

Effet de wavé-fortex, un phyto-alicament naturel, sur la croissance de trois espèces d'Aspergillus au Gabon

*¹Alexis Nicaise LEPENGUE, ¹Ephrem NZENGUE, ²Alain SOUZA, ¹Bertrand MBATCHI

¹ Laboratoire de Physiologie végétale et Phyto-alicaments ; Département de Biologie ; Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM). Franceville, Gabon.

² Laboratoire de Physiologie Animale-Pharmacologie ; Département de Biologie ; Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM). Franceville, Gabon. E-mail: souzapg@yahoo.fr

E-mail: lepengue_nicaise@yahoo.fr ; Tel 07684362 / 06764738; E-mail: brandtbertachi@hotmail.com

Original submitted in on 24th July 2019. Published online at www.m.elewa.org/journals/ on 30th September 2019
<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v14i1.6>

RÉSUMÉ

Objectif : Ce travail a pour objectif d'étudier l'activité antifongique d'un complément alimentaire gabonais Wavé-fortex un mélange de poudres de 24 plantes locales de formulation codée et brevetée, sur 3 espèces fongiques responsables des dégradations de plusieurs aliments en conservation. Ces champignons sont: *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* et *A. flavus*.

Méthodologie et Résultats : Les tests de sensibilité fongique ont été réalisés sur des milieux nutritifs PDA contenant des concentrations de 1%, 3% et 5% de cet alicament. Les inhibitions de croissance ont été calculées après 6 jours d'incubation. Les résultats ont montré que les 3 concentrations de Wavé-fortex ont significativement inhibé la croissance des 3 champignons testés. Ces inhibitions toutes supérieures à 75% étaient proportionnelles aux doses du complément alimentaire constituées. Les légères différences de sensibilité notées entre les champignons vis-à-vis d'un même traitement n'ont pas été significatives au seuil de 5%.

Conclusions et application des résultats : Le complément alimentaire Wavé-fortex contient des principes antifongiques dans sa formulation. Il peut donc être utilisé dans la lutte antifongique contre les détériorations alimentaires occasionnées par les champignons *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* et *A. flavus*.

Mots clés : Aliments ; Aspergillus ; Phyto-alicament ; Wavé-fortex ; Antifongique.

ABSTRACT

Objective: This work aims to study the antifungal activity of a food supplement Gabon Wavé-fortex a mixture of powders of 24 local plants coded and patented formulation, on 3 fungal species responsible for the degradation of several foods in conservation. These fungi are: *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* and *A. flavus*.

Methods and Results: The fungal susceptibility tests were performed on PDA nutrient media containing 1%, 3% and 5% concentrations of this product. Growth inhibitions were calculated after 6 days of incubation. The results showed that the 3 concentrations of Wavé-fortex significantly inhibited the growth of the 3 fungi

tested. These inhibitions, all greater than 75%, were proportional to the doses of the dietary supplement constituted. The slight differences in sensitivity noted between the fungi with respect to the same treatment were not significant at the 5% level.

Conclusions and application of results: Wavé-fortex food supplement contains antifungal principles in its formulation. It can therefore be used in the antifungal fight against food deterioration caused by fungi *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* and *A. flavus*.

Keywords: Food; *Aspergillus*; Phytomedicine; Wavé-fortex; Antifungal.

INTRODUCTION

Selon la FAO, plus de 10 millions de fruits et légumes récoltés chaque année périssent en raison des méventes ou des problèmes de conservation (Gustavsson *et al.*, 2012). La détérioration des aliments en conservation est essentiellement liée à 3 causes : les chocs mécaniques, les dégradations biochimiques et les attaques microbiologiques (Engström et Carlsson-Kanyama, 2004). Les causes mécaniques concernent les chocs infligés aux denrées durant la récolte, le transport ou les conditions de stockage (Thompson, 1996). Les aléas biochimiques impliquent les oxydations enzymatiques, notamment les enzymes de la chaîne de respiration qui accélèrent la dégradation des denrées. Les attaques microbiologiques constituent les atteintes les plus graves, et découlent de l'action de divers microorganismes pathogènes, notamment les virus, les bactéries et les champignons microscopiques (Beuchât, 1996). Ces agents microbiens proviennent de différentes sources de contamination, notamment les champs de récolte, les emballages de transport, l'environnement de stockage, les manipulations humaines etc. (Griffin *et al.*, 2009). Nombreux de ces microorganismes sont pathogènes et sécrètent des toxines susceptibles d'affecter l'homme. C'est le cas des aflatoxines (B₁, B₂, G₁ et G₂) sécrétées par *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* ; de la citrine et l'ochratoxine de *Penicillium* sp., ou de la T-2 Trichothecène et du nivalénol sécrétés par *Fusarium* sp. dont les effets toxiques ont déjà été rapportés sur plusieurs humains et animaux en

