République de Côte d'Ivoire

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et

De la Recherche Scientifique

UNIVERSITE NANGUI ABROGOUA

UFR des Sciences et Technologies des Aliments

Année Universitaire

2018-2019

Numéro d'ordre

504

THESE UNIQUE

pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences et Technologies des Aliments de l'Université Nangui Abrogoua

Spécialité : Biochimie et Technologies des Aliments

Présentée par

SESS-TCHOTCH Didier-Axel

THEME

CONTAMINATION DES FEVES DE CACAO ET PRODUITS DERIVES PAR LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs) MAJEURS. ESSAIS DE BIODEGRADATION *INVITRO*

Commission d'examen

Soutenu publiquement

Le 06/06/2019

- **M. KOUAME Patrice, Professeur Titulaire, UNA, Président**
- **M. GUEHI Tagro Simplice, Professeur Titulaire, UNA, Directeur**
- **M. ASSIDJO Nogbou Emmanuel, Professeur Titulaire, INP-HB, Rapporteur**
- **M. CHATIGRE Kouamé Olivier, Maître de Conférences, UFHB, Rapporteur**
- **Mme. TIGORI-SANGARE B., Maître de Conférences Ag., UFHB, Examinateur**
- **M. KODJO Charles Guillaume, Professeur Titulaire, UNA Examinateur**

DEDICACE

A mon père SESS TCHOTCH Denis

A ma mère ASSAGOU Suzanne Rose De Lima épse SESS-TCHOTCH

A mes frères et Sœurs

SESS-TCHOTCH Jocelyne Vanessa Mariette,

SESS-TCHOTCH Pierre Auguste Philippe,

SESS-TCHOTCH Bénédicte Eve Marlène.

« *Le Seigneur est mon berger, je ne manquerai de rien …* »

REMERCIEMENTS

Nous tenons très sincèrement à exprimer nos vifs remerciements et notre reconnaissance à toutes les personnes en leur rang, grade et qualité respectif, pour leur contribution à la réalisation de la présente étude. Ce sont :

❖ **Professeur TANO Yao**, Président de l'UNA, pour son appui à la recherche scientifique et sa vision de l'excellence au sein de cette Institution.

❖ **Professeur ATTA Diallo Hortense,** Vice-Présidente chargée de la Planification, de la Programmation etdes Relations Extérieures, pour sa vision de la coopération entre les institutions de recherches scientifiques,

❖ **Professeur BOHOUALouisGuichard,** Vice-Président chargé de la Pédagogie, de la Vie Universitaire, de la Recherche et de l'Innovation Technologique, pour sa vision de l'enseignement et l'orientation des formations de recherches,

❖ **Docteur ASSEMAND Koffi Emma**, Maître de Conférences, Doyen de l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA) de l'Université Nangui ABROGOUA (UNA) pour l'intérêt qu'elle accorde à la recherche scientifique et à la formation des étudiants inscrits dans son UFR.

❖ **Professeur GUEHI Tagro Simplice**, Professeur Titulaire, Enseignant-chercheur à l'UFR-STA de l'UNA, **Directeur Scientifique de ma thèse de Doctorat.** Monsieur le Directeur de thèse, toute ma reconnaissance et ma gratitude à vous pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe de recherche et aidé à réaliser mon projet de Thèse. Votre disponibilité, votre dynamisme, vos précieux conseils, votre rigueur scientifique, votre sens du travail bien fait et votre vision de la recherche ont été pour moi une grande et excellente source de motivation et d'inspiration. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Dieu vous bénisse abondamment.

❖ **Docteur DURAND Noël**, Chercheur et Chef de l'équipe « **Maîtrise des contaminants de la chaîne Alimentaire »** de l'UMR Qualisud du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement de Montpellier. Merci pour votre accompagnement scientifique et technique, votre disponibilité, toutes vos orientations et pour l'animation de mon séjour à l'UMR Qualisud. Le souvenir de notre collaboration restera exceptionnellement gravé dans ma mémoire. Merci pour votre amitié.

❖ **GRABULOS Joël,** Technicien supérieur de laboratoire dans l'équipe 1«**Qualité des produits frais et transformés**» de l'UMR Qualisud du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement de Montpellier. Je te remercie pour ta précieuse aide dans l'élaboration et la mise en œuvre des analyses réalisées au cours de ma

thèse. Merci pour ton amitié et pour m'avoir permis d'affiner certaines aptitudes et compétences.

❖ **Docteur FONTANA-TACHON Angélique**, Maître de Conférences, HDR, Enseignant-chercheur de l'Université Montpellier et Chercheur à l'UMR Qualisud. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance pour votre sollicitude qui a facilité mes premiers pas en France et pour tout l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour votre grande contribution au succès des analyses microbiologiques.

❖ **Docteur MONTET Didier**, HDR, Chercheur au sein de l'Equipe 2 « **Maîtrise des contaminants de la chaîne Alimentaire »** de l'UMR Qualisud du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement de Montpellier. Merci pour le privilège de votre chaleureuse amitié et que j'ai eu de bénéficier de votre solide expérience en Sureté Sanitaire des Aliments. Je reste particulièrement sensible à vos grandes qualités humaines, votre joie de vivre, votre enthousiasme professionnel et votre sens exceptionnel de l'humour.

❖ **Docteur BOULANGER Renaud**, Chercheur et Chef de l'Equipe 1 **"Qualité sensorielle des produits frais et transformés"** de l'UMR Qualisud du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement de Montpellier. Je vous remercie pour vos contributions et vos conseils avisés lors des différents comités de thèse. Merci pour votre amitié.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à l'endroit de mes maîtres qui ont bien voulu contribuer à l'amélioration et à l'évaluation cette thèse :

- **Professeur KOUAME Lucien Patrice**, Professeur Titulaire, UFR des Sciences et Technologies des Aliments, Université Nangui Abrogoua-Abidjan, **Président du jury**,
- **Professeur ASSIDJO Nogbou Emmanuel**, Professeur Titulaire, Laboratoire des procédés industriels de synthèses des énergies nouvelles, INP-HB, **Rapporteur**,
- **Professeur AMANI N'Guessan Georges**, Professeur Titulaire, UFR des Sciences et Technologies des Aliments, Université Nangui Abrogoua-Abidjan, **Rapporteur**,
- **Docteur CHATIGRE Kouamé Olivier,** Maître de Conférence, Laboratoire de Biochimie et Sciences des Aliments, UFHB, **Rapporteur**,
- **Docteur TIGORI – SANGARE Béatrice,** Maître de Conférences Agrégé, Département de Santé Publique, Hydrologie et Toxicologie, UFHB, **Examinateur**,
- **Professeur KODJO Charles Guillaume,** Professeur Titulaire, UFR des Sciences Fondamentales et Appliquées, Université Nangui Abrogoua-Abidjan, **Examinateur**,

J'adresse mes très vifs et sincères remerciements aux

- Professeurs **KOUADIO Luc Philippe, KAMENAN Alphonse, OGA Agbaya Serge Stéphane**, **BIEGO Godi Henri Adiélou Marius, ADJAFFI Nanga Angéline, KOFFI Rose Névry, KACOU Célah, KOUADIO Parfait,TANOH Kablan, GONNETY Tia Jean, BORAUD Mireille, AHI Amédé, FAULET Meuwiah Betty,**

- Docteurs **MARAVAL Isabelle**, **BUGAUDChristophe,** tous les deux chercheurs à Qualisud

- Techniciens supérieurs de Laboratoire, **ALTER Pascaline**, **METAYER-PIROT Isabelle, GUIBERT Benjamin, FORESTIER Nelly, LAHON Marie Christine, PONCE Brigitte,BERTHIOT Laurent.** Je vous remercie de toute l'aide que vous m'avez accordée lors de mes expérimentations au laboratoire et dans la vie sociale. Vous avez su m'aider à joindre l'utile à l'agréable et à faciliter mon intégration au sein de l'UMR Qualisud.

Mercià M. **KOUA Amian et BOHOUSSOU Jean-Claude** pour leur conseil, leur amitié, leur accompagnement, leur implication professionnelle dans mes travaux de recherche.

Toute ma profonde gratitude aux institutions/organismes et leurs animateurs grâce auxquels cette étude a pu se concrétiser. Ce sont :

- Le **Programme de Bourse C2D/AMRUGE de la coopération France-Côte d'Ivoire,** pour m'avoir accordé une bourse de recherche pour la réalisation de ma thèse.

- L**'Unité Mixte de Recherche (UMR) Qualisud du CIRAD**, pour m'avoir accueilli et permis de réaliser mon stage doctoral.

En remerciant **Mme NTAKPE KABLAN Juliette**, Gestionnaire des Bourses, Missions et Invitations, Coordonnatrice Bourses du C2D près l'Ambassade de France-Abidjan (Côte d'Ivoire) pour sa gentillesse, je voudrais dire ma profonde gratitude à tous ses collaborateurs.

Ma profonde gratitude à **M. ANON Edmond et son épouse Léontine** ainsi qu'à **toute sa famille**, pour avoir mis à notre disposition leur plantation en vue des expérimentations agricoles de l'étude et leur aide pendant nos activités agricoles ont été pour nous d'un inestimable secours.

Je voudrais terminer mes remerciements sans oublier mes amis et compagnons d'équipe.

- Docteurs **KEDJEBO Kra Brou Didier, KONE Koumba Maï, MANIZAN Léthicia, SAWA André, NYAMIEN Yves, BETTENCOURT Munanga de Jesus Coxe, SINELA André** et le Doctorant**ASSI-CLAIR Brice Judicaël**, Merci à vous pour tous les bons moments de convivialité et de partage.

- Tout le personnel Enseignant, Technique et Administratif de l'UFR-STA.

- Toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de mes travaux de recherche que je n'ai pu nommément citer ici.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE ..... **I**

REMERCIEMENTS ..... **II**

TABLE DES MATIERES ..... **V**

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS ..... **XI**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XIII**

LISTE DES FIGURES ..... **XIV**

INTRODUCTION **1**

PARTIE 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **4**

I. GENERALITES SUR LE CACAO **5**

1. HISTORIQUE DU CACAO **5**

1.1. Origine **5**

1.2. Historique de la cacao-culture en Côte d'Ivoire **6**

2. TAXONOMIE **7**

3. ECOLOGIE DU CACAOYER **8**

4. DESCRIPTION DES PRODUITS DU CACAOYER **9**

4.1. Variétés cultivées du cacaoyer **9**

4.1.1. Groupe *Criollo* ou *T. cacao subsp. ovalifolium* **9**

4.1.2. Groupe *Forastero* ou *T. cacao subsp. sohaerocarpum* **9**

4.1.3. Groupe *Trinitario* **10**

4.2. Fruit **11**

4.3. Graine **12**

4.4. Composition biochimique de la graine **13**

4.4.1. Glucides **13**

4.4.2. Lipides **13**

4.4.3. Protéines et acide aminés **14**

4.4.4. Composés phénoliques **14**

4.4.5. Théobromine et caféine **14**

4.4.6. Acides organiques **15**

4.4.7. Composés aromatiques volatils **15**

5. TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES POST-RECOLTE AGRICOLES DU CACAO 16
5.1. Récolte du cacao 16
5.2. Ecabossage 16
5.3. Fermentation du cacao 16
5.3.1. Techniques de fermentation 17
5.3.2. Conséquences de la fermentation 18
5.3.3. Microorganismes fermentaires du cacao 18
5.3.4. Principaux types de fermentation du cacao 21
5.4. Séchage du cacao 23
5.4.1. Séchage solaire 23
5.4.2. Séchage artificiel 24
5.5. Stockage du cacao 27
6. QUALITE DES FEVES DE CACAO 27
6.1. Critères de la qualité marchande 28
6.1.1. Défauts physiques de qualité 28
6.1.2. Taux d'humidité 31
6.1.3. Caractéristiques et qualité du beurre de cacao 31
6.2. Déterminant de la qualité sanitaire 31
7. PRODUCTION ET TRANSFORMATION MONDIALE DU CACAO 32
7.1. Production 32
7.2. Transformation 33
7.2.1. Statistiques de transformation du cacao 33
7.2.2. Consommation mondiale du cacao 34
8. CACAO-CULTURE EN CÔTE D'IVOIRE 35
8.1. Caractéristiques de la filière de cacao 35
8.2. Système de gestion 36
8.3. Statistiques de production et transformation du cacao 36
II. GENERALITES ET TOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs) 38
1. GENERALITES SUR LES HAPs 38
1.1. Définition 38
1.2. Caractéristiques physico-chimiques 39
1.3. Sources de formation 40

1.4. Denrées alimentaires couramment contaminées en HAPs 41
1.4.1. Denrées alimentaires d'origine animale 41
1.4.2. Denrées alimentaires d'origine végétale 42
1.4.3. Boissons et confiseries 43
2. TOXICITE DES HAPs 43
2.1. Mécanismes d'action 43
2.2. Toxicité aigüe 44
2.3. Toxicité chronique 44
3. EFFETS TOXICOLOGIQUES DES HAPs 45
3.1. Effet cancérigène 45
3.2. Effet tératogène 45
3.3. Effet immunotoxicologique 46
3.4. Effet génotoxique 46
4. MAITRISE DE LA CONTAMINATION DES HAPs DANS LA CHAINE ALIMENTAIRE 46
4.1. Facteurs influençant la formation des HAPs 46
4.1.1. Processus direct de formation des HAPs 47
4.1.2. Autres processus de formation des HAPs 50
4.2. Méthodes de dégradation microbienne des HAPs 50
4.2.1. Utilisation des bactéries 51
4.2.2. Utilisation des champignons 51
4.2.3. Utilisation des algues 51
4.2.4. Utilisation d'un consortium microbien 52
5. REGLEMENTATION SUR LES HAPs DANS LES ALIMENTS 52
PARTIE 2. MATERIEL ET METHODES 54
I. MATERIEL 55
1. MATERIEL VEGETAL 55
2. MATERIEL TECHNIQUE AGRICOLE 55
3. PRODUITS CHIMIQUES ET CONSOMMABLES DE LABORATOIRE 56
4. EQUIPEMENTS TECHNIQUES ET INSTRUMENTS DE MESURE 57
5. MILIEUX DE CULTURE 57
II. METHODES 58

1. VALIDATION DE LA METHODE DE DETERMINATION DES HAPs ET ANALYSES DES FEVES DE CACAO 58
1.1. Validation de la méthode de détermination des HAPs 58
1.1.1. Test de linéarité 58
1.1.2. Détermination des limites de détection et de quantification 59
1.1.3. Test de répétabilité et de précision intermédiaire 59
1.1.4. Détermination de la justesse 60
1.2. Détermination de quelques paramètres physico-chimiques des fèves de cacao 60
1.2.1. Détermination du taux d'humidité 60
1.2.2. Détermination du taux de matières grasses 61
1.3. Détermination des teneurs en HAPs du cacao 61
1.3.1. Méthode d'extraction des HAPs 61
1.3.2. Dosage des HAPs par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à une détection Fluorimétrique 62
2. INFLUENCE DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES POST-RECOLTE AGRICOLES SUR LA FORMATION DES HAPs DANS LES FEVES DE CACAO 63
2.1. Ecabossage 63
2.2. Fermentation 63
2.3. Séchage 63
2.4. Stockage 64
2.5. Plan expérimental complet des échantillonnages des fèves de cacao 64
3. IMPACT DU PROCESSUS DE FABRICATION SUR LA CONTAMINATION EN HAPs DES PRODUITS DERIVES DES FEVES DE CACAO 66
3.1. Processus de fabrication de produits dérivés des fèves de cacao 66
3.2. Détermination des teneurs en HAPs des produits dérivés du cacao 68
4. ESSAIS DE DEGRADATION DES HAPs PAR LES BACTERIES ISOLEES A PARTIR DES FEVES DE CACAO. 68
4.1. Culture des bactéries 68
4.2. Isolement et détermination des caractéristiques morphologiques des bactéries dégradant les HAPs 68

4.3. Détermination du taux de dégradation des HAPs par le consortium bactérien 69

4.4. Identification des bactéries constitutives du consortium par des outils moléculaires 70

4.4.1. Extraction d'ADN 70

4.4.2. Amplification de l'ADNr 16S par Réactions de Polymérisation en Chaine (PCR) 71

4.4.3. Séquençage des ADN amplifiés 75

4.4.4. Analyse des séquences d'ADN 76

5. ANALYSES STATISTIQUES 76

PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION 77

I.VALIDATION D'UNE METHODE DE DETERMINATION DES HAPS DU CACAO PAR HPLC COUPLEE AU DETECTEUR FLUORIMETRIQUE. 78

1. RESULTATS 78

1.1. Chromatogramme d'analyse des HAPs marqueurs. 78

1.2. Résultats des différents tests de validation de la méthode analytique 79

1.2.1. Etude de la linéarité 79

1.2.2. Valeurs des limites de détection et de quantification 80

1.2.3. Résultats du test de répétabilité et de la précision intermédiaire. 80

1.2.4. Résultats du test de justesse 81

1.3. Analyses de quelques échantillons de fèves de cacao prélevés à partir des entrepôts de cacao au port d'Abidjan 84

1.3.1. Taux d'humidité et de matières grasses des cacaos analysés 84

1.3.2. Teneurs en HAPs 84

2. DISCUSSION 85

CONCLUSION PARTIELLE 88

II.INFLUENCE DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES POST-RECOLTE SUR LA FORMATION DES HAPS DANS LES FEVES DE CACAO ET PRODUITS DERIVES. 89

1. RESULTATS 89

1.1. Influence des traitements technologiques post-récolte des fèves de cacao au champ 89

1.1.1. Influence de différents itinéraires techniques de préparation de l'écabossage à la fermentation 89

1.1.2. Influence des techniques de séchage 90

1.1.3. Influence des conditions de stockage 90

1.2. Evolution de la teneur en HAPs du cacao lors de la transformation en produits dérivés. 92

2. DISCUSSION 93

CONCLUSION PARTIELLE 96

III.ESSAIS DE DEGRADATION DES HAPS PAR UN CONSORTIUM DE BACTERIES ISOLEES A PARTIR DES FEVES DE CACAO 97

1. RESULTATS 97

1.1. Caractéristiques des bactéries isolées à partir des fèves de cacao. 97

1.1.1. Caractéristiques macroscopiques des colonies de bactéries d'intérêt sur milieu PCA. 97

1.1.2. Caractéristiques microscopiques des cellules de bactéries d'intérêt. ... 98

1.2. Identification moléculaire des bactéries d'intérêt. 98

1.2.1. Electrophorèse des produits issus de l'amplification PCR 98

1.2.2. Identification des bactéries d'intérêt par séquençage des ARNr 16S .. 99

1.3. Taux de dégradation des HAPs par le consortium constitué de bactéries d'intérêt 101

2. DISCUSSION 103

CONCLUSION PARTIELLE 106

CONCLUSION GENERALE, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS 108

REFERENCES BIBILOGRAPHIQUES 110

ANNEXES 134

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomique

ADNr 16S : ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

AGL : Acide Gras Libre

AKR : Aldo-céto réductase.

BaA: Benzo(a)Anthracène

BaP: Benzo(a)Pyrène.

BbF: Benzo(b)Fluoranthène.

B(g,h,i)P : Benzo(g,h,i)pérylène.

B(k)F: Benzo(k)Fluoranthène.

Chr : Chrysène

CAISTAB : Caisse de Stabilisation et de soutien des prix des productions agricoles

CCC : Conseil Café Cacao

CIRC : Centre Internationale de Recherche sur le Cancer.

HPLC-FD: High Performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detector

CAOBISCO: Chocolate, biscuits and Confectionery of Europe

CV : Coefficient de Variation

CYP450 : Cytochrome P450.

DBahA: Dibenzo (a, h) Anthracène

EC: European Commission

ECA: European Cocoa Association

EFSA: European Food Safety Authority.

F: Fluoranthène.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FAPAS: Food Analysis Performance Assessment Scheme (Company).

FCC : Fédération of cocoa commerce

Fl : Valeur de Fisher pour le modèle de régression.

Fnl : Valeur de Fisher pour le modèle expérimentale.

GST : Glutathion-S-transférase.

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HAPs-HPM : HAPs à haut poids moléculaire

IARC:International Agency for research on Cancer

ICCO: International Cocoa and Coffee Organization

IP : Indéno (1,2,3-cd) pyrène.

IPCS : International Programme on Chemical Safety

ISO: International Standard Organization

KOH: Hydroxide de Potassium

LOD: Limit of detection.

LOQ : Limit of quantification.

M : Molaire

mAU : Milli Area Unit.

$\mathbf{M_{blanc}}$: Moyenne des blancs.

Min: Minute.

NAD :Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF : Norme Française

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

OTA :Ochratoxine A

PCB : Polychlorobiphényle

pH : Potentiel d'Hydrogène

PIB : Produit Intérieur Brut.

$\mathbf{R^2}$: Coefficient de détermination

HAPs majeurs : Somme des concentrations en HAPs (BaA, Chr, BbF, BaP)

HAP4 : Groupe de HAPs marqueurs, prioritaire selon le rapport de l'EFSA de 2008

$\mathbf{S_{blanc}}$: Ecart-type des blancs.

SCF: Scientific Committee on Food.

UE: Union Européenne.

UHT: Ultra Hight Temperature

UNA: Université d'Abobo-Adjamé.

USD: United States Dollar.

US-EPA: United States Environmental Protection Agency.

W : Coefficient de Shapiro-Wilk

TAE : Tris Ammonium EDTA (Tampon)

EDTA: Ethylène Diamine Tetra Acétique

TEMED : Tétraméthyléthylediamine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Norme de qualité du cacao marchand selon la FAO 29
Tableau II. Propriétés physico-chimiques des 16 HAPs prioritaires 39
Tableau III. Niveau de contamination humaine en HAPs selon les sources d'exposition. Source : Menzie *et al*, (1992) 40
Tableau IV. Séquence des amorces universelles utilisées pour l'amplification de l'ADN des bactéries. 71
Tableau V. Composition du mélange réactionnel en vue de l'amplification par PCR de l'ADN des bactéries 73
Tableau VI. Conditions réactionnelles d'amplification par PCR de l'ADN des bactéries 75
Tableau VII. Résultats du test de la linéarité de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs mise au point 80
Tableau VIII. Limites de détection et de quantification de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs mise au point 80
Tableau IX. Résultats des tests de répétabilité de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs mise au point 81
Tableau X. Résultats des tests de précision intermédiaire de la méthode analytique des HAPs mise au point 81
Tableau XI. Valeurs des différents paramètres du test de justesse de la méthode analytique des HAPs mise au point 83
Tableau XII. Résultats d'identification par séquençage d'ADN des bactéries isolées des fèves de cacao. 100

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte de la répartition du cacao. A) Voies possibles de distribution du cacao à travers la culture du cacaoyer le long des plaines de l'Amérique du Sud, l'Amérique centrale et le sud du Mexique, B) Répartition de la culture du cacao en Amérique centrale et au Mexique en 1502 avant Jésus-Christ. Source : **Crown (2013)** 6

Figure 2. Photographies de cabosses de cacaoyer du groupe : A) *Criollo*, B) *Forastero*, C) *Trinitario*. Source : **Koné (2017)** 8

Figure 3. Cabosse de cacao de la variété *Criollo* 9

Figure 4. Cabosse de cacao de la variété *Forastero* 10

Figure 5. Cabosse de cacao de la variété *Trinitario* 10

Figure 6A-B. Cabosses matures de cacao. A). Cabosse lisse, B) Cabosse verruqueuse 11

Figure 7. Schéma de la coupe transversale et longitudinale de la cabosse de cacaoyer. Source : **Guéhi (2003)**..... 11

Figure 8. Photographie et schéma annoté d'une coupe longitudinale de graine de cacao. Source : **Mossu (1990)**. 12

Figure 9A-B. Structures chimiques de A) la théobromine et de B) la caféine. 15

Figure 10A-D. Techniques courantes de fermentation des fèves de cacao. A) fermentation en tas dans des feuilles de bananiers ; B) fermentation en paniers ; C) fermentation en caisses en bois superposées en escalier ; D) fermentation en caisses en plastique et caisses en bois. 17

Figure 11A-D. Diverses techniques de séchage solaire de cacao : A) Séchage sur claie, B) Séchage sur une bâche plastique, C) Séchage sur une aire cimentée, D) Séchage sur une aire bitumée 24

Figure 12A-B. Différents types de séchoir artificiel. A) Séchoir à convection forcée Source : **Kamenan *et al.*, (2017)**, B) Séchoir de type Samoa. Source : https://fambolena.com/page/cacao-cote-ivoire..... 26

Figure 13. Emballage de fèves de cacao dans des sacs en jutes. Source : www.google.fr 27

Figure 14. Notion de la qualité selon divers acteurs de la filière cacao. Source : **Barel (2013)** 28

Figure 15. Principales zones de production mondiale du cacao. Source : **ICCO (2018)** 32

Figure 16. Production mondiale de fèves cacao de 2015/2016 à 2017/2018 par pays (en millier de tonne métriques). Source : **ICCO (2018)** 33

Figure 17. Principaux pays transformateurs des fèves de cacao de 2012/2013 à 2016/2017 (en milliers de tonnes) Source : **ICCO (2018)**..... 34

Figure 18. Répartition mondiale de la consommation du cacao en 2015/2016 en millier de tonnes. Source : **ICCO (2017)** 35
Figure 19. Structure chimique des 16 HAPs prioritaires..... 38
Figure 20. Caractéristiques structurales des HAPs potentiellement cancérogènes **(Huang & Penning, 2014)**..... 44
Figure 21A-B. Situation géographique de la plantation paysanne de réalisation des expérimentations agricoles en vue de l'échantillonnage dans le Département d'Akoupé (Sud-Est de la Côte d'Ivoire). A) Situation en Côte d'Ivoire, B) Situation dans le département d'Akoupé 55
Figure 22. Diagramme de préparation des échantillons au cours de la campagne de récolte du cacao de 2014 65
Figure 23. Diagramme de préparation des échantillons au cours de la campagne de récolte du cacao de 2015. 66
Figure 24. Processus de fabrication des produits dérivés des fèves de cacao 67
Figure 25. Exemple de chromatogramme standard présentant les pics de détection des HAPs marqueurs (BaA, BbF, Chr et BaP) à partir d'une solution standard contenant 16 HAPs à concentration de 8 $\mu g.L^{-1}$. 78
Figure 26. Equations des droites d'étalonnage et équations des droites accompagnées des coefficients de détermination (R^2) obtenues pour les quatre HAPs marqueurs. 79
Figure 27. Taux d'humidité et de matières grasses des échantillons prélevés à partir des entrepôts de cacao au Port d'Abidjan. 84
Figure 28. Teneurs en BaP et Somme de BaA, BbF, Chr, BaP (HAPs majeurs) des échantillons de cacao prélevés à partir des entrepôts de stockage au Port d'Abidjan..... 85
Figure 29. Teneurs en HAPs majeurs de fèves de cacao issues de divers itinéraires techniques post-récoltes et séchées sur une aire bitume. Avec « CP » = Fermentation en Caisses Plastique, « CB » = Fermentation en Caisses en Bois, « FB » = Fermentation en Feuilles de Bananiers, « sa » = cabosses Saines, « ab » = cabosses Abimés), « 0 » =0 jours de délais d'écabossage, « 7 » =7 jours de délais d'écabossage. 89
Figure 30. Evolution des teneurs en HAPs majeurs des fèves de cacao séchées par différentes techniques. FB : Séchage au feu de bois ; S+FB : Séchage solaire suivi de Séchage au feu de bois ; S+SG : Séchage solaire suivi de Séchage au four de grillage d'arachides, Sf : Séchage solaire de fèves de cacao fermentées. 90

Figure 31A-D. Evolution des teneurs en HAPs majeurs des beurres extraits des fèves de cacao séchées sur A) claie, B) bâche plastique, C) Aire cimentée, D) bitume au cours du stockage en environnement paysan 92
Figure 32. Répartition des HAPs majeurs dans les produits dérivés au cours de la transformation des fèves de cacao en produits dérivés. 93
Figure 33A-C. Cultures sur milieu PCA des bactéries isolées à partir des fèves de cacao et utilisant les HAPs majeurs comme source de carbone. 97
Figure 34 A-B. Observations microscopiques de A) jeunes cultures et de B) vieilles cultures de bactéries isolées à partir de fèves de cacao et utilisant les HAPs majeurs comme source de carbone 98
Figure 35A-B. Profils électrophorétiques des produits PCR des ADNr 16S des bactéries isolées à partir de fèves de cacao. 99
Figure 36. Arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-joining basée sur les séquences d'ARNr 16S des souches « HAP » affiliées à *Bacillus sp.*, *Lysinibacillus sp.* et *Brevibacillus sp*. et des espèces apparentées isolées des fèves de cacao contaminées par les HAPs. Bar = 0,020 substitution de nucléotides par site. 100
Figure 37A-C. Evolution de la teneur en HAPs du A) Surnageant, B) Culot Bactérien et du C) milieu réactionnel au cours de l'incubation d'un milieu de culture enrichi en HAPs..... 102

RESUME

La contamination en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) du cacao et produits dérivés est devenue l'objet de l'attention internationale au regard de leurs effets toxicologiques. En vue de garantir la qualité du cacao de Côte d'Ivoire, l'objectif de cette étude est de déterminer les facteurs de formation des HAPs lors des traitements technologiques post-récolte et de proposer une alternative biologique de décontamination du cacao. Une méthode simple, rapide, écologique et peu coûteuse de détermination des HAPs du cacao et produits dérivés a été mise au point et validée en conformité avec les critères de performance du règlement UE 836/2011 et la norme de validation NF V03-110. La méthode validée a été ensuite utilisée pour déterminer les teneurs en HAPs majeurs de 224 échantillons de fèves de cacao préparés selon des itinéraires techniques post-récolte spécifiques. Il ressort qu'à l'exception du séchage et du stockage réalisés en présence de fumées, les traitements post-récolte ne favorisent pas la formation des HAPs majeurs au niveau des fèves de cacao. Entre autres, des échantillons de fèves collectées au port d'Abidjan ont présenté des teneurs en Σ4HAPs comprises entre 5,4 ± 0,6 et 11,4 ± 0,0 $\mu g.kg^{-1}$. Aussi, le suivi des teneurs en HAPs majeurs lors du processus de transformation du cacao en produits dérivés, a montré que le décorticage réduit de plus de 90 % la contamination initiale des fèves de cacao. Par ailleurs, un consortium de *Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Lysinibacillus sphaericus, Brevibacillus brevis* et *Brevibacillus laterosporus* et bien d'autres espèces bactériennes isolées à partir des fèves de cacao a permis de dégrader les HAPs majeurs *in vitro*. Ce consortium se présente comme une excellente et potentielle alternative biologique de décontamination du cacao et probablement d'autres ressources agricoles.

Mots clés : Cacao, Technologie post-récolte, HAPs, Biodégradation, Côte d'Ivoire

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) contamination of cocoa and derived products has been considered as the focus of international attention due to their toxicological effects. In order to guarantee the quality of cocoa from Côte d'Ivoire, the objective of this study is to determine the factors of PAHs formation during post-harvest treatments and to propose a biological alternative for cocoa decontamination. A simple, fast, ecological and inexpensive method for the determination of PAHs in raw cocoa and derived products has been developed and validated in accordance with the performance criteria of EU Regulation 836/2011 and the validation standard NF V 03-110. The validated method was used to determine the major PAH contents of 224 cocoa bean samples prepared according to specific post-harvest technical routes. It appears that, except for drying and storage in the presence of smoke, post-harvest treatments do not support the formation of major PAHs in cocoa beans. Among other things, samples of beans collected at the port of Abidjan showed Σ4HAPs contents ranging from 5.4 ± 0.6 to 11.4 ± 0.0 $\mu g.kg^{-1}$. Also, the monitoring of major PAH levels during the process of transforming cocoa into cocoa products has shown that shelling reduces the initial contamination of cocoa beans by more than 90%. In addition, a consortium of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Brevibacillus brevis* and *Brevibacillus laterosporus* and many other bacterial species isolated from cocoa beans degraded major PAHs *in vitro*. This consortium is an excellent and potential biological alternative for decontaminating cocoa and probably other agricultural resources.

Keywords: Cocoa, Post-harvest technology, PAHs, Biodegradation, Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) constituent une vaste classe de composés chimiques constitués d'au moins deux cycles aromatiques condensés **(Purcaro *et al.*, 2013)**.Ce sont des composés organiques de haute toxicité et très répandus dans l'environnement. Ils se forment au cours de la pyrolyse et de la pyrosynthèse de la matière organique pendant des processus domestiques, industriels ou géothermiques **(Garnier, 2010 ; Tarantini, 2010)**. Ces composés sont très lipophiles et peuvent induire des mutations au sein de l'ADN **(Tarantini, 2010, Fuxing Kang *et al.*, 2010)**. Jusqu'à ce jour, bien que les effets toxicologiques de tous les HAPs soient imparfaitement connus, les données expérimentales disponibles chez l'animal ont montré que certains HAPs sont spécifiquement responsables de nombreux effets toxicologiques sur la santé. En effet, ils seraient cancérogènes, tératogènes et génotoxiques **(Ghosal *et al.*, 2016 ; Zachara *et al.*, 2017)**. En raison de leur mode de formation, l'exposition de l'homme à ces composés paraît inévitable et la principale voie d'exposition est l'alimentation **(Purcaro *et al.*, 2013 ; Bansal & Kim, 2015 ; Tarantini, 2010)**. Les HAPs affectent diverses denrées alimentaires, majoritairement les produits carnés fumés **(Ake-Assi *et al.*, 2012 ; Rozentāle *et al.*, 2015)**, les produits végétaux comme les céréales ainsi que les oléagineux (**Bansal & Kim, 2015 ; Al-Rashdan *et al.*, 2010**) comme les fèves de cacao **(Ziegenhals *et al.*, 2009)**. Du fait de leur teneur élevée en matières grasses avoisinant 60 %, les fèves de cacao sont très sujettes à la contamination en HAPs(**Raters et Matissek, 2014 ; Ziegenhals *et al.*, 2009)**.

