

Extraits de caïeux d'*Allium sativum* et d'écorces racinaires de *Diospyros heterotricha* utilisés comme biopesticides pour inhiber la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus*

Pululu B.F¹, Uмба M.J², Masimango T.N.³, Badibanga D² et Nepa N.D⁴

¹Institut Supérieur Agro-Vétérinaire de Kimwenza, B.P. 3724 Kinshasa-Gombe

²Faculté de Médecine Vétérinaire, Université Nationale Pédagogique de Kinshasa, B.P. 8815 Kinshasa - Ngaliema

³Faculté des Sciences Agronomiques, Université de Kinshasa, B.P. 190 Kinshasa 11

⁴Institut Supérieur Pédagogique de Bukavu, B.P. 854 Bukavu

Email Corresponding : joachimumba@yahoo.fr

Mots clés : *Allium sativum*, *Diospyros heterotricha*, *Aspergillus flavus*, Biopesticides, Inhibition de la croissance, Milieu de culture, Acide acétique.

Key words: *Allium sativum*, *Diospyros heterotricha*, *Aspergillus flavus*, Biopesticides, Growth inhibition, Culture medium, Acetic acid.

1 RÉSUMÉ

L'étude a consisté à comparer la croissance d'*Aspergillus Flavus* dans quatre milieux de culture (Czapeck, manioc, patate douce et plantain) et d'évaluer l'action biofungicide de deux espèces végétales (*Allium sativum* et *Diospyros heterotricha*) sur la croissance. Les résultats obtenus montrent que la croissance végétative du champignon varie d'un milieu à l'autre, cependant plus rapide dans le milieu de Czapeck. Des extraits des deux plants antifongiques (*Allium sativum* et *Diospyros heterotricha*) confirment leur action inhibitrice de croissance mycélienne d'*Aspergillus Flavus*. L'inhibition végétative est comparable à celle obtenue avec l'acide acétique pour *Allium sativum*, mais pour *Diospyros heterotricha* elle s'avère moindre. L'extrait des caïeux d'*Allium sativum* conviendrait mieux pour protéger le manioc et la patate douce en stock, alors que les écorces de *Diospyros heterotricha* seront conseillées pour le plantain.

ABSTRACT

Aspergillus flavus growth been compared in four culture media: Czapeck medium, Cassava broth, Sweet potato broth and plantain broth. The biofungicide action of two vegetal (*Allium sativum* and *Diospyros heterotricha*) has been tested on the growth of *Aspergillus*. Results show that vegetative growth of the fungus varies from a medium to another, with Czapeck medium showing the highest growth. Extracts of the two antifungal plants (A. *Sativum* and D. *heterotricha*) confirmed their inhibitor action on the *Aspergillus* growth. This inhibitor activity is comparable to the one obtained with acetic acid for *Allium sativum* but lesser for *Diospyros heterotricha*. Extracts of A. *sativum* bulb would be appropriate to protect cassava and sweet potatoes in storage, while de bark of D. *hetero* will be recommended of the protection of plantain.

2 INTRODUCTION

Les aliments constituent souvent un véhicule de pathogènes ou de substances nuisibles à la santé. Les agents pathogènes contaminant les denrées alimentaires se développent suite à des négligences lors des manipulations, la conservation et la commercialisation. Les moisissures colonisent régulièrement les denrées et synthétisent des mycotoxines qui sont excrétées dans le milieu (Harley *et al*, 2003). Les toxines bien que préjudiciables à la santé du consommateur, ne présentent aucun danger pour l'hôte (Cobraz, 1990). Parmi ces mycotoxines, les aflatoxines sont les plus étudiées à cause de leurs effets nocifs sur la santé humaine et animale. En République Démocratique du Congo, *Aspergillus flavus* est l'espèce incriminée pour les mycotoxines responsables de cancer primaire de foie. Sur 10 cas observés de cette pathologie aux cliniques universitaires de Kinshasa, 7 sont causés par les aflatoxines (Masimango, 2005). Parmi les denrées consommées par les populations

