

UNIVERSITE DE KINSHASA



FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Département de chimie et industries agricoles

B.P. 127 KINSHASA XI



« Effet inhibiteur d'un mélange de deux acides (acétique et propionique) sur le développement d'*Aspergillus flavus* (souche isolée a partir des graines d'arachide).



TAKA MATSHAKAY Scifo

IR 2 CHIMIE ET INDUSTRIES AGRICOLES

Professeur : MASIMANGO

Année Académique 2011-2012

EPIGRAPHIE

« Nul n'a reçu du bon Dieu un don quelconque pour sa vanité personnelle mais pour être utile à la communauté. »

NDELO-DI-PHANZU

DEDICACE

Oh ! Dieu tout puissant un grand merci de ce que tu as fait pour moi depuis ma naissance jusqu'à ce jour.

En ayant une pensée pieuse et d'un cœur déployé nous nous retrouvons dans l'obligation de remercier et de dédier cet exercice attestant la fin de formation à : mon père : MATSHAKAY MBASI, ma mère MAWA SONGILA marie Josée, mes sœurs : MULENGU Thérèse, PAMBU véronique, MATUNGA Mireille mon frère : MATSHAKAY Carlos, WAMENGA SEMI Wam's ma tante : KILALA Honorine, mon oncle : Pasteur BUMBA jules.

Nous remercions de tout cœur ceux dont le nom n'est pas repris ci haut ; qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

TAKA MATSHAKAY Scifo

REMERCIEMENTS

L'enfant pour grandir à besoin d'une éducation soutenue et intégrale ceci en accord et avec l'appui de la société dans laquelle il évolue c'est pourquoi dans une communauté donnée il ya des règles qui régissent l'élaboration d'une bonne formation intégrée de l'enfant en commençant par la maternelle en passant par le primaire suivi du cycle secondaire pour achever avec un diplôme de l'université.

Ayant bénéficié de façon digne d'une bonne connaissance en ce qui concerne la formation d'ingénieur agronome, nous remercions le professeur MASIMANGO qui, malgré ses nombreuses occupations a voulu nous encadrer et nous orienter. Nous serions ingrats si nous ne remercions pas le chef de Département, le professeur Eric SUMBU qui étant que père, charge par les occupations familiales et du travail a fait de nous de bon chimiste. Que le Dieu du ciel le comble de toutes les grâces.

Nous nous préoccupons de remercier ceux qui ont laissé des empreintes remarquables dans notre vie. CT VAWAZOLA, Daddy LULENDO, Gauthier GITAGO, Nadège NDANGI, David BIENKO, BABU Nestor, TINGU NZOLAMESO, Germain NYEMBO, Freddy MPIANA, douglas BIDIKI, Timothée NTAMBALA, fanfan KAZADI, rigobert DIAWIDI, Pasteur LEVIER DELEKE, Gisèle SETSHI, hornella NSONI, lydie META, Sandra tembi.

TAKA MATSHAKAY Scifo

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriété physiques et chimiques des aflatoxines

Tableau 2 : Différentes doses de deux acides utilisées pour le 4 traitements à incuber à 30°C

Tableau 3 : Différentes doses de deux acides utilisées pour le 4 traitements à incuber à 37°C

Tableau 4 : Description des colonies des moisissures développées sur les 5boites de Pétri contenant le milieu de Sabouraud au chloramphénicol

Tableau 5 : Présence de la tête aspergillaire

Tableau 6 : Poids sec du mycélium formé à 30°C d'incubation

Tableau 7 : Poids sec du mycélium formé à 37°C d'incubation

RESUME

Dans le but de déterminer l'effet du mélange de deux acides (acide acétique et propionique) sur la croissance d'aspergillus flavus , trois souches d'aspergillus flavus ont été isolées des graines d'arachides moisies.

La mise en évidence de la production des aflatoxines a révèlé que ces souches sont productrices des aflatoxines du groupe B. L'effet inhibiteur du mélange de deux acides organiques sur la croissance de ces souches à été partiel. L'effet de synergie éventuelle des deux acides n'est pas prouvé.

INTRODUCTION

1. Problématique

Les régions tropicales offrent des conditions idéales pour la prolifération des microorganismes à cause du taux d'humidité et des températures moyennes. Les aliments tels que les grains, les légumes et les tubercules conservés dans ces conditions sont exposés aux attaques des insectes et aux contaminations des bactéries et des champignons causant la détérioration de leur qualité marchande et de leur qualité nutritionnelle occasionnant ainsi de nombreuses pertes.

Bien qu'ils soient importants dans l'environnement pour la dégradation de la matière organique, les champignons, appelés mycotoxines, qui, se développent dans les aliments sont responsables de multiples de multiples nuisances telles que la modification des caractéristiques de leur emballages.

Par leur développement dans l'aliment, certaines moisissures sont capables de synthétiser certaines métabolites, appelés mycotoxines, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante par l'homme ou l'animal, peuvent provoquer des maladies graves pouvant conduire à la mort du consommateur (MASIMANGO, 2005).

Parmi ces métabolites, le plus redoutable est l'aflatoxine qui est produit par une moisissure emmêlée *Aspergillus flavus*. Ces aflatoxines sont requittées cancérogènes, chez l'homme il peut provoquer une pathologie pulmonaire, des infections de la sphère oro-pharyngée, des allergies pulmonaires et des mycoses (MASUDI 2010).

Leur présence dans les aliments constitue un danger réel et potentiel pour les consommateurs. Une chose reste vraie, de plusieurs études consacrées à la lutte contre *l'Aspergillus Flavus* et ses métabolites, il est vraiment difficile de recommander un traitement qui met consommateur à l'abri de tout danger.

Par manque des méthodes adéquates d'élimination des aflatoxines dans les aliments sans altération de la qualité nutritive de ces derniers, plusieurs études sont orientées vers l'inhibition de la croissance des agents producteurs de ces aflatoxines, parmi lequel la moisissure *Aspergillus Flavus*, par les acides organiques.