Inde (Ravi Babu *et al.*, 2011 ; Rajarajan *et al.*, 2013). Au Gabon, quelques études prospectives ont confirmé la présence de plusieurs microorganismes sur les denrées alimentaires dans les conditions de mauvaise conservation tant au marché que dans les restaurants ou les cuisines domestiques (Lépengué *et al.*, 2012). A défaut de les détruire, certains vendeurs ou consommateurs les stérilisent par traitement à l'aide des solutions chimiques telles que l'hypochlorite de potassium (KPO₄), ou l'eau chlorée, faiblement concentrées (Lépengué *et al.*, 2012). Mais compte tenu de la rémanence potentielle de ces composés et les conséquences possibles sur la santé des consommateurs, les alternatives de traitements naturels des denrées s'avèrent nécessaires. C'est dans ce cadre que se situe l'élaboration du présent travail. Il vise à étudier l'action d'un complément alimentaire local, "Wavé-fortex" sur la croissance mycélienne de 3 souches fongiques d'*Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus* de la famille des Trichocomaceae) couramment rencontrées sur les aliments en conservation au Gabon. Wavé-fortex est une poudre alimentaire formulée à partir de 24 plantes sauvages du Gabon et brevetée par l'Organisation Africaine de la propriété Intellectuelle (OAPI). L'hypothèse de travail suggère que Wavé-fortex renfermerait des propriétés antifongiques susceptibles d'être utilisés dans la lutte contre les pourritures des denrées en conservation.

MATERIEL ET METHODES

Matériel : Le matériel de cette étude est constitué de la poudre de Wavé-fortex, un complément alimentaire

homologué par le Conseil Africain et Malgache pour l'Enseignant Supérieur (CAMES), et breveté (Code

1201600267-OAPI) par l'Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle (OAPI). Il comprend aussi trois souches fongiques, à savoir *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus* de la famille des Trichocomaceae.

Méthodes

Préparation des milieux de culture : Les milieux de culture amendés en complément alimentaire Wavé-fortex ont été préparés suivant les techniques proposées par Lépengué *et al.* (Lépengué *et al.*, 2013). Pour cela, 100 g de poudre (fourni par le Laboratoire des Phyto-alicaments de l'USTM) de ce produit ont été dissouts dans 100 ml d'eau distillée stérile, et homogénéisés par agitation à l'aide d'un agitateur magnétique (IKA RO-10; EA) pendant 10 minutes. La solution-mère (de concentration 1 g/ml) a été obtenue après filtration du produit sur un filtre millipore de 0,22 µm de diamètre, sous la hotte à flux laminaire (Gemini Steril SPA, 14113; Italie). Pour préparer les milieux de culture amendés en Wavé-fortex aux concentrations de 1%, 3% et 5%, des volumes respectifs de 1 ml, 3 ml et 5 ml de la solution-mère ont été transférés dans 3 fioles jaugées, et complétés à 100 ml avec les solutions liquides PDA en surfusion (Lépengué *et al.*, 2013). Après agitation manuelle sous la hotte, les milieux homogénéisés ont été coulés dans des boîtes de pétri de 12 cm de diamètre. Une série de boîtes de pétri non amendées, contenant uniquement des milieux PDA ont également été préparées pour servir de témoins.