Le cacao est l'une des matières premières agricoles internationales de premier plan. Sur le plan social, environ 5 à 6 millions d'agriculteurs dans le monde vivent de la cacao-culture (**Anga, 2016 ; Beg *et al.*, 2017**). La consommation mondiale annuelle du cacao est estimée à 3,63 millions de tonnes équivalent à 5 milliards de dollars américains (**Neela *et al.*, 2013**). De plus entre 40 à 50 millions de personnes vivent directement de la cacao-culture dans le monde **(Doumbia et kouassi, 2009 ; Beg *et al.*, 2017)**. Avec plus de 40 %, soit environ 2 millions de tonnes de l'offre internationale en 2017/18, la Côte d'Ivoire est le leader mondial **(ICCO, 2018)**. L'économie de la Côte d'Ivoire est essentiellement basée sur cette matière première **(Aikpokpodion *et al.*, 2013 ; Kedjebo *et al.*, 2015 ; Kone *et al.*, 2016).** En effet, le cacao à lui seul génère environ 40 % des recettes d'exportation et contribue à hauteur de 10 % au produit intérieur brut (PIB) ivoirien **(Banzio, 2003 ; Akmel *et al.*, 2008)**. Malgré cette importance économique vitale, seulement 20 % de la production ivoirienne sont localement transformés. Le reste, près de 80 % est exporté vers les pays occidentaux où les fèves sont transformées **(Whitefield, 2005)**. L'une des dimensions de la qualité les plus préoccupantes

du cacao est l'aspect sanitaire des fèves. Quelle que soit la dimension considérée, la qualité des fèves de cacao et donc des produits dérivés est fortement dépendante des traitements technologiques post-récolte **(Misnawi, 2012 ; Lowor *et al.*, 2012 ; Barel, 2013)**. Ces techniques post-récolte au nombre desquelles figurent l'écabossage, la fermentation, le séchage, le stockage et la manutention des fèves sont généralement pratiquées par les producteurs au niveau du champ (**Kedjebo *et al.*, 2015 ; Kone *et al.*, 2016**). Plusieurs types de contaminants découlant de ces pratiques agricoles sont couramment associés aux fèves de cacao. C'est le cas de l'ochratoxine A **(Kedjebo *et al.*, 2015)**, des HAPs (**Ziegenhals *et al.*, 2009 ; Rater et Matissek, 2014**) et du cadmium **(Cryer *et al.*, 2012).** Particulièrement, la formation des HAPs dans les fèves de cacao serait liée aux techniques de séchage artificiel du cacao utilisant les feux de bois (**Zahouli *et al.*, 2010 ; Misnawi, 2012**), aux supports de séchage comme les aires bitumées **(Owusu-Boateng et Owusu, 2015 ; Nogbou *et al.*, 2015)** et au stockage du cacao marchand à proximité des fumées de feux de bois. Les fèves de cacao sont transformées en trois produits principaux dont la liqueur de cacao, la poudre de cacao et le beurre de cacao. Ce dernier constitue un ingrédient indispensable en industrie chocolatière en raison de ses caractéristiques rhéologiques, fonctionnelles et chimiques spécifiques **(Guehi *et al.*, 2007 ; Beckett, 2009 ; Kone*et al.*, 2016)**. La qualité de cette matière grasse peut être altérée par des teneurs en HAPs hors spécifications internationales (**Ziegenhals *et al.*, 2009**). L'impossibilité de raffiner le beurre de cacao comme les autres huiles végétales (**European Union, 2011a ; Bratinova *et al.*, 2015)** poserait avec acuité un réel problème de santé publique au regard des teneurs élevées de HAPs qui pourraient survenir dans le chocolat. En vue de protéger la santé des consommateurs de denrées alimentaires susceptibles d'être incriminées notamment de chocolat, la fixation de teneurs maximales des HAPs dans le cacao était au centre des directives Européennes depuis 2005 (**European Commission, 2006).** Cependant, l'entrée en vigueur des directives sur les fèves de cacao et produits dérivés avait été reportée jusqu'au mois d'avril 2013 afin de permettre aux pays producteurs de réaliser les améliorations technologiques requises pour la conformité de leurs productions aux directives envisagées (**European Union, 2011a**). Depuis cettedate, des normes limitant les teneurs en HAPs admises dans le cacao sont en application sur les marchés Européens. Elles invitent tous les pays exportateurs de cacao à adopter des mesures en vue de réduire les teneurs en HAPsde leur cacao. La Côte d'Ivoire en tant que producteur leader mondial des fèves de cacao est directement concernée par ces mesures Européennes. Si rien n'est fait, d'énormes lots de cacao ivoirien ne seront plus exportés vers les États de l'Union Européenne. A ce jour, les causes et les conditions de formation des HAPs ne reposent que sur des hypothèses et des

spéculations d'expertises répandues par les transformateurs du cacao. De plus, les méthodes d'analyses des HAPs dans les fèves de cacao en particulier sont fastidieuses, coûteuses et quasi inexistantes en Côte d'Ivoire. Afin de préserver le cacao ivoirien de la contamination en HAPs d'une part et d'autre part d'éviter d'énormes pertes financières au pays et aux petits producteurs de cacao tout en garantissant la santé des consommateurs du chocolat, il s'avère urgent et nécessaire d'investiguer sur les facteurs de formation des HAPs dans ce produit.

L'objectif général de cette étude est de contribuer à l'amélioration de la qualité sanitaire des fèves de cacao produites en Côte d'Ivoire. De façon plus spécifique, il s'agit de :

- valider une méthode analytique en vue de la détermination rapide, simple et peu onéreuse des HAPs du cacao,

- déterminer l'influence des techniques post-récolte sur la contamination en HAPs des fèves de cacao et produits dérivés,

- mettre au point une alternative biologique utilisant des microorganismes en vue de la dégradation des HAPs et donc de la décontamination des fèves de cacao présentant des fortes teneurs en HAPs.

Afin d'y parvenir, le présent mémoire est structuré en trois sections dont :

- une section réservée à la revue bibliographique résumant les connaissances scientifiques sur le problème des HAPs en lien avec les denrées alimentaires en général et les fèves de cacao en particulier,

- une seconde section décrivant les matériels utilisés et l'approche méthodologique analytique adoptée pour l'atteinte et l'analyse des résultats,

- une ultime section consacrée aux résultats obtenus et leur interprétation. Cette section est elle-même scindée en trois chapitres décrivant et discutant les principaux résultats obtenus et relatif à chacun des objectifs spécifiques précédemment décrits.

Bien que chaque chapitre ait été achevé par une conclusion partielle, une conclusion générale mettant l'accent sur les retombées et présentant quelques principales perspectives et recommandations clôt l'étude.

PARTIE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GENERALITES SUR LE CACAO

1. HISTORIQUE DU CACAO

1.1. Origine

Le cacao a successivement intégré l'alimentation des populations mokaya, olmecas, aztèques et mayas dès 1900 avant Jésus-Christ **(Coe et Coe 2007 ; Powis *et al.*, 2011)**. Sa consommation était une composante importante des rituels de leur vie quotidienne, tandis que le contrôle des fèves de cacao alimentait les interactions économiques entre les populations jusqu'à l'arrivée des explorateurs espagnols. Les échanges commerciaux impliquaient le plus souvent les fèves de cacao grillées plutôt que les fruits ou les boissons alcoolisées **(Crown, 2013**). Des publications récentes indiquent que *Theobroma cacao* étaient une plante indigène du bassin nord-ouest amazonien (**Crown, 2013 ; Watson *et al.*, 2013**), domestiquée dans l'ouest mésoamérique, avec une possible domestication naissante en amazonie. Selon plusieurs auteurs (**Coe et Coe, 2007 ; Powis *et al.*, 2011**), le mot "cacao" est originaire de "kakaw" prononcé "kakawa" dans une langue ancienne mije-sokean parlée le long de la côte du golfe du sud mexicain (**Figure 1A-B**). Les agriculteurs mayas cultivaient les cacaoyers *Theobroma* dans les basses terres et les hauts plateaux du Mexique, Guatemala et du Belize. Certaines des élites et membres de la royauté maya étaient les principaux consommateurs du chocolat (*xocolatl*). Le cacao était un signe de richesse et de pouvoir parmi eux et servait dans les fêtes somptueuses. Le *xocolatl* était additionné à de nombreuses épices et d'autres additifs alimentaires (**Whymper, 1912**). Les premières fèves de cacao ont été apportées en Europe par Christophe Colomb. Elles ont été commercialement exploitées par Don Herman Cortez dans une nouvelle formule de boisson (**Minifie, 1989**). Les Espagnols ont préféré une boisson sucrée, et c'est sous cette forme que s'étendit la popularité du chocolat à l'Europe centrale et nordique. Ce fut d'abord l'introduction du lait dans cette boisson qui a débuté au Royaume-Uni en 1727 par Nicholas Sanders (**Cook, 1984**). La forme solide du chocolat au lait est normalement attribuée à Daniel Peter de Vevey de Genève en 1875. De nombreuses saveurs différentes de chocolat clair ont été développées par la suite au fil des années. Le cacao arriva en Afrique de l'ouest au 18ème siècle après son entrée au Brésil. Les premières importantes plantations cacaoyères furent créées au 20ème siècle au Cameroun, au Nigeria, au Ghana puis en Côte d'Ivoire **(Sundiata, 1974 ; Grossman-Greene et Bayer, 2009).**

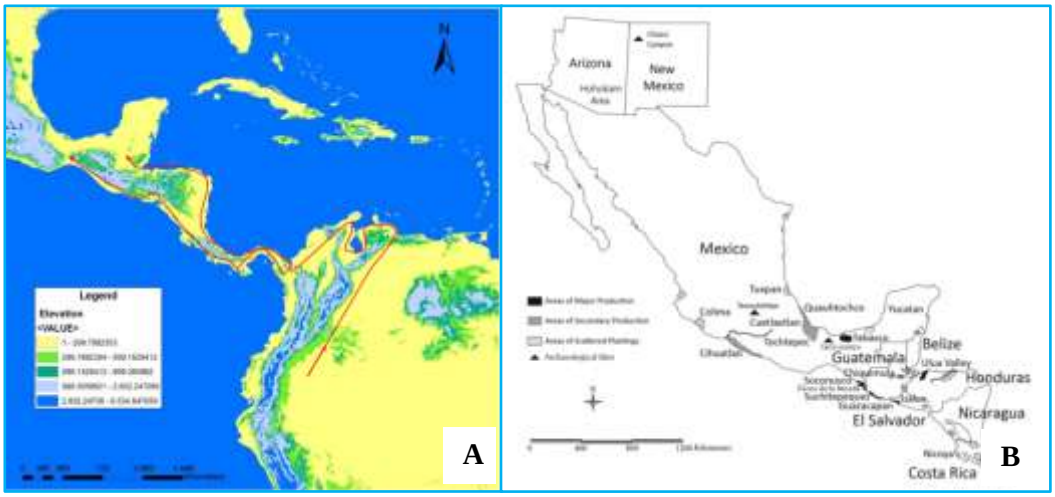


Figure 1. Carte de la répartition du cacao. A) Voies possibles de distribution du cacao à travers la culture du cacaoyer le long des plaines de l'Amérique du sud, l'Amérique centrale et le sud du Mexique, B) Répartition de la culture du cacao en Amérique centrale et au Mexique en 1502 avant Jésus-Christ. Source : **Crown (2013)**

1.2. Historique de la cacao-culture en Côte d'Ivoire

Sous l'influence du colonialisme et en particulier des missionnaires Français, une culture sporadique du cacao se développa un peu partout dans la zone forestière de la Côte d'Ivoire. Mais en 1908, cette culture était sous forme d'îlots isolés et la production n'excédait pas deux tonnes/an. Les conditions naturelles propices à la culture du cacaoyer étaient bien présentes dans la forêt dense de la basse Côte d'Ivoire, entre le 5° et 8° nord à climat subéquatorial. D'autre part, le cacaoyer, très exigeant du point de vue des propriétés physiques des sols, s'accommode très facilement des conditions chimiques comme les argiles latéritiques et latérites meubles de la forêt (**Planhol, 1947**). C'est la région orientale de la basse-côte en bordure de la Gold Coast (Indénié) que la production du cacao a été très rapide. En effet, le cercle d'Abengourou produisait les 2/5e de la production totale de la Côte d'Ivoire. C'est de là que la culture s'est répandue progressivement dans le Centre et le Centre-Ouest du pays. L'extension de la culture ne s'est d'ailleurs pas bornée à la zone forestière, mais s'est profondément étendue en savane. C'est ainsi que les cacaoyers se sont développés dans les régions de Bouaké et de M'Bahiakro. Ainsi les exportations de fèves de cacao à partir de la Côte d'Ivoire atteignaient 55.713 tonnes en 1939 (**Planhol, 1947**).

2. TAXONOMIE

Le cacaoyer appartient au règne Planta, à la superdivision Spermatophyta, à la division Magnoliophyta, à la classe Magnoliopsida, à l'ordre des Malvales, à la famille des Sterculiacae et au genre *Théobroma*. Récemment, il a été reclassé dans la famille des Malvacées (**Loor, 2007**) avec la position systématique suivante :

Règne : *Planta*

Superdivision : *Spermatophyta*(plantes à graines)

Division : *Magnoliophyta*(plantes à fleurs)

Classe : *Magnoliopsida*(dicotylédones)

Ordre : *Malvales*

Famille : *Sterculiaceae* (ou *Malvaceae* selon le type de classification)

Tribu: *Bilterneriées*

Genre : *Theobroma*

Espèce : *cacao* Linné

Le genre *Theobroma* a été subdivisé par **Cuatrecasas (1964)** en six sections regroupant vingt-deux espèces. Les fèves de la plupart des espèces peuvent être utilisées en chocolaterie. Il s'agit de : *Theobroma bicolor, T. cacao, T. herrania, T. grandiflora, T. microcarpa et T. speciosa*(**Kennedy, 1995**). Cependant, l'espèce *Theobromacacao* L. est la seule cultivée pour la production des graines destinées à la préparation du chocolat ou à l'extraction du beurre de cacao (**Lagunes-Galvez,2005**). Le cacaoyer *Theobroma cacao* L. présente une très grande diversité. Celle-ci repose sur les caractéristiques morphologiques des cabosses ou des graines. Les cabosses et graines de cacao présentent en effet une très grande variabilité. Seules les fleurs sont morphologiquement peu variables. Trois grandes variétés de cacao sont exploitées par l'industrie chocolatière. Ce sont les *Criollo, Forastero* amazonien et *Trinitario* (**Figure 2**). Des croisements de ces trois grands groupes ont abouti à l'obtention des hybrides fertiles qui constituent la majorité des cultivars utilisés en plantation.

Figure 2. Photographies de cabosses de cacaoyer du groupe : A) *Criollo*, B) *Forastero*, C) *Trinitario*. Source : **Koné (2017)**

3. ECOLOGIE DU CACAOYER

La température, la pluviosité et la composition du sol jouent un rôle très important dans la culture du cacaoyer. En effet, le cacaoyer présente une bonne croissance et produit mieux à une température comprise entre 24 et 26°C. Cependant il présente des difficultés de croissance en dessous de 18°C. Au-delà de 32°C sa production est réduite. Le cacaoyer exige une pluviosité annuelle supérieure à 1700 mm et une humidité du sol proche de 80 %. Ainsi, la saison sèche de la zone de production ne doit pas excéder quatre mois (**Martens *et al.*, 2011**). Très sensible au soleil et au vent, le cacaoyer nécessite de l'ombrage ainsi que des sols bien drainés, aérés de pH 6,5 et riches en éléments minéraux (phosphore, potassium) et en matières organiques (**Martens *et al.*, 2011**). Un ombrage provisoire est indispensable pendant les premières années de culture du jeune cacaoyer. Cet ombrage doit être relativement dense, ne laissant passer que 50 % de la lumière totale au moins pendant deux années après la mise en terre. Cet ombrage sera diminué progressivement au fur et à mesure du développement du cacaoyer, mais pas avant la formation bien établie des couronnes (**Mossu, 1990**).

4. DESCRIPTION DES PRODUITS DU CACAOYER

4.1. Variétés cultivées du cacaoyer

4.1.1. Groupe *Criollo* ou *T. cacao subsp. ovalifolium*

Le *Criollo* est la variété des cacaos la plus anciennement exploitée. Les cacaos *Criollo*, originaires d'Amérique Centrale et du Mexique sont cultivés dans la zone méso-américaine ainsi que dans l'Arc Antillais. Considérés comme des cacaos « fins », les *Criollo* représentent seulement 1 à 5 % de la production mondiale à cause de leur fragilité et leur sensibilité parasitaire (**Martens *et al.*, 2011**). Les *Criollo* produisent des cabosses de forme allongée, vertes et orangées à maturité (**Figure 3**). Leur péricarpe est verruqueux, mince, facile à couper. Le mésocarpe est mince et peu lignifié. Les fèves sont dodues, de section presque ronde, avec des cotylédons blancs ou peu pigmentés. Les *Criollo* produisent un cacao de haute qualité aromatique, avec une légère amertume. Ils sont utilisés en chocolaterie pour la production des produits de luxe (**Kongor *et al.*, 2016**).

Figure 3. Cabosse de cacao de la variété *Criollo*

4.1.2. Groupe *Forastero* ou *T. cacao subsp. sohaerocarpum*

Les cacaoyers *Forastero* dans leur état sauvage sont originaires de la Haute Amazonie. Ils sont très répandus en Afrique de l'Ouest. Ces cacaoyers sont des arbres vigoureux dont la production est précoce et à haut rendement. Ils sont les plus cultivés et occupent la plus grande part de la production mondiale du cacao estimée à 80-90 % (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015** ; **Kongor *et al.*, 2016)**. Les cabosses des cacaoyers *Forastero* sont généralement de formes très variables, de couleur verte puis jaune à maturité (**Figure 4**). Le péricarpe est morphologiquement dépendant du génotype, mais reste en général fortement lignifié. Les fèves fraîches, plus ou moins aplaties, présentent des cotylédons de couleur violette. Les cacaos *Forastero* sont considérés comme de qualité standard. Plusieurs cultivars de cacaoyer *Forastero* sont rencontrés, mais seuls deux types sont particuliers : *Nacional* de l'Equateur

qui produit un cacao bénéficiant d'une surcote sur le marché international (2 % de la production mondiale) et qui est considéré comme un "cacao fin" par opposition aux cacaos courants fournis par les autres *Forastero*.

Figure 4. Cabosse de cacao de la variété *Forastero*

4.1.3. Groupe *Trinitario*

Les cacaos de variété *Trinitario* (**Figure 5**) sont des hybrides issus d'un croisement naturel entre les cacaos des variétés *Criollo* et *Forastero*. Ce sont des cacaos connus uniquement à l'état cultivé. Ils proviennent de l'île de Trinidad et de toute la zone de recouvrement des deux premières variétés. Mais, aujourd'hui, les cacaos *Trinitario* sont cultivés dans tous les pays où furent autrefois cultivés les *Criollo*. Sur le plan botanique, les cacaoyers *Trinitario* sont difficilement caractérisables. Etant des hybrides, ils peuvent donner des cabosses lisses et rondes jusqu'à des cabosses allongées et verruqueuses. Ils présentent à la fois la robustesse des *Forastero* et un arôme plus fin des *Criollo*. De couleurs allant du blanc des fèves de *Criollo* au sombre des fèves *Forastero*, les cacaoyers *Trinitario* fournissent des cacaos recherchés pour la fabrication des poudres cacaotés. Ilsreprésentent 10 à 20 % de la production mondiale (**Hamdouche, 2015**).

Figure 5. Cabosse de cacao de la variété *Trinitario*

4.2. Fruit

Considéré comme une drupe ou une baie, le fruit du cacaoyer est communément appelé « chérelle » pendant sa croissance, puis “cabosse” lorsqu’il atteint la maturité. Cette maturité est atteinte au bout de cinq à six mois selon ses origines génétiques et les conditions climatiques. La taille de la cabosse de cacao varie de 10 à 30 cm de longueur avec une masse de 200 à 800 g. Elle est de forme allongée et possède 5 à 10 sillons longitudinaux plus ou moins marqués et régulièrement espacés. Sa surface peut être parfaitement lisse ou très verruqueuse (**Figure 6A-B**). Sa couleur varie du vert au rouge pour un jeune fruit, passe au jaune ou rouge pourpre pour un fruit mûr (**Mossu, 1990**). Selon les variétés du cacaoyer, 20 à 90 % des « chérelles » n’arrivent pas à maturité à cause du dessèchement qui intervient à l’âge de 50 jours de la cabosse (**Barel, 2013**). La cabosse de cacao contient en moyenne entre 20 et 60 fèves de forme ovoïde alignées sur cinq rangées (**Figure 7**).

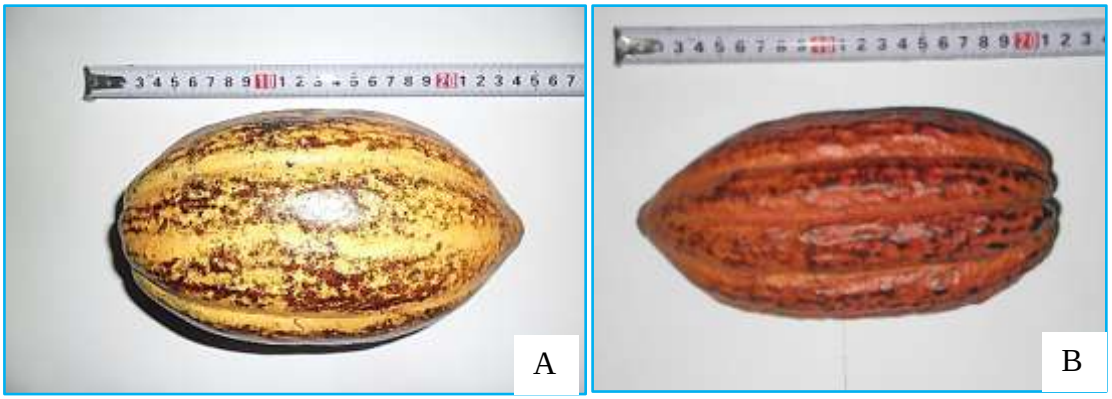


Figure 6A-B. Cabosses matures de cacao. A). Cabosse lisse, B) Cabosse verruqueuse

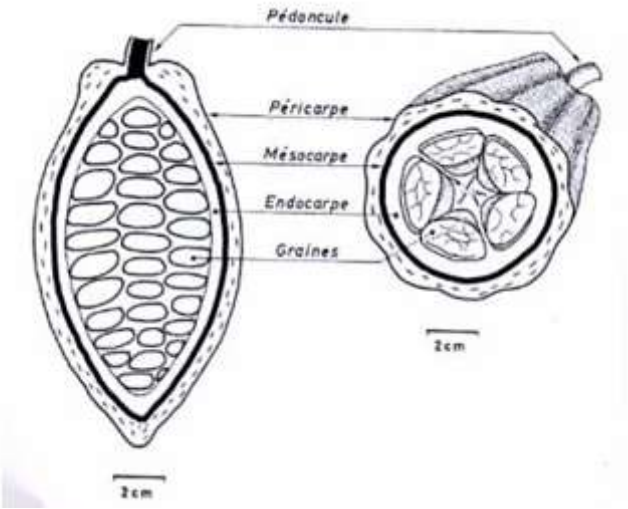


Figure 7. Schéma de la coupe transversale et longitudinale de la cabosse de cacaoyer. Source : **Guéhi (2003).**

4.3. Graine

La graine ou la fève de cacao mesure 2 à 4 cm de long, 1 à 1,7 cm de large, 0,7 à 1,2 cm d'épaisseur. Sa forme est comparable à celle d'une amande plus ou moins bombée. A maturité, les fèves fraîches représentent 25 % du poids massique de fruit. La fève de cacao est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une enveloppe mince, résistante, rosée, fortement nervurée, appelée tégument. Elle recouvre l'amande constituée de deux cotylédons fortement plissés et recouverts d'une très fine pellicule translucide brillante que représentent les vestiges de l'endosperme (**Figure 8**). Ces cotylédons sont réunis à la base par une radicule dont la longueur atteint 6 à 7 mm et une gemmule qui constitue le germe de la fève de cacao (**Barel, 2013**). De coloration variable du blanc au violet foncé selon l'origine de la graine, les cotylédons sont plissés avec de nombreux lobes imbriqués les uns dans les autres. Ils sont constitués de cellules à anthocyanines responsables de leur coloration violacée et de cellules parenchymateuses de réserve qui sont très riches en matière grasse 45 à 57 % de la masse des graines sèches selon leurs origines. Ils contiennent aussi les tannins et la théobromine. Les tanins s'oxydent rapidement pour aboutir à des produits appelés "brun de cacao". La théobromine est responsable de l'amertume du cacao (**Mossu, 1990**). La pulpe mucilagineuse des fruits mûrs contient 80-87 % d'eau, 10-13 % de sucres constitués principalement de glucose et de fructose, 0,5 % d'acides non volatils majoritairement représenté par l'acide citrique, de l'amidon, de sels minéraux et 1 % de pectines (**Jinap *et al*., 1993**).

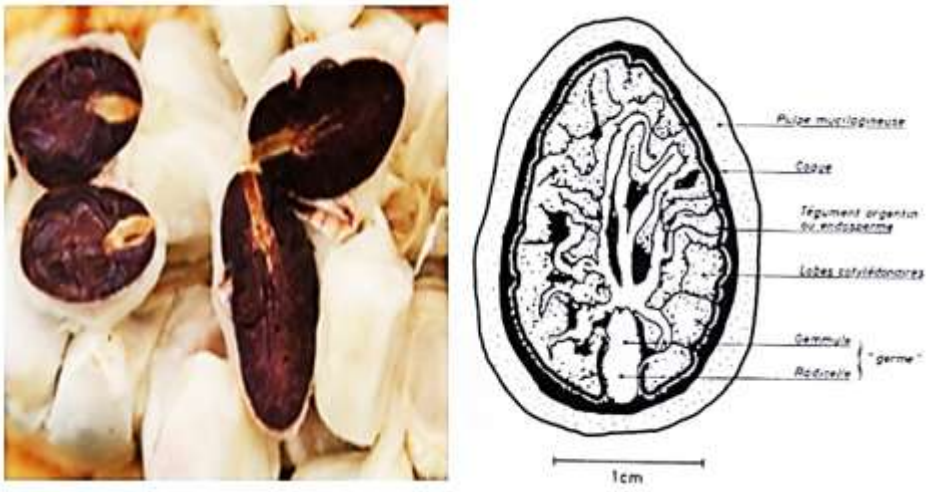


Figure 8. Photographie et schéma annoté d'une coupe longitudinale de graine de cacao. Source :**Mossu (1990).**

4.4. Composition biochimique de la graine

La pulpe de cacao contient entre 82 et 87 % d'eau, 10-15 % de sucres dont 60 % de saccharose et 39 % du mélange de glucose et fructose, 1 à 1,5 % de pectine et 1 à 3 % d'acide citrique. Les protéines, les acides aminés, la vitamine C et les sels minéraux sont également présents dans la pulpe entourant les fèves à la maturité de la cabosse (**Kongor *et al.*, 2016 ; Ban-Koffi *et al.*, 2013**). La composition chimique de la pulpe et de la fève évolue de façon importante au cours de la transformation pots-récolte du cacao et notamment lors de la fermentation. La composition approximative en gramme pour 100 grammes de fèves fraiches de quelques différentes variétés de criollo présente environ 52,50 % d'eau, 7,88 % de protéines, 23,92 % de matière grasse, 3,13% de fibre, 2,07% de cendre et 10,50 % de glucides (**Sotelo et Alvarez, 1991**).Après fermentation et séchage les teneurs moyennes obtenues des différents paramètres passent à 5,57 % d'eau, 17,25 % de protéines, 52,41 % de matière grasse, 6,20 % de fibre, 4,26 % de cendre, et 15,69% de glucides (**Liendo *et al.*, 1997**).

4.4.1. Glucides

L'amidon est l'hydrate de carbone le plus abondant dans les végétaux. Il est présent dans les fèves fraiches du cacao. Les fibres de cacao sont composées de pentosanes, galactanes, mucines contenant de l'acide galacturonique, et de la cellulose. **Reineccius *et al.* (1972)** ont rapporté que les fèves de cacao non fermentées contiennent 15,8 $mg.g^{-1}$ de saccharose et des traces de fructose, du sorbose, du mannitol et de l'inositol. Les différences éventuelles constatées ont été attribuées à la méthode d'analyse, au temps de la récolte, au type et à l'origine des fèves de cacao **(Watson *et al.*, 2013).**

4.4.2. Lipides

Le beurre de cacao est un mélange de triglycérides (**Watson *et al.*, 2013**). Il se présente sous différents aspects : cristallisé, plus ou moins onctueux selon la température de stockage et selon les proportions de triglycérides liquides et solides. Le beurre de cacao se distingue des autres matières grasses végétales par un taux limité d'acides gras insaturés. La détermination de la composition en acides gras basée sur une analyse chromatographique en phase gazeuse a révélé essentiellement des acides oléique, palmitique et stéarique (**Torres-Moreno *et al.*, 2015**). Le beurre de cacao représente 13,69 $mg.g^{-1}$de poudre de cacao.

4.4.3. Protéines et acide aminés

Les protéines représentent environ 16,85 % des fèves de cacao fermentées. Les acides aminés libres constituent la fraction d'azote non protéique dont 0,02 % sont sous forme d'ammoniac formé pendant la fermentation des fèves. Diverses enzymes sont rencontrées dans les fèves, à savoir α-amylase, β-fructosidase, β-glucosidase, β-galactosidase, pectinestérase, polygalacturonase, protéinases, phosphatases alcalines et acides, lipase, catalase. Des activités de peroxydase et de polyphénol oxydase ont été détectées dans les fèves fraîches du cacao. Ces enzymes sont inactivées dans une large mesure au cours des traitements technologiques post-récolte liés à la fermentation (**Hamdouche, 2015**)

4.4.4. Composés phénoliques

Les cotylédons sont composés de deux types de cellules du parenchyme. Plus de 90 % des cellules sont de petite taille et contiennent le protoplasme, des granules d'amidon, des grains d'aleurone et des globules gras. Les cellules plus grandes sont dispersées et contiennent l'ensemble des composés phénoliques et les purines. Ces cellules pigmentaires représentent 11 à 13 % du tissu et contiennent des anthocyanines. Trois groupes de phénols sont présents dans la fève de cacao : Proanthocyanidines (environ 58 %), catéchines (environ 37 %) et anthocyanines (environ 4 %). La principale catéchine est la (-) - épicatéchine.Les autres catéchines sont les (+) - catéchine, (+) - gallocatéchine et (-) - epigallocatechine (**Caligiani *et al.*, 2016**). La fraction des anthocyanes se compose essentiellement de cyanidine-3-α-L-arabinoside et cyanidine-3-β-D- galactoside (**Afoakwa, 2010**).

4.4.5. Théobromine et caféine

La théobromine ou 3,7-diméthylxanthine (**Figure 9A**) représente 1,2 % de la matière sèche du cacao. Elle a un effet stimulant (toutefois inférieur à celui de la caféine du café) et par conséquent, une grande importance physiologique. La caféine (**Figure 9B**) est également présente, mais en quantités beaucoup plus faibles (en moyenne 0,2 %). Une tasse de cacao contient environ 0,1 g de théobromine et 0,01 g de caféine. Dans les fèves de cacao fermentées, la présence de théobromine peut être souvent liée aux tanins libérés par la formation d'acide acétique au cours de la fermentation. Une partie de cette théobromine diffuse ensuite dans la coque de la fève (**Afoakwa, 2010**).

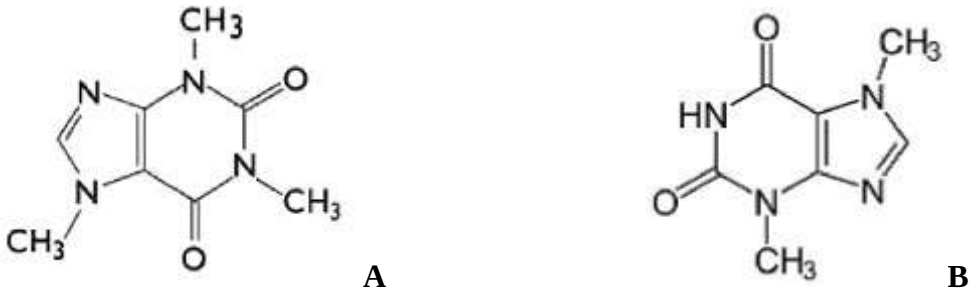


Figure 9A-B. Structures chimiques de A) la théobromine et de B) la caféine.

4.4.6. Acides organiques

Dans la pulpe fraîche entourant les fèves de cacao, les acides organiques présents sont principalement les acides citrique (44 - 45 $mg.g^{-1}$), malique (7 - 8 $mg.g^{-1}$) et succinique (5 - 6 $mg.g^{-1}$). Dans les fèves fermentées, des concentrations en ces acides variables de 13 - 14, 1 - 2 et de 7 - 8 $mg.g^{-1}$ respectivement pour les acides citrique, malique et oxalique ont été détecté (**Ho *et al.*, 2014**). Parmi les acides organiques des fèves fermentées et torréfiées les acides citrique, acétique, lactique, succinique et malique ont été détectés à des taux de 1,2 - 1,6 %. Les acides acétique et lactique sont formés pendant la fermentation. Ces fèves contiennent 1,22 à 1,64 %d'acides totaux, 0,79 à 1,25 % d'acides volatils dont 0,19 à 0,71 % d'acide acétique (**Afoakwa, 2010**). D'autres travaux ont montré que les concentrations en acides trouvées dans des fèves fermentées et séchées varient de 1,3 à 11,8 $g.kg^{-1}$ pour l'acide acétique, 1,6 à 9,9 $g.kg^{-1}$ pour l'acide citrique, de 0,6 à 11,1 $g.kg^{-1}$ pour l'acide lactique et de 2,1 à 6,5 $g.kg^{-1}$ pour l'acide oxalique (**Holm *et al.*, 1993**).