Des études antérieures ont envisagé plusieurs pistes de solution pour lutter contre cette moisissure en utilisant soit des acides, des bases et des sel.

En 2006, Khasa dans ses recherches, avait obtenu une dose minimale efficace de 333 ppm d'acide propénoïque et IVAMI dans ces conditions expérimentales avait obtenu la dose minimale d'inhibition de 200 ppm d'acide acétique.

Les deux acides organiques (acide acétique et acide propionique) sont utilisés comme les additifs chimiques pour assurer la conservation des aliments.

2. Hypothèse

Etant donné que les deux acides (acétique et propionique) utilisés séparément inhibent à une certaine dose, la croissance d'*Aspergillus flavus*, la combinaison de 2 acides peut avoir, dans une certaine mesure, un effet inhibiteur sur la croissance d'*Aspergillus flavus*, productrice d'aflatoxines.

3. Objectif

Pour le présent travail, nous nous fixons comme objectif de déterminer l'effet inhibiteur du mélange de deux acides (acétique et propionique) sur la croissance d'*Aspergillus flavus* isolées des graines d'arachide moisies collectées au marché de Rond-point Ngaba.

4. Intérêt de l'étude

L'intérêt de la présente étude est de contribuer à la lutte contre moisissures contaminant les aliments en général et les moisissures productrices d'aflatoxines en particulier.

5. Subdivision du travail

Outre cette introduction et une conclusion ; le présent travail a comme subdivisions :

- Chapitre I : Généralités sur l'*Aspergillus flavus*
- Chapitre II : Aperçu sur les conservateurs organique utilisés en agro- alimentaire
- Chapitre III : Matériel et méthodes
- Chapitre IV : Résultats et discussions.

CHAPITRE I : GENERALITES

I.1. Aspergillus

I.1.1. Description

Aspergillus flavus appartient à la classe des Deutéromycètes ou Fungi Imperfectif ; caractérisés par l'absence d'une phase sexuée dans le processus de reproduction.

Les Aspergillus poussent rapidement et sont poudreux ou duveteux, de couleur blanche, jaune, verte, brune à noire. Les thalles sont plus denses vers le centre, lâches en périphérie.

Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique dont le diamètre varie de 20 à 60 μm . Les têtes conidiennes sont uni ou bisériées selon leur de maturation et peuvent atteindre jusqu' à 1 mm. La vésicule est recouverte entièrement ou au 3/4 de sa surface et donne des têtes à disposition radiaire ou en colonne. Les conidies subsphériques à ellipsoïdales de 3 à 6 μm sont grises pâles et échinulées.

I.1.2. Structure

Le corps végétatif de l'Aspergillaires *flavus* est un filament (hyphe) long, fin et ramifié à structure cellulaire, cellulaire, dénommé thalle, généralement de couleur verte jaune à jaune olive, floconneux. Le contenu cellulaire comprend le cytoplasme avec un noyau ainsi que des inclusions variées (ABDELLAH et al, 2004).

L'Aspergillus *flavus* est caractérisé par un mycélium formé des hyphes de taille régulière, septés, avec des ramifications souvent dichotomiques à angle aigu, et des filaments dits conidiophores (stipes) lisses ou échinulés, droits ou sinueux, pouvant parfois être septés, se terminant par une vésicule de forme globuleuse sphérique plus au moins allongée et de taille variable.

Autour de celle-ci sont disposées une ou plusieurs rangées de phialides à l'intérieur des quelles naissent des spores ou phialospores. Les phialides sont parfois portées par des métules et recouvrent toutes les vésicules ou seulement la partie supérieure.

L'ensemble forme la tête Aspergillaire qui a l'aspect d'un aspersoir d'où leur nom. Chaque tête Aspergillaire peut reléguer jusqu' à 104 spore.

I.1.3. Ecologie

Aspergillus flavus est une moisissure cosmopolite particulièrement fréquente dans les régions chaudes et humides du globe (zone tropicales et subtropicales). Il est souvent isolé du sol qui demeure le plus grand réservoir des micro-organismes, des végétaux, des produits laitiers et carnés et même des billes de banque. Pour se développer, l'*Aspergillus flavus* exige une humidité relative d'au moins 80% et une température optimale de 37°C.

Mais il croît normalement dans un intervalle de température allant de 25 à 42°C, dans des conditions extrêmes il peut pousser dans une gamme de température allant de 12 à 48°C (PAYNE et BROWN, 1998).

Le meilleur pH pour sa croissance est à 7,5 et à 6,5 pour la production des conidies (BOTTON et al, 1985).

I.1.4. Nutrition

Les moisissures se caractérisent par une polyphagie marquée, elles sont capables d'assimiler des combinaisons variées minérales et organiques. Les éléments minéraux indispensables sont ceux de tous les micro-organismes. Le potassium et le phosphore sont particulièrement limitants (MASIMANGO, 2003).

I.1.5. reproduction et croissance

Chez les *Aspergillus flavus*, comme pour tous les Deutéromycètes, la reproduction est exclusivement asexuée. Des cellules se multiplient pour former une cellule particulière : le conidiophore, sur lequel se forment les spores (conidies ou conidiospores) (BOUCHET et al, 1999).

I.1.6. pouvoir pathogène

Aspergillus flavus se comporte comme un microorganisme opportuniste qui est généralement inoffensif dans son environnement normal mais devient pathogène chez un hôte compromis, lequel est souvent un immunodéprimé. *Aspergillus* est la deuxième espèce impliquée en pathologie après *Aspergillus fumigatus* (TABUC, 2007).

Les voies respiratoires sont la porte d'entrée majeure d'*Aspergillus*. Chez l'homme il peut provoquer une pathologie pulmonaire, des Kératites, des infections de la sphère oro-pharyngée ; des allergies pulmonaires et/ou des sinus et des mycoses.

