

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES  
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**UTILISATION D'ACTINOMYCETES EN BIOCONTROLES DE L'AFLATOXINE B1 PRODUITE PAR  
*ASPERGILLUS FLAVUS* SUR EPIS DE MAÏS EN SERRE**

D. CARON <sup>(1)</sup>, P. ANSON <sup>(2)</sup>, P. JARA <sup>(3)</sup>, C. VERHEECKE <sup>(2)</sup>, et F. MATHIEU <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Diagnophyt : [d.caron@diagnophyt.fr](mailto:d.caron@diagnophyt.fr) France

<sup>(2)</sup> Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503 CNRS/INPT/UPS, INP-ENSAT, 1,  
avenue de l'Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan, France : [mathieu@ensat.fr](mailto:mathieu@ensat.fr) France

<sup>(3)</sup> Sanofi, détaché auprès de Diagnophyt

**RÉSUMÉ**

L'aflatoxine B1 (AFB1) est une mycotoxine hépatotoxique, génotoxique, immunodépressive et cancérogène. Le réchauffement climatique fait évoluer la zone d'extension d'*A. flavus*, producteur de cette toxine, sur les épis de maïs en végétation. La présence d'aflatoxines dans l'alimentation devient préoccupante. Les pesticides de synthèses sont polluants et difficiles à appliquer sur épis. La lutte biologique est une alternative utile à mettre au point. Nous avons sélectionné des souches d'actinomycètes pour servir d'agents de biocontrôle et nous avons effectué des inoculations artificielles sur épis 17 jours après floraison. Le bioagresseur *A. flavus* a été inoculé selon 2 modalités : conjointement le même jour ou ultérieurement à l'actinomycète, 7 jours plus tard. Il produit une contamination moyenne en AFB1 de 63 ng/grain inoculé. Dans les 2 cas, une des souches testée a permis d'obtenir une diminution très significative de l'AFB1 de 50 %. Ces premiers résultats nous encouragent à sélectionner d'autres souches encore plus efficaces et à envisager l'expérimentation au champ.

Mots-clés : biocontrôle, aflatoxine B1, *Aspergillus flavus*, actinomycète, *Zea mays*.

**ABSTRACT:**

**USE OF ACTINOMYCETES AS BIOCONTROLS AGAINST AFLATOXIN B1 PRODUCED BY *ASPERGILLUS FLAVUS* ON MAIZE COB IN GREENHOUSE**

The aflatoxin B1 (AFB1) is an hepatotoxic, genotoxic, immunosuppressive and carcinogenic mycotoxin. Global warming is changing the extension area of *A. flavus*, producer of this toxin on maize cob during vegetation. Presence of aflatoxins in the diet becomes alarming. Chemical pesticides are polluting and difficult to apply on ears. Biological control is a useful alternative. We selected actinomycetes strains to use as biocontrol agents. We carried out artificial inoculations of these actinomycete strains on cobs 17 days after flowering. The bioaggressor *A. flavus* was inoculated with 2 modalities: jointly the same day or 7 days later than the actinomycete. It produces an average contamination of AFB1 of 63 ng/inoculated kernel. In these two modalities, one of our strains got a very significant AFB1 decrease of 50%. These promising results encourage us to continue the selection of efficient strains and to consider field experiments.

Keywords: biocontrol, aflatoxin B1, *Aspergillus flavus*, actinomycete, *Zea mays*.