4.4.7. Composés aromatiques volatils

Les composés volatils qui déterminent l'arôme particulier du chocolat ne sont pas tous initialement présents dans les fèves de cacao. C'est au cours des différentes étapes de transformation post-récolte de la fève que les arômes se développent. La diversité de ces composés volatils ayant des caractéristiques odorantes différentes est relative au terroir, à la variété du cacaoyer, aux différents traitements pos-récoltes agricoles et industriels appliqués (**Kone*et al.*, 2016**). Les familles chimiques des composés d'arômes les plus importantes dans les fèves fraîches sont les esters, les alcools et les acides (**Rodriguez-Campos*et al.*, 2012 ; Kone*et al.*, 2016**). Ces composés sont souvent caractérisés par des odeurs florales, douces et vertes. **Ho *et al.* (2014)** ont montré que les composés alcooliques sont peu détectables dans les

fèves fraiches par rapport aux aldéhydes et cétones, alors que les esters ne sont pas détectables.

5. TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES POST-RECOLTE AGRICOLES DU CACAO

5.1. Récolte du cacao

De la pollinisation des fleurs jusqu'à la maturité des fruits du cacaoyer, il faut en moyenne une période de 5 à 6 mois. Le plus souvent, c'est au changement de couleur que l'on apprécie la maturité des cabosses, le vert virant au jaune et le rouge virant à l'orange. Il ne faut pas attendre trop longtemps pour récolter une cabosse mûre en raison des risques de pourriture et de germination des fèves sur le cacaoyer. Ce qui pourrait provoquer la contamination microbienne des fèves par le micropyle et accroitre le risque de production de fèves défectueuses et donc d'un beurre de mauvaise qualité (**Barel, 2013**). C'est pourquoi, il est recommandé de récolter les cabosses de cacao dès le changement de leur coloration tout en prenant soin de ne pas les récolter avant maturité. La cueillette des cabosses de cacao doit être effectuée de sorte à ne pas blesser la cabosse (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). En effet, ces blessures peuvent atteindre les fèves à l'intérieur des cabosses et occasionner la mise en contact entre la matrice lipidique et les enzymes dégradantes. L'opération de récolte doit être effectuée à intervalles réguliers, en moyenne de 10 à 15 jours à l'aide d'une machette pour les cabosses directement accessibles ou d'une petite faucille doublement tranchante au bout d'une perche pour les cabosses plus haute.

5.2. Ecabossage

L'écabossage du cacao ou l'ouverture des cabosses en vue d'en extraire les fèves est le premier traitement technologique post-récolte qui est réalisé soit manuellement en frappant les cabosses avec un morceau de bois (gourdin) ou une pierre, soit au moyen d'un couteau ou d'une machette tranchante, ou encore à l'aide de tables d'écabossage. Les fèves extraites sont alors séparées non seulement du rachis mais aussi les unes des autres et triées pour éliminer les fèves défectueuses (**Barel, 2013**).

5.3. Fermentation du cacao

Les fèves fraîches de cacao présentent une saveur astringente et déplaisante. C'est pourquoi, il est absolument nécessaire de les fermenter, sécher et torréfier afin d'obtenir des caractéristiques organoleptiques du chocolat. La fermentation est donc une étape cruciale pendant les traitements post-récolte du cacao. Elle doit débuter au plus tard 6 heures après

l'écabossage (**Barel, 2013**). Cependant, plusieurs types de techniques de fermentation coexistent dans les pays producteurs du cacao.

5.3.1. Techniques de fermentation

Les techniques de fermentation du cacao (**Figure 10A-D**) varient selon pays producteurs et des paysans (**Guehi *et al*., 2010a, 2010b ; Romero-Cortes, 2012 ; Afoakwa *et al*., 2013**). Quelle que soit la technique utilisée, la fermentation du cacao est principalement alcoolique, puis lactique et enfin acétique. Au cours du processus, il est recommandé aux opérateurs d'effectuer deux à trois brassages afin d'homogénéiser la fermentation des fèves. Quant à la durée de fermentation du cacao, elle varie de 0 à 8 jours avec une moyenne de 5 à 6 jours. Cette variation peut être liée aux conditions climatiques et saisonnières, au délai d'écabossage, à la disponibilité de la main d'œuvre ainsi qu'à la quantité et la qualité de la pulpe mucilagineuse entourant les fèves (**Barel, 2013**).

Figure 10A-D. Techniques courantes de fermentation des fèves de cacao. A) fermentation en tas dans des feuilles de bananiers ; B) fermentation en paniers ; C) fermentation en caisses en bois superposées en escalier ; D) fermentation en caisses en plastique et caisses en bois.

5.3.2. Conséquences de la fermentation

La fermentation est l'étape primordiale du traitement post-récolte du cacao. Elle a deux objectifs principaux qui sont :

- L'élimination par liquéfaction de la pulpe due au métabolisme d'une diversité microbienne provenant de la surface de la cabosse, des mains des opérateurs agricoles, des insectes, des feuilles de bananiers utilisées pour les couvrir et de l'environnement. Ces microorganismes trouvent des conditions favorables à leur croissance dans la pulpe des fèves. La dégradation de la pulpe des fèves accélère par la suite le séchage des fèves fermentées ;
- le déclenchement à l'intérieur des fèves des modifications biochimiques entraînant une diminution de l'amertume et de l'astringence et provocant l'apparition de précurseurs d'arôme du cacao (**Crafack *et al.*, 2014**).

La mort de l'embryon qui s'ensuit par suppression du pouvoir germinatif des fèves est à la fois un objectif et une conséquence des réactions biochimiques ayant lieu au cours de la fermentation (**Koné, 2017**).

5.3.3. Microorganismes fermentaires du cacao

Diverses études (**Hamdouche, 2015 ; Ban-Koffi *et al.*, 2013 ; Koné, 2017**) ont porté sur la succession des communautés microbiennes au cours de la fermentation des fèves de cacao. Elles ont établi que les levures sont les premiers types de microorganismes à croître, ensuite viennent les bactéries lactiques, auxquelles succèdent les bactéries acétiques qui sont remplacées par des bacilles sporulés aérobies comme les *Bacillus.* La succession microbienne au cours de la fermentation des fèves de cacao est le reflet de l'évolution de la composition biochimique de la pulpe des fèves et des conditions d'aération de la masse du cacao. En effet, les relais microbiens n'ont lieu que si l'aération du milieu est suffisante, conduisant à un profil de température et de pH (4,5) (**Schwan *et al.*, 2014**).

5.3.3.1. Levures

Les levures sont les premiers microorganismes à se développer et deviennent très rapidement majoritaires et dominants. Elles transforment les sucres présents dans la pulpe (saccharose, glucose et/ou fructose) en alcool éthanolique avec un dégagement de gaz carbonique. La fermentation alcoolique se déroule au cours des deux premiers jours de fermentation. Elle a lieu dans des conditions d'anaérobiose due à la densité de la pulpe qui empêche l'aération des fèves et à l'acidité (pH = 3,5) due à l'acide citrique dans la pulpe. Certaines levures possèdent une bonne activité pectinolytique. Ceux-ci hydrolysent le

mucilage des fèves et entrainent la liquéfaction de la pulpe (**Crafack *et al.*, 2013**). Pendant cette phase, la charge maximale de levures varie de 6 à 8 log UFC/g de cacao (**Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007**). La fermentation alcoolique est moyennement exothermique (93,3 kJ avec une élévation de la température jusqu'à 35-40 °C après 48 h) et s'accompagne d'une légère augmentation du pH provenant de la consommation de l'acide citrique par les levures. Certains travaux ont montré que les levures du genre *Hanseniaspora* sont les plus fréquemment isolées durant la phase initiale de la fermentation (**de Melo Pereira *et al.*, 2014**). *Hanseniaspora guilliermondii* en particulier est l'espèce la plus fréquemment isolée du cacao fermenté au Ghana avec *Hanseniaspora opuntiae* (**Papalexandratou *et al.*, 2013**). *Saccharomyces cerivisiae* est aussi impliquée dans la fermentation du cacao provenant de diverses régions productrices du cacao comme l'Indonésie (**Ardhana and Fleet 2003**), le Brésil (**de Melo Pereira *et al.*, 2014**), la République Dominicaine (**Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007**). D'autres espèces ont été impliquées dans la fermentation du cacao. C'est le cas de *Kloeckera apis, Candida tropicalis, Candida krusei, Candida zemplinina,Candida diversa, Issatchenkia orientalis, Pichia membranifaciens* (**Hamdouche *et al.*, 2015 ; de Melo Pereira *et al.*, 2014**). Par ailleurs, **Kone*et al.* (2016)** ont identifié six souches de levures impliquées dans la fermentation du cacao ivoirien. Ce sont *Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis, Pichia kudriavzevii, Pichia galeiformes, Galactomyces geotrichum* et *Wickerhamomyces anomalus*.

5.3.3.2. Bactéries lactiques

À la suite de la fermentation alcoolique, les conditions micro-aérophiles, le milieu acide (pH = 4) et la disponibilité des substrats favorisent en premier lieu la croissance des bactéries lactiques parmi la communauté bactérienne du cacao. Ces bactéries atteignent une croissance variant de 7 à 7,8 log UFC.g^{-1} de fèves de cacao (**Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007**). Les espèces de bactéries lactiques les plus fréquemment isolées des fèves de cacao en fermentation sont *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum* suivies de *Leuconostoc pseudomesenteroides* (**Lefeber *et al.*, 2011 ;Papalexandratou *et al.*, 2011a, 2011b et 2013**). D'autres espèces du genre *Fructobacillus, Enterococcus et Weissella* (**Lefeber *et al.*, 2011 ;Papalexandratou *et al.*, 2011b**) ont été détectées dans le cacao fermenté. Les bactéries lactiques convertissent l'acide citrique et les sucres de la pulpe en acide lactique parfois en acide acétique et en éthanol dans le cas d'une fermentation hétérolactique. L'acide lactique produit pénètre à l'intérieur des fèves pour y rester définitivement du fait de sa très faible volatilité (**Barel, 2013**). L'acidité des cotylédons augmente et génère ainsi des arômes

désagréables et du cacao marchand de moindre qualité (**Koné, 2017**)**.** Ce type de fermentation est donc indésirable.L'assimilation de l'acide citrique par les bactéries lactiques génère une légère élévation du pH et de la température de la pulpe. La présence d'éthanol et l'augmentation de la pression d'oxygène due à la dégradation de la pulpe permettent de démarrer la seconde phase de la fermentation des fèves dirigée par les bactéries acétiques (**Guéhi, 2003**).

5.3.3.3. Bactéries acétiques

Les bactéries acétiques transforment l'éthanol en acide acétique par oxydation. Cette réaction très exothermique (496 kJ par molécule d'éthanol transformée) s'accompagne d'une forte élévation de la température atteignant jusqu'à 50 °C. La charge microbienne maximale de ces microorganismes sur les fèves de cacao varie de 7,8 à 8 log UFC.g^{-1} (**Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007)**. L'acide acétique produit est un métabolite clé dans le processus de fermentation des fèves de cacao. Il pénètre à l'intérieur des fèves où il provoque, avec l'élévation de la température due à l'oxydation de l'éthanol, la destruction des cellules internes et la mort de l'embryon. Ceci s'accompagne des changements biochimiquesdans les fèves, menant à la formation des composés précurseurs des arômes caractéristiques du cacao (**Afoakwa *et al.*, 2010 ; Koné, 2017**). Ce processus de formation des composés précurseurs d'arômes (Ketoamine, acides aminés et sucres réducteurs) se poursuit durant le séchage et la torréfaction des fèves. Des brassages réguliers de la masse des fèves sont nécessaires afin de favoriser l'aération (oxygénation) de la masse d'une part et d'autre part d'obtenir une fermentation homogène des fèves. Le rythme le plus généralement recommandé est d'effectuer des brassages à 48 et 96 h de fermentation (**Guehi *et al.*, 2010b**).Le plus souvent les bactéries acétiques trouvées dans les fèves fermentées appartiennent au genre *Acetobacter* dont *A pasteurianus* est l'espèce la plus dominante. D'autres espèces comme *A. syzygii, A. ghanensis, A. senegalensis A. tropicalis* sont généralement identifiées (**Papalexandratou *et al.*, 2011b, 2013**). La période de croissance des bactéries acétiques au cours de la fermentation est encore incertaine. En effet, **Lefeber *et al.* (2011)** ont montré qu'elles sont présentes seulement à la fin de la fermentation alors que **Papalexandratou *et al.* (2011b)** ont remarqué la présence d'*A. senegalensis* au début de fermentation.

5.3.3.4. Autres bactéries

Lorsque la fermentation dure au-delà de sept jours, les substrats microbiens du milieu s'épuisent et l'aération devient importante. De nouvelles populations microbiennes comme les

bactéries sporulées peuvent alors croître. Au cours de leur croissance, elles produisent un certain nombre de composés chimiques influençant les propriétés aromatiques des fèves. C'est le cas par exemple des espèces du genre *Bacillus* tels que*B. cereus, B. megaterium* et *B. coagulans, B. licheniformis* (**Nielsen *et al.,* 2007**).Le rôle de ces microorganismes dans la fermentation est mal connu (**Ouattara *et al*., 2008**). Toutefois **Ouattara *et al*. (2011)** pensent qu'elles produiraient des pectinases utiles lors de la fermentation des fèves. Par ailleurs, d'autres bactéries non sporulées comme la famille des *Enterobacteriaceae : Tatumella, Erwinia* et *Pantoea sp* sont également détectées dans la fermentation du cacao (**Papalexandratou *et al.,* 2011a ; Lefeber *et al.,* 2011**).

5.3.3.5. Moisissures

Les moisissures participent plus ou moins à la fermentation du cacao. Mais elles croissent généralement en cas de fermentation prolongée c'est-à-dire pendant une durée au-delà de 7-8 jours ou en cas d'un séchage insuffisant suivi de mauvaises conditions de stockage. La présence des moisissures sur les fèves de cacao marchand constitue un défaut de qualité majeur. En effet, des altérations majeures de la qualité du cacao comme la production des acides gras libres (**Guehi *et al.,* 2008**), la production de mycotoxines comme l'ochratoxine A (**Mounjouenpou *et al*., 2012 ; Kedjebo *et al*. 2015 ; Kouadio *et al*., 2015**), la détérioration de la couleur et l'apparition d'odeurs indésirablesrésultent de la contamination fongique(**Guéhi, 2003**). C'est en raison de cette dégradation de la qualité du cacao que le développement des moisissures est indésirable sur le cacao (**Guehi *etal.,* 2007**). Cependant, plusieurs études ont montré que les espèces fongiques les plus couramment rencontrées appartiennent aux genres *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Mucor* et *Rhizopus* (**Guehi *etal.,* 2007 ; Copetti *et al.,* 2011)**.

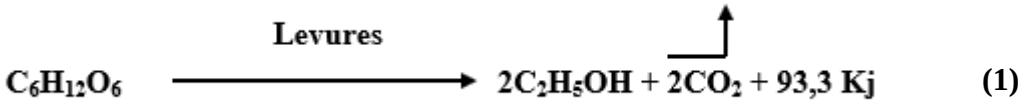
5.3.4. Principaux types de fermentation du cacao

La fermentation du cacao se déroule en trois principales étapes quelle que soit la technique utilisée : la fermentation alcoolique, la fermentation lactique et la fermentation acétique.

5.3.4.1. Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique du cacao a lieu pendant les premières 48 heures du processus sous l'action des levures. Elle se déroule en anaérobiose stricte occasionnée par la présence de la pulpe mucilagineuse qui réduit la diffusion de l'oxygène à travers la masse de

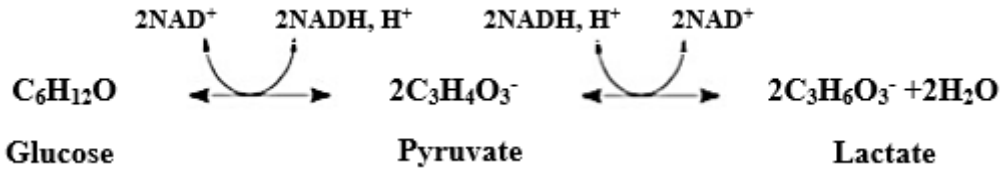
fèves (**Arana-Sanchez *etal.*, 2015**). Au cours de cette étape, la pulpe des fèves est alors considérablement liquéfiée sous l'action des levures qui transforment les sucres en éthanol avec un dégagement de CO_2 à la faveur d'une forte acidité (**Crafack *etal.*, 2013)**. Selon **Pereira*et al.*, (2012)** cette transformation se déroule entre 24 et 48 heures de fermentation selon une réaction chimique peu exothermique **(1).**



(1)

5.3.4.2. Fermentation lactique

Conduite sous l'action des bactéries lactiques, la fermentation lactique succède à la fermentation alcoolique. La liquéfaction de la pulpe entraînant une micro-aération, la transformation des sucres en alcool et l'augmentation du pH créent de nouvelles conditions favorables à la croissance des bactéries lactiques au détriment progressif des levures. Elles transforment alors les sucres résiduels en acide lactique, d'autres acides organiques, éthanol et en dioxyde de carbone (**Lagunes-Galvez *etal.*, 2007 ; Ho *etal.*, 2014**). Cependant, la production d'acide lactique est indésirable au cours de la fermentation du cacao. En effet, cet acide pénètre à l'intérieur des fèves et rend le produit final acide en raison de sa faible volatilité (**Barel, 2013**). Afin de réduire la fermentation lactique du cacao, il est recommandé d'effectuer des brassages au cours de la fermentation permettant d'entrainer l'aération de la masse des fèves et donc la croissance des bactéries acétiques au détriment des lactiques. La fermentation lactique se déroule selon la réaction **(2)**.



(2)

5.3.4.3. Fermentation acétique

Lafermentationacétique se déroule essentiellement sous l'action des bactéries acétiques. Les bactéries acétiques oxydent l'éthanol produit par les levures et par les bactéries lactiques en acide acétique avec production d'eau et un dégagement de chaleur. Selon **Lima et *al.* (2011)** et **Ho et *al.* (2014)** cela aboutit à une élévation de la température du milieu de fermentation à 45-50 °c suivantlaréaction chimique(3)**.** La pénétration de l'éthanol et de

l'acide acétique produits à l'intérieur des fèves ainsi que l'élévation de la température conduisent à la mort de l'embryon, la formation de précurseurs de composés d'arômes caractéristiques et le virage de la couleur des cotylédons du violet au brun (**Papalexandratou *etal.*, 2011b ; Crafack *etal.*, 2013 ; Pereira *etal.*, 2013**). La fermentation du cacao est arrêtée par des critères totalement subjectifs jusqu'à présent. Ces critères se déclinent en le gonflement des fèves, l'odeur de la masse, le changement de la couleur des cotylédons et la chute de la température. Toutes ces observations demandent de la pratique et de l'expérience de l'opérateur (**Lagunes-Galvez, 2005**).

$$C_2H_5OH + O_2 \xrightarrow{\text{Bactéries acétiques}} CH_3COOH + H_2O + 496\ kj \qquad (3)$$

5.4. Séchage du cacao

Après la fermentation, les fèves de cacao sont séchées en vue d'abaisser le taux d'humidité d'environ 60 à 7 % (**Prabhakaran Nair, 2010**) afin d'étendre la période de conservation et de stockage mais aussi de permettre des changements chimiques favorables à la qualité du produit (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). Le séchage des fèves de cacao fermentées déclenche des réactions majeures d'oxydation des polyphénols catalysées par la polyphénol oxydase. Ce qui contribue à la réduction de l'amertume et de l'astringence des fèves de cacao ainsi qu'à la production de l'acide acétique **(Afoakwa, 2010 ; Prabhakaran Nair, 2010)**. Des études ont montré que des composés aromatiques volatiles comme les pyrazines se forment en majorité pendant le séchage des fèves de cacao (**Watson *et al*., 2013)**. Le séchage revêt une importance cruciale pour la qualité finale des fèves de cacao. Le processus de séchage doit être lent afin de favoriser l'évaporation des acides volatils tel que l'acide acétique (**Zahouli *et al*., 2010 ; Saltini *et al*., 2013**). En effet, un séchage rapide du cacao entraîne une accumulation de l'acidité dans les fèves (**Kongor *et al*., 2016**). Toutefois un rythme de séchage trop lent entrainera une forte prolifération des moisissures (**Kongor *et al*., 2016 ; Zahouli *et al*., 2010**). Les techniques de séchage du cacao peuvent être donc classées en deux principaux types qui sont le séchage naturel ou solaireet le séchage artificiel ou industriel. Il existe un troisième type de séchage dit « séchage combiné » qui alterne le séchage naturel et le séchage artificiel ou vice versa (**Cros *et al*., 2010 ; Amoah-Awua, 2014**).

5.4.1. Séchage solaire

La production du cacao a lieu dans les pays tropicaux et subtropicaux. Par conséquent les fèves de cacao sont généralement séchées au soleil. Selon **Akmel *etal.* (2008)**, ce type de séchage se réalise sur divers supports dont les claies (**Figure 11A**), les bâches noires (**Figure 11B**), des aires cimentées (**Figure 11C**) ou bitumées (**Figure 11D**) et est généralement utilisé par les petits exploitants. Il optimise la qualité du produit et nécessite de faibles investissements. En effet, il permet la migration des précurseurs d'arômes qui ont été formés lors de la fermentation à l'intérieur des fèves (**Guehi *et al*., 2010a**). Cependant, il présente les inconvénients de nécessiter une importante main d'œuvre permanente pour le brassage et le ramassage du produit en cas de pluie ou en fin de journée, ainsi que de surfaces importantes de séchage **(Barel, 2013)**. Sa durée dépendant des conditions climatiques et très variable. Ce qui crée une sérieuse fluctuation du taux d'humidité et donc de la qualité des fèves (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**).

Figure 11A-D. Diverses techniques de séchage solaire de cacao : A) Séchage sur claie, B) Séchage sur une bâche plastique, C) Séchage sur une aire cimentée, D) Séchage sur une aire bitumée

5.4.2. Séchage artificiel

Lorsque les conditions climatiques sont défavorables le séchage solaire devient inefficace. Le séchage artificiel du cacao s'effectue généralement dans les régions où les conditions climatiques sont humides (**Owusu-Boateng & Owusu, 2015**). Dans ce cas, les exploitants du cacao utilisent alors le séchage artificiel réalisé à partir de séchoirs à gaz et/ou aux feux de bois, de systèmes électriques. Les formes les plus simples de séchoirs artificiels sont les séchoirs à convection ou de type Samoa qui se composent d'un flux simple de chaleur émanant d'une chambre de combustion et d'une plate-forme de séchage perméable au-dessus (**Figure 12B**). Les entrées d'air doivent être prévues afin de laisser passer le flux de convection de chaleur sans permettre à la fumée de se déposer sur les fèves. Ces séchoirs sont simples à construire et ont été utilisés au Cameroun, au Brésil et aux îles Salomon (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015).** Il existe d'autres séchoirs artificiels à plate-forme utilisant des échangeurs de chaleur **(Krysiak, 2011 ; Abouo *et al.*, 2015 ;Kamenan *et al.*, 2017)**. Ces séchoirs peuvent utiliser des ondes, de l'huile ou des combustibles solides comme source de chaleur. L'ajout d'un ventilateur force l'air chaud à travers les fèves et crée un séchoir à tirage forcé (**Figure 12A**). Un autre type de séchoir utilise la conduction. Cependant, les inconvénients de ce mode de séchage sont de nécessiter des investissements pour l'acquisition des équipements et surtout des dépenses énergétiques importantes (**Oke & Omotayo, 2012**). Aussi ce mode de séchage augmente-t-il le risque de formation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (**Afoakwa*et al.*, 2014 ; Lowor *et al.*, 2012 ; Nogbou *et al.*, 2015**).

Figure 12A-B. Différents types de séchoir artificiel. A) Séchoir à convection forcée Source : **Kamenan *et al*., (2017)**, B) Séchoir de type Samoa. Source :https://fambolena.com/page/cacao-cote-ivoire

5.5. Stockage du cacao

Après le séchage, les fèves de cacao marchandes sont conditionnées et stockées soit au niveau du producteur, soit au niveau des magasins des coopératives ou au niveau de l'exportateur et/ou dans les entrepôts des industriels. Mais avant, les fèves de cacao sont débarrassées de toutes matières étrangères et emballées dans des sacs en jute (**Figure 13**) selon les exigences de la filière de production. Pendant des périodes de stockage plus longues, la qualité des fèves de cacao peut être sérieusement affectée si des soins appropriés ne sont pas appliqués. Une humidité relative de stockage de 65 à 70 % permet une longue conservation des fèves de cacao bien séchées présentant une teneur en humidité de 7 à 8 % **(CAOBISCO/ECA/FCC, 2015)**.

Figure 13. Emballage de fèves de cacao dans des sacs en jutes. Source : www.google.fr

6. QUALITE DES FEVES DE CACAO

L'industrie du cacao a besoin d'une offre durable et homogène de fèves de cacao dotées de traits qualitatifs répondant à ses multiples exigences. Divers types de cacao sont nécessaires pour satisfaire la demande du marché complexe du chocolat et de produits dérivés du cacao. La sécurité des denrées alimentaires dans ce marché, l'efficience et le rapport coût efficacité sont des facteurs clés outre les exigences qualitatives du consommateur. La qualité des fèves étant à l'origine des composants aromatiques et nutritionnels spécifiques du cacao, il convient d'insister sur l'importance d'un niveau élevé et uniforme de qualité. Le terme "qualité" ainsi employé englobe les caractéristiques physiques qui ont un impact direct sur la performance industrielle mais aussi les aspects essentiels liés à l'arôme et à la sécurité sanitaire des denrées alimentaires (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). La notion de qualité du

cacao en particulier peut être catégorisée selon les acteurs de la filière et se résumer selon la **Figure 14.**

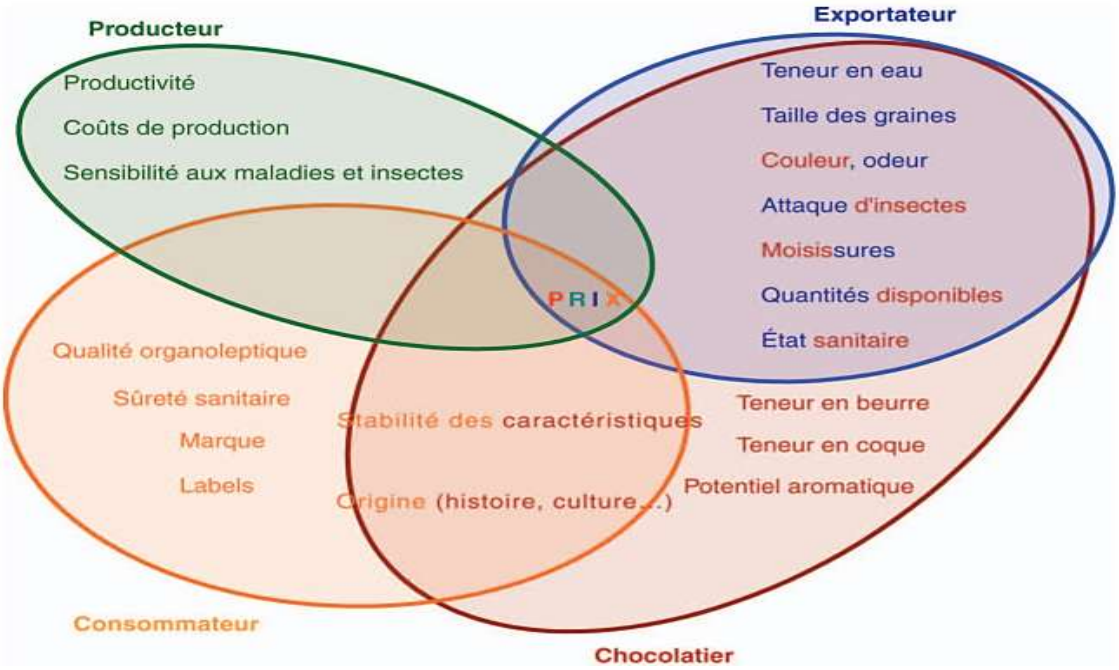


Figure 14. Notion de la qualité selon divers acteurs de la filière cacao. Source : **Barel (2013)**

6.1. Critères de la qualité marchande

La qualité marchande des fèves de cacao est définie par plusieurs normes dont une norme internationale négociée au sein de la FAO couramment utilisée dans de nombreux pays producteurs de cacao. Cette norme intègre à la fois, les défauts physiques, le grainage, la teneur en eau des fèves et la teneur en acides gras libres du beurre de cacao extrait.

6.1.1. Défauts physiques de qualité

Les défauts physiques de qualité des fèves marchandes sont déterminés par le grainage et l'épreuve à la coupe ou « *cut test* ». Le grainage consiste à déterminer le nombre de fèves contenu dans 100 g d'un lot de fèves prélevé aléatoirement. Le critère de bonne qualité pour ce paramètre est fixé à 100 fèves pour 100 g (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**).L'épreuve à la coupe quant à elle permet de déterminer les taux de fèves défectueuses, fèves moisies, fèves ardoisées d'une part et d'autre part d'apprécier le degré de fermentation par le taux de fèves violettes d'un lot de cacao **(Barel, 2013**). C'est un test qui consiste à couper longitudinalement 300 fèves de cacao marchand au moyen d'un couteau ou d'une « guillotine », d'observer les coupes réalisées à la lumière du jour et enfin à les classer selon les différentes catégories qui sont :

- **Fèves défectueuses :** ellescomprennent les fèves mitées par les insectes, les fèves plates et les fèves germées. Les fèves mitées présentent un orifice laissé par la présence ou le passage visible à l'œil nu d'un insecte. Les fèves plates sont celles dont les cotylédons sont si inexistants qu'ils ne présentent pas de surface coupée. Enfin, les fèves germées sont celles dont le germe est émergent ou absent laissant un orifice visible dans la partie distale de la fève ;
- **Fèves violettes :** ce sont des fèvesinsuffisamment fermentées. Leur coupe présente une couleur violette ou pourpre, avec peu d'arôme et une astringence ou une amertume prononcée ;
- **Fèves ardoisées :** la couleur des cotylédons de ce type de fèves est grise ardoisée et lisse. Les fèves ardoisées ne sont pas fermentées et sont sans arôme avec de fortes astringence et amertume ;
- **Fèves moisies** : ce sont des fèves dont la coupe des cotylédons présente des moisissures visibles à l'œil nu par la présence de filaments (hyphes fongiques), ou de poudre de couleur soit blanchâtre soit vert grisâtre ou jaune claire qui sont en fait les spores fongiques.

Ainsi l'épreuve à la coupe permet de catégoriser en différents grades de qualité marchande (**Tableau I**) selon les normes internationales les lots de cacao destinés à l'exportation (**Kédjébo, 2016**).

Tableau I. Norme de qualité du cacao marchand selon la FAO

Grade	Défaut de qualité du cacao		
	Fèves moisies (%)	Fèves ardoisées (%)	Fèves défectueuses (%)
Grade I	**3**	**3**	**3**
Grade II	**4**	**8**	**6**
Hors grade	**>4**	**>8**	**>6**

Source : **Barel (2013)**

Grade I : Cacao de bonne qualité marchande

Grade II : Cacao de qualité marchande moyenne

Grade III : Cacao de qualité marchande défectueuse

6.1.2. Taux d'humidité

Le taux d'humidité des fèves de cacao marchand doit être inférieur à 8 % m/m (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). S'il est supérieur à 8%, le risque de contamination fongique est élevé **(Guehi *et al.*, 2010a ; Dano *et al.*, 2013)** avec de sérieuses conséquences potentielles pour la sécurité, l'arôme et la qualité de transformation du cacao (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). Cependant, si la teneur en humidité est inférieure à 6,5%, la coque sera trop fragile et les fèves se désagrègeront facilement. Ce qui produira un niveau élevé de fèves brisées avec des risques d'obtention de teneurs en acides gras libres au-delà des spécifications.

6.1.3. Caractéristiques et qualité du beurre de cacao

Le beurre de cacao est un mélange de triglycérides dont la plupart contiennent de l'acide stéarique, palmitique et/ou oléique à des proportions variables, donnant lieu à diverses propriétés physiques et rhéologiques de la matière grasse (**Guéhi, 2003**). Sa proportion dans la formulation du chocolat influe le processus de fabrication, la texture et son apparence du produit fini. C'est pourquoi les chocolatiers préfèrent du beurre de cacao relativement dur et uniforme. Les acides gras libre (AGL) peuvent avoir un impact sur la duretéet la rhéologie en somme la qualité du beurre de cacao. Ces AGL sont libérés essentiellement à partir des triglycérides sous l'action d'enzymes lipolytiques ou lipases qui peuvent être d'origine endogène ou exogène notamment microbienne résultant de mauvaises pratiques post-récolte (**Guehi *et al.*, 2008 ; Guéhi, 2003**). Le beurre de cacao à haute teneur en AGL est généralement moins ferme que celui qui contient moins d'AGL (**CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). Un beurre de cacao à haute teneur en AGL intégré à la formulation du chocolat altère la qualité finale du produit. En effet, les AGL affectent la cristallisation, le tempérage et éventuellement l'arôme du chocolat. Une teneur en AGL d'un beurre de cacao supérieure à 1,75 % est un mauvais critère de qualité selon la Directive 2000/36/EC (**European Union, 2000**) et norme 86-1981, Rev.1- 2001 (**Codex Alimentarius, 2001**).

6.2. Déterminant de la qualité sanitaire

Il est essentiel que les produits cacaotés et le chocolat soient sains et consommés sans problème pour la santé des consommateurs. Pour cela, des normes et des directives internationales ont été décidées (**CAOBISCO, 2011; CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). Les principaux problèmes de sécurité sanitaire au niveau du cacao sont liés aux allergènes, bactéries, dioxines, polychlorobiphényles (PCB), métaux lourds (cadmium), hydrocarbures

polycycliques aromatiques (HAPs), AGE, AHA, les mycotoxines comme l'ochratoxine A (OTA) et aux résidus de pesticides (**Maharaj *et al.*, 2014**). Cependant les situations sanitaires les plus mises en avant sont les problèmes des HAPs, d'OTA et du cadmium. Ces composés à risques sanitaires très élevés sont l'objet d'une attention toute particulière et d'une vigilance de la part des pays industrialisés. Les HAPs en particulier constituent une classe de composés organiques très toxiques et très répandus dans l'environnement relativement à leur source d'exposition, à leur caractère très lipophile et leur capacité d'induire des mutations au niveau de l'ADN (**IARC, 2012 ; EFSA, 2008**). Leur effet néfaste sur la santé est aujourd'hui confirmé. A partir de 2006 des normes Européennes en ont fixé les teneurs maximales admises dans diverses denrées alimentaires dont les fèves de cacao. Quant à l'OTA, c'est une toxine produite par des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus et Penicillium.* Son effet toxicologique sur la santé humaine est dû à ses propriétés cancérigènes, néphrotoxiques avérés(**Copetti *et al.*, 2013**).