Le terme « aspergilloses » désigne ces différentes infections causées par l'*aspergillus*. On peut également mentionner ses métabolites (mycotoxines) qui ont une

action hépatotoxique et parfois cancérigène dont les plus connus et les plus étudiés sont les aflatoxines, lesquelles s'accumulent sur des denrées servant de substance au champignon.

Toutefois, bien que le cancer du foie soit particulièrement fréquent dans les régions d'Afrique où les céréales et les arachides sont les plus contaminées par les aflatoxines, une relation de cause à effet entre l'aflatoxine et le cancer du foie chez l'homme n'est pas établie, d'autres facteurs peuvent en effet intervenir dans l'apparition de ce type de cancer : malnutrition, parasites, hépatite virale, alcoolismes, etc. (BOUCHET et al, 1999).

L'union européenne (UE) a édicté il y a quelque temps un règlement (CE N° 1525/98 du 16 juillet 1998) pour limiter la présence d'aflatoxines dans l'alimentation humaine. Ce règlement dit que la limite maximale admissible en aflatoxine B₁ (ou des aflatoxine B et G) ne doit pas dépasser 2 µg/kg (ou 4 µg/kg pour les aflatoxines totales) dans les arachides, fruits séchés et fruits à coque et dans les produits de leur transformation. La limite maximale admissible pour l'aflatoxine M₁ dans le lait est quant à elle fixée à 0,05 µg/l (EGMOND, 1991).

I.2. LES AFLATOXINES

Les aflatoxines désignent un ensemble de métabolites secondaires biosynthétisés par des champignons microscopiques appartenant essentiellement au genre *Aspergillus*.

Ces métabolites sont élaborés à la faveur d'une forte humidité relative (80-90% conjointement à une température élevée (20- 35°C). on les rencontre actuellement dans la quasi-totalité des productions végétales des zones tropicales (MASIMANGO, 2006).

I.2.2. propriété des aflatoxines

Les aflatoxines sont des substances très toxiques, cancérigènes, majeurs sont les immunodépresseurs produits comme métabolites secondaires par les *Aspergillus* sur une grande variété de produits alimentaires.

Des 18 différents types d'aflatoxines identifiées, les membres majeurs sont les aflatoxines B₁ B₂ G₁ et G₂.

À côté de ceux – ci quatre autres types d'aflatoxines sont secondairement recensés. il s'agit des aflatoxines M₁, M₂ G_{2a} et B_{2a}.

Les aflatoxines M₁ et M₂ sont respectivement des métabolites majeurs des aflatoxines B₁ et B₂ retrouvés dans le lait des animaux ayant consommé des aliments contaminés. Par contre, les aflatoxines G_{2a} et B_{2a} diffèrent des aflatoxines B₂ et G₂ par la présence d'un hydroxyle en position 5 du premier cycle furfurolique.

Les aflatoxines sont solubles dans certains solvants organiques tels que le chloroforme, le méthanol, l'acétone, l'éthanol, le benzène et l'acétonitrile.

Elles restent cependant insolubles dans l'hexane, l'éther de pétrole et l'éther sulfurique (solvant usuels des lipides). Exposées à la lumière U.V., les aflatoxines fluorescent intensément (les aflatoxines B₁ et B₂ produisent une fluorescence bleue tandis qu'elle est verte pour G₁ et G₂) (CAROLE et al, 2009).

C'est base de ces propriétés (solubilité et fluorescence) que se font la détection et le dosage de ces substances.

Le tableau 1 ci – dessous reprend quelque caractéristique physique et chimique des principales aflatoxines.

Tableau 1 : propriétés physiques et chimiques des aflatoxines

Aflatoxine	Formule Moléculaire	point de	Point de fusion
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	190

Source : KHASA (2006)

I.2.3. Structure des aflatoxines

Au point de vue chimique, les aflatoxines sont des composés organiques hétérocycliques caractérisés par la présence dans leurs molécules d'un noyau

coumarique, ce qui les fait encore appeler flavacoumarines, et d'un noyau furfurolique. Leur structure élucidée par spectrométries U.V, RMN et de masse le fait ranger en deux groupes : les aflatoxines du groupe B qui possèdent une fonction lactone contre deux pour celles du groupe G. Les premières se caractérisent par un noyau penta cyclique carboné, les autres par un noyau hexacyclique hétéroatome, car elles portent, en plus un atome d'oxygène.

L'indice 1 indique que le premier noyau garde caractère furfurolique, deux plus importantes (B et G) :

- les littératures décrites de nombreuses aflatoxines dont les formules dérivent du rapport aux aflatoxines B dont elles décrivent ;
- les aflatoxines B_a et G_{2a} qui diffèrent des aflatoxines B₂ et G₂ par la présence d'un hydroxyde en position 5 du premier cycle furfurolique.

I.2.4. Réaction des aflatoxines

Les réactions des aflatoxines à plusieurs conditions physiques et à divers réactifs ont largement été étudiées à cause de l'application possible des telles réactions à la désintoxication des matières (produits) contaminées.

(REDDY, et WALIYARD, 2006).

a. La chaleur

Les aflatoxines à l'état sec sont très stables en dessous de leur de fusion. Cependant, en présence d'humidité et des températures élevées, on assiste pendant un certain temps à la destruction dans les repas des grains oléagineux, des cacahouètes rôtis ou dans une solution aqueuse d'aflatoxines à pH 7. Bien que les produits de la réaction n'aient pas été examinés en détail, il apparaît invraisemblable qu'une telle température élevée. (MASIMANGO, 1987).

b. Les alcalis

Dans une solution alcaline, l'hydrolyse de la moitié du lactone se produit. Cette hydrolyse paraît être réversible car il a été montré qu'une réformation du cycle a lieu de l'acidification de la solution base contenant l'aflatoxine.