Inoculation des milieux et mesure des croissances fongiques : Les trois (03) souches de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus* proviennent de la mycothèque du Laboratoire de Phytopathologie de l'USTM. Pour chaque espèce, une

solution sporale de concentration 10² spores/ml a été préparée (Lépengué *et al.*, 2013). Un (1) ml de chaque solution a été ensemencé sur un milieu solide PDA, par la technique d'étalement, pour permettre la germination isolée des spores fongiques. Après 24 h d'incubation, chaque spore en germination a été prélevée à l'aide d'une aiguille lancéolée flambée, et repiquée dans différentes boîtes de pétri (essais et témoins) en condition aseptique. Pour chaque espèce fongique, 4 boîtes de pétri (3 essais et 1 témoin) ont été ensemencées par traitement. Ce qui correspond à 12 boîtes de Pétri pour les trois souches fongiques, et 36 unités pour les 3 répétitions. La croissance fongique a été mesurée après 6 jours de culture à l'étuve à la température fixe de 25 °C. La technique consistait à mesurer à l'aide d'une règle graduée, le diamètre mycélien des champignons suivant 2 axes perpendiculaires tracés au dos des boîtes de pétri (Lépengué *et al.*, 2013). Pour chaque traitement, la croissance mycélienne a correspondu à la moyenne des 3 boîtes de Pétri. Les inhibitions de croissance (IC) occasionnées par les différents amendements ont été calculées à partir des croissances des boîtes essais (Ce) et témoins (Ct), selon la formule suivante :

$$IC = \frac{Ce - Ct}{Ct} \times 100$$

Analyses statistiques : Les analyses statistiques ont été réalisées avec un Logiciel Statistica 6.8. En cas de différence de croissance mycélienne, les tests comparaisons multiples de Newman-keuls ont été utilisés au seuil de 5 %, pour déterminer la significativité.

RESULTATS

Les résultats de cette étude sont présentés aux figures 1 et 2. Leur analyse a révélé que tous les milieux de culture amendés en solution de Wavé-fortex ont induit des réductions de croissance mycélienne des 3 champignons étudiés. Ces réductions sont proportionnelles aux concentrations de l'alicament dans le milieu de culture. Les réductions les plus légères ont été observées au niveau des milieux de concentration 1% de Wavé-fortex, et les plus sévères dans les substrats de concentration 5%. Ces réductions sévères sont caractérisées par une absence totale de croissance mycélienne. Chez *Aspergillus fumigatus* par exemple, les réductions de croissance dans les trois milieux concentrés à 1%, 3% et 5% ont respectivement

été de 78%, 89% et 100%. L'analyse statistique a montré que les réductions induites par chaque milieu amendé en Wavé-fortex étaient significatives au seuil de 5%. Les résultats de cette étude ont également révélé qu'à de faibles concentrations de 1% et 3% de Wavé-fortex, les 3 champignons (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus*) présentaient de légères différences de sensibilité vis-à-vis d'un même milieu de culture. Ainsi, le champignon le plus sensible a été *Aspergillus nidulans*, avec des réductions de croissance de 85% et 93% aux concentrations respectives de Wavé-fortex de 1% et 3%. L'espèce *Aspergillus flavus* a, quant à elle, présenté la plus faible sensibilité avec des taux de

réduction respectifs de 80% et 89%, pour les concentrations des milieux de 1% et 3%. Malgré ces différences, l'analyse statistique n'a pas décelé des

différences de sensibilité significatives entre les 3 champignons au phytoalicament Wavé-fortex, au seuil de 5%.