7. PRODUCTION ET TRANSFORMATION MONDIALE DU CACAO

7.1. Production

Le cacao est un produit d'exportation vital pour l'économie de nombreux pays producteurs d'Afrique qui produisent environ 72 % de l'offre mondiale. Aussi constitue-t-il une source de devises pour certains pays d'Amérique latine (10 %) ainsi que d'Asie et d'Océanie (6 %) (**Figure 15**). Selon **l'ICCO (2018)**, la production mondiale du cacao 2017/2018 a été d'environ 4, 645 millions de tonnes. La Côte d'Ivoire est le leader des pays producteurs de cacao avec plus 40 % de l'offre mondiale (**Figure 16**).

Figure 15. Principales zones de production mondiale du cacao. Source : **ICCO (2018)**

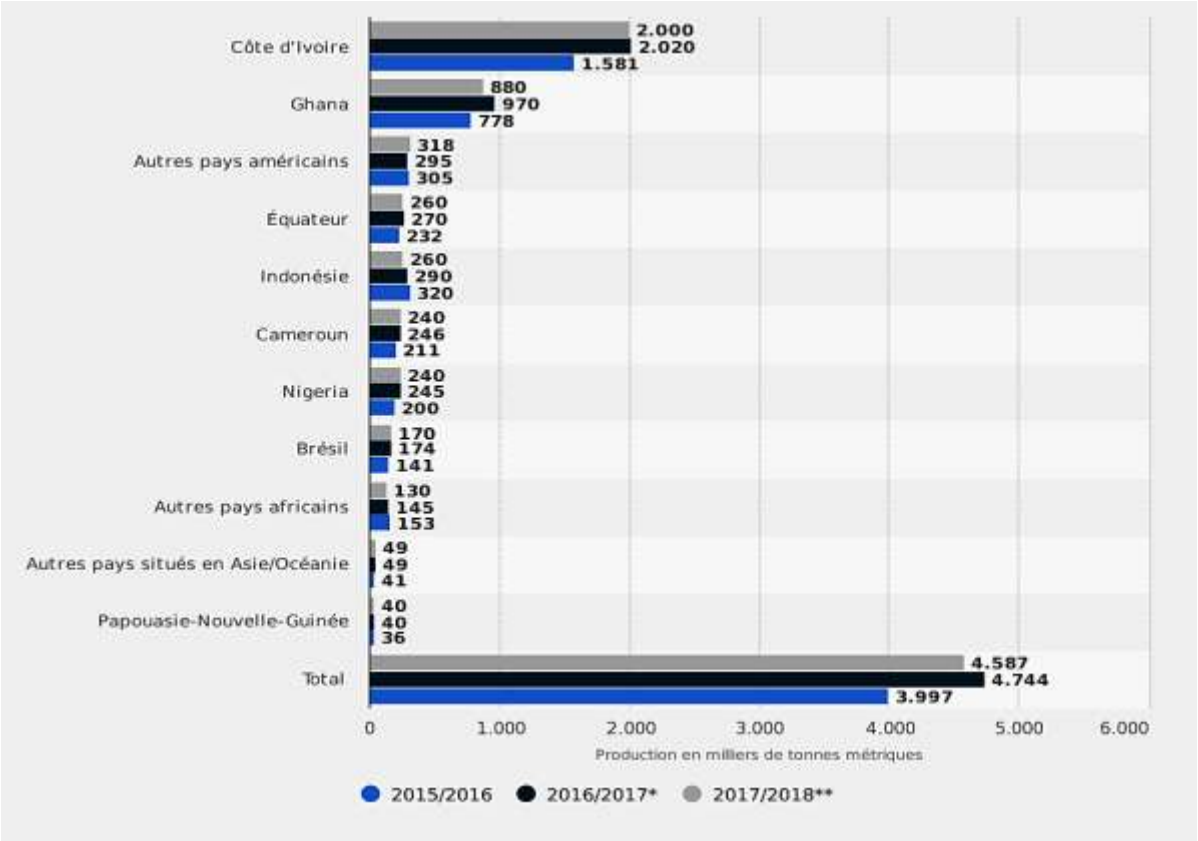


Figure 16. Production mondiale de fèves cacao de 2015/2016 à 2017/2018 par pays (en millier de tonne métriques). Source : **ICCO (2018)**

7.2. Transformation

7.2.1. Statistiques de transformation du cacao

Bien que les pays Africains soient les plus grands producteurs, le taux de transformation du cacao en Afrique est de seulement de 20 % tandis que près de 37% de la production mondiale de fèves de cacao sont transformés en Europe (**Figure 17**). L'Asie-Océanie et l'Amérique en transforment respectivement 22 et 21%.

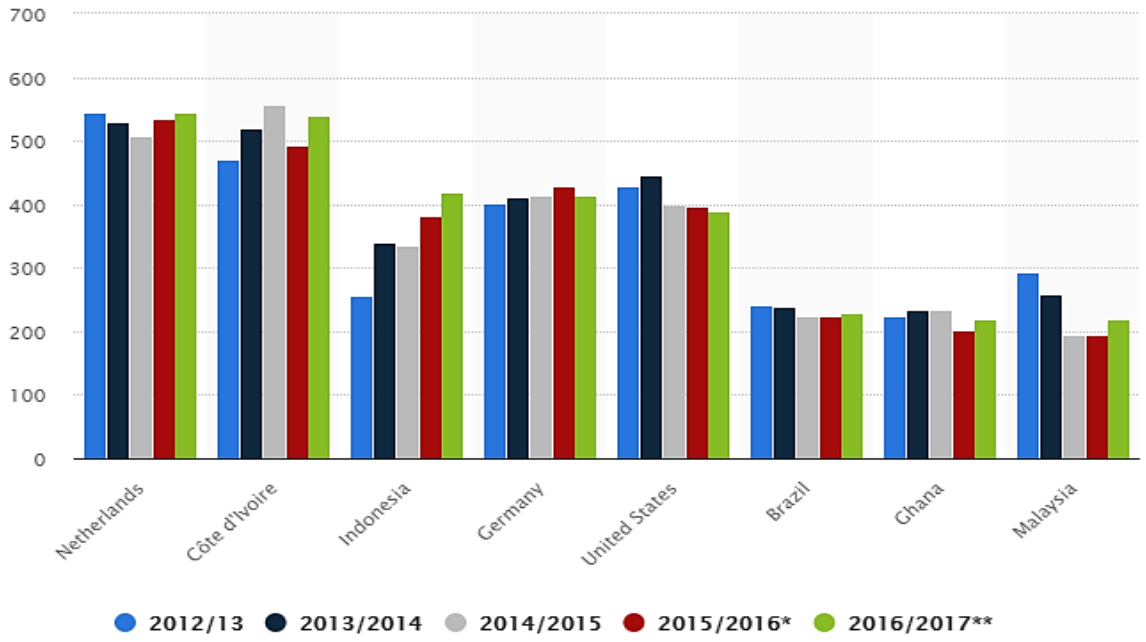


Figure 17. Principaux pays transformateurs des fèves de cacao de 2012/2013 à 2016/2017 (en milliers de tonnes) Source : **ICCO (2018)**

7.2.2. Consommation mondiale du cacao

D'après **l'ICCO (2017),** le pays consommateur le plus important est les États-Unis, suivis par l'Allemagne, où environ 9 % du cacao produit dans le monde est consommé (**Figure 18**). Les États-Unis et l'Allemagne représentaient à eux seuls 20 % de la consommation mondiale de cacao (2010). L'Allemagne est le premier producteur de chocolat en Europe. En 2017, les ventes de chocolat aux États-Unis représentent 22 milliards de dollars. Selon les données de **l'ICCO (2017)** illustrées par la **Figure 18**, la répartition de la consommation mondiale du cacao pour l'année 2016-2017 était de : Etats-Unis (18,40%), Allemagne (8,81%), France (5,66%), Grande bretagne (5,51%), Brésil (4,76%), Russie (4,63%), Japon (4,38%), Italie (2,64%), Autres pays (45,21%).

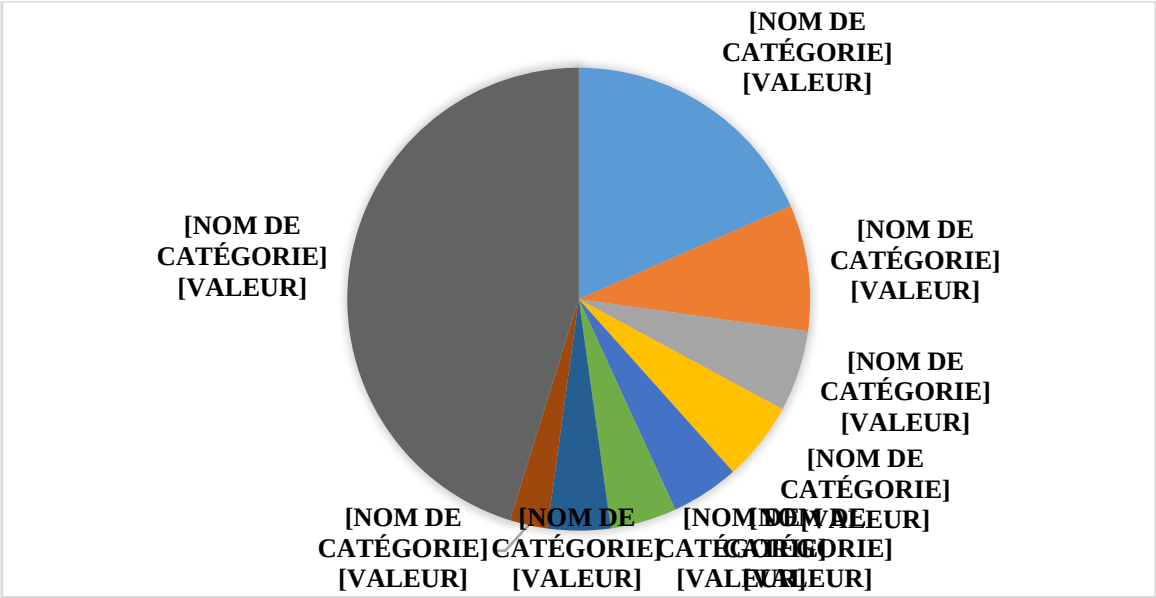


Figure 18. Répartition mondiale de la consommation du cacao en 2015/2016 en millier de tonnes. Source : **ICCO (2017)**

8. CACAO-CULTURE EN CÔTE D'IVOIRE

8.1. Caractéristiques de la filière de cacao

Les cacaos cultivés en Côte d'Ivoire sont principalement du groupe *Forastero* (cultivar Amelonado). Mais avec des échanges incontrôlés de semences entre les producteurs ivoiriens et les producteurs ghanéens la cacao-culture ivoirienne a une large proportion de cacaoyers hybrides sélectionnés ou non. La récolte du cacao en Côte d'Ivoire s'effectue sur deux saisons: une grande campagne qui dure 5 à 6 mois de septembre à février selon les bassins de production et une petite campagne de 3 mois de mai à juillet. Les principaux bassins de production du cacao sont situés dans la partie méridionale du pays et se répartissent à l'Ouest, au Sud, au Sud-Est, au Sud-Ouest, au Centre et au Centre-Ouest. Tous ces bassins sont globalement caractérisés par des températures moyennes (25 à 30 °C), un fort taux d'humidité (80-90 %) et des précipitations annuelles abondantes allant de 1766 à 2129 mm. Le nombre des cueillettes pendant la récolte principale peut varier entre 4 et 5 en raison d'une récolte toutes les 3 ou 4 semaines. La récolte du cacao s'opère au moyen soit de machette pour les cabosses à portée de mains, soit de coutelas attaché au bout d'une perche appelé sécateur. Quant aux techniques de fermentation, elles varient en fonction des régions productrices. Ainsi à l'Est, au Sud et au Sud-Est du pays, 50 % des planteurs fermentent leurs cacaos en tas dans des feuilles de bananiers, contre 50 % dans des bâches noires en plastique (**Guéhi *et al.*, 2010b ; Kouakou *et al.*, 2013**). Au Sud-Ouest et au Centre-Ouest, 70 % des producteurs utilisent des bâches noires en plastique, 20 % les feuilles de bananiers et seulement 10 %

combinent les deux matériaux. Quelle que soit la technique adoptée, la durée moyenne de fermentation est de5 à 6 jours. La fermentation s'effectue généralement avec au maximum 2 brassages de la masse de fèves. Certes quelques rares unités agro-industrielles utilisent le séchage artificiel du cacao, mais le séchage solaire est le mode de séchage le plus répandu et le plus couramment pratiqué en Côte d'Ivoire. Quatre supports de séchage comme la claie, l'aire cimentée, la bâche plastique et parfois le bitume au bord des grands axes routiers sont utilisés. Cependant le séchage du cacao sur le bitume est officiellement proscrit et entraîne des sanctions pénales ou destruction du produit de la part du Conseil Café Cacao. L'utilisation de la claie est plus fréquente dans le Sud-Ouest et l'Est en raison de la disponibilité des matériaux forestiers (**Guehi *et al*., 2010a**).

8.2. Système de gestion

L'histoire de la gestion de la filière cacao en Côte d'Ivoire rime avec celle de la Caisse de Stabilisation et de Soutien des Prix des Produits Agricoles (CAISTAB). Cette structure, créée en 1962 puis liquidée en 1999, a été l'instrument de gestion de la filière et de la politique agricole nationale dès l'indépendance du pays. Elle a été le maître d'œuvre du développement des cultures du café et du cacao et des premières réformes de la filière. Ainsi plusieurs réformes ont été mises en œuvre avec les mêmes objectifs spécifiques, à savoir le retrait de l'Etat de la filière et l'amélioration des revenus des planteurs. La réforme actuelle, débutée en 2011 et mise en œuvre par le Conseil du Café Cacao (CCC) vise principalement à promouvoir une économie cacaoyère durable.

8.3. Statistiques de production et transformation du cacao

Le cacao constitue un produit très stratégique pour l'économie ivoirienne. La production nationale moyenne annuelle est d'environ 1,900 millions de tonnes, soit plus de 40 % de l'offre mondiale en 2016/2017 (**ICCO, 2017**). Les revenus générés par l'exportation du cacao représentent 40 % des recettes d'exportation et environ 10 % du Produit Intérieur Brut (PIB) du pays. Sur le plan macro-économique, la Côte d'Ivoire occupe le rang de premier broyeur mondial des fèves de cacao avec quelques unités industrielles de transformation absorbant environ 20 % de sa production. Malgré cette performance, la filière cacao reste très marquée par un très faible niveau de transformation locale, la grosse partie étant exportée à l'état brut à destination des pays Européens et des Etats-Unis. Cependant, la volonté politique des autorités de Côte d'Ivoire est de hisser le taux de transformation à 50 % de la production nationale d'ici 2020.

II. GENERALITES ET TOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs)

1. GENERALITES SUR LES HAPs

1.1. Définition

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ou polynucléaires (HAPs) constituent une famille chimique comptant plus d'une centaine de composés dont 16 consignés dans la **Figure 19** sont considérés comme prioritairement toxiques (**Zelinkova & Wenzl, 2015 ;Singh *et al.*, 2016**). Ils sont un groupe de composés formés à partir de deux ou plusieurs noyaux aromatiques fusionnés de façon linéaires, angulaires, ou sous forme d'arrangements de cluster. Par définition, ils contiennent uniquement du carbone et de l'hydrogène (**Kuppusamy *et al.*, 2017**). Ils sont formés en grande majorité au cours de la pyrolyse ou la pyrosynthèse lors de la combustion incomplète des matières organiques comme les combustibles fossiles et les matières contenant du carbone et de l'hydrogène (**Alegbeleye *et al.*, 2017 ; Lowor *et al.*, 2012**). Les HAPs peuvent être classés selon le nombre d'anneaux aromatiques condensés comme des HAP légers (2-3 anneaux) ou lourds (4-6 anneaux). Leur stabilité et leur toxicité dépendent du nombre de leurs noyaux aromatiques constitutifs.

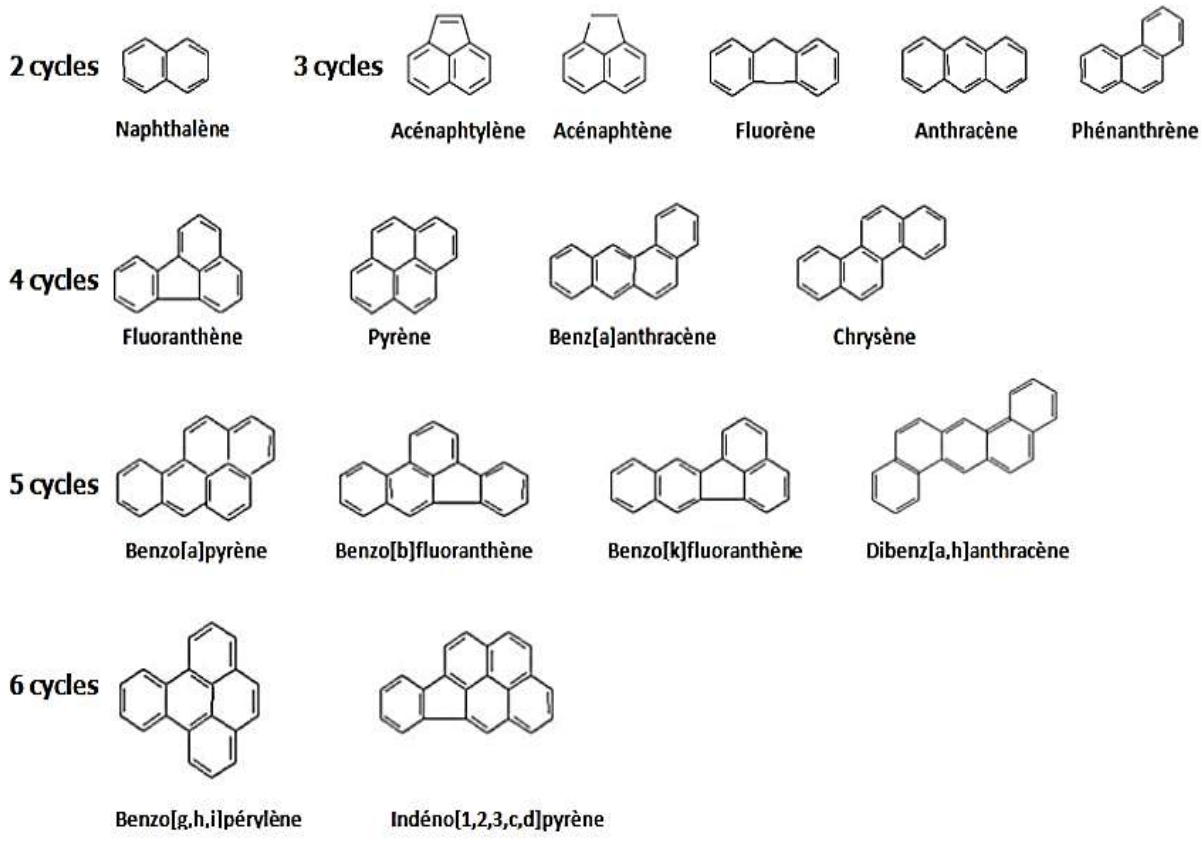


Figure 19. Structure chimique des 16 HAPs prioritaires

1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des HAPs sont des facteurs qui orientent la répartition de ces contaminants au niveau des phases solubles et particulaire dans l'atmosphère, les milieux aqueux et biotiques. Les propriétés physico-chimiques des HAPs intègrent le poids moléculaire, la solubilité dans l'eau et la densité (**Tableau II**). Les HAPs sont des composés aromatiques contenants entre deux et sept noyaux benzeniques conjugués. leurs masses molaires varient de 128 à 302 g/mol (**Ghosal *et al*., 2016 ; Singh *et al*., 2016**). En général, l'hydrosolubilité des HAPs diminue avec l'augmentation de poids moléculaire **(Zelinkova & Wenzl, 2015)**. Dans un environnement aqueux, les HAPs se trouvent adsorbés sur des particules et les matières humiques ou dissous **(EFSA, 2008)**.

Tableau II. Propriétés physico-chimiques des 16 HAPs prioritaires

HAPs	Poids Moléculaires ($g.mol^{-1}$)	Solubilité/eau ($mg.L^{-1}$)	Densité
Acénaphtène	154,21	3,8	1,024
Acénaphtylène	152,20	16,1	1,194
Anthracène	178	0,045	1,25
Benzo(a)anthracène	228	0,0094	1,27
Benzo(a)pyrène	252	0,0016	1,35
Benzo(b)Fluoranthène	252	0,0015	1,27
Benzo(g,h,i)Pérylène	276	0,0007	1,3
Benzo(k)Fluoranthène	252	0,008	-
Chrysène	228	0,0018	1,27
Dibenzo(ah) anthracène	278	0,005	1,28
Fluoranthène	202	0,206	1,2
Fluorène	166	1,68	1,2
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	276	0,0002	1,07
Naphtalène	128	31,7	1,02
Phénanthrène	178	1	1,18
Pyrène	202	0,132	1,27

Sources : **Zelinkova & Wenzl (2015) ; IARC (2012)**

1.3. Sources de formation

Les HAPs peuvent avoir des origines naturelles (feux de forêts, volcans, processus hydrothermaux, suintement d'huile et carbonisation) et anthropiques (principalement, la combustion de combustibles fossiles et les rejets directs de pétrole et produits pétroliers) (**Tarantini, 2010 ; Purcaro *et al.*, 2013**). De ces origines découlent deux grandes catégories de sources d'exposition (**Tableau III**). Ce sont les sources d'exposition environnementale et les sources d'exposition professionnelle (**Garnier, 2010**). La principale source d'exposition humaine aux HAPs est l'alimentation. En effet, l'ingestion des denrées alimentaires carnées fumées ou rôties en particulier, telles que les graisses, huiles végétales ou de produits contaminés constitue la principale source d'exposition de l'homme aux HAPs (**Singh *et al.*, 2016**).

Tableau III. Niveau de contamination humaine en HAPs selon les sources d'exposition. Source **: Menzie *et al*, (1992)**

Source de HAP	**Apport médian (µg/pers/j)**	**Pourcentage du total (%)**	**Apport maximum**	**Pourcentage du total (%)**
Non-fumeurs				
Alimentation	3	**96,2**	12	**79**
Air	0,05	**1,6**	2,7	**18**
Eau	0,006	**0,2**	0,124	**1**
Sol	0,06	**1,9**	0,4	**2**
Total	3,12	100	15,22	100
Fumeurs	**1 paquet/j sans filtre**		**3 paquets/j sans filtre**	
Fumée de cigarette	2 à 5		6 à 15	
Autres sources	3		15	
Total	5 à 8		21 à 30	

Mais aussi, les HAPs peuvent provenir de sources endogènes (formés in situ par des réactions de pyrolyse ou de carbonisation suivie des réactions bimoléculaires entre les radicaux précédemment formés lors de la pyrolyse et des alcènes, alcynes ou aromatiques) (**Houessou, 2007**). En effet, des glucides ou polyphénols, des acides aminés, des acides gras et des stéroïdes peuvent se dégrader dans des conditions bien définies de pyrolyse pour former des HAPs de 3 à 6 noyaux aromatiques (**Chen *et al.*, 2001 ; McGrath *et al.*, 2001, 2003 ; Britt *et al.*, 2004 ; Sharma *et al.*, 2006**). **Britt *et al.* (2004)** mentionne le rôle possible de la

réaction de Maillard dans la formation desintermédiaires dans le cas de la proline. En effet, la présence de glucose au cours de la pyrolyse de la proline à 840°C pendant 10 s, permetclairementd'augmenter les rendements de formation des HAPs. Cependant dans des conditions similaires, le composé proline Amadori permet un rendement de formation 2 à 8 fois plus élevé que la pyrolyse de la proline, même s'il n'est pas certain que la proline Amadori soit ou pas un intermédiaire réactionnel de Maillard.

1.4. Denrées alimentaires couramment contaminées en HAPs

1.4.1. Denrées alimentaires d'origine animale

1.4.1.1. Viandes

La viande et les produits carnés fumés sont très sujets à une contamination en HAPs (**Alomirah *et al.*, 2011**). Les sources des HAPs les plus incriminés sont les fours en fer, en acier ou en aluminium qui induisent un chauffage à haute température (**Manda *et al.*, 2012 ; Singh *et al.*, 2016**). La contamination des produits carnés par les HAPs se produit à cause de la combustion de matières organiques pendant le fumage (**Farhadian *et al.*, 2012**). La consommation de viande grillée (ou cuite au barbecue) constitue un facteur causal important de l'apport quotidien en Benzo(a)Pyrène (BaP) aux USA (**Kazerouni *et al.*, 2001**). Des teneurs élevées (0,02-17,63 $\mu g.kg^{-1}$) en BaP ont été détectées dans les produits dérivés de la viande de porc tels que le jambon fumé, le jambon de tripes de porc et le jambon fumé de sanglier à des concentrations comprises entre 0,02-17,63 $\mu g.kg^{-1}$ (**Janoszka, 2011**). La brochette de bœuf s'avère être contaminée par du Fluoranthène à une teneur variant de 6,22-13,8 $\mu g.kg^{-1}$ (**Farhadian *et al.*, 2010**). Par ailleurs, **Farhadian *et al.* (2011)** ont signalé la présence élevée de HAPs dans le poulet fumé et les brochettes de bœuf cuites sur des grilles.

1.4.1.2. Poissons

Les fruits de mer comme le poisson, les crevettes, les crabes, les huîtres et les moules sont contaminées par les HAPs à cause du mode de cuisson. Cependant ces toxiques peuvent être naturellement présents par l'intermédiaire des dépôts des HAPs provenant de l'air et du sol (**Abdel-Shafy & Mansour, 2016**). Toutefois les taux de 12 HAPs spécifiques dans des échantillons aquatiques ont été constaté inférieurs à la limite maximale fixée par la commission européenne **(EuropeanCommission, 2005)**. **Ramalhosa *et al.* (2012a)** ont signalé des concentrations plus élevées en naphtalène dans plusieurs espèces de poisson couramment consommés comme la sardine, le maquereau espagnol et le chinchard. Cela met

en évidence une corrélation positive entre la teneur en lipides et les concentrations résiduelles en HAPs (**Xu *et al.*, 2011 ; Ramalhosa *et al.*, 2012b**).

1.4.2. Denrées alimentaires d'origine végétale

1.4.2.1. Céréales

Les céréales sont l'une des principales voies alimentaires de l'exposition aux HAPs chez les humains (**Ledesma *et al.*, 2015**). Selon le mode de cuisson des produits dérivés des céréales, la contamination en HAPs se produit inévitablement (**Al-Rashdan *et al.*, 2010**). En effet, le type d'énergie utilisée comme l'électricité, le bois, la flamme ou l'énergie solaire pour le chauffage peut également contribuer à la contamination du pain par les HAPs (**Fasano*et al.*, 2016**). Dans la plupart des cas, l'exposition atmosphérique est la voie de contamination dominante chez les céréales (**Ashraf & Salam, 2012**).Certaines études ont mis en évidence des teneurs en HAPs comprises entre 7,38 et 18,0 $\mu g.kg^{-1}$ dans le pain grillé (**Nieva-Cano *et al.*, 2001**).

1.4.2.2. Fruits et légumes

Divers HAPs ont été détectés dans les fruits et les légumes (**Paris *et al.*, 2018**). L'accumulation de HAPs dans ces produits végétaux peut conduire à des niveaux d'exposition significatifs chez l'homme. Les fruits sont moins contaminés par les HAPs que les légumes. C'est le cas des légumes verts à larges feuilles comme la laitue et le chou qui enregistrent des teneurs en HAPs élevées respectives de 9 et 14 $\mu g.kg^{-1}$ (**Bansal & Kim, 2015**).

1.4.2.3. Huiles

Les graisses et les huiles sont des denrées alimentaires qui présentent généralement de fortes teneurs en HAPs. La formation des HAPs dans les huiles végétales s'explique par les effets combinés de multiples facteurs des procédés technologiques appliqués dont le séchage, le matériel d'emballage, les résidus d'huiles minérales et l'utilisation de l'eau contaminée (**Amzad et Salehuddin, 2012**). Les huiles végétales naturellement obtenues sont généralement exemptes de HAPs. Cependant, leur contamination augmente par dépôt atmosphérique sur les cultures ou pendant les traitements technologiques post-récolte (**Bansal & Kim, 2015**). Une enquête récente sur les niveaux de contamination des HAPs comparée de diverses huiles végétales a signalé neuf HAPs dans l'huile de maïs avec une teneur comprise entre 6,40 à 76,08 $\mu g.L^{-1}$. Parmi ces HAPs, le fluoranthène a été le prédominant suivi de Benzo (K) Fluoranthène (**Dost et İdeli, 2012**).

1.4.3. Boissons et confiseries

Toutes les boissons sucrées contiennent du sucre obtenu à partir de canne à sucre brûlée et de ses produits dérivés (**Bansal & Kim, 2015**). Parmi les boissons le lait et produits laitiers sont les plus contaminées par les HAPs. En effet, le traitement du lait fait intervenir des traitements thermiques dans la chaîne de valorisation. La mesure de la teneur en HAPs de divers types d'échantillons de lait a mis en évidence divers niveaux de contamination en HAPs (**Naccari *et al*., 2011**).

La formation des HAPs dans ces produits sucrés est attribuée au beurre de cacao et au sucre. Le niveau de contamination en HAPs du chocolat est affecté par le séchage, la torréfaction des fèves de cacao. **Ziegenhals *et al*. (2009)** ont analysé différents types de chocolat contenant diverses compositions de teneur en cacao. La concentration en BaP de ces chocolats varient de 0,07 à 0,63 $\mu g.kg^{-1}$ alors que la teneur en DBP était indétectable ($\leq$0,07 $\mu g.kg^{-1}$). Toutefois, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la teneur en HAP des chocolats testés et leur teneur en cacao (**Ziegenhals *et al*., 2009**). Par ailleurs, Le beurre de cacao a longtemps été considéré comme une source de contamination en HAPs en raison des processus de séchage inappropriés des fèves de cacao (**Lowor *et al*., 2012**). Cependant, un léger effet de barrière de la coque de cacao a été observé pour prévenir la formation des HAPs. Ainsi en 2011, l'union européenne a dû amender la réglementation de contamination relative aux fèves de cacao et ses produits dérivés à une concentration maximale de 5,0 $\mu g.kg^{-1}$ de matière grasse pour le BaP et de 35 $\mu g.kg^{-1}$ de graisse (**Raters et Matissek, 2014**).

2. TOXICITE DES HAPs

2.1. Mécanismes d'action

La toxicité des HAPs est liée à leur lipophilie et à leur faculté à modifier l'ADN avec la formation d'adduits. Cette lipophilie leur permet de passer facilement à travers toutes les barrières biologiques formées de phospholipides et se loger dans le noyau des cellules (**Fuxing Kang *et al*., 2010**). Il a été montré que les HAPs peuvent avoir des effets toxiques très variés, tels que des effets hématologiques, une phototoxicité, une immunotoxicité, une tératogénicité, une génotoxicité (**Ghosal *et al*., 2016)**. Depuis quelques années, les HAPs sont considérés comme potentiellement génotoxiques et cancérogènes pour l'être humain (**Misnawi, 2012 ; Kumari *et al*., 2012**). La cancérogénicité et la génotoxicité sont donc des effets sévères qui se produisent à de très faibles doses. Ainsi, les potentiels cancérogènes et génotoxiques les plus importants sont causés par les HAPs de haut poids moléculaire. Les HAPs les plus réactifs semblent être les composés dont la structure forme une région baie ou

une région fjord (**Huang & Penning, 2014 ; Singh *et al*., 2016**). Ces régions favorisent les réactions d'oxydation et la formation de radicaux libres (**Figure 20**). Dans tous les cas, il existe deux types de toxicité : la toxicité aigüe et la toxicité chronique. L'étude toxicologique des HAPs a montré qu'ils sont peuvent être responsables d'une toxicité aiguë et d'une toxicité chronique.

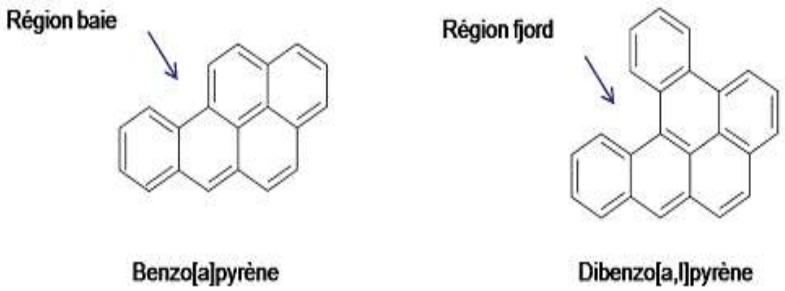


Figure 20. Caractéristiques structurales des HAPs potentiellement cancérogènes **(Huang & Penning, 2014).**

2.2. Toxicité aigüe

L'impact des HAPs sur la santé humaine dépend principalement de la durée et de la voie d'exposition de l'organisme ainsi que de la dose des HAPs (**Abdel-Shafy & Mansour, 2016**). Divers autres facteurs peuvent affecter les effets toxicologiques des HAPs sur la santé humaine. Ce sont principalement des facteurs subjectifs tels que l'état de santé, la sensibilité et l'âge de l'individu. Cependant, la capacité des HAPs à induire des effets à court terme sur la santé chez les humains n'est pas encore complètement élucidée. Et, les expositions professionnelles à des niveaux élevés de mélanges de polluants contenant des HAPs ont entraîné des symptômes toxicologiques tels que l'irritation des yeux, les nausées, les vomissements, la diarrhée, la confusion et une inflammation de la peau (**Unwin *et al*., 2006**). Néanmoins, on ne sait pas quels composants du mélange ont été responsables de ces effets. L'anthracène, le Benzo (a) Pyrène et le naphtalène sont des irritants cutanés directs chez les animaux et les humains (**IPCS, 2010**).