A des plus hautes températures (plus de 100°C) ; l'ouverture de la bague suivie. Par la décarboxylation se produit et la réaction peut aller plus aller plus loin

menant à la perte du groupe méthoxy de la bague aromatique. Une série semblable de réactions aussi se produisent avec l'ammoniac et plusieurs amines.

c. Les acides

En présence d'acides minéraux, les aflatoxines B₁ et G₁ sont converties en aflatoxines B_{2a} et G_{2a}. Cela est dû à l'addition acido-catalysée de l'eau au niveau du premier cycle furfurolique.

En présence d'anhydride acétique et d'acide chlorhydrique, la réaction continue jusqu'à donner un d'acétoxy. Des produits d'addition semblables aux aflatoxines B₁ et G₁ sont formés dans des milieux contenant : acide formique-chlorure de thionyl, acide acétique-chlorure de thionyl et acide trifluoroacétique.

d. Les agents d'oxydation

Beaucoup d'agent d'oxydation tels que l'hypochlorite de sodium, le permanganate de potassium, le chlore, le peroxyde d'hydrogène, l'ozone et le perborate de potassium, le chlore, le peroxyde d'hydrogène, l'ozone et le perborate de sodium réagissent avec les aflatoxines et modifient ces dernières, d'une certaine manière comme indiqué par la perte de fluorescence.

Cependant les mécanismes de ces réactions sont incertains et les produits de la réaction restent non identifiés dans la plupart des cas.

e. La réduction

L'hydrogénation des aflatoxines B₁ et G₁ aboutit respectivement aux aflatoxines B_{2a} et G_{2a}.

La réduction de l'aflatoxine B par 3 moles d'hydrogène produit le tétrahydroxyflatoxine et la réduction des aflatoxines B₁ et B₂ avec le borohydride de sodium aboutit

f. La lumière ultra violette

A l'état libre, les aflatoxines sont détruites par les UV tandis qu'à l'état naturel, elles sont liées aux protéines du milieu où elles ont été synthétisées, ces dernières les protégeant.

I.2.5. effet des aflatoxines

Les aflatoxines sont parmi les substances toxiques les plus puissantes produites naturellement. La voie majeure à travers laquelle les êtres humains et animaux y sont exposés est l'alimentation.

Hormis les effets des aflatoxines susmentionnés (effets toxiques, cancérigènes, mutagènes et immunodépresseurs) :

- Elles ont un effet synergique avec les virus de l'hépatite B et C ; ce qui aggrave le risque de contracter ces maladies.
- Elles altèrent la croissance chez les enfants en Afrique, et causent des cirrhoses infantiles en Inde.
- Chez la volaille et le bétail, l'aflatoxine peut entraîner un manque d'appétit, une perte de poids, une réduction d'œufs et la contamination des produits tels que le lait et autres (KAMUHA, 2005).

Carcinogénicité des aflatoxines

Après de nombreuses expérimentations sur plusieurs espèces animales, les aflatoxines ont été confirmées comme des cancérigènes potentiels. Elles affichent leur puissance de toxicité dans l'ordre suivant : $B_1 > G_1 > G_2$. Le métabolisme joue un rôle majeur dans le degré de toxicité.

En effet, après ingestion, l'aflatoxine est métabolisée au niveau du foie où elle est convertie en plusieurs autres produits comme l'aflatoxicol, les aflatoxines Q1, P1 et M1 selon la prédisposition génétique de l'espèce.

Avec les précipités, il se forme un autre métabolite dénommé aflatoxine 8, 9 époxyde. C'est ce dernier qui détermine la susceptibilité de l'espèce à l'induction des mutations car s'intercalant dans l'ADN et formant un produit d'addition avec la guanine dans l'ADN.

Cette intercalation peut des transversions des bases azotées (notamment G est T) des codons du gène dans le foie. Cela a été observé dans la plupart des modèles expérimentaux. Il est présumé que c'est la raison majeure de la carcinogénicité de l'aflatoxine.

De plus, la susceptibilité de l'espèce à l'aflatoxine dépend principalement de ses systèmes de désintoxication du foie, de son patrimoine génétique, de l'âge et d'autres facteurs alimentaires, environnementaux, niveau de l'exposition et sanitaire (KHASA, 2006).

Aflatoxines et Santé

Des études épidémiologiques, cliniques et expérimentales révèlent que l'exposition aux aflatoxines abouti à une toxicité soit aigue lorsque des grandes doses d'aflatoxines ont été ingérées, soit chronique quand il s'agit une exposition modérée.

Chez la plupart d'espèce, les DL 50 varient de 0,5 à 10 mg/kg de poids corporel et elles réagissent différemment dans leur susceptibilité à la toxicité chronique et aigüe d'aflatoxines.

Dans tous les cas, le foie demeure le principal organe cible es aflatoxines. Le cas le plus sévère d'empoisonnement aigue par les aflatoxines a été rapporté dans le Nord- ouest de l'Inde en 1974 où 25% de la population exposée sont mort après ingestion de maïs moulu contaminé à environ 6250-15600mg /kg.

I.2.6. Lutte contre les aflatoxines

Plusieurs techniques pouvant contribuer à réduire les risques de contamination par les aflatoxines et / ou à les éliminer des denrées ont été mises au point et expérimentés.

Celle –ci inclut la résistance génétique. Les pratiques de la gestion intégrée des cultures, les pratiques agronomiques, la lutte biologique, les interventions biotechnologiques et les essais de détoxification (NTZRE, 2006).

✓ Prévention

Des essais de prévention de la contamination des matières premières par les mycotoxines ont été réalisé tout abord sous des climats types tropicaux chauds et humides jugés à risque, la prévention aux champs peut consister en utilisation raisonnée d'insecticides ou des fongicides. Les insecticides permettent une diminution des lésions des plantes, ce qui réduit d' autant les portes ouvertes à l'envahissement par les moisissures.

Les fongicides en inhibant la croissance des moisissures empêchent, de fait la toxigenèse. Des essais de sélection génétique des plantes résistants à l'invasion par des moisissures ont été lancés.