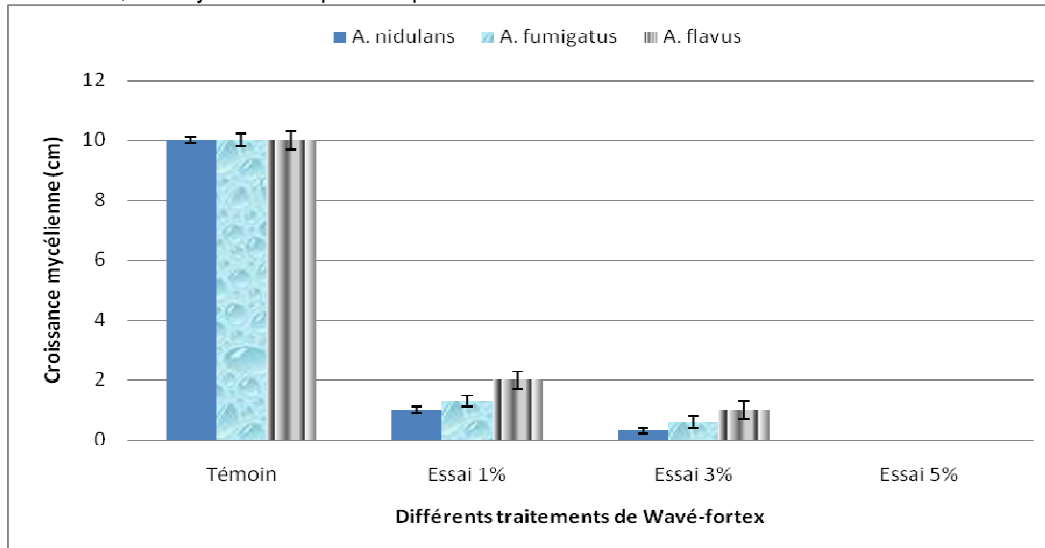


Figure 1 : Croissance mycélienne de 3 souches d'*Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* et *A. flavus*) sur des milieux de culture solides PDA amendés en différentes concentrations de Wavé-fortex.

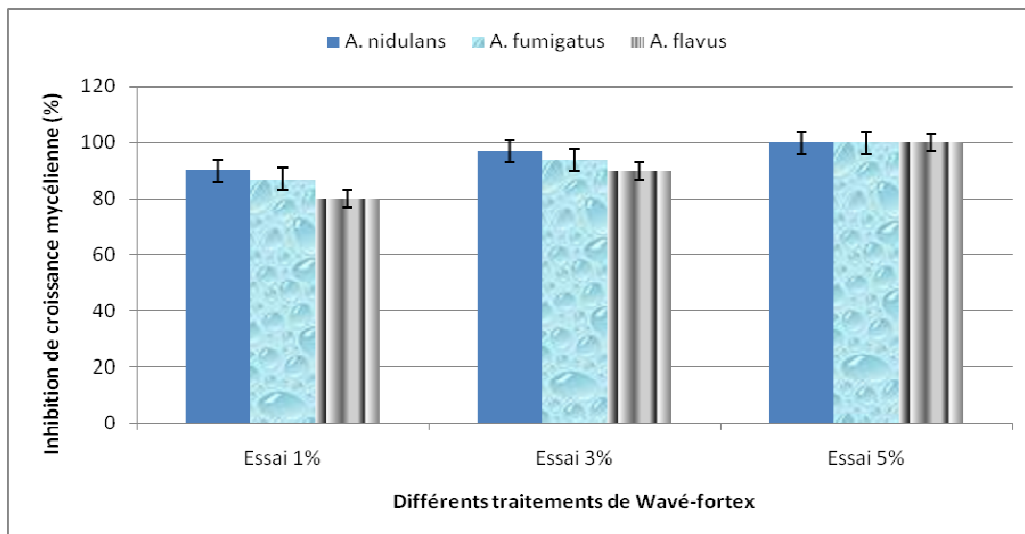


Figure 2 : Inhibition de la croissance mycélienne de 3 souches d'*Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* et *A. flavus*) par différents traitements de Wavé-fortex, en laboratoire.

DISCUSSION

Les résultats de cette étude ont montré que les 3 concentrations de Wavé-fortex (1%, 3% et 5%) induisaient des réductions de croissance mycélienne des 3 souches fongiques d'*Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* et *A. flavus*). La concentration de 5% a présenté un effet fongicide en inhibant totalement la croissance des 3 champignons. Ces résultats

suggèrent que l'alicament Wavé-fortex contient des composés antifongiques ; Ce qui est en accord avec les travaux de Lépengué *et al.* (2016) qui ont rapporté la présence de plusieurs molécules antimicrobiennes dans la formulation de Wavé-fortex. C'est le cas de la diosgénine, de la solanine et de l'allicine (Lépengué *et al.*, 2016). La diosgénine est en effet un saponoside