2.3. Toxicité chronique

Les effets sur la santé humaine par suite d'une exposition prolongée ou répétée des HAPs peuvent inclure une diminution de la fonction immunitaire, des cataractes, des lésions rénales et hépatiques, des problèmes respiratoires, des symptômes semblables à l'asthme et

des anomalies de la fonction pulmonaire. Pendant ce temps, les contacts chroniques avec la peau peuvent induire une rougeur et une inflammation de la peau. Le naphtalène peut causer la dégradation des globules rouges en cas d'inhalation ou d'ingestion en grandes quantités. Si un humain est exposé aux HAPs, les effets nocifs qui peuvent survenir dépendent en grande partie du type d'exposition (**Olsson *et al.*, 2010**).

3. EFFETS TOXICOLOGIQUES DES HAPs

3.1. Effet cancérigène

Bien que les HAPs non biotransformés puissent avoir des effets toxicologiques, la préoccupation majeure est la capacité des métabolites réactifs comme les époxydes et les dihydrodiols de certains HAPs à se lier aux protéines cellulaires et à l'ADN (**Abdel-Shafy & Mansour, 2016**). Les perturbations biochimiques et l'apparition des dommages cellulaires entraînent des mutations, des malformations du développement de l'embryon et/ou du fœtus, des tumeurs et des cancers. Néanmoins, il n'est pas encore clairement établi que l'exposition aux HAPs est la principale cause de certaines affections apparues chez des travailleurs exposés à un mélange de HAPs et d'autres polluants (**Tarantini, 2010)**. Parmi les HAPs, le Benzo (a) pyrène se décline comme le premier agent cancérogène chimique (**Bratinova *et al.*, 2015**).

3.2. Effet tératogène

Les effets embryotoxiques des HAPs ont été décrits au laboratoire chez des animaux exposés aux HAPs tels que benzo (a) anthracène, benzo (a) pyrène et naphtalène (**Jedrychowski *et al.*, 2017**). Des études menées sur des souris ont démontré que l'ingestion des doses élevées de benzo (a) pyrène pendant la grossesse entraîne des anomalies congénitales et une diminution du poids corporel chez les descendants (**Jedrychowski *et al.*, 2014**). L'on ignore encore si ces effets peuvent se produire chez les humains. Néanmoins, il a été signalé et démontré que l'exposition à la pollution par les HAPs pendant la grossesse cause un accouchement prématuré, un faible poids à la naissance et des malformations cardiaques de nouveau-né. L'exposition prénatale élevée aux HAPs est également associée à un quotient intellectuel (QI) inférieur à l'âge de trois ans, à des problèmes de comportement accrus à six et huit ans et à l'asthme chez l'enfant. Le sang des bébés exposés montre des dommages de l'ADN qui sont liés au cancer (**Edwards *et al.*, 2010 ; Abdel-Shafy & Mansour, 2016**).

3.3. Effet immunotoxicologique

Il a été signalé au laboratoire que les HAPs induisent la suppression de la réaction immunitaire chez les rongeurs (**IPCS, 2010**). Les mécanismes précis de la toxicité immunitaire induite par les HAPs ne sont toujours pas clairs. Toutefois, il a été conclu que l'immuno-suppression pourrait être impliquée dans les mécanismes par lesquels les HAPs induisent un cancer. Les effets immuno toxiques des HAPs ont été étudiés pendant de nombreuses années. Quelle que soit la voie d'exposition, les effets résultants ont été considérés principalement au niveau systémique. Cependant, très peu d'études ont porté sur des altérations du système immunitaire intestinal local. En outre **Burchiel *et al*. (2001**) indiquent que l'immunodéficience est signalée après une exposition atmosphérique ou en utilisant des systèmes in vitro.

3.4. Effet génotoxique

Les effets génotoxiques dus à certains HAPs ont été démontrés à la fois chez des rongeurs et des tests in vitro utilisant des lignées cellulaires de mammifères (**Abdel-Shafy & Mansour, 2016**). La plupart des HAPs ne sont pas génotoxiques par eux-mêmes. Mais une fois métabolisés par les époxydes de diol, ils réagissent avec l'ADN et induisent des dommages génotoxiques. En effet, les HAPs subissent de multiples biotransformations qui peuvent conduire à la formation de dérivés électrophiles capables de causer une interaction covalente avec des centres nucléophiles de macromolécules. Le mécanisme de mutagénicité des HAPs a été principalement étudié à l'aide de Benzo(a)pyrène et Benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde (BaPDE) en tant que composés modèles (**Tarantini, 2010**).

4. MAITRISE DE LA CONTAMINATION DES HAPs DANS LA CHAINE ALIMENTAIRE

4.1. Facteurs influençant la formation des HAPs

Les fortes concentrations en HAPs de différentes denrées alimentaires ont attiré l'attention sur leurs procédés de préparation. En effet, les processus de transformation, d'emballage et de conservation thermiques ont contribués significativement à la formation des HAPs (**Ledesma *et al*., 2014 ; Orecchio *et al*., 2009**). En effet, les radicaux libres générés lors de la cuisson des aliments à haute température (250 – 700°C) subissent des recombinaisons aboutissant à des HAPs qui se lient à des chaînes hydrophobes des aliments gras (**Luzardo *et al*., 2013a, b**). Au total, les processus de formation des HAPs peuvent être

regroupés en deux principaux types qui sont les processus directs de formation et les autres processus.

4.1.1. Processus direct de formation des HAPs

4.1.1.1. Cuisson par chauffage

La formation des HAPs dans les aliments se déroule par chauffage direct à haute température. Les HAPs évalués dans du lait traité thermiquement présentent des teneurs en HAPs croissantes comme suit : lait cru < lait pasteurisé < lait demi-écrémé à haute température (UHT) < lait entier UHT (**Naccari *et al.*, 2011**). Ainsi la présence de chrysène dans du lait pasteurisé et ultra haute température (UHT) et celle du benzo (k) fluoranthène dans du lait entier UHT montrent l'important rôle du traitement thermique dans la formation des HAPs.

4.1.1.2. Séchage

Le séchage est une technique de conservation couramment utilisée pour éliminer l'humidité des denrées alimentaires. Le séchage peut se réaliser selon deux modes : le mode naturel ou solaire et le séchage artificiel. Ce dernier s'effectue dans des fours industriels à petite échelle. La contamination en HAPs du maïs se fait par deux procédés dont la pyrolyse entraînant une formation de HAPs instables et la pyrosynthèse favorisant la transformation très complexe en HAPs. Le séchage par la fumée de graines oléagineuses, les degrés de séchage et les procédés de raffinage favorisent des teneurs en HAPs dans les huiles végétales (**Ciecierska & Obiedzinski, 2013 ; Muntean *et al.*, 2013**).

4.1.1.3. Cuisson au four

La cuisson au four ou sur gril est employée pour divers produits comme les gâteaux, les tartes, les pâtisseries, les pains, les biscuits etc. Ce traitement souvent réalisé à des hautes températures contribue à la formation de HAPs. En effet, la teneur en HAPs du pain cuit au four est 2-6 fois plus élevée que celle de la farine (**Ciecierska & Obiedzinski, 2013**).

4.1.1.4. Grillage et/ou torréfaction

Le poisson rôti présente une variabilité dans le taux de phénanthrène et en acénaphtène. L'effet des méthodes de cuisson comme le grillage au four électrique et le rôtissage direct au charbon de bois sur les contaminations en HAPs de la viande a été mis en évidence (**Onyango**

***et al.*, 2012**). A près de 220 °C, les grains de café présentent aussi des teneurs en Phénanthrène, Benzo(a)anthracène et en Anthracène (**Olesen *et al.*, 2015**).

4.1.1.5. Cuisson par friture

Les acides gras mono-insaturés présents dans les huiles ou les graisses subissent l'aromatisation et la déshydrocyclisation. Ce qui favorise la formation des HAPs dans les aliments frits **(Olatunji *et al*., 2014)**. **Perelló *et al*. (2009)** ont montré que des concentrations en HAPs dans les aliments frits de l'ordre de13,30 à 35,42 $\mu g.kg^{-1}$ sont plus élevées que celles des mêmes aliments cuits par d'autres techniques (3,15 - 27,93 $\mu g.kg^{-1}$).

4.1.1.6. Cuisson par traitement aux micro-ondes

Les boulettes de viande semi-cuites contiennent des teneurs en HAPs de 4,44±1,90 $\mu g.kg^{-1}$ avec 0,09 $\mu g.kg^{-1}$ de B(a)P et 0,19 $\mu g.kg^{-1}$ Benzo(b)Fluoranthène (**Sengun *et al*., 2014**). En effet, pendant la cuisson aux micro-ondes, la température à cœur des aliments atteint 75 °C et pendant la cuisson infrarouge, les températures à la surface de l'aliment sont proches de 120 °C facilitant la formation des HAPs.

4.1.1.7. Cuisson par rôtissage

Les aliments cuits directement sur des flammes ou des braises présentent généralement des teneurs en HAPs élevées. Pendant la cuisson, la graisse s'égoutte de l'aliment et chute sur les flammes et les braises. Ce qui provoque la production d'une fumée grasse qui transportent les HAPs et les déposent comme un revêtement sur les aliments rôtis **(Lin *et al*., 2011**). Par exemple, le kebab préparé à partir de filets de viande rôties sur grille verticale en rotation présent des teneurs élevées en HAPs **(Lin *et al*., 2011**).

4.1.1.8. Cuisson sur barbecue

Les aliments cuits sur barbecue à charbon présentent des concentrations en HAPs différentes de celles des aliments frits, grillés et rôtis (**Rose *et al*., 2015**). En effet, la teneur en HAPs majoritaires des aliments cuits sur le barbecue sont parfois de 2 à 8 fois supérieures à celles de des viandes de bœuf, de poulet et de porc fait-maison (**Dost et Ideli, 2012**) qui sont respectivement 17,3, 1,1 et 2,6 $\mu g.kg^{-1}$ (**Aaslyng *et al*., 2013**). Les feux de gaz, les surfaces de cuisson des aliments, les gouttes de graisse et la distance étroite entre l'aliment et la source de chaleur ont été les principaux facteurs de contamination des HAPs dans les échantillons grillés (**Rose *et al*., 2015**)

4.1.1.9. Cuisson par fumage

La fumée générée par une combustion incomplète au contact des aliments entraîne leur contamination en HAPs pendant la cuisson. Cependant, la composition de la fumée est fortement affectée par l'énergie d'oxydation du processus, le type de générateur, le carburant utilisé, la présence d'agents aromatisants et la température de combustion (**Esposito *et al*., 2015**).

4.1.2. Autres processus de formation des HAPs

Les concentrations naturelles en HAPs des aliments comme les herbes et plantes légumes **(Martens *et al*., 2011)**, les techniques de broyage **(Tfouni *et al*., 2009)**, le conchage **(Kumari *et al*., 2012)**, le stockage à proximité des produits à base de HAPs **(Machado *et al*., 2014)** sont autant de voies de formation des HAPs dans les aliments.

4.2. Méthodes de dégradation microbienne des HAPs

Les moyens de dégradation des HAPs sont divers et se déclinent en l'adsorption, la volatilisation, la photolyse, dégradation chimique et en la dégradation microbienne (**Ukiwe *et al*., 2013)** La bioremédiation ou biodégradation est un outil qui permet par l'intermédiaire de microorganismes, de transformer des polluants et autres contaminants de l'environnement en des formes sans innocuité avec moins d'apport en produits chimiques, en énergie et en temps (**Kadri*et al*., 2017 ; Kuppusamy *et al*. 2017**). En effet, les microorganismes sont connus pour leur activité catabolique dans la bioremédiation. Mais les changements dans les communautés microbiennes sont à ce jour imprévisibles et de ce fait elle est encore appelée « boîte noire » (**Dua *et al*., 2002**). Les microorganismes catabolisant les HAPs sont nombreux et diversifiés. Ils appartiennent aux algues, bactéries et aux champignons. Leurs actions conduisent à des métabolites moins complexes et en minéraux inorganiques. Ainsi, les bactéries et les champignons ont été particulièrement étudiés pour leur capacité à dégrader les HAPs. Le niveau et le taux de dégradation des HAPs par les microorganismes dépendent de nombreux facteurs tels que le pH, la température, l'oxygène, la biomasse, le degré d'acclimatation, l'accessibilité aux nutriments, la structure chimique du composé, les propriétés du transport cellulaire et le partage chimique en milieu de croissance (**Srivastava & Kumar, 2019**).

4.2.1. Utilisation des bactéries

Les espèces bactériennes appartenant à divers genres tels que *Pseudomonas, Micrococcus, Cellulomonas, Mycobacterium, Haemophilus, Rhodococcus, Paenibacillus, Bacillus, Aeromonas, Burkholderia, Xanthomonas, Arthrobacter, Acinetobacter, Corynebacterium et Enterobacter* (**Bayoumi, 2009 ; Wu *et al.* 2013**) ont été identifiées pour leurs potentiels de dégradation des HAPs. De nombreuses études ont révélé que ces espèces bactériennes utilisent les HAPs comme sources de carbone et d'énergie (**Bayoumi, 2009 ; Seo *et al.*, 2009**).

4.2.2. Utilisation des champignons

Les espèces fongiques sont des microorganismes très compétents dans la dégradation des HAPs car elles tolèrent des concentrations élevées de composés récalcitrants et peuvent s'épanouir dans des conditions extrêmes telles qu'à des températures élevées et à des conditions de faible pH (**Anastasi *et al.*, 2013, Ding *et al.*, 2013**). En outre, le fait que les champignons forment un mycélium large et ramifié leur permet de dégrader les HAPs grâce aux enzymes extracellulaires sécrétées **(Zhang *et al.*, 2015 ; Bhattacharya *et al.*, 2012**). En effet, elles possèdent divers systèmes enzymatiques de peroxydases (peroxydases polyvalentes, tyrosinases) et d'autres enzymes qui oxydent efficacement les HAPs (**Pozdnyakova, 2012 ; Ding *et al.*, 2013**). Ainsi **Silva *etal.* (2009**) ont rapporté que les HAP-LMW sont beaucoup plus dégradés par *Aspergillus sp*., *Trichocladium canadense* et *Fusarium oxysporum*.

4.2.3. Utilisation des algues

Les algues ont un grand potentiel de dégradation des HAPs parce qu'elles vivent dans les milieux aquatiques qui sont des réservoirs communs des HAPs (**El-sheekh *et al.*, 2012**). C'est le cas des algues marines photoautotrophes qui oxydent les HAPs et forment des intermédiaires hydroxylés (**Kadri *et al.*, 2017**). **Warshawsky *et al.* (1995)** ont montré que seules les algues vertes métabolisent presque complètement le BaP en dihydrodiols. Aussi, diverses études ont décrit la microalgue verte d'eau douce *Selenastrum capricornutum* comme capable de dégrader les HAPs (**Kadri *et al.*, 2017 ; Tam *et al.*, 2010**).

4.2.4. Utilisation d'un consortium microbien

Le cométabolisme par l'utilisation d'un consortium de microorganismes joue un rôle crucial dans la dégradation des HAPs de l'environnement. En effet, il a été parfois observé qu'un seul microorganisme ne dispose pas de tous les gènes requis pour la minéralisation complète des HAPs. C'est en cela que le cométabolisme de plusieurs microorganismes aurait un effet synergique sur la dégradation d'autres HAPs (**Wu *et al*., 2013 ; Ghosal *et al*., 2016**). Toutefois, il est donné de constater que le taux de dégradation des HAPs individuels est lié à leur solubilité dans l'eau (**Uche & Dadrasnia, 2017**). Néanmoins, l'inhibition de la dégradation par un consortium microbien pourrait être due à la formation d'un excès de co-produits résultants de la dégradation des HAPs (**Ghosal *et al*., 2016)**.

5. REGLEMENTATION SUR LES HAPs DANS LES ALIMENTS

A la suite d'une forte contamination des grignons d'olive en République tchèque, l'absence d'une législation européenne harmonisée sur les limites et les méthodes de détermination des HAPs est devenue une question prioritaire. Une procédure d'alerte rapide a été immédiatement mise en place (**European Commission, 2005**). A partir de cet incident, l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Suède ont fixé une limite de 5 $\mu g.kg^{-1}$ pour les 8 HAPs lourds dont BaP, dibenz [a, h] anthracène (DBahA), benz [a] anthracène (BaA), benzène [b] pyrène (BbP), benzo [b] fluoranthène (BbF), benzo [k] fluoranthène (BkF), indéno [1,2,3-cd] pyrène (IP) et benzo [g, h, i] pérylène (BghiP) et une limite de 2 $\mu g.kg^{-1}$ pour chaque HAP pris individuellement dans l'huile de grignons d'olive. Les 16 HAPs prioritaires et/ou seulement le BaP ont été l'objet de plusieurs recherches du comité scientifique pour l'alimentation (**SCF, 2002**). L'Allemagne avait une limite de 5 $\mu g.kg^{-1}$ pour les HAPs lourds (BaP, DBahA, BaA, BbF, BkF, IP, Chr et BghiP) et de 25 $\mu g.kg^{-1}$ pour tous les 16 HAPs. La législation canadienne a fixé une limite de 3 $\mu g.kg^{-1}$ pour les HAPs lourds. Ces diverses limites réglementaires ont entraîné plusieurs problèmes dans les échanges commerciaux internationaux. Afin d'harmoniser la législation vis-à-vis des HAPs dans l'espace Européen, la Commission Européenne a introduit successivement deux règlements : le N° 208/2005 (**European Commission, 2005**) et N° 1881/2006 (**European Commission, 2006**) fixant les teneurs maximales de certains contaminants comme le BaP dans les denrées alimentaires, excluant le cacao. En outre, la Commission Européenne, a défini des critères de performance pour les méthodes d'analyses des HAPs majoritaires dans le règlement 333/2007 (**European Commission, 2007**) puis des quatre HAPs prioritaires avec le Règlement 836/2011 (**European Union, 2011b**). Le règlement UE 835/2011 a actualisé le règlement 1881/2006 en

fixant les teneurs maximales pour le BaP (5 µg.kg^{-1}) et la somme des quatre HAPs prioritaires (30 - 35 µg.kg^{-1}) dans les denrées alimentaires telles que les fèves de cacao et produits dérivés (exprimé en µg/kg de graisse)(**European Union, 2011a**). Très récemment le règlement UE 2015/1933 a abaissé les limites maximales admises dans certaines denrées alimentaires telles que la fibre de cacao et ses produits dérivés utilisé comme ingrédients alimentaires à 3 µg.kg^{-1} pour le BaP et 15 µg.kg^{-1} pour les HAPs majeurs prioritaires (**European Union, 2015a**)

PARTIE 2

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. MATERIEL VEGETAL

Des fèves extraites de cabosses de cacao saines et/ou abimées récoltées pendant les grandes campagnes de récolte de cacao (Novembre 2014 et 2015) dans une plantation paysanne ont été utilisées. Cette plantation d'une superficie de 5 hectares est située à 142 km d'Abidjan dans le Département d'Akoupé localisé au Sud-Est de la Côte d'Ivoire entre le 6,38 ° latitude Nord et le 3,87 ° longitude Ouest plus précisément aux coordonnées GPS N 06°30.806' et W 003°57.001'. Cette zone géographique est caractérisée par une grande et une petite saison de pluies respectivement dans les périodes de mai à juin et de septembre à décembre (**Kédjébo, 2016**). Les cabosses saines sont visiblement intactes, intègres et sans meurtrissures. Quant aux cabosses abîmées, elles ont été soit attaquées partiellement par des rongeurs, soit atteintes de pourritures et/ou d'agents fongiques sur le pied de cacaoyer ou encore abîmées accidentellement lors de la récolte ou volontairement blessées en profondeur par une coupe à la machette après la récolte.

Figure 21A-B. Situation géographique de la plantation paysanne de réalisation des expérimentations agricoles en vue de l'échantillonnage dans le département d'Akoupé (Sud-Est de la Côte d'Ivoire). A) Situation en Côte d'Ivoire, B) Situation dans le département d'Akoupé

2. MATERIEL TECHNIQUE AGRICOLE

Le matériel technique agricole utilisé pour la récolte des cabosses de cacao a été constitué de machettes et/ou de coutelas attachés ou non à une perche. Des caisses en bois préfabriquées et des caisses en plastique de dimension 50 x 30 x 30 cm^3 ainsi que des feuilles de bananiers plantains ont été utilisées pour la fermentation des fèves de cacao (**Kédjébo,**

2016 ; Koné 2017). Des bâches en plastique noire, une aire cimentée, une claie surélevée constituée de bambous tressées à l'aide de fibres végétales et une aire bitumée située sur l'axe Akoupé-Bongouanou (**Figure 21A-B**) ont servi comme aires de séchage des fèves de cacao fermentées.

3. PRODUITS CHIMIQUES ET CONSOMMABLES DE LABORATOIRE

Pour l'extraction des HAPs à partir des fèves de cacao, l'acetonitrile (ACN) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), le cyclohexane (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), l'éthanol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) de qualité CLHP et l'éther de pétrole (Carlo Erba, France) de qualité analytique (pureté supérieure > 98 %) ainsi que des pellètes d'hydroxyde de potassium à 85 % (Panreac, France) ont été utilisés. De l'eau désionisée issue d'un système de purification Millipore (Millipore Milli-Q Plus (ZD5211584) Ultra-Pure Water Purifier, Markham, Ontario, Canada) et de l'eau distillée ont été utilisées pour la préparation des solutions aqueuses. Du beurre de cacao FAPAS (Sand Hutton, Angleterre) contenant des standards de HAPs à diverses concentrations comme le benzo(a)anthracène (BaA) (1,00 $\mu g.kg^{-1}$), chrysène (Chr) (1,34 $\mu g.kg^{-1}$), benzo (b) fluoranthene (BbF) (0,74 $\mu g.kg^{-1}$), benzo(a)pyrène (BaP) (5,44 $\mu g.kg^{-1}$), indeno (1,2,3-cd) pyrène (Id) (0,39 $\mu g.kg^{-1}$), benzo (g,h,i) perylene (BghiP) (0,45 $\mu g.kg^{-1}$) a été utilisé pour la calibration des techniques d'extraction et la validation des analyses chromatographiques des HAPs. Un étalon de référence contenant un mélange de 16 HAPs à concentrations connues (Supelco, Bellefonte, PA, USA) comme le benzo(a)anthracène (BaA) (10,720 $\mu g.mL^{-1}$), le chrysène (Chr) (10,493 $\mu g.mL^{-1}$), le benzo(b)fluoranthene (BbF) (10,683 $\mu g.mL^{-1}$) et le benzo(a)pyrène (BaP) (10,725 $\mu g.mL^{-1}$), etc. dissous dans de l'acétonitrile a été utilisé pour la calibration des analyses chromatographiques des HAPs. Un standard de HAPs contenant un mélange de 4 HAPs tels que le BaA, BbF, Chr, BaP (EFSA, Restek, Bellefonte, USA) dissous dans du toluène à une concentration individuelle de 1 $mg.mL^{-1}$ a été utilisé pour les tests de biodégradation des HAPs in vitro. Les produits chimiques et autres consommables de laboratoire ci-dessous ont été utilisés pour les analyses microbiologiques et de biologie moléculaire. Ce sont : l'acide tartrique, du NaCl, de l'acétate de sodium 3 M, du bromure d'éthidium (Promega, France), un colorant bleu/orange (Promega, France), du deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) (Promega, France), de l' eau moléculaire (5 Prime, France), des tubes Eppendorf (Gosselin), de l'éthanol 70 %(Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), formamide (Promega, France), du gel à 8 % d'acrylamide/bisacrylamide (Promega, France), du gel d'agarose (Eurobio, France), du glycogène, de l'isopropanol(Carlo

Erba, France), un marqueur de taille moléculaire de 100 pb (Invitrogen, USA et Promega, France), un marqueur de taille moléculaire de 1 kb (Invitrogen, USA et Promega, France), du persulfate d'ammonium (APS) (Promega, France), une solution Gel Red (Promega, France), du TAE 50x(Tris-acétate, EDTA pH 8,3), une solution tampon phosphate à pH 7,3 (PBS), tampon TAE 1x (Eppendorf, Allemagne), une solution tampon TAE 50x (Euromedex), des enzymes Taq polymerase (Promega, France), une solution TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0, Promega, France), du tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Promega, France), gc-Ul (Sigma, France), U2 (Sigma, France), etc.

4. EQUIPEMENTS TECHNIQUES ET INSTRUMENTS DE MESURE

Les équipements utilisés peuvent être regroupés en trois catégories. La première catégorie concerne les analyses chimiques et comporte un moulin Warring blender (Laboratory Mill 3600, Perten, Suède), une centrifugeuse (2K15, Sigma, Germany), une raffineuse (EXAKT, Allemagne), des cartouches d'extraction 33 × 80mm (VWR, France), un bain à ultrason (VWR, France), une étuve EM10 (Chopin, France), un Système d'extraction Foss Tecator 2050 Soxtec Avanti (Foss, Danemark), du coton de verre (VWR, France), chaine HPLC DIONEX de type UltiMate 3000 (Thermo Fisher, USA) couplée à un détecteur fluorescence RF 2000, une colonne C18 greffé en phase inverse de type Uptisphere 300 Å WTF, 250 × 4,6 mm de diamètre, 5 µm de taille de particule (Interchim, Montluçon, FRANCE). Pour ce qui concerne les analyses microbiologiques, les équipements utilisés ont été constitués d'un agitateur rotatif à 12 rpm (ORBIT, Selecta, Espagne), d'un autoclave (MEMMERT, Germany), d'un bain marie (JANKE AND KUNKEL pour 42 °C), de boites de Pétri de 90 mm de diamètre (Gosselin), une étuve (MEMMERT, Germany), d'un microscope ordinaire (Laborlux S, France). Les analyses moléculaires ont nécessité l'utilisation d'une caméra digitale munie d'un système gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France), d'une cuve d'électrophorèse (Bio-Rad Dcode System, USA), d'un système DGGE utilisant un système universel de détection de mutation de type Bio-Rad DcodeTM (Bio-Rad Laboratories, USA), des Eppendorfs (Safe Lock), des micropipettes (Eppendorf Reaserch), des plaques de 96 puits SorensonTM (BioScience, USA), d'une pompe Percom-I de type Watson-Marlon (USA), d'un préparateur de gradient (Bio-Rad Model 485, USA), d'un scalpel, spectrophotomètre UV-Visible du type Biospec Nano (Shimadzu, Japon), d'un thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc, USA).

5. MILIEUX DE CULTURE

Le milieu PCA (Plate Count Agar), MYE (Malt, Yeast, Extract), MBS (Medium Basal Salt) ont été utilisé pour l'enrichissement, l'isolement et la caractérisation des microorganismes testés pour la dégradation des HAPs. Des milieux minéraux sans source de carbone additionnés de HAPs ont servi pour les essais de biodégradation des HAPs par le consortium bactérien constitué (**Moscoso *et al*., 2012 ;Wu *et al*., 2013**).

II. METHODES

1. VALIDATION DE LA METHODE DE DETERMINATION DES HAPs ET ANALYSES DES FEVES DE CACAO

1.1. Validation de la méthode de détermination des HAPs

La procédure de validation de la méthode de détermination des HAPs du cacao a été réalisée selon les critères de performance des règlements de l'Union Européenne **(European Union, 2011 a, b)** et de la norme française **NF V03-110 (1998)**. Cette validation a intégré la détermination de la linéarité de la méthode dans un intervalle d'étalonnage à cinq (5) points de concentrations compris entre 2 et 32 $ng.mL^{-1}$, les limites de détection et de quantification des HAPs, la détermination des coefficients de variation pour les tests de répétabilité et de la précision intermédiaire ; et enfin la détermination du taux de récupération au coursdu test d'exactitude.

1.1.1. Test de linéarité

L'étalonnage de l'HPLC a été effectué à partir de 5 concentrations (2 $ng.mL^{-1}$, 4 $ng.mL^{-1}$, 8 $ng.mL^{-1}$, 16 $ng.mL^{-1}$, 32 $ng.mL^{-1}$) en HAPs et 10 répétitions portant sur chacune des concentrations données ont été effectuées. La linéarité de l'étalonnage a été testée selon la loi de Fischer au seuil critique de 1 % **(NF V03-110, 1998)**. En vue de réaliser le test de linéarité, les calculs suivants ont été faits selon les équations **(4)** et **(5)**. Les valeurs calculées de ces paramètres ont été comparées aux valeurs théoriques critiques figurant dans la table de Fisher au seuil critique de 1 %. Si la valeur de Fl calculée est supérieure à la valeur théorique critique, le modèle de régression est jugé acceptable. Si la valeur calculée de Fnl est inférieure à la valeur théorique critique le domaine de linéarité choisi est validé. Les résultats de ces deux comparaisons des valeurs calculées de Fl et Fnl aux valeurs théoriques critiques permettent de valider le test de la linéarité.

$$\mathbf{Fl} = \frac{\mathbf{S}_t^2(\boldsymbol{y})}{\mathbf{S}_e^2(\boldsymbol{y})} \qquad \textbf{(4)}$$

(5)

$$\mathbf{Fnl} = \frac{\mathbf{S}_{nl}^2(y)}{\mathbf{S}_e^2(y)}$$

Avec

$\mathbf{S}_t^2(y) = SCE_t(y)$: variance de la régression

$\mathbf{S}_{nl}^2(y) = \frac{SCE_{nl}(y)}{P-2}$: variance de l'erreur du modèle expérimental

$\mathbf{S}_e^2(y) = \frac{SCE_e(y)}{P(n-1)}$: variance résiduelle

SCE $(y) = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2$: Somme des carrés des écarts à la moyenne pour la variable y

Fl : valeur de Fischer pour le modèle de la régression

Fnl : valeur de Fischer pour le modèle expérimental

1.1.2. Détermination des limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et les limites de quantification (LQ) des HAPs ont été calculées à partir d'une solution standard de HAPs en utilisant 3×10 analyses distinctes. Sur chaque chromatogramme, la surface du pic la plus élevée, intégré dans la fenêtre du temps de rétention correspondant aux différents HAPs étudiés a été retenu (**Aké-Assi *et al.*, 2012**). La limite de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées selon les équations **(6)** et **(7)** :

$$\mathbf{LD = mb + 3\sigma} \quad \mathbf{(6)}$$

$$\mathbf{LQ = mb + 10\sigma} \quad \mathbf{(7)}$$

Où

mb (µg.kg^{-1}) : concentration moyenne en HAPs dans la solution étalon ;

σ : écart-type des concentrations moyennes en HAPs calculées.

1.1.3. Test de répétabilité et de précision intermédiaire

Les tests de répétabilité et de précision intermédiaire ont été réalisés selon la norme française (**NF V03-110, 1998**). Pour tester la répétabilité, 3×10 extractions de HAPs à partir d'un échantillon de beurre de cacao de référence (FAPAS) ont été effectuées. Les extraits ont été analysés par HPLC-FLD. Le test de précision intermédiaire a été effectué en utilisant 3×6 extractions de HAPs menées séparément sur 3 types de beurre de cacao (A, B, C) dont les teneurs en HAPs sont connues. La méthode de détermination des HAPs a été considérée comme répétable et reproductible si le coefficient de variation de chaque beurre de cacao est inférieur à 5 % (**ISO 15753, 2016**).

1.1.4. Détermination de la justesse

En vue d'effectuer le test de justesse, 3×10 extractions de HAPs ont été réalisées sur un beurre de cacao de référence (FAPAS). La méthode de détermination des HAPs a été jugée exacte si le taux de récupération est compris entre 50 et 120 % (**European Union, 2011b ; ISO 15753, 2016**) et le coefficient de Shapiro - Wilk (W), calculé selon l'équation**(8)**, inférieur ou égal à 3 (**NF V03-110, 1998**) :

$$\mathbf{W=\frac{m(d)}{\sigma(d)}} \qquad \mathbf{(8)}$$

Où :

m(d): moyenne des valeurs absolues des différences entre les valeurs de références (X) et les valeurs mesurées (Z)

σ(d) : valeur de l'écart-type des différences entre les valeurs de références (X) et les valeurs mesurées (Z).

