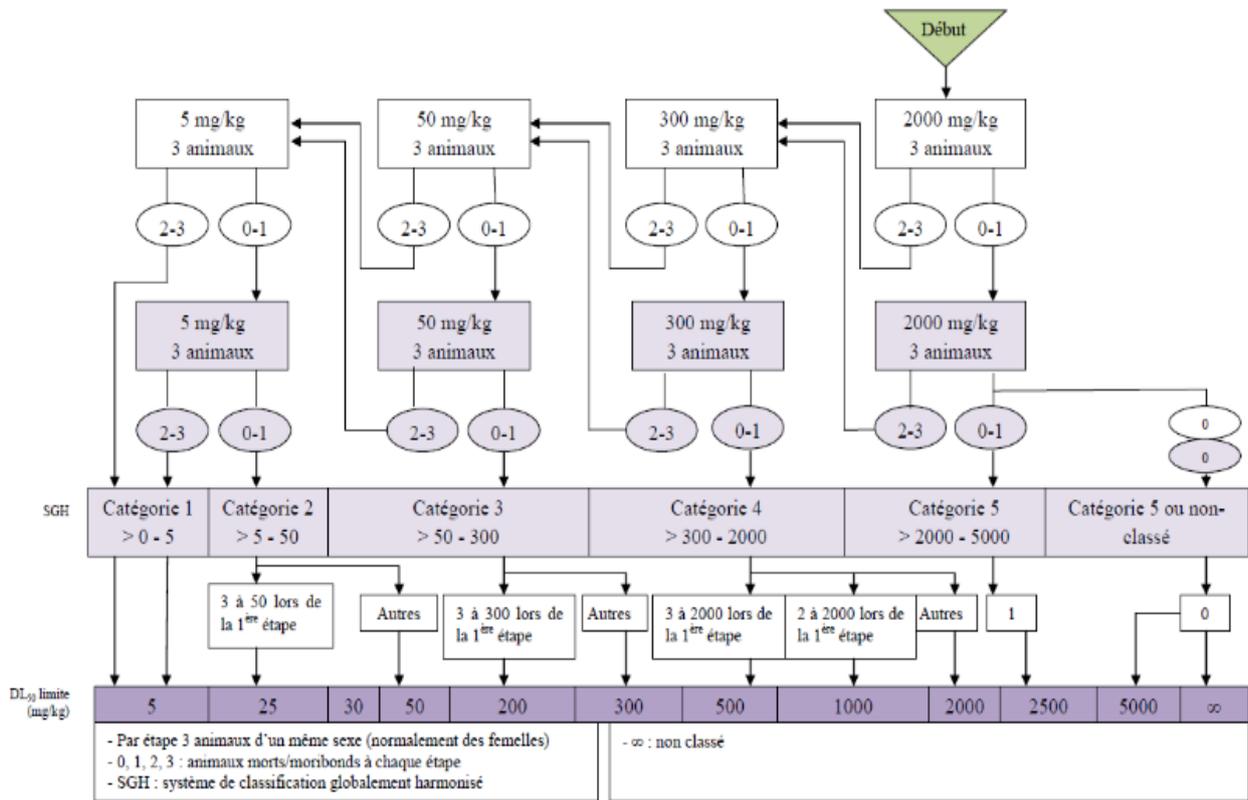
c) Dosage ALAT (Alanine Amino Transférase)



a) Dosage ASAT (Aspartate Amino Transférase)



Annexe 9 : Shéma d'essai avec une dose limite de 2000 mg/kg



ANNEXE: SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 2000 MG/KG (OCDE, 2001b)

Annexe 10 : Quelques variétés de maïs améliorées disponibles au Cameroun

Zones agro-écologiques	Composites			Hybrides		
	Variété	Couleur	Cycle (jour)	Variété	Couleur	Cycle
Zone forestière à deux saisons des pluies (centre, Sud, Est)	CMS 8704	Jaune	110-120	CHH 105	Blanche	110-120
	CMS 8501	Blanche	110-120	CHH 101	J/B	-/-
	CMS 9015	Blanche	100-105	CLM103	Blanche	-/-
	CMS 8806	jaune	90-95	CLM107	Blanche	-/-
				CLM 105	Blanche	-/-
Zone forestière à une saison des pluies (littoral, partie du Sud-Ouest)	CMS 8704	Jaune	110-120	CHH 105	Blanche	110-120
	CMS 8501	Blanche	110-120	CHH 101	J/B	-/-
	CMS 9015	Blanche	100-105	CLM103	Blanche	-/-
	CMS 8806	jaune	90-95	CLM107	Blanche	-/-
				CLM 105	Blanche	-/-
Zone des hauts plateaux de l'Ouest (Ouest, Nord-ouest, partie du Sud-ouest)	CHC 201	Blanche	130-130	CHH 105	Blanche	110-120
	CHC 202	Jaune	110-120	CHH 101	J/B	110-120
	CHC 205	Blanche	105-110	CHH 108	J/B	110-120
Zone sahélienne (soudano-guinéenne et guinéenne)	CMS 8704	Jaune		CHH 105	Blanche	110-120
	CMS 8501	Blanche		CLM 107	Blanche	110-120
	CMS 9015	Blanche				
	CMS 8806	Jaune		STR		
	TZEE-W	Blanche				

Liste de publications issues de la thèse

Les résultats obtenus dans cette thèse ont déjà permis la rédaction et la publication de deux articles scientifiques dans les journaux à comité de lecture, un troisième étant en cours de rédaction :

1: **Njankouo Ndam** Y, Mounjouenpou P, Kansci G, Kenfack MJ, Meguia MPF, Ngonon ENSN, Akhobakoh M, Nyegue MA. 2019. Influence of cultivars and processing methods on the cyanide contents of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its traditional food product. *Scientific African*, 05(2019) e0019.

2: **Njankouo NY**, Nyegue MA, Mounjouenpou P, Kansci G, Kenfack MJ, Ehebe EE. 2020. LC-MS quantification of scopoletin in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties, local derived foods, and activity on some food spoilage fungi. *Journal of Food Process Preservation*. 2020; 00: e14387. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14387>.