rencontré dans plusieurs espèces d'ignames (*Dioscorea nipponica*, *D. alata*, *D. opposita*, *D. deltoidea*; *D. vilosa*...) et qui ont une action antimicrobienne étendue tant au niveau des bactéries qu'à celui des champignons et des virus. Son action antibiotique a notamment été rapportée sur *Staphylococcus aureus* (Francis *et al.*, 2002). Le principe d'action de cette molécule reposerait, comme la plupart des saponosides sur le dérèglement de la perméabilité membranaire, par complexification du cholestérol des membranes des cellules fongiques ou bactériennes (Marjan et Hossein, 2008). La solanine est un glyco-alcaloïde responsable de la saveur amère de nombreuses plantes sauvages ou domestiques d'aubergine (*Solanum melongena*; *S. aethiopicum*...; Solanaceae) (Guignard, 1996). De nombreux effets fongiques ou fongistatiques ont notamment été rapportés sur *Fusarium oxysporium* f. sp. *albedinis*, *Phytophthora capsicii* (Amraoui *et al.*, 2005; Boulenouar *et al.*, 2008) et *Pseudomonas aeruginosa* (Makkar *et al.*, 2007). Son mécanisme d'action n'est pas encore clairement détaillé. Mais de nombreux auteurs suggèrent la destruction des cellules hôtes par fixation de cette molécule sur la membrane mitochondriale des microorganismes envahisseurs. Des résultats similaires ont été rapportés également sur les bactéries Gram⁺ ainsi que sur les champignons de *Aspergillus flavus*, et de *Candida albicans* (Schmelzer *et al.*, 2008). L'allicine est un composé organo-sulfuré rencontré dans les feuilles et les bulbes de *Allium cepa* et *A. sativum* (Alliaceae) deux aliments constitutifs de Wavé-fortex (Lépengué *et al.*, 2018). Cette molécule présente un

CONCLUSION

Les analyses des activités microbiennes de Wavé-fortex ont montré que cet alicament renfermait des propriétés fongicides révélées sur 3 souches de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus*. Au delà des propriétés nutritives de ce complément alimentaire conseillé dans le cadre des

spectre d'action large, tant au niveau microbiologique qu'entomologique (Lozano *et al.*, 2000). En effet, de nombreuses actions insecticides et nématicides de cette molécule ont déjà été notées sur plusieurs amibes et nématodes (Sealy *et al.*, 2007). Les travaux de Lozano *et al.* (2000) et de Saniewska (1995) ont également rapporté plusieurs effets fongicides et antibiotiques de cette molécule sur de nombreuses souches de champignons (*Botrytis allii*, *Sclerotium cepivorum*, et *Stagonospora curtisii*) et de bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Erwinia carotovora*). Le mécanisme d'action de cette molécule paraît lié aux changements des profils lipidiques des membranes des cellules microbiennes cibles (Lozano *et al.*, 2000). Les actions fongicides de Wavé-fortex sur les différentes souches d'*Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus flavus*) pourraient provenir de l'action potentielle d'au moins l'une de ces molécules précitées, contenues dans les aliments constitutifs de ce phytoalicament. D'autres composés, notamment les éléments minéraux (fer, calcium, magnésium, zinc) présents en grandes quantités dans cet alicament (Lépengué *et al.*, 2018) pourraient également créer un effet de toxicité vis-à-vis de ces trois champignons. En effet, de nombreux travaux ont montré que certains champignons étaient très sensibles aux accumulations minérales (Giller *et al.*, 1998; Kabata-Pendias et Pendias, 2001). C'est le cas des bactéries du genre *Rhizobium* (*R. leguminosarum*; *R. phaseoli*; *R. meliloti*) au zinc (Saniewska, 1995).

malnutritions et carences alimentaires humaines, Wavé-fortex pourrait également servir dans la lutte biologique antimicrobienne. Il pourrait entre autre servir à l'élimination de certaines souches du genre *Aspergillus* responsables de la détérioration de nombreux aliments en conservation.

BIBLIOGRAPHIE

- Amraoui H., Lazrek H. & Sedra M., 2005. Chromatographic Characterization and Phytotoxic Activity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and Saprophytic Strain Toxins. *Journal of Phytopathology*, 153 (4): 203-208.
- Beuchât LR., 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59(2) :204-216.
- Boulenouar N., Marouf A. & Cheriti A., 2008. Effect of Some Saharian Medicinal Plant Extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. 3^e Symposium international sur les plantes médicinales et aromatiques (SIPMA 3) & 1^{er} Congrès International sur les Molécules Bioactives (CIMB 1), Oujda 29-30 Mai 2008, Morocco.