Très difficiles à mettre au point, ces premiers essais restent toute fois peu concluants. La prévention en stockage des grains et le contrôle de la température, de l'humidité et de l'oxydation dans silos.

✓ Décontamination

Les mycotoxines sont molécules de petit poids moléculaire, en général thermostables en milieu non aqueux et difficilement dégradables. Il faut bien se rendre compte que les mycotoxines peuvent rester dans les denrées premières, même après disparition des moisissures. Les procédés d'élimination des micro-organismes (Chauffage, stérilisation ...) sont inefficaces sur l'élimination de la plupart des mycotoxines. En revanche une augmentation de pH (milieu alcalin) permet de détruire les aflatoxines (par ouverture du noyau lactone).

Il n'existe pas de méthode universelle de décontamination qui pourrait convenir à l'ensemble de mycotoxines. Les procédés de décontamination concernent essentiellement les graines de céréales et d'oléagineux.

- Ils doivent être efficace sans rendre impropres à la consommation les denrées traitées.
- Ils doivent être simples à mettre en œuvre et peu coûteux car la décontamination peut concerner des tonnages importants.

Ces procédés ne sont d'ailleurs pas toujours faciles à réaliser car la contamination est en général hétérogène. Parfois seuls quelques grains sont très fortement contaminés là où s'est développée la moisissure toxigène.

CHAPITRE II : APERÇU SUR LES CONSERVATEURS ORGANIQUES

II.1. Définition

Un conservateur est un additif alimentaire incorporé à un aliment dans le but de ralentir l'évolution de sa flore microbienne. L'incorporation se fait à faible dose pour éviter tout risque d'ordre toxicologique.

II.2. Les conservateurs organiques

II.2.1. les acides organiques saturés

Ils exercent un effet inhibiteur sur la croissance des micro-organismes par acidification de l'aliment et par le fait de l'action inhibitrice de leur forme ionisée.



RCOO⁻ : anion très actif contre les moisissures

L'acide acétique et l'acide propionique sont le plus largement utilisés. Leur utilisation est souvent couplée à d'autres procédés de conservation et stabilisation (pasteurisation, déshydratation et réfrigération.)

II.2.2. les acides organiques insaturés

La présence d'une double liaison accroît l'activité antimicrobienne des acides organiques. Les principaux représentants du groupe sont l'acide sorbique et ses sels, l'acide benzoïque et ses dérivés, l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et l'acide lactique.

a. Mode d'action des conservateurs organiques

Ils agissent par :

- Altération des conditions de croissance (Variation du pH, de pression osmotique, du potentiel d'oxydoréduction)
- Interactions moléculaires directes (formation des complexes avec des molécules biologiquement importantes par exemple) ou

indirecte de leurs ions avec les composantes des micro-organismes cibles (obstruction des canaux membranaires par exemple) YANGAZA, 2005).

II.3. L'ACIDE PROPIONIQUE

L'acide propionique est largement utilisé dans la conservation, dans la mesure où son action sur les aliments est préjudiciable pour de nombreux germes pathogènes. C'est un acide alcanoïque qui peut dériver d'un alcane dont le groupement terminal méthyle (CH₃) a été oxydé en groupement carboxyle (COOH) (MPUZA, 2009).

Caractéristiques

Formule brute : C₂H₅COOH

Densité : 0,995

K_a : 1,25.10⁻⁵

L'acide propionique est soluble dans l'eau, l'alcool, le chloroforme et l'éther.

Mode d'action

Il a été établi qu'outre l'effet acidifiant, l'acide propionique agit aussi entre autre, par inhibition du complexe pyruvate-déshydrogénase via le propyl - CoA, par réduction de la synthèse d'ATP par la voie du transport d'électron ainsi que par inhibition de la synthèse de la β-alanine (MARUYAMA, 1985).

Usages

C'est un agent antifongique efficace contre les germes suivants : *Epidermophyton*, *Microspores* et *Trichophyton spp* (spore) ; localement on l'utilise sous formes de pommade pour la peau, spécialement sous sa forme de sel de calcium de zinc ou de sodium. Sous la même forme, il est utilisé dans la fermentation ou dans les industries laitières comme inhibiteur des moisissures.

Les quantités d'acide propionique comme celles de toutes les additifs alimentaires à ajouter sont déterminées par la D.J.A (Dose journalière Admissible par définition, la D.J.A est la quantité d'un additif pour une substance chimique quelconque dont l'ingestion quotidienne est considérée comme inoffensive pour l'organisme

humain. Elle est exprimée en milligramme ou en gramme d'additifs par kilogrammes (MANFRED et MOLL).

II.4.L'ACIDE ACETIQUE

L'acide acétique ($\text{CH}_3 \text{COOH}$) est un organique (acide éthanoïque) naturellement présent dans le vinaigre où il est responsable du goût amer. C'est un liquide incolore et inflammable. Son point de fusion se situe à $16,6^\circ\text{C}$ et son point d'ébullition à $117,9^\circ\text{C}$; sa densité est de 1,049.

L'acide acétique est aussi connu sous le nom d'acide acétique glacial car il devient solide à une température légèrement plus basse que la température ambiante.

Dans le corps humain l'acide acétique est produit en outre par la consommation d'alcool, l'éthanol est converti en acétaldéhyde qui est alors converti en acétique sous l'influence d'une enzyme.

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

Notre travail consiste à évaluer l'effet d'un mélange de deux acides organiques, en l'occurrence l'acide acétique et l'acide propionique sur le développement d'*Aspergillus flavus*. Les expériences ont été effectuées au laboratoire de bactériologie de l'INRB (Institut National de Recherches Biomédicales).

III. I. Matériel

Le matériel d'étude est constitué de la souche d'*Aspergillus* isolée des graines d'arachides collectées au marché de Rond-point Ngaba.

III.2. METHODES

III.2.1. Isolement des moisissures

La souche d'*Aspergillus flavus* que nous avons utilisée dans notre travail a été isolée des graines d'arachide moisies collectées au marché de Rond-point Ngaba.