congolaises, beaucoup sont souvent contaminées par l'*Aspergillus flavus* : c'est le cas de l'arachide, du manioc, du maïs, de la patate douce, du plantain et du riz (Masimango, 1987). Les aflatoxines peuvent être ingérées en consommant les denrées contaminées ou en les inhalant lors de leur manipulation pendant les différentes moutures en farine. (Masimango, 1978 et SIMBA, 2006) Le corps humain est capable de les métaboliser et de les excréter, malheureusement cette capacité est réduite chez les enfants mal ou insuffisamment nourris (de Waele et Swanelder, 2001). Les études menées récemment ont démontré que certains acides organiques tels que l'acide acétique et propionique, inhibent la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus*. En lieu et place des vertus antimycosiques ont retenu notre attention pour lutter contre *Aspergillus flavus*. Deux espèces ont fait l'objet de l'étude, il s'agit d'*Allium sativum* et *Diospyros heterotricha*.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Matériel végétal : Cinq espèces végétales ont été engagées dans expérimentation: *Diospyros heterotricha* (Photo 1): est une ébénacée tropicale, spontanée dans les formations forestières du Kongo Central en R.D.Congo et de l'Angola (Pauwels, 1993). L'espèce est timidement en voie de domestication. Ses racines sont utilisées comme

brosses à dents. L'espèce est dotée des vertus fongicides et bactéricides. Certaines espèces de ce genre sont utilisées dans la fabrication de dentifrice (Rukangira, 2006). PARIS *et al* (1949) ont parlé du pouvoir antimicrobien et de la présence du plumbagol chez *Diospyros xanthochamys* et *Diospyros mespiliformis*.



Photo 1 : source (Pauwels, 1993).

Allium sativum (Photo 2): est une alliaceée à nombreux usages thérapeutiques (bactéricide, antimycosique, vermifuge, etc.), et très prisée dans la cuisine congolaise. Originnaire d'Asie centrale, sa hampe florale peut atteindre 70 cm de haut (Siiauenberg et Paris, 1977). La partie consommée, le bulbe qui compte plusieurs

caïeux, est fixé sur le plateau, d'où partent les racines (Clement, 1981). Toute la plante contient une huile essentielle à action antibiotique, composé d'allacine de sulfide, de diallyle, d'une enzyme : allinase, des vitales A1, B1, B3 et de nicolyamide (Shaunenberget Paris, 1977).



Photo 2 source: (Clement, 1981). **Photo 3** source : (Demol, 2003)

Manihot esculenta (Photo 3) : est une euphorbiacée jouant un rôle stratégique en R.D.Congo par le fait qu'il constitue l'aliment de base de la grande fraction de la population et compte parmi les denrées les plus vendues. Cette euphorbiacée originaire d'Amérique tropicale (Silvestre et Arraudeau, 1983), est cultivée pour ses tubercules et ses jeunes feuilles. Les feuilles de manioc sont riches en protéines et sels minéraux (Janssens, 2001). Les cosettes utilisées pour faire la farine sont souvent colonisées par des moisissures dont *Aspergillus flavus* et *Penicillium* sp.

Musa paradisiaca (Photo 4): est une musaceae constituant l'aliment de base d'une bonne fraction de la population congolaise. Cette espèce compte aujourd'hui en Afrique plus de 119 cultivars (Swennen et Vuylsteke, 2001). Originnaire de l'Asie, le plantain, herbe vivace de 1,5 à 6m de hauteur donne un fruit comestible susceptible d'être colonisé par *Aspergillus flavus*. Les cendres issues de la transformation des épluchures de fruits transformés sont utilisées comme sel dans l'alimentation ou comme produit thérapeutique en médecine traditionnelle.



Photo 4 source : (Swennen et Vuylsteke, 2001).

Ipomoea batatas (Photo 5) : est une convolvulaceae vivace, originaire d'Amérique centrale (Vendenput, 1981). La patate douce cultivée proviendrait d'*Ipomea trifida* (Janssens, 2001 et Demol, 2003) et compte parmi des aliments de base en R.D.Congo. Elle est

cultivée pour ses tubercules consommés comme légume. Ses tubercules sont hôtes de la moisissure *Aspergillus flavus*. Cette plante est aussi dotée des vertus thérapeutiques ; ses tubercules sont utilisés contre la constipation et ses feuilles prises contre la diarrhée.



Photo 5 source : (Janssens, 2001 ; Demol, 2003)

3.1.1 Milieux de culture : Quatre milieux de culture ont été utilisés : un milieu synthétique, milieu de Czapeck et trois milieux empiriques préparés à base des extraits des tubercules de manioc, de patate douce et de plantain.

3.1.2 Souche d'*Aspergillus flavus* : La souche utilisée est d'origine américaine, identifiée par le n° 10124 de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elle est productrice d'aflatoxine Bl.

3.2 Methodes

3.2.1 Préparation du milieu de Czapeck liquide : Les différents ingrédients sont dissous dans de l'eau distillée. Le mélange obtenu est porté à l'ébullition jusqu'à l'homogénéisation. Le milieu est ensuite réparti dans les erlenmeyers et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes.