## INTRODUCTION

Les mycotoxines produites par les moisissures dans les aliments sont à l'origine depuis des temps très anciens de problèmes de sécurité sanitaire dégradant la santé et conduisant parfois à la mort. Les technologies modernes permettent les analyses des toxines et leur mise en relation avec les symptômes. Elles ont abouti à établir les niveaux d'exposition maximales tolérées et les normes réglementaires dans les denrées alimentaires (AFSSA 2009 ; Règlement CE No 1881/2006 ; Directive 2002/32/CE). Le réchauffement climatique risque d'augmenter encore cette contamination alimentaire (Battilani *et al.* 2012). Certains de nos pays voisins subissent déjà cette hausse. Par exemple, les cultures de maïs en Italie sont depuis les années 2000, fréquemment atteints sur les épis au champ par *Aspergillus flavus* producteur d'aflatoxines B1 et B2 (Giorni *et al.* 2007 ; Battilani *et al.* 2008). Parmi ces dernières, l'aflatoxine B1 est hépatotoxique, génotoxique, immunodépressive et surtout classée cancérigène par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC/IARC) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS/WHO) dès 1993 (IARC/CIRC 1993 ; 2015). Cette toxine, une fois métabolisée par la vache se retrouve dans le lait sous forme d'aflatoxine M1. Récemment, le scandale du lait contaminé dans les Balkans en 2013 concrétise la gravité du problème (Van Egmond 2013 ; de Jong *et al.* 2013). Il a conduit la Serbie dans l'urgence, le 28 février 2013, afin de limiter les destructions de lait, à remonter unilatéralement sa norme réglementaire en aflatoxine M1 de 0,05 µg/L à 0,5 µg/L, réduisant ainsi très fortement ses exportations vers l'Union Européenne.

Pour lutter contre ces contaminations en toxines, il est nécessaire de prévenir leurs productions dès le champ. Il faudrait agir contre les champignons mycotoxinogènes sur maïs. Pour cela nous pourrions utiliser les fongicides de synthèse mais les pollutions engendrées par ces produits les soumettent aux recommandations du projet gouvernemental « Écophyto » retranscrivant la directive 2009/128/CE (Ministère de l'Agriculture 2015) et prônant avec force après l'échec de 2018, une diminution des pesticides de 50 % d'ici 2025. De plus, il n'y a pas de matériel agricole pour projeter ces produits sur les épis, bien couverts au sein d'une végétation dense de plus de 2 m de haut.

Le biocontrôle ou lutte biologique consiste à utiliser des agents biologiques antagonistes des maladies, ravageurs et adventices des plantes ou des denrées stockées pour les protéger. Le concept est aussi ancien que l'utilisation du chat contre les souris. Le plus médiatisé actuellement est le lâcher de coccinelles contre les pucerons. Le biocontrôle présente l'avantage de diminuer ou d'éliminer l'usage de pesticides polluants conformément à la volonté de la communauté et des gouvernements. Bien qu'ancien le concept est en forte évolution technologique depuis la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle et intègre les microorganismes et leurs interactions (Herth *et al.* 2011). L'*A. flavus* lui-même fait l'objet d'application au champ par compétition avec épandage de souches non productrices d'aflatoxines (Abbas *et al.* 2001). D'autres microorganismes sont aussi étudiés ou utilisés comme la levure *Pichia anomala* contre l'AFB1 (Hua 2013).

C'est dans cet objectif que nous avons proposé le Projet AFLAFREE à l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Il consiste à inhiber la production d'aflatoxine B1 par la moisissure *Aspergillus flavus* (champignon microscopique) en utilisant les propriétés antagonistes des actinomycètes contre la production de la toxine. Ces bactéries filamenteuses produisent d'innombrables métabolites secondaires parfois caractéristiques des genres, des espèces, ou particuliers à la souche individuelle. Ces propriétés font de chaque souche un instrument qui (si nous apprenons à bien le manier) permet une lutte propre vers la qualité sanitaire des produits alimentaires (Shams-Ghahfarokhi *et al.* 2013). Nous avons au laboratoire (LGC : Laboratoire de Génie Chimique, Département BioSyM : Bioprocédés et Systèmes Microbiens) une souchothèque parmi laquelle nous avons sélectionné *in vitro* des actinomycètes pour une réduction de la production d'AFB1 et d'AFB2 (Verheecke *et al.* 2014). Nous n'avons pas retenu les souches qui en plus de la réduction en aflatoxines inhibaient aussi la croissance mycélienne. De cette façon, nous évitons de perturber artificiellement l'équilibre de la niche écologique de l'épi qui pourrait se déplacer vers d'autres parasites préjudiciables. Parmi cette sélection, nous avons choisi les quelques souches qui permettent la réduction la plus importante *in vitro*. Nous les avons appliquées directement sur les épis de maïs cultivés en serre. Pour une de ces souches (S22) nous avons obtenu une réduction significative de la présence

d'aflatoxines. Les résultats obtenus avec cette souche seront exposés ci-dessous, les autres souches n'ayant pas produit de différences.