Pour ce faire, le milieu de Saboraud au chloramphénicol a été utilisé. Le Sabourand au chloramphénicol est un milieu de culture servant pour isoler et identifier les champignons pathogènes de la peau. Il convient en outre pour la mise en évidence et la numération des moisissures et levures dans les boissons, les jus de fruit et autres produits.

La présence de chloramphénicol permet d'inhiber la croissance des bactéries. Ce milieu convient très bien pour le développement des formes de croissance et des autres caractéristiques diagnostiques comme formation de colorant, modification de la surface.

Ce milieu se compose d'une peptone spéciale comme source d'acide d'acides aminés et d'azote et des concentrations relativement élevées en glucides. On a cependant ajusté le pH à 5.6 pour ralentir d'une manière générale la croissance des bactéries se multipliant plus rapidement. Les champignons et les levures se développent sans gêne à ce pH, à l'opposé de la plupart des bactéries (MARCK, 1972 ; DIFCO, 1984).

Les graines d'arachide moisies ont été introduites aseptiquement en raison de 4 graines par boîtes dans 5 boîtes de pétri contenant le milieu Sabouraud au chloramphénicol. Ces boîtes ont été incubées à 37°C pendant 72 heures pour permettre le développement des colonies.

Les colonies formées ont été décrites en fonction de leur forme, leur couleur.

III.2.2. détection de la présence d'*Aspergillus flavus*

Les *Aspergillus* se caractérisent par la présence de tête aspergillaire dans leur morphologie. Cette tête aspergillaire, soit une seule rangée de phialides (structure unisériée), soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous- dénommées appelées métules (structure bisériées). Les phialides et les métules sont également dénommées stérigmates. Les conides produites en grand nombre par les phialides donnent, à la tête conidienne, un aspect radié si les stérigmates couvrent l'ensemble de la vésicule, ou une apparence en colonne si seule la partie supérieure de celle-ci est fertile.

Chaque colonie, ayant poussé sur le milieu de Sabouraud au chloramphénicol après l'incubation, a été prélevée de sa boîte et mélangée avec une ou deux gouttes d'eau physiologique sur une jusqu' à obtenir une suspension homogène. Cette préparation a été recouverte d'une lamelle et puis examinée au microscope.

L'observation au champ microscopique de la présence de la tête aspergillaire composée d'un conidiophore, d'une vésicule, des phialides et des conidies confirme l'appartenance de la souche au genre *Aspergillus* sp.

III.2.3. Mise en culture de la souche d'*Aspergillus flavus* dans la solution nutritive de Czapek modifiée

Pour la mise en culture des souches suspectes d'*Aspergillus*, la solution nutritive de Czapek modifiée a été utilisée. Ce milieu de nutritif synthétique contient du saccharose comme seule source de carbone et du nitrate comme seule d'azote. Cette solution nutritive de Czapek a été modifiée par l'ajout de l'extrait de levure. Dans ce milieu les champignons et les levures poussent très bien alors que dans la flore

bactérienne seules les bactéries du sol, peu exigeantes, peuvent se développer. (MERCK, 1972 ; DIFCO, 1984).

Après l'observation de la tête aspergillus au microscope, Deux colonies suspectes (ayant les mêmes caractéristiques culturales) isolées dans des boîtes de petit ayant contenant chacun 250 ml du bouillon de Czapek. Les 2 Erlenmeyers ainsi inoculés ont été incubés à 37°C pendant 6 jours en fin d'observer le développement de mycélium (l' un a servi à la mise en évidence de la production d' aflatoxine et l' autre au test d' inhibition de croissance avec le mélange de deux acides).

III.2.4. Mise en évidence de la production d'aflatoxine par la souche

➤ Extraction

Après 6 jours d'incubation, la solution mère (souche d'*Aspergillus flavus* dans un Erlenmeyer de 250ml) a été agitée manuellement puis nous avons ajouté 150 ml de chloroforme (CHCL₃) pour extraire dans la phase organique toutes les aflatoxines. Deux phases ont été obtenues : la phase aqueuse et la phase organique (Chloroformique) dans laquelle l' aflatoxine est extraite. Les deux phases ont été séparées. La phase chloroformique a été concentrée par chauffage dans un bêche jusqu' à l'obtention de 2 ml de résidu (solution concentrée des aflatoxines) qui a été transvasé dans un flacon noir la conservation.

➤ Séparation par chromatographie

A l'aide d'un capillaire, 3 spots de la solution concentrée des aflatoxines ont été déposées sur une plaque chromatographique de manière équidistante sur la ligne tracée à 2 cm de la base de la plaque.

La plaque a été introduite dans une cuve chromatographique contenant l'éluant constitué d'un mélange de chloroforme / acétone/ méthanol dans les proportions 8/1/1 pour le développement.

Après quelques minutes de migration, la plaque a été retirée de la cuve et a été séchée à l'air libre la plaque séchée a révélée sous la lampe UV à 365 nm pour la détermination de la coloration des substances ayant migré qui caractérise le type d'aflatoxine.

III.2.5. test d'inhibition du développement de la souche production d'aflatoxines

1. Constitution des traitements

Pour évaluer l'effet du mélange de deux acides (acétique et propionique) sur le développement de la souche productrice d'aflatoxine, 2 séries de 4 traitements, ayant chacune un témoin, ont été constitués avec des volumes variables de deux acides pour être incubés à 30 °C et à 37°C. Les tableaux n° 2 et 3 donnent les différentes doses de deux acides utilisés.