Tableau 1 : La composition du milieu est la suivante :

Na N03	3g
KNHN04	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05g
KCl	0,5g

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
Saccharose	100g
Extrait de levure	2g
Eau distillée	1000ml

3.2.2 Préparation des milieux aux extraits des tubercules de manioc, de patate douce et de plantain :

Déarrassé du phelloderme, de l'écorce ou de l'épicarpe, 20g de tubercule ou de mésocarpe de chaque espèce utilisée, sont découpés en petits morceaux portés à l'ébullition jusqu'au ramollissement. Après ébullition dans 1000ml d'eau diluée, les extraits sont récupérés et le volume réajuste à 1000ml en ajoutant de l'eau distillée. Les milieux sont répartis ensuite dans des erlenmeyers à raison de 150ml, avant d'être stérilisés à 120°C pendant 15 minutes. La composition des milieux à base d'extraits végétaux est la suivante : Tubercules ou fruits : 20g
 Eau distillée : 1000ml

3.2.3 Préparation des extraits de plantes fongicides : Les caïeux d'*Allium sativum* (30g) et les écorces de *Diospyros heterotricha* (12 g) sont désinfectés à l'alcool éthylique à 70% pendant 3 minutes et ensuite rincés à l'eau distillée. Chaque espèce végétale est introduite dans 60ml d'eau distillée et stérile, et est ensuite broyée au mixeur. Le mélange obtenu est filtré, le filtrat sert au traitement des milieux manioc, aux extraits de patate douce et plantain préalablement inoculés d'*Aspergillus flavus*.

3.2.4 Préparation et ensemencement de l'inoculum : L'inoculum est préparé en ensemencant le milieu de Czapeck liquide avec la souche ATCC qu'on laisse développer pendant 48 heures. Les milieux aux traits de manioc, patate douce et plantain sont infectés à raison de 1ml d'inoculum.

3.2.5 Traitement aux extraits végétaux et à l'acide acétique : Les erlenmeyers contenant les milieux aux extraits de manioc, patate douce, plantain et Czapeck déjà inoculés par des conidies d'*Aspergillus flavus*, sont ensuite traités aux extraits des caïeux d'ail, des écorces de *D. heterotricha* (3ml), et à l'acide acétique à 98,9% à raison de 1ml dans 150ml de milieu. Les inoculum ainsi traités sont déposés pendant 14 jours dans un endroit où la température ambiante oscille entre 30 et 37°C.

3.2.6 Pesée de mycélium : Les contenus des différents erlenmeyers traités aux extraits végétaux et à l'acide acétique, et dans lesquels se développe la moisissure, sont filtrés après 14 jours d'incubation. Le mycélium de chaque erlenmeyer est mis à l'étuve à 80°C pour le séchage, jusqu'à poids constant.

4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 Croissance d'*Aspergillus flavus* dans différents milieux de culture utilisés : Les données consignées dans le tableau 1 montrent que la croissance mycélienne varie selon le milieu. Le développement de l'appareil végétatif

de la moisissure évolue selon l'ordre décroissant suivant : Czapeck, plantain, patate douce et manioc. La différence observée peut s'expliquer par la variation de la composition de chaque milieu et peut être aussi par le pH.

Tableau 2 : Croissance mycélienne dans différents milieux de culture (Poids en g)

Traitements	Repetitions		Moyenne (G)
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	
Czapeck	1,71	1,18	1,445
Manioc	0,03	0,02	0,025
Patate douce	0,06	0,04	0,05

Plantain	0,09	0,08	0,085
----------	------	------	-------

4.2 Effet des extraits végétaux sur la croissance mycélienne en milieu Czapeck :

Les résultats consignés dans le tableau II, montrent que la croissance mycélienne, appréciée par le poids sec du mycélium après 14 jours de culture, varie entre 0,110 et 0,806 g. Parmi les extraits végétaux expérimentés, l'ail présente une très bonne action antimycosique, il inhibe la croissance du mycélium en % le poids sec. L'extrait de *D. heterotricha*, par

contre, semble favoriser le développement de l'appareil végétatif de la moisissure : le poids sec du mycélium mesuré est supérieur au témoin. Après avoir mené les essais de la croissance mycélienne dans Czapeck, traité aux extraits végétaux antimycoses, ce milieu synthétique a été remplacé par les extraits de plantain, manioc et patate douce pour se rapprocher des conditions naturelles de ces denrées.