## MATERIEL ET MÉTHODE

### MATERIEL VEGETAL : LE MAÏS

Le choix de la variété n'a pas pu se faire sur les sensibilités et résistances variétales à *A. flavus*, ces tests ne se pratiquant pas encore en France, la maladie n'y étant pas assez fréquente.

Nous avons choisi Es Flato, une variété ½ précoce dentée inscrite au catalogue français en 2009. Elle est suffisamment régulière et productive pour avoir été adoptée par Arvalis - institut du végétal parmi les variétés de référence de ses essais en 2014 et 2015. Bonne vigueur au démarrage, peu sensible à la verse, mais sensible aux fusarioses de l'épi, moyennement sensible à l'helminthosporiose (Arvalis 2014). Mise à germer en phytotron à l'obscurité à 30°C le 28 mai 2014, les plantules les plus vigoureuses sont repiquées en serre 7 jours plus tard. Chaque plante est repiquée dans un pot de 26 cm de diamètre contenant 11 L d'un mélange 50/50 de terreau neutre non amendé et de terre argilo-calcaire. Un arrosage automatique journalier est réalisé par goutte à goutte créant une réserve d'eau permanente conduisant à une absence de stress hydrique. Le stade mi-floraison est atteint le 26 juillet. La pollinisation manuelle au pinceau est effectuée après récupération du pollen à l'aspirateur et appliquée sur les soies immédiatement après, le 31 juillet (5 jours après floraison). La récolte a lieu 48 jours après pollinisation à 22 % d'humidité des grains.

Amendement NPK 10-10-10 à 2 fois la dose normale en azote, réalisé en 3 apports en suspension aqueuse. Amendement en oligoéléments : Ferticament, 2 apports de 152 mg/plante en suspension aqueuse.

### MICROORGANISMES :

#### *Aspergillus flavus* :

La souche d'*A. flavus* utilisée (AFc5) est fortement productrice d'AFB1. Elle est fournie par le Laboratoire INRA Toxalim (Adjovi *et al.* 2014) dans le cadre des partenariats de l'action ANR AFLAFREE. La croissance et la production de spores pour l'inoculum ont été effectuées à l'obscurité sur milieu PDA à 28°C.

#### L'actinomycète :

La souche S22 utilisée dans cet essai présente un antagonisme de contact avec la souche d'*A. flavus* NRRL 62477 utilisée lors des tests *in vitro*. Elle y réduit de 84 % la présence d'AFB1 pour seulement 30 % de réduction de croissance (Verheecke *et al.* 2014). La croissance et la production de spores pour l'inoculum ont été effectuées à l'obscurité sur milieu ISP2 à 28°C.

### INOCULATIONS :

Après 2 semaines de croissance sur leurs milieux respectifs, les spores des 2 microorganismes sont prélevées sous hotte stérile à l'aide de 10 mL d'eau additionnée de 0,2 % de Tween 20. Les spores sont dénombrées à l'aide d'une cellule de numération de Thoma.

Évaluation de la germination des spores : après dilution à 10<sup>2</sup> spores/mL, 1 mL est ensemencé sur les milieux respectifs PDA et ISP2 où pratiquement la totalité des spores produisent des colonies.

Pour réaliser les inoculations, les concentrations sont ajustées pour injection à 5.10<sup>7</sup> spores/mL pour l'actinomycète et à 5.10<sup>6</sup> spores/mL pour *A. flavus*.

Les inoculations sont réalisées avec 0,2 mL de suspension de spores par piqûres sur le côté de l'épi à travers les spathes. Les piqûres des grains sont effectuées à 2 mm de profondeur maximale à l'aide d'un inoculateur composé de 8 aiguilles disposées à la périphérie d'une couronne de 1,5 cm de diamètre, montée sur une seringue à remplissage automatique.

Les inoculums sont injectés soit séparément ou ensemble selon le protocole :

- Témoin : injection d'eau stérile.
- *A. flavus* seul.
- Actinomycète seul.
- Actinomycète + *A. flavus* ensemble, ratio spores 10/1.
- Actinomycète puis *A. flavus* 1 semaine après, ratio spores 10/1.