Tableau 2 : Différentes doses de deux acides utilisées pour les 4 traitements à incubé à 30°C

Traitement	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Volume d'acide acétique	0	0,5ml	1,0ml	1,0ml	0,5ml
Volume d'acide propionique	0	0,5ml	1,0ml	0,5ml	1,0ml

Tableau 3 : Différentes doses de deux acides utilisées pour les 4 traitements à incubé à 37°C

Traitement	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Volume d'acide acétique	0	0,5ml	1,0ml	1,0ml	0,5ml
Volume d'acide propionique	0	0,5ml	1,0ml	0,5ml	1,0ml

2. Traitement avec les doses de deux acides

Huit Erlenmeyers contenant la même quantité de milieu de CZAPEK liquide (250ml) ont reçu différentes doses ou mélange d'acide acétique et d'acide propionique. Chaque Erlenmeyer a été ensuiteensemencé avec 1 ml de l'inoculum. L'incubation a été faite à la température de 37°C et de 30°C pendant 72 heures.

3. Mesure de la croissance de la souche d'*Aspergillus flavus*.

Cette mesure s'est effectuée par la pesée de la masse du mycélium formé après incubation.

Sur un papier filtre préalablement taré (P_2), le contenu de chaque traitement a été filtré, la masse de mycélium a été recueillie, séchée et pesée pour déterminer le poids (P_1) du papier et du mycélium de la souche d'*Aspergillus flavus*.

Le poids sec du mycélium est donné par la différence de $P_1 - P_2$ avec :

P_1 : poids du papier filtre + mycélium sèches.

P_2 : poids de papier filtre taré.

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSION

IV. 1. L'isolement des moisissures

De graines d'arachide moisies déposées sur les boîtes de pétri contenant le milieu de Sabouraud au chloramphénicol, après incubation à 37°C pendant 72 heures, il s'est développé quelques colonies de moisissures dont le tableau n° 4 ci-dessous décrit les caractéristiques culturales.

Tableau 4 : description des colonies des moisissures développées sur les 5 boîtes de pétri contenant le milieu de Sabouraud au chloramphénicol

Boîte de pétri	Caractéristiques culturales
1 ^{ère} Boîte de pétri	Colonie vert- jaunes à vert olive de forme Irrégulière, ayant les têtes cnidiennes bisériées
2 ^{ème} Boîte de pétri	Pas développement de colonie
3 ^{ème} Boîte pétri	Colonie brune à noire de forme circulaire, ayant le conidiophore nettement rugueux, les conidies sont subsphériques à ellipoidales
4 ^{ème} Boite de pétri	Colonie vert- jaune de forme irrégulière, ayant les phialides verdâtres, Vésicule hémisphérique
5 ^{ème} Boite de pétri	Pas développement de Colonie

Ce tableau ci- dessus montre que, sur les 5 boîte de pétri contenant le milieu de Sabouraud au chloramphénicol ayant reçu la graine d'arachide moisie, il n' y a eu développement des colonies des moisissures que sur 3 de 5 boîtes de pétri. Les colonies ainsi développées ont des caractéristiques culturales plus ou similaires.

Dans la 1^{ère} boîte de pétri, il s'est développé une colonie ayant des mycéliums jaunes avec des conidies vertes ; la colonie est irrégulière et la couleur formée par la colonie à de pétri, la colonie avait des mycéliums bruns avec des conidies noires. Cette colonie était de forme circulaire avec une coloration noire en l'envers de la boîte de pétri. Dans la 4^{ème} boîte de pétri, la colonie avait des caractéristiques similaires à la colonie développée dans la première boîte.

IV.2. la détection de la présence de tête aspergillaires des souches d'Aspergillus sp

L'observation microscopique de la préparation de ces colonies développées dans les 3 boîtes de pétri e, vue détection de la présence d'une tête aspergillaires a donné les résultats consignés dans le tableau n° 5 ci – dessous.

Tableau 5 : présence de la tête aspergillaire

Colonie issu de la boite de pétri	Présence
1 ^{ère} Boite de pétri	+
3 ^{ème} Boite de pétri	+
4 ^{ème} Boite de pétri	+

Il ressort de ce tableau n°5 qu'il existe bel bien de tête aspergillaire sur toutes les préparations observées au microscope des collines issues de 2 boites de pétri. De ce fait les 3 colonies appartiennent au genre Aspergillus caractérisée par la présence de tête aspergillaire dans leur structure microscopique.

Eu égard aux caractéristiques culturelles du tableau n° 4 et aux caractéristique microscopiques du tableau n°5, les colonies de moisissures développées sur les 3 boîtes de pétri sont les souches de la moisissure Aspergillus flavus.

IV. 3. Mise en évidence de la production des aflatoxines

La révélation de la plaque de chromatographie sous la lampe à U.V a permis d'observer la migration de 3 spots colorés en bleu. 2 photos en annexe montrent la migration de 3 spots. Tenant compte de la couleur révélée par les rayons U.V, les 3 spots montrent qu'il s'agit bien de l'aflatoxine B1.

La souche de la moisissure utilisée dans la présente étude est une souche production d'aflatoxine B1. Il s'agit de la souche d'Aspergillus flavus.

IV.4. Inhibition de la croissance d' *aspergillus flavus* par le mélange de deux acides (acide acétique et acide propionique)

Pour évaluer l'effet du mélange de deux acides sur la croissance souche d'*Aspergillus flavus*, le poids des mycéliums développés dans chaque Erlenmeyer (traitement), après filtration et séchage, a été pesé. Les tableaux n° 6 et 7 ci-dessous indiquent les différents poids des mycéliums filtrés et séchés suivant les conditions d'incubation.

Tableau 6 : poids sec du mycélium formé à 30°C d'incubation

Echantillon	P ₁ – P ₂ (g)	Poids sec (g)
T ₀	1,23-0,84	0,39
T ₁	0,99-0,84	0,15
T ₂	1,02-0,84	0,18
T ₃	0,98-0,84	0,14
T ₄	1,09-0,84	0,25

Tableau 7 : poids sec du mycélium formé à 37°C d'incubation

Echantillon	P ₁ – P ₂ (g)	Poids sec (g)
T ₀	1,21-0,84	0,37
T ₁	0,08-0,84	0,24
T ₂	1,95-0,84	0,11
T ₃	1,56-1,41	0,15
T ₄	1,03-0,84	0,19

Les résultats consignés dans le tableau n° 6 montrent qu'à la température d'incubation de 30°C, c'est le traitement T₃ s'est révélé très efficace suivi de T₁, T₂ et T₄.