Tableau 3 : Poids sec de mycélium récolté après 14 jours dans le milieu Czapeck d'extraits végétaux (Poids en g)

Traitements	Repetitions			Moyenne (G)
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	
Acide acétique	0,14	0,15	0,17	0,153
<i>Allium sativum</i>	0,09	0,13	0,11	0,110
<i>Diospyros heterotricha</i>	0,83	0,89	0,70	0,806
Témoin	0,64	0,61	0,59	0,613

Tableau 4 : Poids sec mycélien récolté après 14 jours en milieu plantain traité aux traits végétaux (Poids en g)

Traitements	Repetitions			Moyenne (G)
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	
Acide acétique	0,03	0,06	0,02	0,036
<i>Allium sativum</i>	0,05	0,05	0,06	0,053
<i>Diospyros heterotricha</i>	0,03	0,04	0,01	0,026
Témoin	0,16	0,13	0,13	0,14

4.3 Effet des extraits végétaux sur la croissance mycélienne en milieu plantain :

Les valeurs enregistrées sur la croissance mycélienne en milieu plantain oscillent entre 0,026 et 0,14g (tableau 4). L'extrait de *Diospyros heterotricha* s'est révélé efficace dans l'inhibition de la moisissure que l'ail et l'acide acétique. Ces résultats montrent bien que la composition du milieu peut influencer l'efficacité d'un produit

antimycosique. L'efficacité de l'extrait de l'ail et de l'acide acétique semble ne pas être influencée par les milieux ; en effet leur inhibition mycélienne ne varie beaucoup en milieu plantain et Czapeck. La croissance de l'appareil végétal d'*Aspergillus flavus* est très lente dans l'extrait de banane plantain que dans le Czapeck.

Tableau 5: Poids sec du mycélium récolté après 14 jours en milieu patate douce traité aux extraits végétaux (Poids en g)

Traitements	Repetitions			Moyenne (G)
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	

Acide acétique	0,02	0,01	0,00	0,01
<i>Allium sativum</i>	0,02	0,08	0,02	0,04
<i>Diospyros heterotricha</i>	0,09	0,07	0,02	0,06
Témoin	0,34	0,35	0,30	0,33

4.3 Effet des extraits végétaux sur la croissance mycélienne en milieu extrait de patate douce : Dans le milieu aux extraits de patate douce, c'est le traitement à l'extrait d'*Allium* qui se montre le moins efficace dans l'inhibition de la croissance du champignon. Ce milieu se montre moins inhibiteur aux deux

autres : le poids sec du mycélium atteint 0,33g (tableau IV), alors que dans les deux autres (manioc et plantain) il est de 0,14g. Les résultats obtenus montrent que l'efficacité d'un extrait végétal à action antimycose peut être influencée par le milieu dans lequel la moisissure est cultivée.

Tableau 6 : Poids de mycélium récolté après 14 jours en milieu traité aux extraits végétaux (Poids en g)

Traitements	Repetitions			Moyenne (G)
	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	
Acide acétique	0,03	0,02	0,03	0,026
<i>Allium sativum</i>	0,03	0,02	0,02	0,023
<i>Diospyros hétérotriche</i>	0,03	0,03	0,05	0,036
Témoin	0,08	0,19	0,16	0,14

4.4 Effet des extraits végétaux sur la croissance mycélienne en milieu manioc : L'expérimentation révèle que la moisissure croît très lentement sur l'extrait de manioc. L'extrait des caïeux de l'ail inhibe mieux la croissance

mycélienne que l'acide acétique et *Diospyros heterotricha* (tableau 6) dans le milieu manioc. L'extrait de *Diospyros heterotricha* est le moins efficace, alors qu'il s'est avéré meilleur en milieu aux extraits de plantain.

5 CONCLUSION

La présente étude avait pour objectif d'apprécier l'action fongicide des extraits végétaux sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus*, une moisissure qui colonise la plupart des denrées alimentaires congolaises de premier ordre, tels que le manioc, le maïs, le plantain, la patate douce, l'arachide, et qui peut y excréter ses métabolites, les aflatoxines. Pour ce faire, la souche ATCC 1024 d'*Aspergillus flavus* sectionnée aux États-Unis d'Amérique pour sa production d'anaflatoxines, a été utilisée. L'action antifongique des extraits d'*Allium sativum* et *Diospyros heterotricha* vis-à-vis de cette souche a été évaluée, la culture de la moisissure a été faite dans quatre milieux différents : le milieu de Czapeck et aux extraits