Les inoculations ont eu lieu 12 jours après la pollinisation, le 12 août. Pour l'*A. flavus* inoculé en différé, l'inoculation a eu lieu 7 jours plus tard le 19 août sur les mêmes piqûres que la première fois avec l'actinomycète, repérées par une marque sur les spathes.

#### ANALYSES D'AFLATOXINES :

Après récolte, les grains piqués ont été prélevés. Ils ont subi un séchage partiel non destructeur des aflatoxines de 72 h à 60°C pour pouvoir être broyés. Le broyage est effectué dans un broyeur à bille d'acier de 2 fois 30 s de façon à obtenir une réduction en poudre fine pour un diamètre de 0,1 mm.

Les extractions et concentrations en aflatoxines ont été effectuées sur les broyats par colonnes d'immunoaffinité Aflaprep (R-Biopharm). Les aflatoxines sont récupérées dans un mélange méthanol:eau 50:50.

L'analyse des aflatoxines est effectuée par HPLC Ultimate 3000 (Dionex) avec colonne de séparation C18 Luna 3 µm 200x4,6 mm et dérivation au Br par Coring-Cell (Diagnostix GmbH). Lecture de la fluorescence : excitation à 362 nm, Lecture d'émission à 440 nm. La quantification d'aflatoxine B1 a été réalisée par le biais de standard (AFB1 produit by *A. flavus*, Sigma-Aldrich, France) et analysé par le logiciel Chromeleon.

**Figure 1 :** **a** : maïs cultivé en serre ; **b** : inoculateur ; **c** : point d'inoculation et traces d'humidité de l'épi ; **d** : haut : inoculum d'actinomycète S22, bas : inoculum d'*A. flavus* AFc5 ; **e** : épi contaminé à maturité ; **f** : broyeur à bille d'acier ; **g** : extraction des aflatoxines en colonnes d'immunoaffinité Aflaprep ; **h** : mesure des aflatoxines à l'HPLC.

**Figure 1:** **a**: maize grown in greenhouse; **b**: inoculator; **c**: inoculation point and moisture marks; **d**: up: actinomycete S22 inoculum, down: *A. flavus* AFc5 inoculum; **e**: contaminated mature cob; **f**: steel bead grinder; **g**: aflatoxins extraction with Aflaprep immunoaffinity columns; **h**: aflatoxins HPLC measures.



## ANALYSES STATISTIQUES :

### Dispositif expérimental :

Les différentes modalités sont disposées en bloc de Fisher à 3 répétitions orientées pour annuler le léger gradient de lumière mesuré et affectant un peu la croissance des plantes.

### Analyses :

Vérification de la normalité des résidus, analyse de variance et tests de Dunnett et de Newman et Keuls réalisés à l'aide du logiciel XLSTAT.

## RESULTATS

Les résultats bruts en aflatoxines ont été présentés en ng par grain inoculé.

### AFLATOXINES PRODUITES :

Il y a principalement production d'AFB1 et un peu d'AFB2. Ce qui est conforme aux caractéristiques de l'espèce *A. flavus*.

La production d'AFB2 est très faible et n'est décelable que dans 3 épis sur les 9 épis inoculés avec *A. flavus*. Lorsqu'elle est décelable, l'AFB2 se situe de 1,0 % à 2,4 % des aflatoxines totales avec une moyenne à 1,6 %, ce qui est négligeable dans le cadre de notre étude.

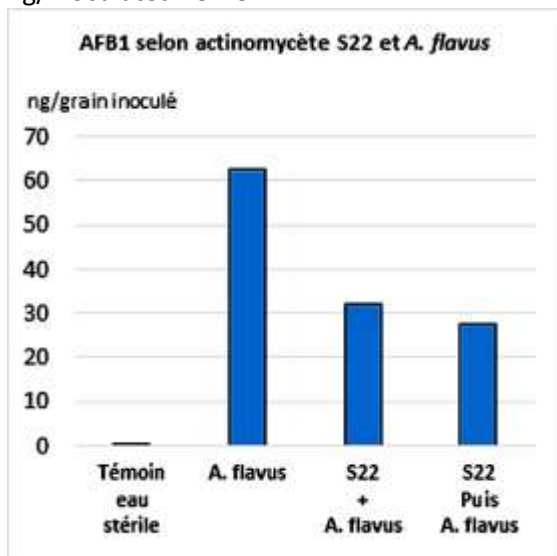
### AFB1 :

#### Quantités présentes :

Les moyennes des résultats en AFB1 sont présentées sur la figure 2 et le détail des données est représenté en éclaté sur la figure 3.