Le traitement T₃ étant constitué de 1, 0 ml d'acide acétique (soit 4000ppm) et 0.5ml d'acide propionique (soit 2000 ppm) a permis une réduction du poids des mycéliums de 64% par rapport au témoin. Contrairement aux observations de KHASA(2006) selon lesquelles il a obtenu une inhibition totale de la croissance de la

souche d' *Aspergillus flavus* avec une concentration de 333.3 ppm d'acide propionique à la température d'incubation de 30°C et de IV AMI (2007) qui a obtenu une inhibition totale de la même souche avec une concentration de 200ppm d'acide acétique, la synergie de deux acides à des concentrations de 2000 à 4000 ppm n' a pas permis une inhibition totale de la croissance de la souche d' *Aspergillus flavus*.

Pour le traitement T₁; la réduction est de 62% alors que pour T₄, elle est de 36% par rapport à la croissance du traitement témoin qui n'a pas reçu les doses de deux acides.

Les résultats consignés dans le tableau n°7 montrent qu'à la température d'incubation de 37°C, c'est le traitement T₂ s'est révélé très efficace suivi de T₃, T₄ et T₁.

Le traitement T₂ étant constitué de 1, 0 ml d'acide acétique (soit 4000 ppm) et 1,0 ml d'acide propionique (soit 4000 ppm= a permis une réduction du pois des mycéliums de 70% par rapport au témoin . Contrairement aux observations de KHASA (2006) selon lesquelles il a obtenu une inhibition totale de la croissance de la souche d' *Aspergillus flavus* avec une concentration 333.3 ppm d'acide propionique à la température d'incubation de 30°C et de IV AMI (2007) qui a obtenu une inhibition totale de la même souche avec une concentration de 200 ppm d'acide acétique, la synergie de deux acides à des concentrations allant de 2000 à 4000 ppm n'a pas permis une inhibition totale de la croissance de la souche d'*Aspergillus flavus*.

Pour le traitement T₃, la réduction est de 59 % alors que pour T₁, elle est de 35 % par rapport à la croissance du traitement témoin qui n'a pas reçu les doses de deux acides.

Quelle soit la température d'incubation et les doses de deux acides acides utilisées, la combinaison de deux acides n' a pas permis une inhibition totale de la croissance de la souche d'*Aspergillus flavus* plutôt une réduction de croissance.

CONCLUSION

L'objectif du présent travail était de mettre en évidence d'effet inhibiteur du mélange de deux acides (acétique et propionique) sur la croissance d'*Aspergillus flavus* isolées des graines d'arachide moisies. Pour ce faire, les souches d'*Aspergillus flavus* productrices d'aflatoxines ont été isolées des graines d'arachide moisies. L'inhibition de leur croissance par le mélange de deux acides a été testée.

Les résultats obtenus montrent que :

- Les colonies isolées des graines d'arachide moisies caractérisées par des mycéliums colorés en jaune ou brun avec des conidies vertes ou noires et par la présence de tête aspergillaire sont des souches d'*Aspergillus flavus*.
- Ces souches d'*Aspergillus flavus* sont productrices d'aflatoxine du groupe B.
- L'inhibition de la croissance de ces souches d'*Aspergillus flavus* par le mélange de deux acides (avec les concentrations variant de 2000 à 4000 ppm) n'était pas totale mais partielle avec, pour l'incubation à 30°C, le traitement T₃ constitué de 1,0 ml d'acide acétique (soit 4000 ppm) et 0,5 ml d'acide propionique (soit 2000 ppm) comme traitement efficace avec une inhibition de 64% et, pour l'incubation à 37 °C, le traitement T₂ constitué de 1,0 ml d'acide acétique (soit 4000ppm) et 1,0 ml d'acide propionique (soit 4000 ppm) comme traitement efficace avec une inhibition de 70%.

Testé sur la croissance des souches d'*Aspergillus flavus*, aucune dose du mélange de deux acides n'a conduit à une inhibition totale. Cette inhibition est partielle.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDELLAH Z, Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries isolées des ferments panaires traditionnels, Thèse de doctorat de l'université SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH 27p.
2. DIFCO, 1984: Difco manual: dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth editions; Difco laboratories; Michigan; USA; 1155p.
3. IVAMI E, 2007: inhibition de l'Aspergillus flavus par l'acide acétique TFE, UNIKIN.39p.
4. KAMUHA M, 2005 : Effet de l'acide propionique sur le développement de l'aspergillus flavus et la production de l'aflatoxine, TFC, UNIKIN.
5. KHASA M, 2006 : effet des acides organique sur la croissance d'Aspergillus flavus par l'acide propionique , TFE, UNIKIN .34p
6. KIBUNGU, 2006 : Effet d'extrait végétique sur la croissance mycélienne d'Aspergillus et la production d'aflatoxines, TFC, UNIKIN.
7. MASIMANGO N. 1987 : Notes de cours de complément de biologie ; Faculté de médecine : université de Kinshasa.
8. MASIMANGO N. 2005 : Notes de cours de Microbiologie des aliments ; cours dispense en première grade chimie et industries agricoles ; faculté des sciences Agronomiques : université de Kinshasa.
9. MASIMANGO N. 2003 : Notes de cours de Microbiologie générales cours dispense en deuxième graduat ; faculté des sciences Agronomiques : université de Kinshasa.
10. MERCK E. ;1972 : manuel de microbiologie ; Dermestadt ;Allemagne ;44p
11. RAPPORT FINAL DE AFSSA (Agence Française de sécurité sanitaire des aliments) par CAROL ;2009 Evaluation des risques liée à la présence de mycotoxine dans les chaînes alimentaires humaines et animales.