de manioc, de plantain et de patate douce. L'incubation a été faite à l'étuve à la température de 27°C pendant 14 jours. Le mycélium récolté, puis séché a permis d'apprécier l'action antimycosique des extraits végétaux vis-à-vis d'*Aspergillus flavus*. Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne, varie d'un milieu à un autre. En culture pure, le milieu le plus favorable au développement de la moisissure est le Czapeck, dans lequel le poids sec mycélien est le plus élevé. Parmi les extraits végétaux, la patate douce s'avère plus favorable à la croissance de la moisissure. En effet, le développement mycélien est plus faible dans les autres milieux, manioc et plantain. Les deux extraits végétaux

aux vertus antimycosiques expérimentés inhibent la croissance mycélienne, à en juger par la mesure du mycélium prélevée après 14 jours de culture. L'extrait de caïeux d'Album sativum exerce une action inhibitrice plus marquée sur la croissance mycélienne du champignon. L'extrait de *Dispyros heterotricha*, une espèce exploitée pour sa richesse en substances antimicrobiennes, a présenté une action inhibitrice plus faible que celle d'*A. sativum*. Il est possible d'améliorer son action antifongique en augmentant la dose de traitement. En effet, la comparaison de l'action des deux extraits ne peut se faire sur base ses présents résultats étant donné la différence de poids de matière première engagée dans l'essai

(30g d'*A. sativum* contre 12g de *D. heterotricha*). Les résultats obtenus sont très encourageants et méritent une étude plus approfondie. Les deux extraits végétaux expérimentés qui inhibent la croissance mycélienne, peuvent aussi avoir le même effet sur la synthèse des aflatoxines produites par la même moisissure. Ceci ouvre également une nouvelle piste de recherche. En l'absence de fongicides chimiques, l'agriculteur congolais peut donc disposer d'une méthode de lutte simple, économique et n'ayant pas d'effets néfastes sur la santé humaine, en utilisant les extraits des plantes comestibles aux vertus antimycosiques comme biopesticides pour lutter contre *Aspergillus flavus*.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Clement J.M (1981), Larousse agricole, Larousse, Paris, 1207 p.
- Cobraz R. (1990), Principes de phytopathologie, P.P.U.R., Lausanne, 286 p.
- De Waele D. et Swanevelder C. (2001); Arachide dans Agriculture en Afrique Tropicale, DGCI, Bruxelles, 767-785 pp.
- Demol J. (2003), Amélioration des plantes, les presses agronomiques de Gembloux, Gembloux, 518 p.
- Herley J.P., Kleind A. Et Prescott L. (2003), Microbiologie, de Boeck et Larder, Bruxelles, 1014 p.
- Jenssen M. (2001), Manioc dans l'agriculture en Afrique tropicale, D.G.C.I, Bruxelles, 194 – 218 pp.
- Masimango N.T (1978) Contribution à l'étude de la production de l'aflatoxine B1 par l'*Aspergillus flavus* Link – Lutte contre la présence de cette toxine dans certaines denrées, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques d'Etat, Gembloux-Belgique 222p
- Masimango N.T (1987), Complément de biologie, UNIKIN, Inédit, Kinshasa 46 p.
- Masimango N.T (2005), Questions spéciales des industries agro alimentaires : Aflatoxines, Facultés des Sciences Agronomiques, Inédit, Kinshasa, 40 p.
- Paris R. et Mdyse Mignon H. (1949), Pouvoir antimicrobien et présence de plumbagol chez deux *Diospyros* africains (*D. xanthochlamys* et *D. mespiliformis*), C.R. Sean. Acad. Sci., Paris, 228, 26. 2063 – 2064 pp.
- Pauwels L (1993), Nzayilu N'ti, Guide des arbres et arbustes de la région de Kinshasa-Brazzaville, JBNB, Meise, 495 p.
- Rukangira E. (2001), African herbal indus constraints and challenges, Inédit, 22 p.
- Schaenberg P. Et Paris F. (1977), Guide de plantes médicinales, Declachaux et Niestle, Paris, 396 p.
- Simba Amina M (2006) Effet de l'acide propionique sur la croissance mycélienne et la production des aflatoxines d'*Aspergillus flavus*, Mémoire de Licence en Biologie animale / Institut Supérieur Pédagogique (ISP)- Gombe, RDCongo, 25 p, inédit
- Sylvestre P. Et Arraudeau M. (1983), Manioc, Maison neuve et Larousse, Paris, 262 p.



- Swennen R. et Vuylsteke D. (2001), Bananier,
dans Agriculture en Afrique Tropicale,
DGCI, 611-636 pp.
- Vandenput R., (1981), Les principales cultures
en Afrique tropicale, AGCD, Bruxelles,
1245 p.