1.2. Détermination de quelques paramètres physico-chimiques des fèves de cacao

1.2.1. Détermination du taux d'humidité

La teneur en eau des échantillons de cacao a été déterminée selon la méthode gravimétrique **ISO (1980-12-01)** grâce à un four Chopin ventilé thermostaté à 103 ºC. Pour cela, les échantillons de fèves de cacao ont été broyés dans un moulin de type Warring Blender après congélation dans de l'azote liquide pour obtenir un broyat grossier. Des coupelles vides avec leur couvercle ont été pesées et tarées au préalable avant pesage des essais de poudre de cacao. Une prise d'essai de 3 g de nibs de cacao a été placée ensuite dans chaque coupelle. Les coupelles bien fermées ont été placées dans le four Chopin à 103 ± 2 °C pendant 16 ± 1h. Elles ont été ensuite refroidies à température ambiante dans un dessiccateur pendant environ 1h. Enfin, la teneur en eau de chaque échantillon de fèves de cacao a été calculée par l'utilisation de l'équation **(9)** :

$$\mathbf{Humidité\ (\%)=\frac{m_1-m_2}{m_1-m_0}\times 100} \qquad \mathbf{(9)}$$

Où :

m_0 (g) : masse de la coupelle vide et son couvercle

m_1 (g) :masse de la coupelle pleine et recouverte par son couvercle avant séchage

m_2 (g) :masse de la coupelle pleine et recouverte par son couvercle après séchage

1.2.2. Détermination du taux de matières grasses

L'extraction des matières grasses a été réalisée à 110 °C pendant 1 heure à partir de 3 g de poudre de cacao à l'aide d'un extracteur semi-automatique programmable de type SOXTEC Avanti 2050 **(Rosalía *et al*., 2014 ; Servent *et al*., 2017)**. Les fèves de cacao congelées ont été entièrement broyés dans un moulin de type Warring Blender. La taille des particules obtenues a été réduite à l'aide d'une raffineuse (EXAKT 70S/1923 Acier). Trois grammes de poudre raffinée ont été placés dans des cartouches d'extraction de type Whatman bouchées avec du coton de verre. Des gobelets extracteurs propres et secs préalablement pesés, tarés et contenant 65 mL d'éther de pétrole ont été placés sur la rampe d'extraction. Le taux de matière grasse de chaque échantillon a été déterminé par l'équation **(10)** :

$$\mathbf{MG\ (\%)} = \frac{\mathbf{(Mp-Mv)}}{\mathbf{Me}} \times \mathbf{100} \qquad \mathbf{(10)}$$

Où :
MG (%) : Taux de matières grasses exprimé sur la base de matières sèches
Mp (g) : Masse totale du gobelet contenant les matières grasses extraites
Mv (g) : Masse du gobelet vide
Me (g) : Masse de la prise d'essai de la poudre de cacao

1.3. Détermination des teneurs en HAPs du cacao

1.3.1. Méthode d'extraction des HAPs

L'extraction des HAPs du beurre de cacao a été effectuée selon un protocole élaboré sur la base d'une méthode d'extraction visant la détermination des 4 HAPs marqueurs de l'EFSA (benzo (a) anthracène (BaA), le chrysène (Chr), le benzo (a) pyrène (BaP) et le benzo (b) fluoranthène (BbF)) dans les produits carnés fumés **(Grabulos, 2011)**. Pour ce faire, l'extraction des HAPs dubeurre de cacao a été réalisée en plusieurs étapes. D'abord une saponification sous agitation de 1 g d'échantillon de référence de beurre de cacao en présence de 6 mL de potasse éthanolique (KOH) à 1 M dans un bain marie à 70 °C pendant 60 minutes a été réalisée **(1)**. Ensuite une extraction liquide-liquide avec 6 mL de cyclohexane et 4 mL d'eau ultra pure a été effectuée **(2)**. Le mélange a été centrifugé à 3000 tr/min à température ambiante pendant 5 minutes et le surnageant a été récupéré après séparation des phases **(3)**. Puis 3 mL de cyclohexane ont été ajouté à la phase restante pour répéter deux fois l'étape **(2) et (3).** Les surnageants récupérés mis ensemble ont été concentré par évaporation du solvant par barbotage d'un courant d'azote gazeux à 40 °C. L'extrait sec obtenu a été repris dans 1 ml d'acétonitrile. Après cela, le mélange a été agité sous vortex à vitesse maximale. La solution obtenue a été transvasé dans une seringue à usage unique munie d'un filtre-seringue PTFE de

maille 0,22 µm. Il a ensuite été filtré dans une fiole ambrée de 2 ml et injecté au Chromatographe Liquide Haute Performance (CLHP) ou a été conservé à -18°C si nécessaire.

1.3.2. Dosage des HAPs par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à une détection Fluorimétrique

Le dosage des HAPs a été réalisé en utilisant une chaine HPLC DIONEX du type Ultimate 3000 couplée à un détecteur fluorescence RF 2000 programmé sur les longueurs d'ondes suivantes : 0-29 min, 270/375 nm ; 29-34 min, 270/420 nm ; 34-60 min, 371/405 nm et muni d'une colonne C18 greffée en phase inverse (Uptisphere 300 Å WTF, 250 mm × 5µm × 4,6 mm) thermostatée à 30 °C. La séparation des HAPs a été réalisée selon le gradient suivant ; acétonitrile (ACN) / Eau (60 :40, v/v) à 100 % d'ACN pendant 5 min, suivie par une rampe de 40 min à 100 % d'eau et finalement à 100 % d'ACN pendant 15 min à un débit d'élution de 1 $mL.min^{-1}$. Une courbe d'étalonnage à cinq (5) points de concentration (2 $ng.mL^{-1}$, 4 $ng.mL^{-1}$, 7 $ng.mL^{-1}$, 16 $ng.mL^{-1}$, 32 $ng.mL^{-1}$) définissant la gamme d'étalonnage de la méthode a été réalisée. Pour cela, une solution étalon de mélanges des quatre HAPs marqueurs (Chr, BaA, BbF, BaP) a permis d'établir une corrélation adéquate entre les surfaces des pics et les concentrations mesurées après analyse des extraits d'échantillons. La détermination des concentrations en HAPs marqueurs de chaque échantillon a été réalisée en triple et les concentrations moyennes ont été calculées selon la formule suivante :

$$Q_{HAP} = \frac{C*V}{m} \quad \textbf{(11)}$$

Où :

Q_{HAP} : est la teneur en HAP ($\mu g.kg^{-1}$)

V : est le volume de reprise de l'extrait sec par l'acétonitrile (mL)

m : est la masse de l'échantillon (g)

C : est la quantité du composé HAP ($ng.mL^{-1}$)

Avec **C**, calculé à partir de la droite d'étalonnage établie sous l'équation suivante :

$$C = a*A_e + b \quad \textbf{(12)}$$

Où :

a et **b** sont les coefficients de la droite d'étalonnage

A_e est l'aire du pic chromatographique du HAP considéré.

2. INFLUENCE DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES POST-RECOLTE AGRICOLES SUR LA FORMATION DES HAPs DANS LES FEVES DE CACAO

2.1. Ecabossage

La préparation de la première série des échantillons de fèves de cacao a nécessité 2400 cabosses dont 1200 cabosses saines et 1200 cabosses abimées. Chaque catégorie de cabosses a été divisée en deux parts de 600 cabosses chacune. Les cabosses de l'une des parts ont été écabossées sans délai tandis que celles de l'autre part ont été ouvertes en différé d'un délai de 7 jours de stockage post récolte **(Figure 22)**. La préparation de la seconde série des échantillons a nécessité 3500 cabosses ouvertes sans délai **(Figure 23)**. Quel que soit le cas de figure, l'écabossage a été réalisé manuellement à l'aide de gourdin et de machettes. Les fèves de cacao extraites ont été soigneusement débarrassées du placenta ou rachis, avant d'être mises en fermentation.

2.2. Fermentation

Les fèves de cacao de la première série d'échantillons (2014) ont été subdivisés en trois parts égales d'environ 50 kg chacune. Les fèves de chaque part ont été fermentées pendant 6 jours sans brassage selon trois techniques de fermentation : la fermentation en caisses en bois (CB), la fermentation en caisses plastique (CP) et la fermentation en tas dans des feuilles de bananier (FB) (**Guehi *et al*., 2010b ; Kédjébo, 2016 ; Koné, 2017**). Les fèves de la seconde série (2015) ont été fermentées en tas dans des feuilles de bananiers pendant 6 jours sans brassages. A la fin de la fermentation, les fèves de cacao traitées ont été réparties en 4 lots de 56 kg chacun.

2.3. Séchage

Chaque lot de fèves fermentées de la première série d'échantillons a été subdivisé en 4 fractions de mêmes masses d'environ 12,5 kg chacune. Les fèves de cacao ont été ensuite séchées au soleil pendant 6 jours sur 4 différentes aires dont une aire cimentée (**A**), une aire bitumée (**B**), une claie (**C**) et une bâche en plastique noire (**D**). Au cours du séchage, les fèves de cacao ont été brassées toutes les 2 heures. Celles séchées sur une claie ont constitué le témoin. Les fèves de cacao de la seconde série d'échantillons ont été séchées selon 4 modalités de séchage combinées parfois pratiquées dans les bassins cacao de Côte d'Ivoire **(Lowor *et al.*, 2012 ; Misnawi, 2012)**. Ces modalités se sont déclinées en plusieurs supports de séchage dont le séchage au feu de bois (8 h/jr pendant 2 jrs), le séchage solaire sur une bâche plastique (8 h/jr pendant 5 jrs), le séchage solaire sur bâche plastique (8h/jr pendant 2

jrs) suivi d'un séchage au feu de bois (8h/jr pendant 2 jrs) et le séchage solaire sur une bâche plastique (8h/jr pendant 2 jrs) suivi d'un séchage artificiel artisanal par un moulin de grillade d'arachides (1h 30min). Pour cette série d'échantillons, les fèves de cacao séchées au soleil sur une bâche plastique ont constitué le témoin.

2.4. Stockage

Cinq (5) échantillons de 250 g chacun ont été constitués à partir de chaque lot des fèves de cacao de la première série d'échantillons (2014). Un lot de deux échantillons de fèves de cacao a été stocké pendant quatre (4) semaines dans une cuisine où les aliments sont cuits au feu de bois et le second lot de deux échantillons dans un magasin non fumigène servant habituellement de lieu de stockage de cacao marchand au niveau de la ferme des producteurs. Le dernier échantillon de fèves de cacao qui n'a pas été stocké ni dans la cuisine ni dans le magasin a été immédiatement emballé et a constitué de témoin. Pour ce qui concerne les échantillons de la seconde série (2015), cinq échantillons de fèves de cacao de 250 g ont été constitués à partir de fèves de cacao séchées sur bâche plastique. Deux lots de deux échantillons ont été stockés respectivement en cuisine et magasin paysans sur le site de la ferme du producteur de cacao. L'échantillon restant a constitué le témoin au temps T_0. Quelle que soit la série d'échantillons, les fèves de cacao fermentées et séchées ont été emballées dans des sacs en jute avant d'être stockées pendant quatre semaines. Un échantillon de fèves de cacao a été prélevé à partir de chaque lot toutes les deux semaines au cours du stockage puis emballé dans du papier aluminium. Par ailleurs deux échantillons ont été constitués à partir des fèves issues de chaque technique de séchage puis emballés dans du papier aluminium. Enfin, une vingtaine d'échantillons de fèves d'itinéraire technique de préparation inconnu excepté leur provenance des entrepôts du cacao au port d'Abidjan a été prélevé en vue de la mise en route de la méthode d'analyse validée.

2.5. Plan expérimental complet des échantillonnages des fèves de cacao

En résumé, la préparation des échantillons a été réalisée lors des campagnes de récolte du cacao 2014 et 2015 selon deux plans expérimentaux schématisés dans les diagrammes décrits par les **Figures22** et **23**. Afin de déterminer l'impact de chaque traitement technologique post récolte sur la formation des HAPs dans le cacao, la teneur en HAPs majeurs des fèves de cacao fermentées et séchées issues de chaque itinéraire technique post récolte avant et après stockage a été déterminée.

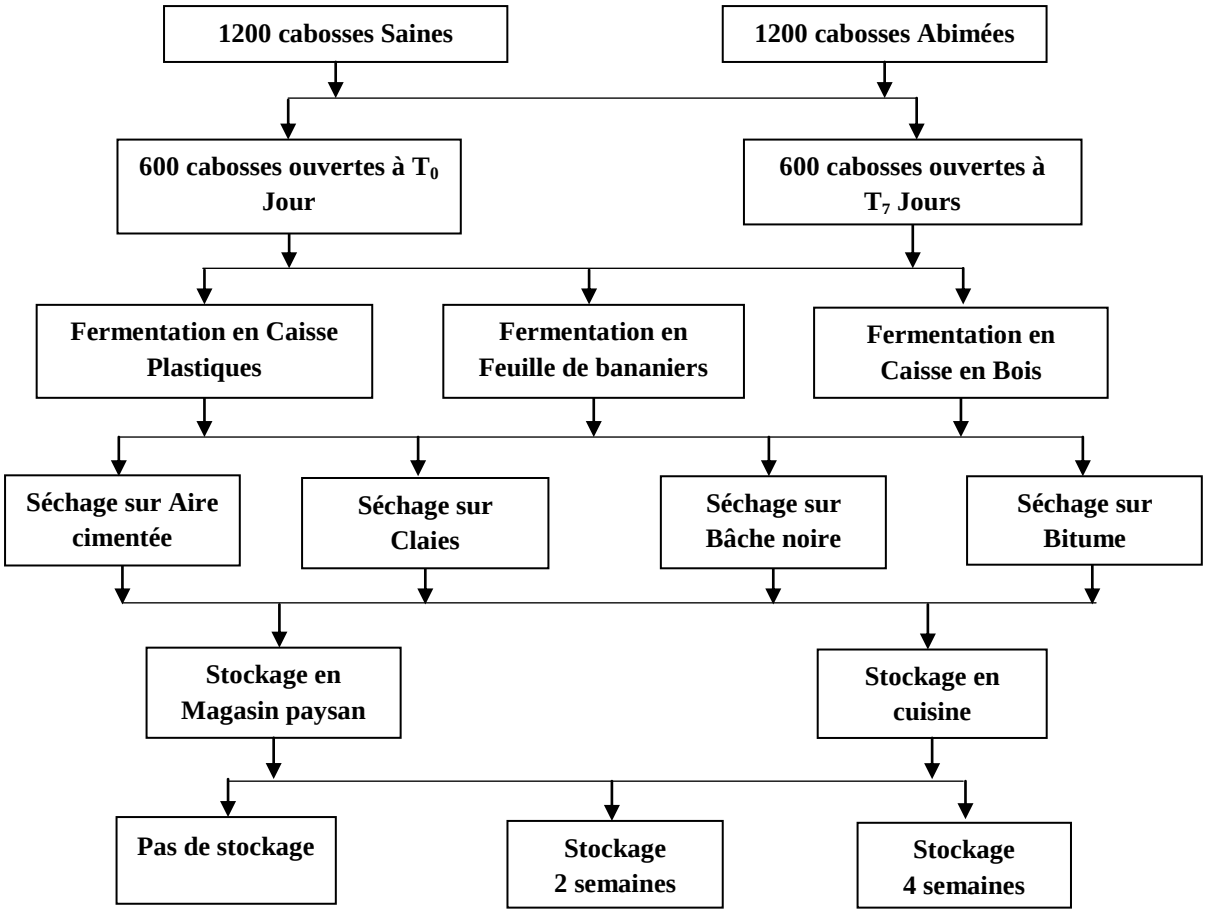


Figure 22. Diagramme de préparation des échantillons au cours de la campagne de récolte du cacao de 2014

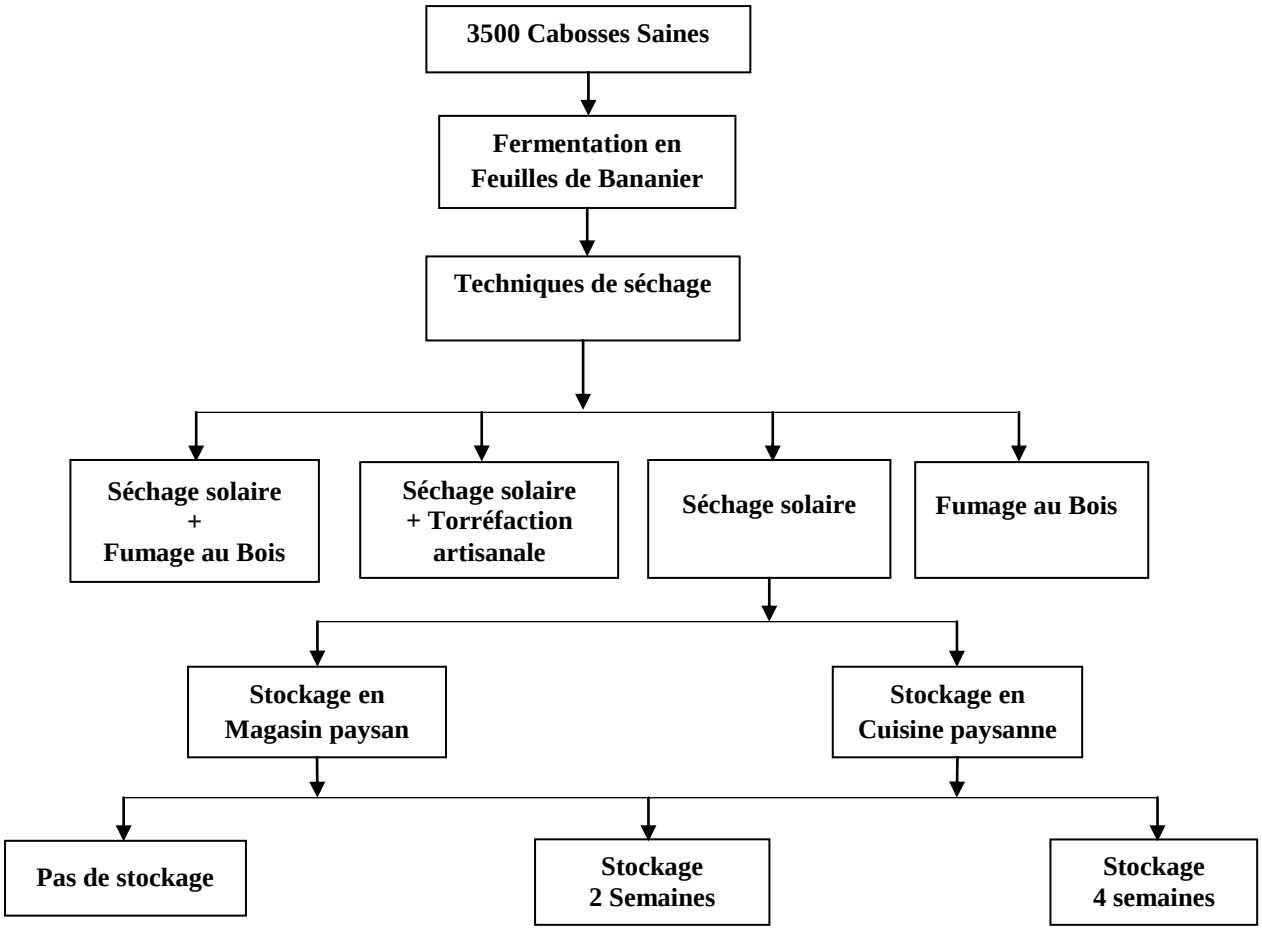


Figure 23. Diagramme de préparation des échantillons au cours de la campagne de récolte du cacao de 2015.

3. IMPACT DU PROCESSUS DE FABRICATION SUR LA CONTAMINATION EN HAPs DES PRODUITS DERIVES DES FEVES DE CACAO

3.1. Processus de fabrication de produits dérivés des fèves de cacao

Le processus de fabrication est décrit à la **Figure 24**. Environ 232 g de fèves de cacao ont été torréfiées pendant 25 minutes à 125 °C dans une étuve ventilée (Memmert, Allemagne). Le taux de perte en eau des fèves de cacao a été calculé par pesée avant et après torréfaction des fèves. Les fèves torréfiées ont été grossièrement broyées à l'aide d'un concasseur à glaçons (Capco test equipment LTD, Angleterre) afin d'en faciliter le décorticage. Les coques ont été éliminées par ventilation dans un catador (Capco test equipment LTD, Angleterre). Les amandes de cacao grossièrement concassées encore appelées le grué ont été pesées avant d'être broyées. Le grué est introduit par petites quantités successives dans un pétrin en porcelaine chauffé. Le broyage de 175-200 g de grué pendant 20 à 30 minutes a permis d'aboutir à l'obtention de la masse de cacao. Du sucre blanc en poudre a été ajouté à hauteur de 50 % de la masse de cacao. Le processus de broyage a été poursuivi jusqu'à obtention

d'une pâte lisse et homogène appelé liqueur de cacao qui a été ensuite soumise au raffinage. Le raffinage consiste à renverser lentement la liqueur de cacao entre le rouleau arrière et le rouleau intermédiaire de la raffineuse (EXAKT, Allemagne). La liqueur de cacao raffinée a été pesée puis stockée dans une banque réfrigérée avant l'étape de conchage. La température de la conche (Thermomécanique, France) a été programmée à 70 °C au moins 2 heures avant le début du conchage. Une fois la température de conchage atteinte l'appareil est démarré à sa vitesse minimale (≈ 33 tr/min). La liqueur de cacao sucrée et raffinée a été ajoutée progressivement dans la conche. Après stabilisation du système, la conche a été actionnée à sa vitesse maximale (≈ 93 tr/min). Puis de la lécithine (0,01 % de la masse de liqueur de cacao) a été rajoutée au mélange liqueur de cacao raffinée + beurre de cacao. Le mélange a été à nouveau soumis à un conchage pendant une heure. La liqueur de cacao contenant tous les ingrédients a été récupérée, pesée et déposée dans une banque réfrigérée (+4 °C) avant d'amorcer le tempérage dans une tempéreuse (Quick start, France) jusqu'à 42 °C. Le tempérage a permis d'obtenir un chocolat noir. Le produit final a été ensuite moulé en tablettes de 70 g chacune et conservé dans la banque réfrigérée.

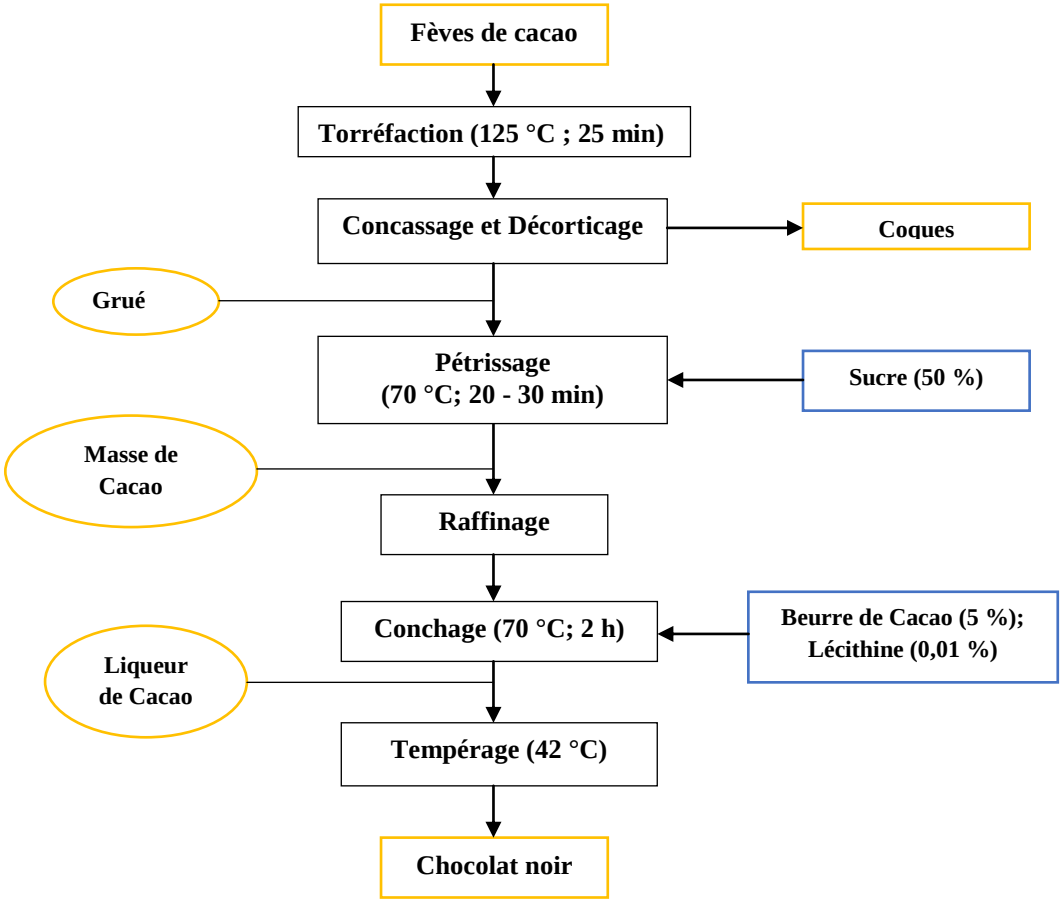


Figure 24. Processus de fabrication des produits dérivés des fèves de cacao

3.2. Détermination des teneurs en HAPs des produits dérivés du cacao

Chaque étape du processus de fabrication de chocolat a été considéré comme un point critique de contamination en HAPs. Les teneurs en HAPs majeurs des produits dérivés issus de ces étapes et identifiés en jaune-orangés sur la **Figure 24** ont été déterminées selon la méthode analytique validée.

4. ESSAIS DE DEGRADATION DES HAPs PAR LES BACTERIES ISOLEES A PARTIR DES FEVES DE CACAO.

4.1. Culture des bactéries

Le milieu Malt Yeast Extract (MYE) contenant 10 g d'extrait de malt, 1 g d'extrait de levure dissout dans 500 mL d'un tampon phosphate au phosphate de sodium disodique (Na_2HPO_4)a été utilisé pour la culture de la communauté microbienne notamment bactérienne des fèves de cacao **(Wu *et al.*, 2013**). Pour cela, 4 fèves de cacao fermentées et séchées présentant un fort taux de contamination en HAPs de 170 $\mu g.kg^{-1}$ ont été suspendus dans 50 mL de MYE 1 tamponné à pH =7,03, contenant 2 mL du mixte de BaA, Chr, BbF, BaP à 200 $\mu g.mL^{-1}$. Le milieu a été incubé dans un bain marie à 25 °C sous agitation (160 rpm) pendant 7 jours. La sélection des bactéries contaminant les fèves de cacao à fortes teneurs en HAPs a été poursuivie par un repiquage de 1 mL de la culture MYE 1 dans un nouveau milieu MYE (MYE 2).

4.2. Isolement et détermination des caractéristiques morphologiques des bactéries dégradant les HAPs

La culture bactérienne issue du milieu MYE 2 (0,5 mL) a été transférée dans 10 mL d'un milieu Medium Basal Salt (MBS) essentiellement minéral constitué de 1 g de sulfate d'ammonium ($(NH4)_2SO_4$), 0,7 g de phosphate de potassium disodique (K_2HPO_4), 0,2 g de phosphate de potassium monosodique (KH_2PO_4), 0,2 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($MgSO4.7H_2O$), 0,1 g de chlorure de calcium dihydraté ($CaCl_2.2H_2O$) et 5 mg de sulfate de fer heptahydraté ($FeSO_4.7H_2O$) dissouts dans 1 L d'eau distillé **(Wu *et al.*, 2013)**. Une solution de HAPs contenant 1 $mg.mL^{-1}$ de chacun des 4 HAPs comme seule source de carbone et donc d'énergie a été ajoutée au milieu MBS. Le milieu MBS1 ainsi préparé a été incubé dans les conditions analogues à celles décrites précédemment. Une seconde culture bactérienne dans du milieu MBS (MBS 2) a été réalisée avec 0,5 mL de la culture précédente. Puis, le milieu MBS3 a été constitué de 50 mL de MBS, 1g d'Agar, 1 mL du mixte des quatre HAPs majeurs à 1 $mg.mL^{-1}$ pour chacun des 4 HAPs a été préparé. Ce milieu a été inoculé par

1 mL du milieu MBS2. Ce milieu ensemencé a été incubé dans une étuve pendant 5 jours à 30°C. Des observations macroscopiques à l'œil nu décrivant la forme (contour, taille) l'aspect (surface, transparence, coloration) et la couleur (**Rezki-Bekki, 2014**) des microorganismes capables d'utiliser les HAPs comme source de carbone ont été effectuées. Puis des examens microscopiques portant sur la morphologie, le type de regroupements des cellules bactériennes, la présence ou non de spores à partir des frottis sec (coloration de Gram) ont été effectués. Pour cela, des frottis secs des cultures bactériennes réalisés sur lame sèche et propre ont été colorés par le violet de gentiane pendant 1 min, puis par plongée dans du lugol pendant 30 s. Une décoloration à l'alcool/acétone et un rinçage à l'eau distillée des frottis ont été effectués. Enfin une contre-coloration à la fuchsine pendant 1 min suivie d'un rinçage à l'eau distillée ont été réalisés. Les frottis ainsi colorés ont été additionnés d'une goutte d'huile d'immersion puis observés au microscope optique à l'objectif 100 (**Gueguen *et al.*, 1982 ; Smith et Hussey, 2005).**

4.3. Détermination du taux de dégradation des HAPs par le consortium bactérien

Le consortium microbien isolé sur boites de Pétri a été remis en suspension dans 10 mL d'eau physiologique à 9 $g.L^{-1}$ de NaCl. Quatre tubes de culture bactérienne constituée de 1 mL de cette suspension, 4,5 mL de milieu MBS et 0,5 mL d'un mélange de HAP4 à 1 $mg.mL^{-1}$ ont été préparés. Ces tubes de culture microbienne ont été incubé à 25°C dans un bain marie sous agitation à une vitesse de 160 tr/min pendant 0, 10, 20, et 30 jours. A la fin de chaque période d'incubation, un tube a été retiré et la culture a été centrifugée pendant 20 minutes à 4000 tr/min. La concentration en Σ4HAP de la culture bactérienne a été déterminée dans le surnageant et le culot microbien. Pour déterminer la teneur en HAPs du surnageant, 0,5 mL de cyclohexane sont ajoutés à 0,5 mL du surnageant. L'ensemble a été vigoureusement agité par vortex pendant 5 min, puis centrifugé pendant 5 min à 3000 tr/min. Après centrifugation, le surnageant organique a été évaporé par barbotage d'un courant d'azote gazeux à 40 °C. L'extrait sec obtenu a été repris dans 1 ml d'acétonitrile. L'homogénat obtenu a été transvasé dans une seringue à usage unique munie d'un filtre-seringue PTFE de maille 0,22 µm. Il a été ensuite filtré dans une fiole ambrée de 2 ml et enfin injecté au Chromatographe Liquide Haute Performance. Pour ce qui concerne le culot bactérien, 0,5 mL de cyclohexane y ont été ajoutés et la suspension obtenue a été agitée par vortex pendant 5 min, puis soumise à la sonication pendant 30 min. Après cela, cette suspension a été centrifugée pendant 20 min à 4000 tr/min. Le surnageant a été évaporé comme précédemment décrit et l'extrait sec repris dans 1 mL

d'acétonitrile. Après filtration à l'aide d'un filtre seringue PTFE de maille 0,22 µm, les teneurs en HAPs ont été déterminées par la méthode analytique mise au point.

4.4. Identification des bactéries constitutives du consortium par des outils moléculaires

4.4.1. Extraction d'ADN

La méthode d'extraction d'ADN mise en œuvre est basée sur l'utilisation d'un mélange phénol/chloroforme. Cette méthode intégrant plusieurs étapes dont une lyse cellulaire et une dénaturation des protéines, suivie d'une étape d'extraction et précipitation d'ADN découle de la modification de celle couramment utilisée (**Le Nguyen *et al.*, 2008 ;El Sheikha *et al.*, 2009)**.

4.4.1.1. Lyse cellulaire

Les isolats bactériens issus de la culture sur milieu MBS-Agar-HAPs ont été repiqués sur un milieu PCA incubé à 30 °C pendant 24 h. Ils ont été ensuite suspendus dans 500 µL de NaCl à 9 $g.L^{-1}$ dans des tubes Eppendorf puis homogénéisé par vortex et enfin centrifugé à 12000 tr/min pendant 15 min. Le culot obtenu a été suspendu dans 100 µL de TE auquel 100 µL d'une solution de lysozyme à 25 $mg.mL^{-1}$ ont été ajoutés. Après un repos de 5 min sur la paillasse, 100 µL d'une solution de Protéinase K à 20 $mg.mL^{-1}$ ont été ajoutés au mélange culot bactérien et lysozyme. Le mélange final a été incubé à 42 °C pendant 20 min. A la fin de l'incubation, 50 µL de SDS (20 %) ont été ajoutés à la suspension puis celle-ci a été réincubée successivement à température ambiante pendant 5 min, puis à 42 °C pendant 10 min. Enfin 400 µL de CTAB (2 %, NaCl, 3 M) y ont été ajoutés et le mélange obtenu a été incubé à 65 °C pendant 10 min.

4.4.1.2. Extractions d'ADN

Les lysats obtenus ont été soumis à une double extraction d'ADN au phénol/chloroforme. Pour ce faire, 700 µL d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25, 24,1, v/v) ont été ajoutés aux lysats sous une hotte dans un tube Eppendorf. Le mélange obtenu a été agité manuellement jusqu'à obtention d'une solution blanche. Cette solution a été centrifugée à 12000 tr/min pendant 15 min. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Le lavage de la solution blanche avec le mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique a été dupliqué. Le phénol résiduel a été éliminé après ajout de 600 µL de mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) et centrifugation du mélange à 12 000 tr/min pendant 15 min.

4.4.1.3. Précipitation de l'ADN extrait

L'ADN contenu dans la phase aqueuse recueillie à partir des lysats a été précipité par ajout de 30 µL d'acétate de sodium (3 M, pH 5) et d'un volume égal d'isopropanol. Le mélange obtenu contenant l'ADN précipité dans l'isopropanol a été incubé à -20 °C pendant 12 h. Après centrifugation à 12 000 tr/min pendant 15 min, le surnageant a été écarté. Les culots d'ADN ont été lavés avec 500 µL d'une solution d'éthanol à 70 % par centrifugation des solutions à 12 000 rpm pendant 15 min. L'éthanol a été éliminé et les culots obtenus séchés à température ambiante pendant 2 à 4 h. L'ADN extrait a été remis en suspension dans 100 µL d'eau ultra pure puis conservé à 4 °C jusqu'aux analyses.

4.4.1.4. Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN

La quantité et la pureté des ADN extraits ont été évaluées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible du type Biospec Nano (Shimadzu, Japon) mesurant l'absorbance de l'échantillon dans une gamme de longueurs d'onde allant de l'UV au visible. La concentration en ADN a été mesurée à 260 nm, et les ratios des mesures effectuées à 260/270 et 260/230 ont permis d'estimer le niveau de pureté de l'ADN extrait. Le ratio 260/270 rend compte de la teneur en acides nucléiques/protéines, le meilleur ratio étant compris entre 1,8 et 2. Le ratio 260/230 correspond aux ratios acides nucléiques/inhibiteurs PCR et doit être compris entre 1,6 et 1,8 (**Hamdouche, 2015 ; Koné, 2016**).