- Engström R. & Carlsson-Kanyama A., 2004. Food losses in food service institutions. Examples from Sweden. *Food Policy*, 29 : 203-213.
- Francis G., Kerem Z. & Harinder PS., 2002. The biological action of saponins in animal systems. *British Journal of Nutrition*, 88; 587-605
- Giller KE., Witter E. & Grath SP., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganism and microbial processes in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.*, 3 : 1389-1414
- Griffin M., Sobal S. & Lyson TA., 2009. An analysis of a community food waste stream. *Agric Hum Values*, 26 : 67- 81.
- Guignard J L., 1996. Biochimie végétale. Éditions Masson, Paris, 255 p.
- Gustavsson J., Cederberg C. & Sonesson ULF., 2012. Pertes et Gaspillages alimentaires dans le monde : Ampleur, causes et prévention. Rapport du Congrès International Save Food dans le Monde. Interpack, Düsseldorf, Allemagne, 41 p.
- Kabata-Pendias A. & Pendias H., 2001. Trace elements in soils & plants. CRC Press, London, 356 p.
- Lépengué AN., Mouaragadja I. & Dick E., 2012. Essai d'amélioration de la durée de conservation des aubergines aux températures ambiantes au Gabon. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 6(2): 792-798.
- Lépengué AN., Souza A. & Ibrahim B., 2013. Effets de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae) et de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) sur la croissance de *Phoma sabdariffae* (Phomaceae) au Gabon. *Phytothérapie*, 11:130-133
- Lépengué AN., Souza A. & Yala JF., 2016. Etude de quelques caractéristiques physicochimiques et biochimiques de Wavé-fortex un complément alimentaire naturel du Gabon. *European Scientific Journal*, 12 (33) 508-520.
- Lépengué AN., Yala JF. & Souza A., 2018. Analyse de quelques paramètres de consommation de Wavé-fortex, un complément alimentaire naturel du Gabon. *European Scientific Journal*, 14 (24) 194-204.
- Lozano TC., Cordoba SN & Avila-de-Moreno C., 2000. Evaluation of the effect of hydrolates of garlic (*Allium sativum*) and welsh onion (*Allium fistulosum*) on the development of the phytopathogenic fungi *Botrytis allii* and *Sclerotium cepivorum*. *Fitopatologia-Colombiana*, 24 : 29-32
- Makkar HPS., Siddhuraju P. & Becker K., 2007. Plant Secondary Metabolites. Humana Press Inc., p.130.
- Marjan N. & Hossein H., 2008. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 22 : 709-24.
- Rajarajan PN., Rajasekaran K. & Asha Devi NK., 2013. Isolation and quantification of aflatoxin from *Aspergillus flavus* infected stored peanuts. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 1, 76-80.
- Ravi Babu G., Guru Prasad M. & Prasad TNVKV., 2011. Isolation and quantification of aflatoxin from *Aspergillus flavus* infected rice. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 5, 16-24.
- Saniewska A., 1995. The garlic-derived diallyl disulphide as the inhibitor of mycelium growth of *Stagonospora curtisii* (Berk.) Sacc. *Phytopathologia-Polonica*, 21 : 37-43
- Schmelzer GH., Gurb-Fakim A. & Arro R., 2008. Medicinal plants- Plant resources of tropical Africa. Ed. Wageningen ; Fondation Prota. Pays Bas ; Pp 582-596.
- Sealy R., Evans M. & Rothrock C., 2007. The effect of a garlic extract and root substrat on soilborne fungal pathogen. *Horth Technology*, 2 : 169-173
- Soussou S., 2013. Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques de *Hedysarum coronarium*. Thèse de Doctorat. Université de Sousse ; 176 p.
- Thompson AK., 1996. Postharvest technology of fruits and vegetables. Blackwelle Science Ltd ; Edt. United Kingdom ; 410 p.