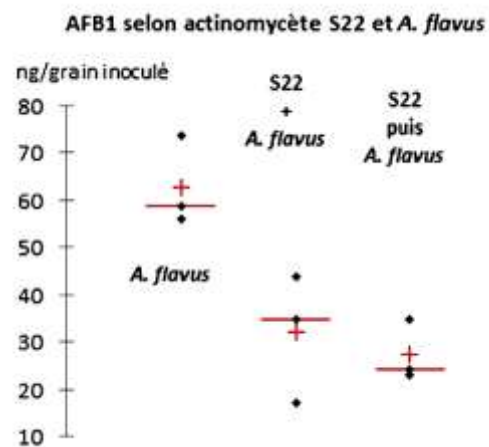
**Figure 2 :** quantité moyenne d'AFB1 en ng/grain inoculé.

**Figure 2:** AFB1 average quantity in ng/inoculated kernel.



**Figure 3 :** représentation éclatée des données d'AFB1 (3 répétitions).

**Figure 3:** Scattergram representation of AFB1 data (3 replicates)



Le + représente la moyenne et le trait rouge la médiane

L'action du biocontrôle S22 diminue la quantité d'AFB1 par grain inoculé de 50 %.

### Normalité des résidus :

Le risque de se tromper en rejetant l'hypothèse de normalité  $H_0$  est supérieur à 50 % :

- Test de Shapiro Wilk : 60 %.
- Test de Anderson-Darling : 54 %.
- Test de Lilliefors : 47 %.

■ Test de Jarque-Bera : 82 %.

Coefficient d'asymétrie des résidus (Fisher) : -0,085 (idéal à 0)

Coefficient d'aplatissement des résidus (Pearson) : -1,025 (idéal à 0 : La répartition est un peu plate).

Les données sont cohérentes avec la loi Normale, l'analyse de variance sera valide.

#### Analyse de variance :

**Tableau I** : analyse de variance ANOVA de l'AFB1.

**Table I:** variance analysis of AFB1 by ANOVA

| Source :      | DDL | Somme des carrés | Moyenne des carrés | F      | Pr>F  |
|---------------|-----|------------------|--------------------|--------|-------|
| Modèle        | 2   | 2211,585         | 1105,593           | 10,748 | 0,010 |
| Erreur        | 6   | 617,281          | 102,880            |        |       |
| Total corrigé | 8   | 2828,866         |                    |        |       |

Calculé contre le modèle  $Y = \text{Moyenne } (Y)$ .

Le risque qu'il n'y ait pas de différence significative (hypothèse  $H_0$ ) est seulement de 1 % au seuil  $\alpha = 5$  %. On admet donc des différences significatives, ce qui paraissait évident au vu des représentations graphiques de la figure 2.

Ces différences sont confirmées par le test de Dunnett :

**Tableau II** : Test de Dunnett bilatéral pour l'AFB1 de la modalité *A. flavus* seul / aux effets d'adjonction d'actinomycète S22.

**Table II:** bilateral Dunnett test for AFB1 of the modality *A. flavus* alone / effects of actinomycete S22 adjonctions.

| Modalités :                    | Différence | Différence Standardisée | Valeur critique | Différence critique | Pr > Diff. | Significatif |
|--------------------------------|------------|-------------------------|-----------------|---------------------|------------|--------------|
| <i>A. flavus</i> /             |            |                         |                 |                     |            |              |
| Actino. S22 + <i>A. flavus</i> | 30,718     | 4,282                   | 2,880           | 20,658              | 0,007      | oui          |
| Actino puis <i>A. flavus</i>   | 35,311     | 4,922                   | 2,880           | 20,658              | 0,003      | oui          |

La représentation en groupes de Newman et Keuls est la suivante :

**Tableau III** : Analyse en groupes de Newman et Keuls de l'AFB1. Les lettres indiquent les groupes significativement différents.