4.4.2. Amplification de l'ADNr 16S par Réactions de Polymérisation en Chaine (PCR)

L'amplification du gène de l'ARNr 16S des bactéries a été réalisée en utilisant les amorces 27f et 1492r (**Moreno *et al*., 2002** ; **Hamdouche, 2015**). Les séquences des amorces universelles utilisées pour les bactéries sont 5'-GTG CTG CAG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' pour l'amorce 27f et 5'-CAC GGA TCC TACG GGT ACC TTG TTA CGA CTT- 3' pour l'amorce 1492r **(Tableau IV)**. Elles donnent des amplicons de 1465 pb et permettent d'amplifier quasiment en totalité le gène de l'ARNr 16S.

Tableau IV. Séquence des amorces universelles utilisées pour l'amplification de l'ADN des bactéries.

Amorces	Séquences

27f	5’-GTG CTG CAG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3’
1492r	5’-CAC GGA TCC TACG GGT ACC TTG TTA CGA CTT- 3’

4.4.2.1. Composition du mélange réactionnel pour la PCR

Toutes les réactions d'amplification par PCR ont été réalisées dans des plaques Sorenson™ (BioScience, USA) de 96 puits (**Koné, 2016**). Chaque mélange réactionnel de volume final de 50 µL a été composé d'ADN matrice (100 ng), des amorces (0,2 µM), de désoxyribonucléotide triphosphate (dNTPs) (200 µM), de MgCl2 (1,5 mM), de tampon Taq à 10x (5 µL) et 1,25 U de GoTaq polymerase (Promega) (**Tableau V)**.

Tableau V. Composition du mélange réactionnel en vue de l'amplification par PCR de l'ADN des bactéries

Réactifs	**Volume par puit (µL)**	**Concentration finale du mix (50 µL)**
Eau moléculaire (Eppendorf, Allemagne)	15,75	
Amorce 27f (Sigma, France)	10	0,2 µM
Amorce 1492r (Sigma, France)	10	0,2 µM
MgCl2 25 Mm (Promega, France)	3	1,5 mM
dNTPs 10 Mm par Dntp (Promega, France)	1	200 µM
Tampon 10X (Promega, France)	5	1X
Go Taq polymerase 5U/µL (Promega, France)	0,25	1,25U
Extrait d'ADN	5	≈ 100 ng

4.4.2.2. Conditions de PCR

L'amplification par PCR a été réalisée selon la méthode de **Le Nguyen et *al.*** (**2008**). Les réactions de PCR ont été effectuées dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA). Une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min, puis 10 cycles de « Touch down » avec une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une hybridation à 65°C (cette température a été abaissée de 1 °C par cycle jusqu'à 55 °C) pendant 1 min, et une élongation à 72 °C pendant 3 min. Ensuite 20 cycles ont été réalisés incluant une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une hybridation à 55 °C pendant 1 min, et une élongation à 72 °C pendant 3 min. Ensuite, l'élongation finale a été réalisée à 72 °C pendant 10 min **(Tableau VI)**.

Tableau VI. Conditions réactionnelles d'amplification par PCR de l'ADN des bactéries

Phase d'amplification	Nombres de Cycles	Température (°C)	Temps (Min)
Dénaturation initiale	1	94	5
Dénaturation		94	1
Hybridation	10	65	1
Elongation		72	3
Dénaturation		94	1
Hybridation	20	55	1
Elongation		72	3
Elongation finale	1	72	10

4.4.2.3. Vérification des produits PCR

Les produits PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (Promega, France) à 2 % (p/v) pour les amplicons de grande taille (1500pb). La migration a été réalisée dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate, EDTA pH 7,3). Pour cela 5 µL d'amplicons auxquels ont été ajoutés 2 µL de colorant bleu/orange (Promega, France) ont été déposés dans chaque puits du gel. Le marqueur servant de témoin positif et de taille moléculaire 1500 pb (Invitrogen, USA) a été également déposé dans un autre puits afin de déterminer la taille des ADN extraits. La migration a duré 30-45 min sous une tension de 100 mV. Le gel d'agarose a été ensuite immergé dans une solution de gel red (Biotium) à 0,1 µg/mL pendant 20 min avant d'être observé sur un trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel a été photographié par une caméra digitale pilotée par le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France) (**Hamdouche, 2015 ; Koné, 2016**).

4.4.3. Séquençage des ADN amplifiés

Les produits PCR ont été envoyés à GATC Biotech en Allemagne pour être séquencés par la méthode de Sänger (**Sänger *et al.*, 1977**). Les séquences d'ADN obtenues ont été visualisées et éditées avec le logiciel BioEdit version 5.0.6 (USA) puis comparées à des séquences de bases de données en utilisant le système BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Les résultats des comparaisons fournissent des

paramètres comme le taux de recouvrement, l'E-value et le taux d'identité qui ont été étudiés afin de réaliser les identifications statistiquement valables.

4.4.4. Analyse des séquences d'ADN

Après avoir effectué les éventuelles corrections nécessaires sur les chromatogrammes, le logiciel MEGA (Version 7) a permis d'aligner les séquences sens et anti-sens des ADN afin d'identifier les régions communes et former la séquence "complète". L'analyse phylogénétique a ensuite été réalisée selon la méthode utilisée par **Bigot (2015)**.

5. ANALYSES STATISTIQUES

Les traitements statistiques ont été effectué à l'aide des logiciel EXCEL 2013 et SPSS 20.0. Les tests de Cochran, de Shapiro-Wilk et de Dixon ont été effectués pour vérifier respectivement l'homogénéité des variances, la normalité des distributions et la présence de valeurs aberrantes. Le test de Fisher-Snedecor a servi à vérifier le modèle des régressions et à valider le domaine de linéarité. Les coefficients de détermination (R^2) ont été déterminés pour apprécier la linéarité. Les concentrations moyennes en Chr, BaA, BbF, BaP ont été calculées avec leur écart-type puis les coefficients de variation ont été obtenus pour exprimer la répétabilité et de la précision intermédiaire. Le pourcentage de recouvrement a été calculé pour exprimer le rendement d'extraction. Les concentrations moyennes et le domaine de variation des concentrations en HAPs ont été utilisés pour décrire le niveau de contamination d'échantillons de fèves de cacao ainsi que de certains produits dérivés (Beurre de cacao, masse de cacao). Le test de Shapiro-Wilk au risque de 1% a été effectué pour vérifier la conformité des valeurs obtenues par la méthode adaptée aux valeurs de référence. Les moyennes et les écarts-types des taux d'humidité et des teneurs en matière grasse des fèves de cacao ont été déterminé.

Partie 3

RESULTATS ET DISCUSSION

I. VALIDATION D'UNE METHODE DE DETERMINATION DES HAPs DU CACAO PAR HPLC COUPLEE AU DETECTEUR FLUORIMETRIQUE.

1. RESULTATS

1.1. Chromatogramme d'analyse des HAPs marqueurs.

La **Figure 25** représente la réponse chromatographique après injection d'une solution standard contenant 16 HAPs prioritaires et d'importance réglementaire. Parmi ces 16 HAPs, seulement les quatre HAPs (BaA, Chr, BbF, BaP) marqueurs de l'EFSA ont été choisis dans le cadre de cette étude. A l'issue des analyses, les absorbances du BaA, Chr, BbF et du BaP matérialisées par des pics ont été détectés à des temps de rétention respectifs de 22,30 ; 24,40 ; 28,80 et 34,23 min. Les résultats de la détermination des concentrations pour chaque HAP marqueur ont été de 8,58 ; 8,39 ; 8,54 ; 8,58 µg.L^{-1} respectivement pour le BaA, le Chr, le BbF et le BaP.

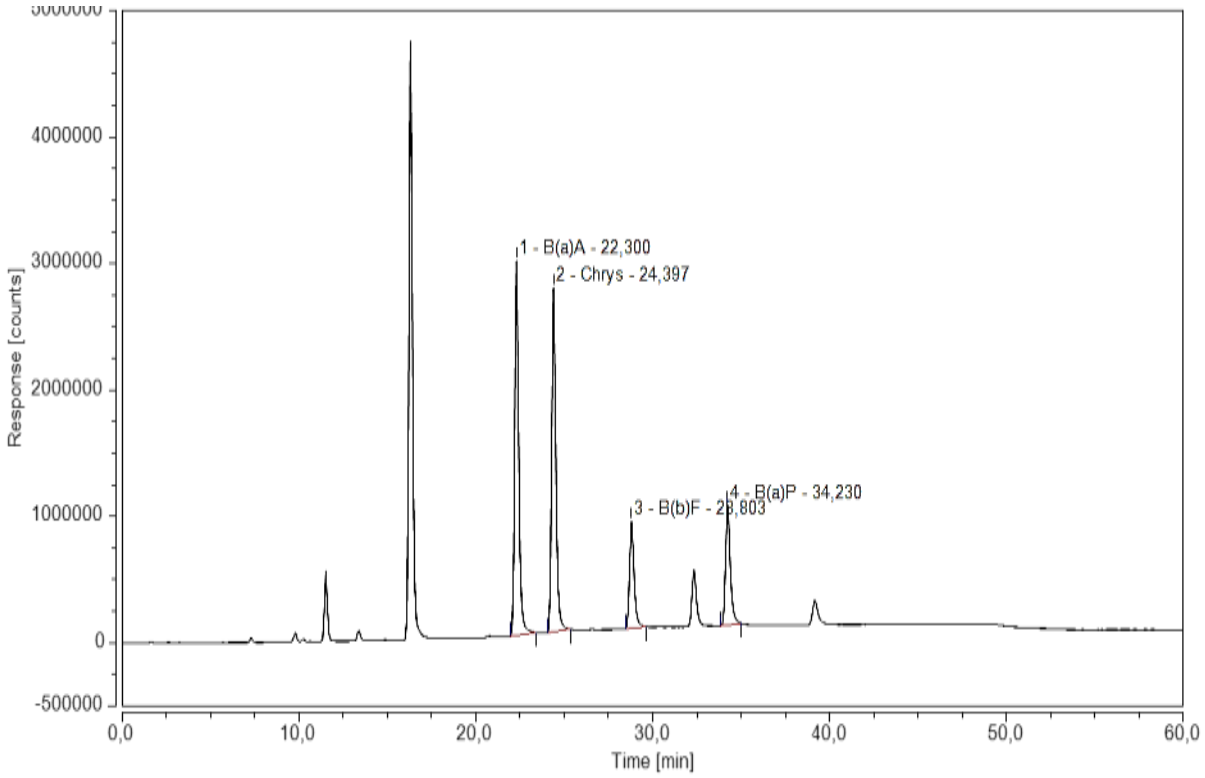


Figure 25. Exemple de chromatogramme standard présentant les pics de détection des HAPs marqueurs (BaA, BbF, Chr et BaP) à partir d'une solution standard contenant 16 HAPs à concentration de 8 µg.L^{-1}.

1.2. Résultats des différents tests de validation de la méthode analytique

1.2.1. Etude de la linéarité

1.2.1.1. Droites d'étalonnage et équations des droites

La **Figure 26** représente les droites d'étalonnages et les équations des droites des 4 HAPs marqueurs accompagnées de leur coefficient de détermination (R^2) respectifs selon la méthode mise au point. Ainsi l'équation de la droite d'étalonnage de BaA est de y = 101785x + 18722 avec un R^2 = 0,9998. Celles des droites d'étalonnage de Chr et de BbF sont respectivement de y = 97905x - 11875 et de y = 33454x - 1407,2 avec R^2 = 0,9995. Enfin y = 38687x + 2138,4 est l'équation de la droite d'étalonnage de BaP avec R^2 = 0,9992. Dans ces équations "y" représente l'aire du pic de chaque HAP et "x" la concentration déterminée en $\mu g.L^{-1}$.

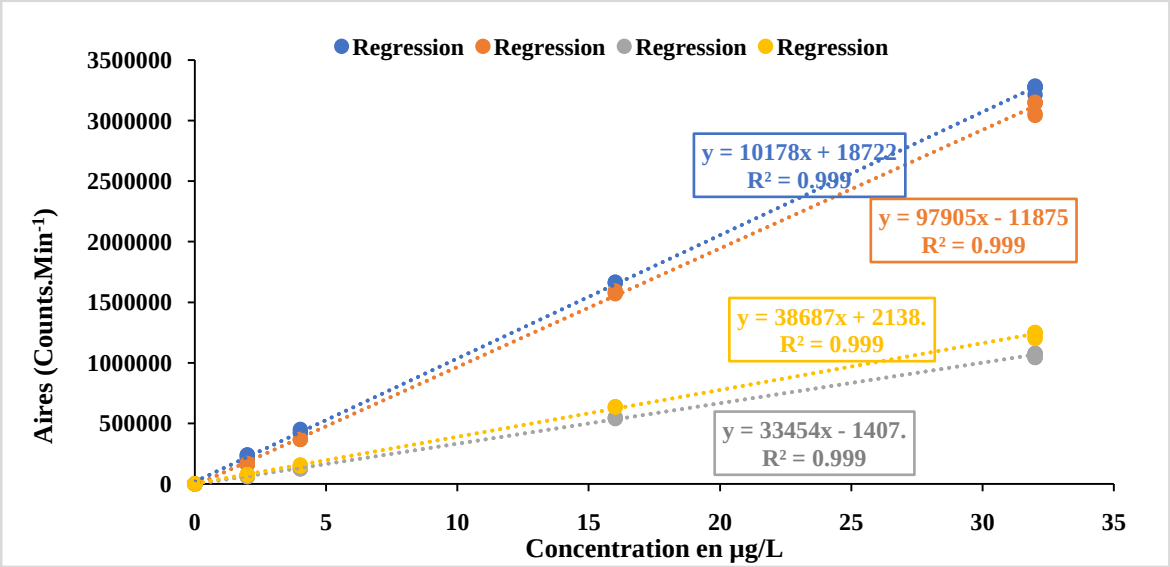


Figure 26. Equations des droites d'étalonnage et équations des droites accompagnées des coefficients de détermination (R^2) obtenues pour les quatre HAPs marqueurs.

1.2.1.2. Résultats du test de linéarité

Le **Tableau VII** récapitule les résultats du test de linéarité de la méthode mise au point. Les valeurs calculées de l'indice **Fl** pour l'acceptabilité des modèles de régressions ont été respectivement de 139940, 58839, 64954, 44958 pour le BaA, le Chr, le BbF et le BaP. Celles de l'indice **Fnl** pour l'acceptabilité des erreurs sur les modèles ont été de 4,73, 4,1, 4,82, 4,88 pour le BaA, le Chr, le BbF et le BaP respectivement. Ces valeurs des indices Fl et Fnl calculées au risque 1 % ont été respectivement supérieures à 8,10 pour les régressions et

inférieures à 4,94 pour les erreurs sur les modèles représentant les valeurs critiques du test de Fisher.

Tableau VII. Résultats du test de la linéarité de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs mise au point

HAPs	Fl	Valeur critique	Modèles de régression	Fnl	Valeur critique	Domaine d'étalonnage
BaA	139940	8,10	Accepté	4,73	4,94	Validé
Chr	58839		Accepté	4,1		Validé
BbF	64954		Accepté	4,82		Validé
BaP	44958		Accepté	4,88		Validé

1.2.2. Valeurs des limites de détection et de quantification

Les valeurs des limites de détection et de quantification de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs sont consignées dans le **Tableau VIII**.Elles sont comprises entre 0,01 et 0,03 µg.kg^{-1} et entre 0,03 et 0,11 µg.kg^{-1} pour les limites de détection et de quantification respectivement.

Tableau VIII. Limites de détection et de quantification de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs mise au point

HAPs	Limites de détection (LOD) (µg.kg^{-1})	Limites de quantification (LOQ) (µg.kg^{-1})
BaA	0,01	0,03
Chr	0,01	0,04
BbF	0,03	0,11
BaP	0,03	0,10

1.2.3. Résultats du test de répétabilité et de la précision intermédiaire.

Le **Tableau IX** consigne les coefficients de variation (CV) calculés lors des tests de répétabilité de la méthode analytique des HAPs. Les résultats obtenus ont été de 1,31, 1,35, 2,16 et 2,29 % respectivement pour le Chr, le BaP, le BaA et le BbF. Les CV des tests de la précision intermédiaire de la méthode sont présentés dans le **Tableau X**. Ils varient d'un échantillon de beurre de cacao à un autre mais sont tous inférieurs à 5 %. Par exemple pour l'échantillon de beurre de cacao A, les coefficients de variation ont été de 3,24 ; 1,54 ; 2,75 et 3,95 % respectivement pour BaA, Chr, BbF et BaP tandis qu'ils ont été 4,12 ; 3,24 ; 1,65 et 2,59 % pour l'échantillon de beurre de cacao B analysés à des jours différents.

Tableau IX. Résultats des tests de répétabilité de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs mise au point

HAPs	**Teneurs mesurées ($\mu g.kg^{-1}$)**	**CV (%)**
BaA	0,98±0,02	2,16
Chr	0,95±0,01	1,31
BbF	0,64±0,01	2,29
BaP	4,35±0,06	1,35

Tableau X. Résultats des tests de précision intermédiaire de la méthode analytique des HAPs mise au point

HAPs	**Echantillon A**		**Echantillon B**		**Echantillon C**	
	Teneurs mesurées ($\mu g.kg^{-1}$)	CV (%)	Teneurs mesurées ($\mu g.kg^{-1}$)	CV (%)	Teneurs mesurées ($\mu g.kg^{-1}$)	CV (%)
BaA	3,32±0,11	3,24	11,71±0,48	4,12	7,77±0,26	3,31
Chr	5,95±0,09	1,54	16,32±0,53	3,24	11,46±0,44	3,82
BbF	1,23±0,03	2,75	4,88±0,08	1,65	2,99±0,07	2,50
BaP	0,95±0,04	3,95	4,00±0,10	2,59	2,53±0,09	3,47

1.2.4. Résultats du test de justesse

Les résultats du calcul des taux de recouvrement et des tests de conformité des données issues de la méthode analytique des quatre HAPs marqueurs mise au point sont consignés

dans le **Tableau XI**. Les valeurs des taux de recouvrement ont été de 98,00 ; 70,89 ; 86,49 ; 79,96 % pour le BaA, le Chr, le BbF et le BaP respectivement. A partir des différences entre les valeurs de référence du beurre de cacao certifié FAPAS et les valeurs mesurées selon la méthode analytique des 4 HAPs marqueurs mise au point la valeur du rapport de Shapiro-Wilk (W) calculée a été de 0,82.

Tableau XI. Valeurs des différents paramètres du test de justesse de la méthode analytique des HAPs mise au point

HAPs	**Teneur de référence (X) ($\mu g.kg^{-1}$)**	**Teneur mesurée (Z) ($\mu g.kg^{-1}$)**	**Taux de recouvrement (%)**	**Différences (d=|X-Z|)**
BaA	1	0,98±0,02	98,00	0,02
Chr	1,34	0,95±0,01	70,89	0,39
BbF	0,74	0,64±0,01	86,49	0,10
BaP	5,44	4,35±0,06	79,96	1,09
Moyenne des différences [moy(d)]				0,40
Ecart-type des différences [σ(d)]				0,49
Rapport de Shapiro-Wilk (W = [moy(d)/σ(d)])				0,82

1.3. Analyses de quelques échantillons de fèves de cacao prélevés à partir des entrepôts de cacao au port d'Abidjan

1.3.1. Taux d'humidité et de matières grasses des cacaos analysés

Les résultats de la détermination de matières grasses et des taux d'humidité des échantillons analysés sont illustrés par la **Figure 27**.Ils indiquent que les taux de matières grasses de ces échantillons de cacao analysés varient de 45,2±0,1 % à 48,9±0,7 % tandis que les valeurs de leurs taux d'humidité sont comprises entre 7,02±0,02 et 7,92±0,05 %.

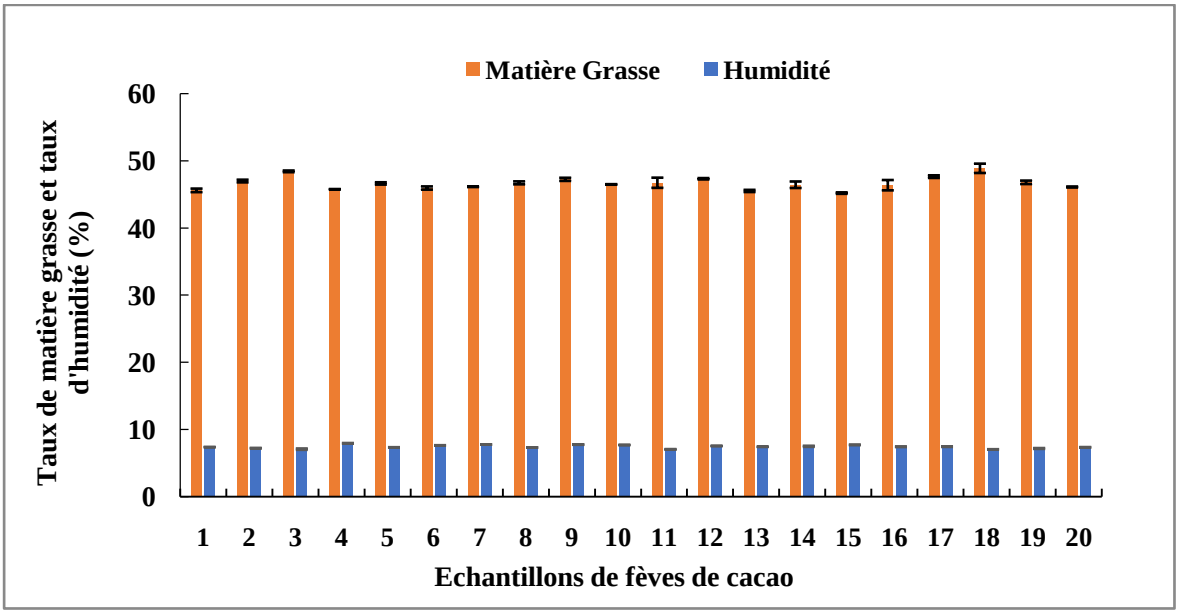


Figure 27. Taux d'humidité et de matières grasses des échantillons prélevés à partir des entrepôts de cacao au port d'Abidjan.

1.3.2. Teneurs en HAPs

Les résultats des analyses des échantillons de cacao provenant d'un entrepôt de stockage du Port d'Abidjan sont présentés à la **Figure 28**. A l'issue de ces analyses, les teneurs en HAPs majeurs et en BaP en particulier varient respectivement de de 5,4 ± 0,6 à 11,37 ± 0,01 $\mu g.kg^{-1}$ et de 0,26 ± 0,00 à 1,75 ± 0,13 $\mu g.kg^{-1}$. En moyenne, les échantillons de cacao analysés contiennent 6,68 $\mu g.kg^{-1}$ HAPs majeurs et de 0,38 $\mu g.kg^{-1}$ BaP.

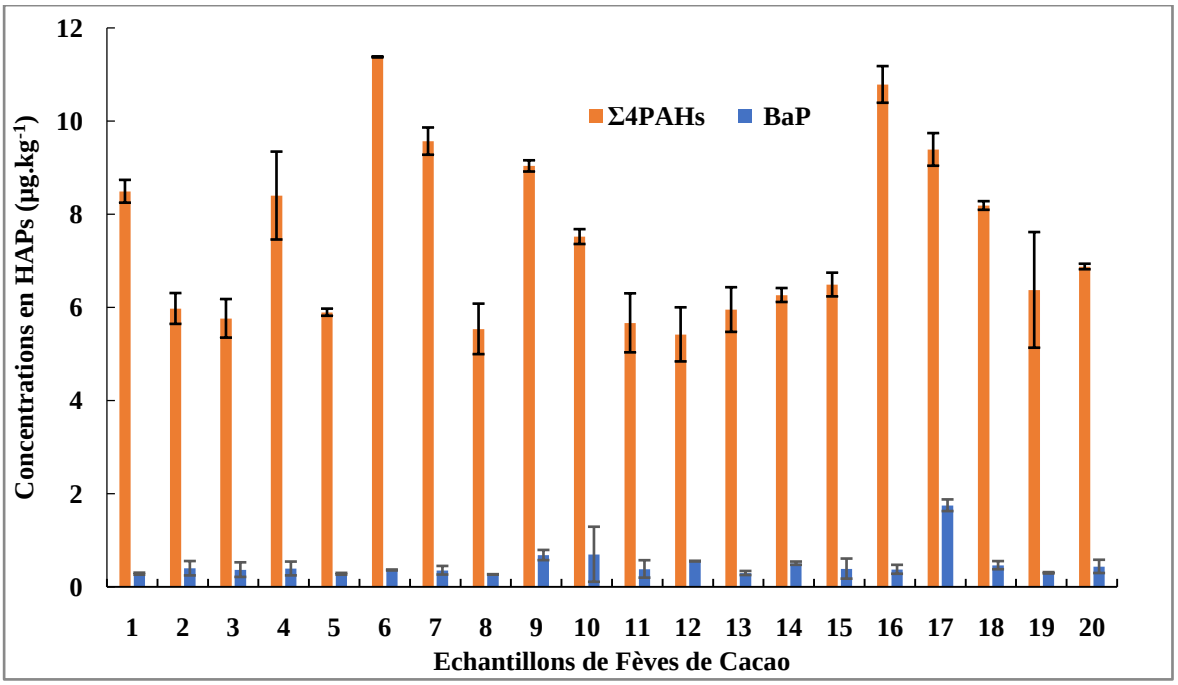


Figure 28. Teneurs en BaP et Somme de BaA, BbF, Chr, BaP (HAPs majeurs) des échantillons de cacao prélevés à partir des entrepôts de stockage au Port d'Abidjan.

2. DISCUSSION

La technique d'extraction des HAPs dans la méthode d'analyse validée a présenté des aspects notables par rapport à d'autres méthodes. Pour ce qui concerne la masse de l'aliquote analysée nous avons utilisé 1 g alors que **Rater et Matissek (2014)** et **Zachara *et al.* (2017)** ont utilisé 2 g de beurre de cacao et d'autres matières grasses d'origine végétale respectivement. Ces observations indiquent que la technique d'extraction des HAPs par saponification utilisée dans le cadre de la présente étude a nécessité moins de quantité de l'échantillon à analyser. Dans notre méthode, la saponification des matières grasses a fait intervenir une solution de KOH comme bien d'autres études. La concentration molaire de cette solution de KOH est parfois similaire à quelques études comme celle de **Dost et Deli, (2012)** mais très souvent de moitié inférieure à celle couramment utilisée (**Alomirah *et al.*, 2010 ; Zyzelewicz *et al.*, 2017)**. Dans notre étude, 6 mL de la solution de KOH ont été utilisés pour la saponification de l'échantillon. Alors que **Alomirah *et al.* (2010)** et **Zyzelewicz *et al.* (2017)** ont utilisé respectivement 100 et 10 mL pour la saponification de la matière grasse. Ces différences de concentration molaire et de volume du solvant de saponification peuvent expliquer le temps de traitement plus réduit dans notre technique (60 min) comparativement aux autres études **Zyzelewicz *et al.* (2017)** qui vont au-delà de 90 min. **Rater et Matissek (2014)** ont observé une durée de saponification plus courte (30 min) que celle observée par la

présente étude. Cela a pu être due au volume de l'éthanol dans la solution de potasse éthanolique qui a été 4 fois supérieur au volume de la solution de KOH à 10%. Par ailleurs, la température d'incubation est un facteur déterminant pour la saponification permettant probablement de réduire la durée de traitement. En effet, alors que la température d'incubation est à 70 °C dans la présente étude, elle a été de 60 °C lors des travaux de **Alomirah *et al*. (2010), Rater et Matissek (2014) ; Zyzelewicz *et al*. (2017)** et de 120 °C pour ceux de **Moret *et al*., (2010)**. A l'analyse de tous ces paramètres, la technique d'extraction des quatre HAPs marqueurs du beurre de cacao mise en œuvre dans notre étude permet de réduire le temps d'analyse et le volume des solvants utilisés par rapport aux techniques utilisées dans des travaux similaires. D'où une répercussion sur le coût d'analyse. Par ailleurs, les pics obtenus des différents HAPs lors des analyses chromatographiques sont bien résolus, de différentes formes et apparaissent à des temps de rétention distincts. Ce qui a permis leur meilleure intégration. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus lors des travaux de **Yu *et al*. (2013)** et de **Semanová *et al*., (2016)** qui ont analysé respectivement 12 HAPs et 4 HAPs incluant le BaA, BbF, Chr, BaP sur des matières grasses végétale et animale. La bonne résolution des pics a permis d'aboutir à une meilleure précision de la quantification des HAPs recherchés (**Nechadi, 2011 ; Rater et Matissek, 2014**). Celle-ci a aussi permis de juger de la bonne sensibilité de la méthode. Cette sensibilité peut s'expliquer aussi par l'usage d'un détecteur fluorescence à laquelle les HAPs montrent une excellente réponse selon divers travaux **(Danyi *et al*., 2009** ; **Ishizaki *et al*., 2010 ; Silva *et al*., 2017)** ; mais aussi, grâce aux conditions chromatographiques optimales.Les coefficients de détermination (R^2) des droites d'étalonnage entre les aires des pics et les concentrations déterminées des quatre HAPs marqueurs testés ont été très proches de 1.Cela dénote un excellent critère de qualité de la linéarité et de la spécificité de la méthode analytique utilisée, comme cela a été observé dans bien d'autres études**(Silva *et al*., 2017 ; Zachara *et al*., 2017)**. Par ailleurs, les valeurs calculées de Fl et de Fnl ont été respectivement supérieures à 8,10 et inférieures à 4,94. Au regard des niveaux de ces deux paramètres (FL, Fnl), l'on peut conclure que les modèles de régression sont acceptables et la gamme de calibration est validée. Le test de linéarité basé sur la comparaison de la variance de l'erreur d'ajustement au modèle par rapport à celle de l'erreur expérimentale montre qu'il n'existe pas de différence significative entre l'ajustement au modèle et l'erreur expérimentale.Les modèles étudiés sont donc linéaires dans la gamme d'étalonnage choisie c'est-à-dire de 0 à 32µg.kg^{-1}, selon la norme **NF V03-110 (1998**). Les intervalles de variation des valeurs des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont très inférieurs aux critères de performances analytiques fixés par l'Union Européenne à

savoir LD ≤ 0,30 $\mu.kg^{-1}$ et LQ ≤ 0,90 $\mu.kg^{-1}$ pour chacun des quatre HAPs testés (**European Union, 2011b**). La méthode analytique des quatre HAPs utilisée présente donc un bon niveau de quantification pour les HAPs. Les valeurs des LD et LQ obtenues dans la présente étude sont analogues à celles obtenues lors de multiples études portant sur diverses matières grasses (**Danyi *et al*., 2009, Raters et Matissek, 2014, Kumar *et al*., 2017 ; Zachara *et al*., 2017)**. De même, plus les LD et LQ sont basses plus la sensibilité de l'appareil pour la détection de ces HAPs étant bonne, les valeurs LD et LQ de la méthode utilisée en révèlent une très bonne sensibilité.La fidélité et la stabilité de la méthode mise au point ont été vérifiées par la détermination des coefficients de variation des résultats des essais de répétabilité et de reproductibilité. Toutes les valeurs des Coefficients de Variation (CV) calculés ont été inférieures à 5 %. Comparativement aux valeurs des CV de répétabilité et de reproductibilité respectivement inférieur à 5,5 % et 9,3 % des travaux de **Sadowska-Rociek *et al*., (2015)**,celles obtenues au cours de la présente étude sont meilleures. En conséquence de ces observations, on peut conclure que la méthode analytique de détermination des HAPs utilisée est répétable et reproductible.Ces résultats montrent aussi la stabilité et la fiabilité de la méthode. Les taux de recouvrement des quatre HAPs testés ont varié entre 70,89 % pour le Chr et 98,00 % pour le B(a)A. Ils restent compris entre 50 % et 120 % conformément au règlement UE 836/2011 **(Raters et Matissek, 2014)**. La comparaison des valeurs mesurées aux valeurs de références à travers le test de conformité de la justesse au risque 1% n'a révélé aucune différence significative. La valeur calculée de Shapiro-Wilk (W) dans cette étude a été égale à 0,82. Cette valeur est inférieure à 3 qui est la valeur critique de référence **(NF V03-110, 1998**). Ce qui correspond à une étroitesse de conformité entre les valeurs des teneurs certifiées et celles calculées.Au regard de ces observations, l'on peut conclure que la méthode analytique des HAPs utilisée présente un bon niveau de justesse. L'analyse des résultats des différents tests de validation de la méthode d'analyse des quatre HAPs marqueurs du beurre de cacao étant concluante, l'on peut en déduire que la méthode est valide.Cette méthode validée a été utilisée pour déterminer les teneurs en HAPs de quelques échantillons de cacao prélevées à partir des entrepôts de cacao du port d'Abidjan.Mais avant, les valeurs des teneurs en humidité et en matières grasses déterminées ont été comprises entre 45,19 ± 0,11 et 48,88 ± 0,69 % pour les matières grasses et entre 7,02 ± 0,02 et 7,92 ± 0,05 % pour les taux d'humidités. Les valeurs de ces deux paramètres physico-chimiques sont conformes aux normes de la FAO qui sont de 45 et 55 % pour les matières grasses et un taux d'humidité inférieur à 8 % **(Barel, 2013)**. Les teneurs en matières grasses des échantillons analysés sont inférieures à celles trouvées par **Servent *et al*., (2017)** sur des échantillons de cacao en

République Dominicaine (80,30 ± 0,13 %), à Madagascar (80,56 ± 0,47 %) et en Equateur (76,52 ± 1,87 %). Ces différences observées pourraient être dues à des différences de durées de fermentation des fèves de cacao **(Guehi *et al.*, 2010b)**.Les teneurs maximales en BaP et HAPs majeurs des échantillons analysés selon la méthode CLHP-DF validée dans cette étude ont été respectivement de 1,75 ± 0,13 et 11,37 ± 0,01 $\mu g.kg^{-1}$. Ces teneurs sont largement inférieures aux valeurs maximales admises par les Directives Européennes qui sont de 5 $\mu g.kg^{-1}$ pour le BaP et 30$\mu g.kg^{-1}$ pour HAPs majeurs **(European Union, 2011a)**. Les teneurs en HAPs des échantillons de cacao analysés sont donc conformes aux spécifications internationales.