**Table III:** Newman and Keuls analysis of group for AFB1. Letters indicate significantly different groups.

| Modalité :                        | Moyenne estimée (ng/grain inoculé) | Groupes NK : |   |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------|---|
| <i>A. flavus</i> seul             | 62,8                               | a            |   |
| Actino. S22 + <i>A. flavus</i>    | 32,0                               |              | b |
| Actino. S22 puis <i>A. flavus</i> | 27,4                               |              | b |

Le contrôle par la souche d'actinomycète S22 diminue très significativement la quantité d'AFB1 de 50 %. Que l'*A. flavus* soit introduit dans les grains en même temps que l'actinomycète ou une semaine après, ceci ne modifie pas la quantité d'AFB1 présente. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux modalités.

## DISCUSSION

Cette expérimentation a été effectuée sur plantes normalement développées dans des conditions proches de ce qui aurait pu être fait au champ. La situation en serre ayant permis de disposer d'une température plus élevée favorisant la croissance de l'*A. flavus* par rapport aux conditions naturelles extérieures. L'expérimentation au champ serait la suite logique de ces résultats, en recherchant les situations naturelles les plus favorables à l'*A. flavus*. Mais auparavant, il faudrait terminer les caractérisations moléculaires des souches utilisées afin d'obtenir des amorces de détection spécifiques

par PCR. Ceci permettra de suivre leur localisation dans les plantes et leur dispersion dans l'environnement.

Cette nette et très significative diminution de 50 % de la présence d'AFB1 sur les grains est importante bien qu'inférieure aux 84 % observés *in vitro* avec cette même souche. Le passage sur la plante confronte le système à d'autres contraintes et interactions que nous nous proposons d'étudier dans un prochain programme.

Nous n'avons testé que peu de souches d'actinomycètes, la place en serre étant réduite. Cependant, une autre souche du même type avec antagonisme de contact et ayant les mêmes caractéristiques de diminution d'AFB1 et de croissance *in vitro* que S22 (Verheecke *et al.* 2014) n'a montré aucune différence significative (résultats non publiés). Ce qui conforte le fait que le passage sur plante est absolument nécessaire pour le choix des souches. La plante expose le système à des contraintes supplémentaires. Il est donc nécessaire de tester un plus grand nombre de souches sur plantes pour rechercher une diminution d'AFB1 plus élevée.

De la même façon, le nombre de souches d'*A. flavus* testé est resté au nombre de deux alors que la littérature montre une grande variabilité des souches naturelles rencontrées dans les champs de maïs (Mauro *et al.* 2013 ; Gallo *et al.* 2012). Nous avons cependant testé une autre souche (NRRL62477) produisant 40 % d'AFB1 de moins avec laquelle nous n'avons obtenue aucune différence significative (résultats non publiés). Ce qui montre qu'il faut aussi se doter d'une souchothèque d'*A. flavus*, adaptée à la population au champ, travail débutant actuellement.

Les inoculations ont été effectuées avec un inoculum 10 fois plus concentré en spores d'actinomycète qu'en spores d'*A. flavus* en partant du principe que dans ces conditions, la pression sur *A. flavus* serait plus forte et que nous aurions plus de chances d'obtenir un effet sur l'AFB1. La place étant limitée dans la serre nous n'avons testé que ce ratio mais il est évident qu'une série de ratios croissants devrait être expérimentée.

Les inoculations ont été effectuées par piqûres sur le côté de l'épi, à travers les spathe, 17 jours après la floraison. Ces pratiques sont courantes (King and Scott 1981 ; Windham *et al.* 2003 ; Williams *et al.* 2013) et permettent l'introduction conjointe de l'actinomycète et de l'*A. flavus*. Nous avons aussi testé l'introduction par le canal des soies et d'autres dates d'inoculation plus tardives mais les conditions utilisées ici donnent les meilleurs résultats et sont cohérents avec la littérature (Caron *et al.* 2014).

Dans la pratique, nous devrons aussi considérer que l'actinomycète ou ses métabolites secondaires utiles seront difficiles à positionner directement sur les épis. La végétation est dense, elle masque les épis et la canopée s'établit à plus de 2 m de haut. Les enjambeurs n'existent que chez les producteurs de semences et ne sont pas adaptés au traitement des épis. Il faudra donc considérer un autre mode d'apport qui pourrait être une pulvérisation sur les plantes avant qu'elles ne soient trop hautes ou l'utilisation du caractère endophyte de certaines souches d'actinomycètes. La sélection de telles souches est en cours actuellement.

D'autre part, ces expérimentations sont longues et requièrent beaucoup de surface, elles sont nécessaires à la sélection des souches mais pourraient être précédées de tests rapides à créer sur plantules en phytotron.

## CONCLUSION

Des tests de biocontrôle sur l'AFB1 par une souche d'actinomycète (S22) ont été effectués avec succès sur épis de maïs cultivés en serre. La diminution de la toxine est de 50 %. Ces tests effectués directement sur plantes, proche de la situation au champ, font suite à la sélection de souches effectuée *in vitro*. Cependant, il est encore nécessaire de rechercher une diminution plus importante de la toxine et d'en vérifier la régularité. D'autres souches d'actinomycètes, d'*A. flavus* et de variétés de maïs devront être testées. Pour accélérer cette sélection, il serait utile de mettre au point des tests rapides sur plante en phytotron.

L'étape suivante consiste à expérimenter au champ. Les bons résultats obtenus en serre pourraient déjà être testés dans des expérimentations en culture de maïs.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du projet AFLAFREE.

Nous avons apprécié l'aide de Céline Matar, d'Hugo Audinot et de Rémy Kirch lors de la mise en place des tests.

Nous remercions chaleureusement Arvalis – Institut du végétal et en particulier Jean Pierre LACHURIE et Pierre ESPARBIER pour leur aide dans la fourniture de semences et de plantes.

## BIBLIOGRAPHIE

Abbas Hamed K., Weaver Mark A., Horn Bruce W., Carbone Ignazio, Monacell James T., and Shier W. Thomas. 2011. *Aspergillus*, Aflatoxins, Cyclopiazonic Acid and Biological Control of Aflatoxins Selection of *Aspergillus flavus* Isolates for Biological Control of Aflatoxins in Corn. *Toxin Reviews* 30 (2-3): 59–70.

Adjovi Y. C. S., Bailly S., Gnonlonfin B. J. G., Tadriss S., Querin A., Sanni A., Oswald I. P., Puel O., and Bailly J. D. 2014. Analysis of the Contrast between Natural Occurrence of Toxigenic *Aspergilli* of the Flavi Section and Aflatoxin B1 in Cassava *Food Microbiology* 38 (April): 151–59.

AFSSA. mars 2009. *Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale* ; rapport final, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 308 pp.

Arvalis - Institut du végétal. 2014. Choisir et Décider : Maïs, Résultats 2013 Préconisations 2014, Centre. [http://www.arvalis-infos.fr/file/galleryelement/pj/3e/d7/5b/6a/choisir\\_mais\\_centre\\_2013\\_integral3913799578941213481.pdf](http://www.arvalis-infos.fr/file/galleryelement/pj/3e/d7/5b/6a/choisir_mais_centre_2013_integral3913799578941213481.pdf). Consulté le 10/09/2015.

Battilani P., Barbano C., and Piva G. 2008. Aflatoxin B1 Contamination in Maize Related to the Aridity Index in North Italy. *World Mycotoxin Journal* 1 (4): 449–56.

Battilani Paola, Van Der Fels-Klerkx H.J., Miraglia. Marina, Moretti Antonio, Miglietta F., Rossi Vittorio, Giorni Paola. 2012. Modelling, Predicting and Mapping the Emergence of Aflatoxins in *Cereals in the EU due to Climate Change*. EFSA European Food Safety Authority. <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/223e.htm>. Consulté le 10-09/2015.

Caron Daniel, Verheecke Carol and Mathieu Florence, 2014. Aflatoxins on maize cobs inoculated with *Aspergillus flavus* in greenhouse. International Mycotoxin Conference 2014 Beijing, China, 19 to 23 May 2014, poster session.

Centre de Recherche International sur le cancer CIRC/IARC. 2015. IARC Monographs- Classifications. [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php). Consulté le 1/09/2015.

Commission Européenne. 2002. Directive 2002/32/CE Du Parlement Européen et Du Conseil Du 7 Mai 2002 Sur Les Substances Indésirables Dans Les Aliments Pour Animaux - Déclaration Du Conseil. [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=uriserv:OJ.L\\_.2002.140.01.0010.01.FRA](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2002.140.01.0010.01.FRA). Consulté le 9-09-2015.

Commission Européenne. 2006. RÈGLEMENT (CE) No 1831/2006 DE LA COMMISSION Du 19 Décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans Les denrées alimentaire

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:FR:PDF>. Consulté le 09/09/2015.

De Jong Jacob, Von Holst Christoph, Van Leeuwen Stephan, Weigel Stephan, Nielen Michel. 2013. Lessons Learnt from the CONFIDENCE Project: Contaminants in Food and Feed – Inexpensive Detection for Control of Exposure. In RAFA 6th International Symposium, Prague 5- 8 October 2013. Book of Abstract: P 112. Accessed September 11.2015.

Gallo Antonia, Stea Gaetano, Battilani Paola, Logrieco Antonio F. and Perrone Giancarlo, 2012. Molecular Characterization of an *Aspergillus Flavus* Population Isolated from Maize during the First Outbreak of Aflatoxin Contamination in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 51 (1): 198–206.

Giorni P., Magan N., Pietri A., Bertuzzi T. and Battilani P. 2007. Studies on *Aspergillus* Section *Flavi* Isolated from Maize in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 113 (3): 330–38.

Herth Antoine. 2011. Le Bio-Contrôle Pour La Protection Des Cultures - 15 recommandations pour soutenir Les technologies vertes -Rapport de la mission parlementaire du député Antoine Herth au Premier Ministre. <http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/114000224.pdf>. Consulté le 9/09/2015.

Hua Sui Sheng T., 2013. Biocontrol of *Aspergillus flavus* by *Pichia anomala*. In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Vol. 2: 1067-1072.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 56. IARC, Lyon, France, p. 489.

King S. B. and Scott G. E. 1981. Field Inoculation Techniques to Evaluate Maize for Reaction to Kernel Infection by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, Vol. 72, N° 7, 782-785.

Mauro Antonio, Battilani Paola, Callicott Kenneth A., Giorni Paola, Pietri Amedeo, and Cotty Peter J. 2013. Structure of an *Aspergillus Flavus* Population from Maize Kernels in Northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 162 (1): 1–7.

Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. 2015. ECOPHYTO Les Nouvelles Orientations Du Plan. [http://draaf.poitou-charentes.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/1501-PA-ECOPHYTO-DEP-planV2-bd\\_cle0c85ba.pdf](http://draaf.poitou-charentes.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/1501-PA-ECOPHYTO-DEP-planV2-bd_cle0c85ba.pdf). Consulté le 9/09/2015.

Shams-Ghahfarokhi Masoomah, Kalantari Sanaz, and Razzaghi-Abyaneh Mehdi. 2013. Terrestrial Bacteria from Agricultural Soils: Versatile Weapons against Aflatoxigenic Fungi. In *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, edited by Mehdi Razzaghi-Abyaneh. InTech. <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/terrestrial-bacteria-from-agricultural-soils-versatile-weapons-against-aflatoxigenic-fungi>. Consulté le 10/09/2015.

Van Egmond Hans P. 2013. Mycotoxins: Risks, Regulations and European Co-Operation. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, no. 125: 7–20.

Verheecke C., Liboz T., Darriet M., Sabaou N., and Mathieu F. 2014. In Vitro Interaction of *Actinomyces* Isolates with *Aspergillus Flavus*: Impact on Aflatoxins B1 and B2 Production. *Letters in Applied Microbiology*, February.

Williams W. Paul, Alpe Michael N., Windham Gary L., Ozkan Seval and Mylroie J. Erik. 2013. Comparison of Two Inoculation Methods for Evaluating Maize for Resistance to *Aspergillus Flavus* Infection and Aflatoxin Accumulation. *International Journal of Agronomy* 2013 (November).

Windham Gary L., Williams W. Paul, Buckley Paul M., and Abbas Hamed K., 2003. Inoculation Techniques Used to Quantify Aflatoxin Resistance in Corn. *Journal of Toxicology TOXIN REVIEWS* Vol. 22, Nos. 2 & 3, pp. 313-325.