CONCLUSION PARTIELLE

Ce chapitre a pour objectif la validation d'une méthode analytique de détermination rapide des HAPs (BaA, Chr, BbF et BaP) dans le beurre de cacao. La technique d'extraction des HAPs du beurre de cacao a utilisé 1 g de beurre de cacao, saponifié avec 6 mL de KOH 1 M pendant 60 min à 70 °C. La méthode d'analyse incluant cette technique d'extraction, pour la détermination des HAPs du beurre de cacao a ensuite été éprouvée par des tests de validation. L'acceptabilité et la fiabilité de cette méthode vis à vis des exigences et critères de l'Union Européenne **(European Union, 2011b)**ont été prouvée. Les modèles de régressions et le domaine d'étalonnage ont été jugé acceptables. Les limites de détection et de quantification ont été déterminées et traduisent une bonne sensibilité. Les tests de répétabilité et de reproductibilité ont présenté des coefficients de variation appréciables. Les taux de recouvrement et l'étude de la justesse ont permis de conclure la validité de la méthode analytique pour la détermination des HAPs du beurre de cacao. De plus, cette méthode a été simple, fiable, rapide, moins couteuse et respectueuse de l'environnement. Ce travail a montré que les teneurs en HAPs d'une vingtaine d'échantillons des fèves de cacao produits en Côte d'Ivoire et destinés à l'exportation présentent des teneurs en HAPs conforment aux spécifications internationales (**European Union, 2015a ; European Union, 2015b)**. Cette méthode d'analyse des HAPs du beurre de cacao est très pratique et immédiatement applicable dans le contrôle qualité sanitaire du cacao en Côte d'Ivoire. Toutefois il est pertinent de s'interroger sur la provenance des HAPs du cacao ivoirien. Afin de répondre efficacement à cette question de recherche, abordons à présent l'étude de l'impact des traitements technologiques post-récolte sur la contamination du cacao marchand en HAPs.

II. INFLUENCE DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES POST-RECOLTE SUR LA FORMATION DES HAPs DANS LES FEVES DE CACAO ET PRODUITS DERIVES.

1. RESULTATS

1.1. Influence des traitements technologiques post-récolte des fèves de cacao au champ

1.1.1. Influence de différents itinéraires techniques de préparation de l'écabossage à la fermentation

Les teneurs en HAPs majeurs des fèves de cacao issues de divers itinéraires techniques post-récolte de préparation primaire testés et intégrant l'état sanitaire des cabosses, le délai d'écabossage, les techniques de fermentation et le séchage solaire sur bitume ont été déterminées. Les teneurs en HAPs majeurs des fèves de cacao étudiées ont été relativement proches de 5 µg.kg^{-1} (**Figure 29)**. Les résultats obtenus ont montré que les teneurs en HAPs majeurs de l'ensemble des fèves analysées ont été comprises entre 4,21±0,30 et 6,19±0,16 µg.kg^{-1} quel que soit l'itinéraire technique appliqué. La valeur moyenne des teneurs en HAPs majeurs a été de 5,27±0,73 µg.kg^{-1}. Les fèves issues des cabosses abimées puis fermentées dans des caisses en plastique sans délai d'écabossage (**CPab0**) ont enregistré la plus forte teneur en HAPs majeurs avoisinant 6,19±0,16 µg.kg^{-1}. Cependant la plus faible teneur en HAPs majeurs de 4,21±0,30 µg.kg^{-1} a été mesurée dans les fèves issues des cabosses abimées puis fermentées dans des feuilles de bananiers sans délai d'écabossage (**FBab0**).

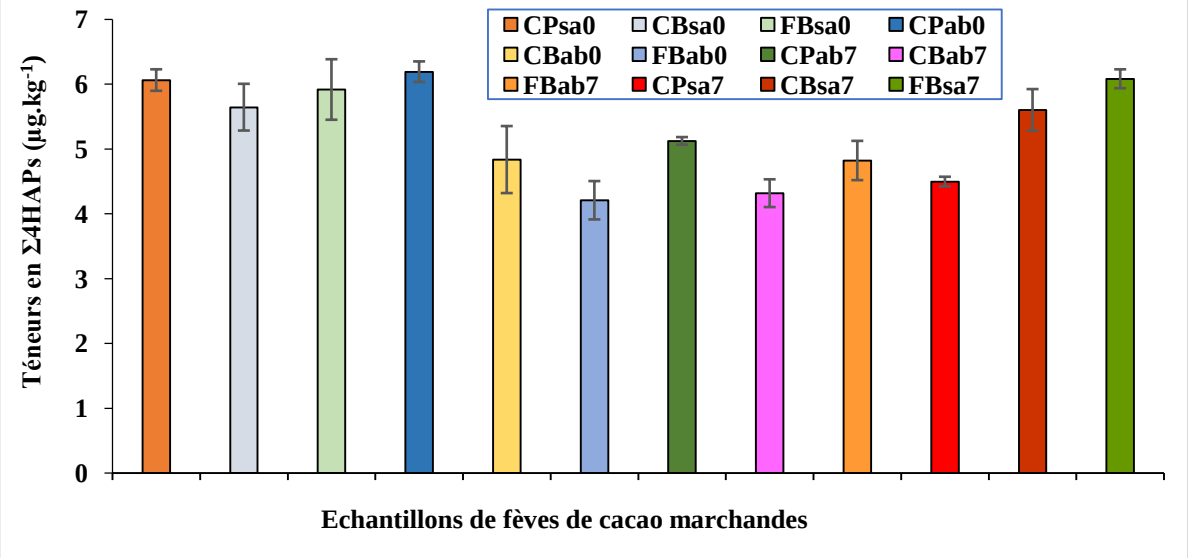


Figure 29. Teneurs en HAPs majeurs de fèves de cacao issues de divers itinéraires techniques post-récoltes et séchées sur une aire bitume. Avec « **CP** » = Fermentation en Caisses Plastique, « **CB** » = Fermentation en Caisses en Bois, « **FB** » = Fermentation en Feuilles de

Bananiers, « **sa** » = cabosses Saines, « **ab** » = cabosses Abimés), « **0** » =0 jours de délais d'écabossage, « **7** » =7 jours de délais d'écabossage.

1.1.2. Influence des techniques de séchage

La **Figure 30** présente les teneurs en HAPs majeurs des fèves de cacao séchées selon différentes techniques. Les résultats obtenus montrent que le beurre extrait des fèves de cacao séchées au soleil a été caractérisé par une teneur en HAPs majeurs de 5,92±1,20 µg.kg^{-1}. Lorsque le séchage des fèves de cacao a été réalisé par une technique solaire suivi d'un séchage par grillade dans un four d'arachides, la teneur en HAPs majeurs du beurre résultant a été de 36,80±4,74 µg.kg^{-1}. Cependant la teneur en HAPs majeurs du beurre a été de 114,92±21,99 µg.kg^{-1} lorsque les fèves de cacao ont été séchées d'abord au soleil ensuite par l'utilisation de feu de bois. Enfin, lorsque les fèves de cacao ont été séchées au feu de bois seul, la teneur en HAPs majeurs du beurre dérivé s'est située autour de 148,86±25,17 µg.kg^{-1}.

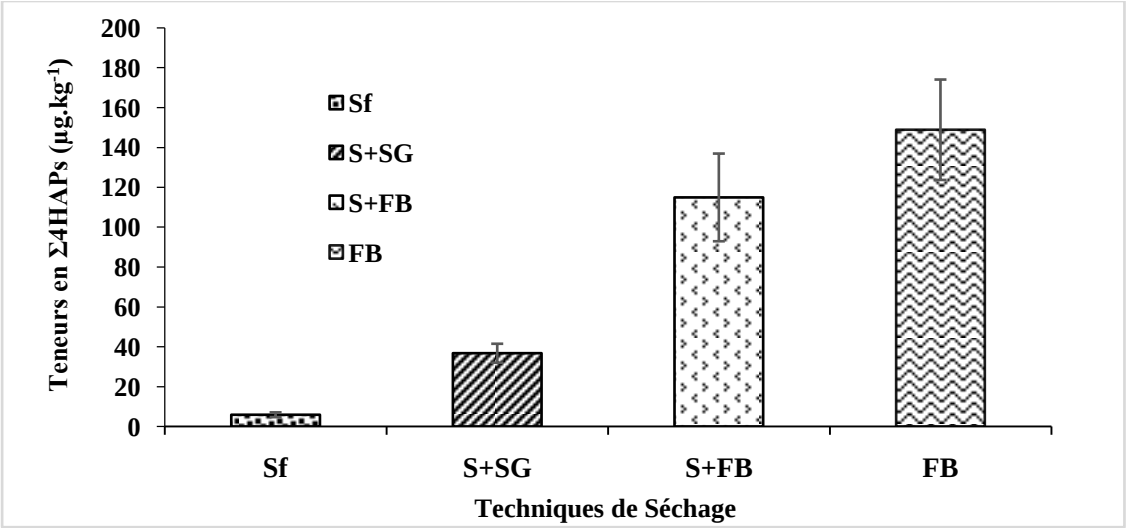


Figure 30. Evolution des teneurs en HAPs majeurs des fèves de cacao séchées par différentes techniques. FB : Séchage au feu de bois ; S+FB : Séchage solaire suivi de Séchage au feu de bois ; S+SG : Séchage solaire suivi de Séchage au four de grillage d'arachides, Sf : Séchage solaire de fèves de cacao fermentées.

1.1.3. Influence des conditions de stockage

La **Figure 31A-D** présente l'évolution des teneurs en HAPs majeurs des fèves de cacao séchées au soleil selon différents supports : claie (**Figure 31A**), bâche plastique (**Figure 31B**), aire cimentée (**Figure 31C**) et bitume (**Figure 31D**). Les résultats obtenus montrent que la teneur en HAPs du beurre issu des fèves de cacao séchées sur claie a été de 5,64±0,01 µg.kg^{-1}

avant stockage. Après deux semaines de stockage, la teneur en HAPs majeurs du beurre des fèves de cacao stockées en cuisine paysanne s'est accrue de 5,64±0,01 à 20,48±1,76 $\mu g.kg^{-1}$ tandis que le beurre extrait des fèves stockées dans un magasin présente une teneur en HAPs majeurs de 6,26±0,56 $\mu g.kg^{-1}$. Au bout de quatre semaines de stockage, les teneurs en HAPs majeurs du beurre produit à partir des fèves stockées en magasin ont stagné autour de 5,98±0,30 $\mu g.kg^{-1}$ alors que celle du beurre extrait à partir des fèves de cacao entreposées dans la cuisine a connu une hausse de près de 44,86 % soit une teneur en HAPs majeurs de 37,14±2,79 $\mu g.kg^{-1}$ (**Figure 31A**). La **Figure 31B** montre parallèlement que le beurre issu des fèves de cacao séchées sur bâche plastique a présenté une teneur en HAPs majeurs de 5,12±0,27 $\mu g.kg^{-1}$ immédiatement après séchage. Après deux semaines de stockage, cette teneur a atteint 27,19±1,85 $\mu g.kg^{-1}$ pour le beurre des fèves stockées en cuisine alors que celle du beurre extrait des fèves stockées au magasin a demeuré constante autour de 5,83±1,21 $\mu g.kg^{-1}$ pour les fèves stockées en magasin. Après quatre semaines de stockage, la teneur en HAPs majeurs du beurre obtenu à partir des fèves stockées en magasin n'a pas connu d'évolution (5,57±0,61 $\mu g.kg^{-1}$) alors que celle du beurre dérivé des fèves de cacao provenant d'un stockage à la cuisine s'est accru pour atteindre 35,11±1,30 $\mu g.kg^{-1}$ soit une augmentation de 20,28 %. Pour ce qui concerne les fèves de cacao séchées sur aire cimentée, leur teneur en HAPs majeurs initiale a été de 6,14±0,30 $\mu g.kg^{-1}$. En deux semaines de stockage en magasin, elle a très peu évolué (5,62±0,16 $\mu g.kg^{-1}$) alors que celle du beurre extrait des fèves stockées en cuisine a connu une hausse de 78,80 % en atteignant 28,97±0,71 $\mu g.kg^{-1}$. Au bout de quatre semaines de stockage, la teneur en HAPs majeurs du beurre extrait des fèves stockées en magasin a peu augmenté à une valeur de 7,16±0,45 $\mu g.kg^{-1}$. Cependant la teneur en HAPs majeurs du beurre des fèves stockées en cuisine, est passée à 39,53±0,75 $\mu g.kg^{-1}$ (**Figure 31C)**. Enfin, la teneur en HAPs majeurs du beurre des fèves de cacao séchées sur bitume avant stockage a été de 5,27±0,73 $\mu g.kg^{-1}$ à la fin du séchage. Au bout de deux semaines de stockage, elle a atteint 6,27±0, 78 et 21,81±3,22 $\mu g.kg^{-1}$ pour les fèves stockées respectivement en magasin et en cuisine. A l'issue de quatre semaines de stockage, les teneurs en HAPs majeurs du beurre extrait des fèves stockées en magasin ont été de 8,03±1,58 $\mu g.kg^{-1}$ tandis que celle des fèves stockées en cuisine a atteint une valeur de 35,70 ±0,21 $\mu g.kg^{-1}$ soit une hausse de 38,91% (**Figure 31D**).

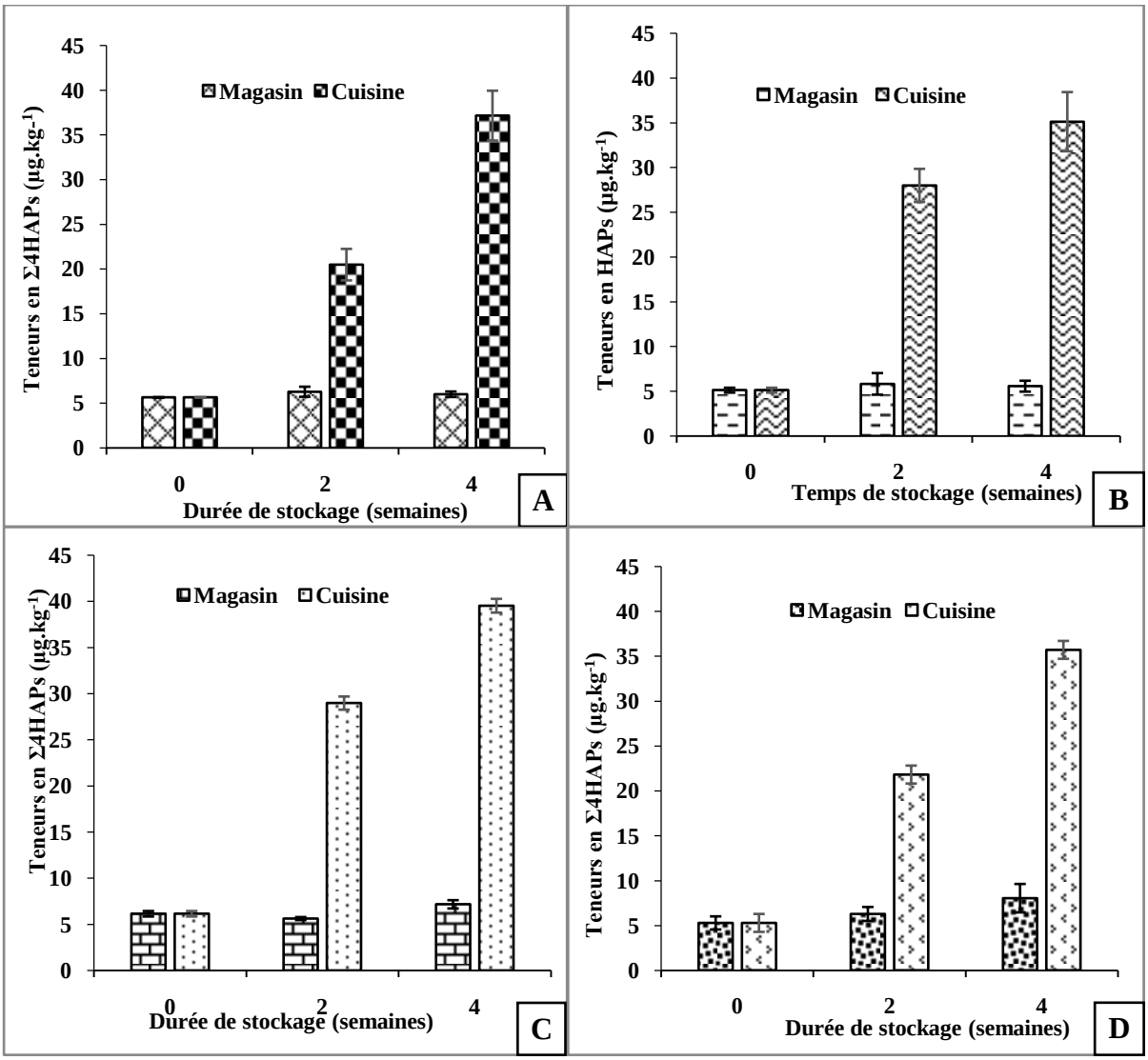


Figure 31A-D. Evolution des teneurs en HAPs majeurs des beurres extraits des fèves de cacao séchées sur A) claie, B) bâche plastique, C) Aire cimentée, D) bitume au cours du stockage en environnement paysan

1.2. Evolution de la teneur en HAPs du cacao lors de la transformation en produits dérivés.

La **Figure 32** recapitule les teneurs en HAPs majeurs des beurres, déterminées aux différentes étapes du processus de fabrication du chocolat dérivé des fèves de cacao traitées dans cette étude. Les résultats obtenus montrent que la teneur en HAPs majeurs des beurres extraits des fèves de cacao marchand avant torréfaction a été de 97,10±1,48 µg.kg^{-1}. Lorsque les fèves de cacao ont été torréfiées, cette teneur en HAPs majeurs chute brutalement à 67,01±3,99 µg.kg^{-1}. Cependant après décorticage des fèves de cacao, les résultats montrent que la teneur en HAPs majeurs de la matière grasse extraite des coques de fèves a été de 91,40±8,96 µg.kg^{-1} tandis que celle du beurre obtenu à partir des nibs n'a été que de

5,76±0,27 µg.kg^{-1}. Après broyage des nibs de cacao, la teneur en HAPs majeurs du beurre extrait de la masse de cacao résultante a été de 6,74±0,26 µg.kg^{-1}. La transformation de la masse de cacao en liqueur de cacao puis en chocolat a induit des teneurs en HAPs majeurs respectives de 7,79±0,26, 8,05±0,05 µg.kg^{-1}. Au total, il y a eu 91,71 % de réduction en HAPs au cours de la transformation des fèves de cacao en chocolat.

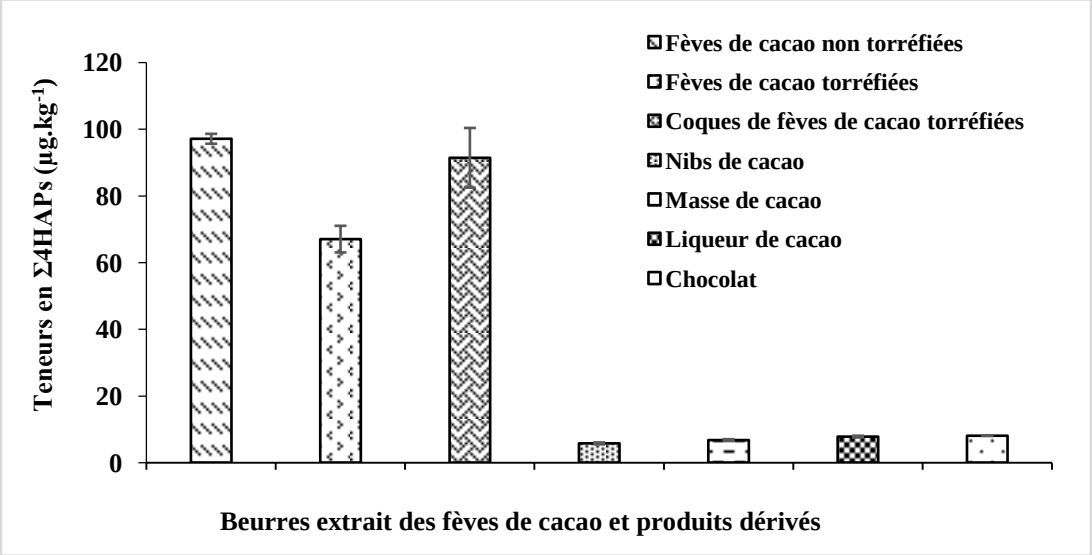


Figure 32. Répartition des HAPs majeurs dans les produits dérivés au cours de la transformation des fèves de cacao en produits dérivés.

2. DISCUSSION

Les résultats de la détermination des teneurs en HAPs majeurs du beurre extrait des fèves de cacao marchand ont mis en relief des valeurs très négligeables en deçà de 7 µg.kg^{-1} quel que soit le support de séchage utilisé. Spécifiquement, le bitume qui était supposé induire une migration importante des HAPs vers les fèves de cacao a aussi présenté des teneurs en HAPs majeurs environ 5 fois en dessous des limites maximales fixées par les critères Européens. Contrairement, à plusieurs études similaires où des teneurs significatives en HAPs ont été retrouvées dans les denrées alimentaires séchées sur le bitume (**Aikpokpodion *et al*., 2013 ; EFSA, 2008**). Cela est dû au fait que, la surface de bitume utilisée dans notre étude a été une ancienne chaussée très peu pratiquée. Les particules d'hydrocarbures pouvant provenir de ce bitume et/ou des gaz d'échappement dus à une circulation routière régulière n'ont pas été disponibles pour contaminer les fèves de cacao (**Tarantini, 2010**).Bien qu'à de très faibles concentrations, la présence des HAPs dans les fèves de cacao semble provenir de sources environnementales lors du séchage. En effet, les sols des plantations, les aires de séchage

et/ou le matériel végétal utilisé dans cette étude, pourraient être contaminée par les HAPs depuis les brulis réalisés lors des défriches et par diverses sources mobiles (**Garnier, 2010**). Aussi, les HAPs pourraient provenir de l'environnement lui-même pollué par les poussières et diverses fumées. (**EFSA, 2008 ; Garnier, 2010 ; CAOBISCO/ECA/FCC, 2015**). Dans les échantillons de fèves de cacao séchées sur le bitume la plus faible teneur en HAPs a été enregistrée au niveau des FBab0. Cette faible présence des HAPs pourrait être reliée à la nature biologique du support de fermentation (feuilles de bananiers) qui favoriserait la croissance des microorganismes capables de métaboliser les HAPs (**Bhattacharya *et al*., 2012 ; Wu *et al*. 2013**). En revanche, la présence des HAPs à des teneurs avoisinant 6,19±0,16 $\mu g.kg^{-1}$ peut être expliquée par le développement des microorganismes dégradant ces contaminants lors de la fermentation des fèves de cacao qui serait probablement limitée par la nature (polyéthylène) des caisses plastiques. Quel que soit l'itinéraire technique de préparation primaire appliqué, les traitements technologiques post récolte précédant le séchage n'ont pas d'impact réel sur la formation des HAPs. Cependant l'utilisation des matériaux plastiques pour la fermentation des fèves de cacao pourrait être proscrite car elle limiterait la croissance des microorganismes qui métabolisent les HAPs en plus de présenter le handicap de produire du cacao mal fermenté (**Guehi et *al*., 2010b**) et de favoriser la sécrétion de l'ochratoxine A (**Kedjebo et *al*., 2015**). Au regard de la diversité des techniques de séchage du cacao mises en œuvre, il a été judicieux d'étudier l'impact de chaque technique sur la formation des HAPs dans les fèves de cacao. Le beurre dérivé des fèves de cacao séchées au soleil a enregistré la plus faible teneur en HAPs alors que celui issu des fèves de cacao traitées uniquement au feu de bois est le plus contaminé en HAPs avec une teneur 4-5 fois supérieure à la spécification européenne et près de 30 fois supérieure à la teneur en HAPs du beurre produit à partir des fèves de cacao séchées par le mode solaire. Cette explosion de la teneur en HAPs majeurs est due à la migration des HAPs de la fumée issue de feu de bois résineux, aux fèves de cacao. En effet, comme plusieurs études l'avaient préalablement décrit, la combustion incomplète de la matière organique notamment du bois génère la formation de divers types de HAPs (**de lima *et al*., 2017 ; Rivier *et al*., 2009 ; Onyemaechi *et al*., 2018**). Aussi, cette abondance des HAPs pourrait s'expliquer par le fait que ceux-ci semblent se former via un processus de carbonisation, où la matrice initiale subit une transformation chimique et un réarrangement pour donner une structure aromatique polycyclique plus condensée (**Houessou, 2007**). Par ailleurs, afin de déterminer l'influence des conditions de stockage au niveau des producteurs sur la contamination des fèves en HAPs, deux entrepôts ont été choisis. Au total, la teneur en HAPs majeurs du beurre extrait des fèves de cacao

stockées dans le magasin loin de toutes sources de fumée reste quasi constante alors que celle du beurre issu des fèves de cacao stockées dans une cuisine n'a fait que s'accroitre quel que soit l'itinéraire technique post-récolte pratiqué. Ces résultats montrent clairement que lorsque les fèves de cacao sont entreposées dans des conditions enfumées la teneur en HAPs du beurre résultant augmente au cours du stockage. Cette augmentation est liée à la contamination des fèves de cacao par les HAPs provenant de la fumée produite par le feu de bois allumé lors de la préparation des repas familiaux (**Misnawi, 2012 ; Lowor *et al.*, 2012 ; Owusu-Boateng & Owusu, 2015**). Le beurre extrait des fèves de cacao est très largement contaminé en HAPs tant si les fèves de cacao ont été séchées au feu de bois que si elles ont été stockées dans des endroits fumigènes ou à proximité de la fumée de feu de bois. Ces observations permettent de conclure que l'itinéraire technique post-récolte faisant intervenir à quelque étape que ce soit une source des HAPs induit la contamination des fèves de cacao avec de fortes concentrations en HAPs majeurs. De ce fait, les seuls moyens de préserver les fèves de cacao marchand d'une contamination alarmante en HAPs consistent à éviter un séchage artificiel faisant intervenir la fumée et un stockage dans des endroits à proximité d'une source fumigène. Enfin, la seule exposition des fèves de cacao à la fumée ne semble pas être le seul facteur de contamination en HAPs. En effet, cela pourrait être favorisé par sa richesse en matière grasse comme cela a été démontré chez la plupart des denrées alimentaires grasses (**Dost et İdeli, 2012 ; Xu *et al.*, 2011 ; Ramalhosa *et al.*, 2012b ; Janoszka, 2011 ; Rater et Matissek, 2014**). Cette observation a été confirmée lors de l'étude de la répartition des HAPs des fèves de cacao dans les produits dérivés lors de la transformation du cacao en chocolat. Les résultats de cette étude ont permis de constater que la torréfaction des fèves de cacao réduit la teneur en HAPs. Cette diminution de la teneur en HAPs pourrait s'expliquer par une oxydation des HAPs à faible température (125 °C) en présence d'air-vapeur dans l'étuve ventilée utilisée pour la torréfaction (**Bordenave, 2015**). Par ailleurs, dans la phase post torréfaction, les résultats indiquent une répartition discriminante des HAPs majeurs dans les fèves de cacao contaminés avec une concentration plus importante dans les coques par rapport aux nibs. Cette observation s'explique par le fait que la coque et l'enveloppe fine couvrant les fèves de cacao constituent une double barrière contre la migration des HAPs **(CAOBISCO, 2015** ;**Owusu-Boateng & Owusu, 2015)**. En effet, les HAPs au contact des fèves de cacao se déposeraient dans une première étape sur les coques où leur migration vers la matière grasse débute. Une fois, cette première barrière franchie, la présence de la fine enveloppe autour des cotylédons de la fève de cacao va aussi limiter le passage des HAPs des coques vers la matière grasse présente à l'intérieur des cotylédons. Après décorticage des

fèves torréfiées et mise à l'écart des coques, les beurres extraits des produits dérivés successifs du cacao tels que la masse et la liqueur de cacao ainsi que le chocolat résultant présentent quasiment les mêmes teneurs en HAPs plus faibles (environ 4-5 fois en dessous des limites critiques) que celles des matières grasses issues des coques des fèves. Ainsi, plus de 90 % des HAPs des fèves de cacao fermentées et séchées sont perdus lors du processus de transformation du cacao en chocolat. Ce constat permet de conclure que la contamination des fèves en HAPs présente un problème sanitaire très limité malgré la toxicité élevée des HAPs. En effet, le risque sanitaire que peut causer les produits cacaotés exceptés les fibres produites à partir des coques s'amenuisent très considérablement à l'issue de la transformation industrielle du cacao. A moins d'une transformation mal maîtrisée du cacao, les produits dérivés ne présentent pas de danger pour les consommateurs du point de vue des HAPs.

CONCLUSION PARTIELLE

Les résultats de cette étude ont montré que l'itinéraire technique post récolte jusqu'au séchage des fèves de cacao n'est pas un facteur déterminant de la contamination du produit en HAPs tant que le séchage est naturel. Cependant ce séchage solaire sur une aire bitumée peut provoquer une migration des HAPs dans les fèves de cacao. Par ailleurs, un séchage artificiel faisant intervenir le feu de bois se présente comme l'une des causes majeures de la présence des HAPs dans les fèves de cacao. Ce rôle de la fumée généralement riche en HAPs a été confirmée par une augmentation galopante de la teneur en HAPs des beurres de cacao extraits des fèves de cacao stockés à proximité d'une source fumigène. Bien que faible la torréfaction (à 125°C dans une étuve ventilée) des fèves de cacao semble réduire la teneur en HAPs du beurre. Toutefois, la contamination des fèves de cacao par les HAPs ne constitue pas un réel problème sanitaire pour les consommateurs des produits dérivés tels que le beurre, la masse, la liqueur de cacao et le chocolat, lorsque l'étape de décorticage est bien réalisée. En effet, plus de 90 % des HAPs contaminant les fèves de cacao sont concentrées dans les coques. Leur non-incorporation dans les produits cacaotés constitue une garantie sanitaire pour les consommateurs. Au regard de l'usage multiple des coques et de leur consommation de plus en plus importante sous la forme de fibres dérivées, il est impératif de maîtriser la présence des HAPs dans les fèves de cacao. Les techniques physiques et chimiques de décontamination étant de plus en plus décriées à cause de leur contre-performance et la toxicité des produits de dégradation, quels pourraient être les résultats d'une alternative biologique impliquant les microorganismes ?

III. ESSAIS DE DEGRADATION DES HAPs PAR UN CONSORTIUM DE BACTERIES ISOLEES A PARTIR DES FEVES DE CACAO.

1. RESULTATS

1.1. Caractéristiques des bactéries isolées à partir des fèves de cacao.

1.1.1. Caractéristiques macroscopiques des colonies de bactéries d'intérêt sur milieu PCA.

Les résultats des observations macroscopiques des colonies de bactéries ayant poussées sur des milieux MYE et MBS enrichis en HAPs puis cultivés sur milieu PCA par stries sont présentés à la **Figure 33A-C**. De ce fait, seules les souches bactériennes ayant utilisées les HAPs comme seules sources de carbone ont été observées. Ces résultats ont permis de discriminer au total 12 colonies bactériennes sur la base des caractéristiques macroscopiques que sont la taille la forme, les bords, la couleur et l'aspect. Parmi ces colonies, certaines ont été de petites, moyennes ou grandes tailles, avec des formes circulaires, ponctiformes ou irrégulières. Des colonies avec des bords ondulés ou réguliers, de diverses couleurs blanche, beige et jaune ont été aussi détectées. Divers aspects de colonies, soit opaque, translucide ou brillante avec des surfaces rugueuses ou lisses ont été observées.

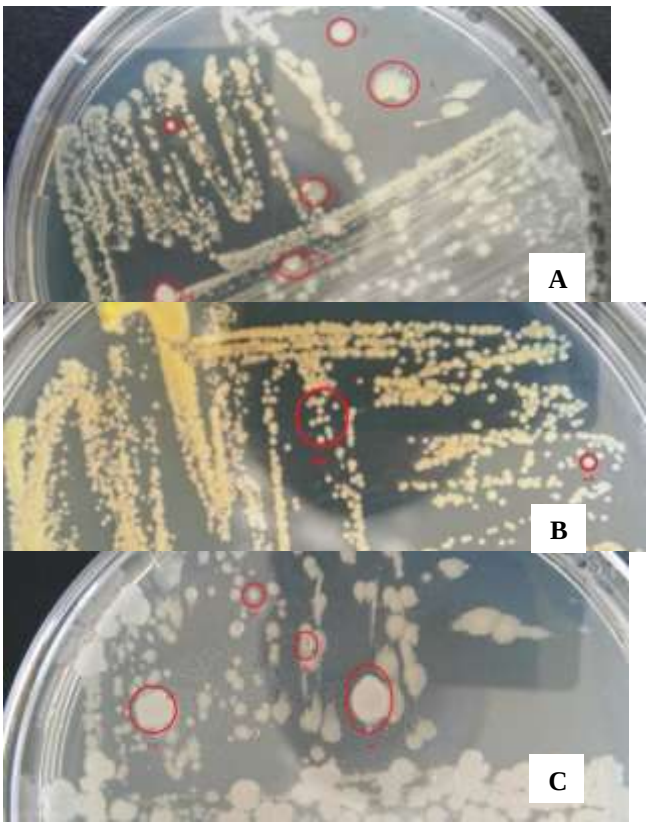


Figure 33A-C. Cultures sur milieu PCA des bactéries isolées à partir des fèves de cacao et utilisant les HAPs majeurs comme source de carbone**.**

1.1.2. Caractéristiques microscopiques des cellules de bactéries d'intérêt.

Les résultats de l'étude de la morphologie, du mode d'assemblage et de la coloration gram des cellules des bactéries en consortium sont présentés à la **Figure 34**. Les résultats de la coloration de Gram ont révélé deux types de bactéries : des bactéries Gram-négatif plus dominantes et des bactéries Gram-positif. Les cellules ont été des bacilles de taille plus ou moins variables, à bordure arrondie ou carrée. Elles ont été soit individuelle, soit assemblée en grappe ou en chainette. Les cellules des différentes bactéries ont présenté des endospores ellipsoïdales subterminales ou terminales non déformantes.

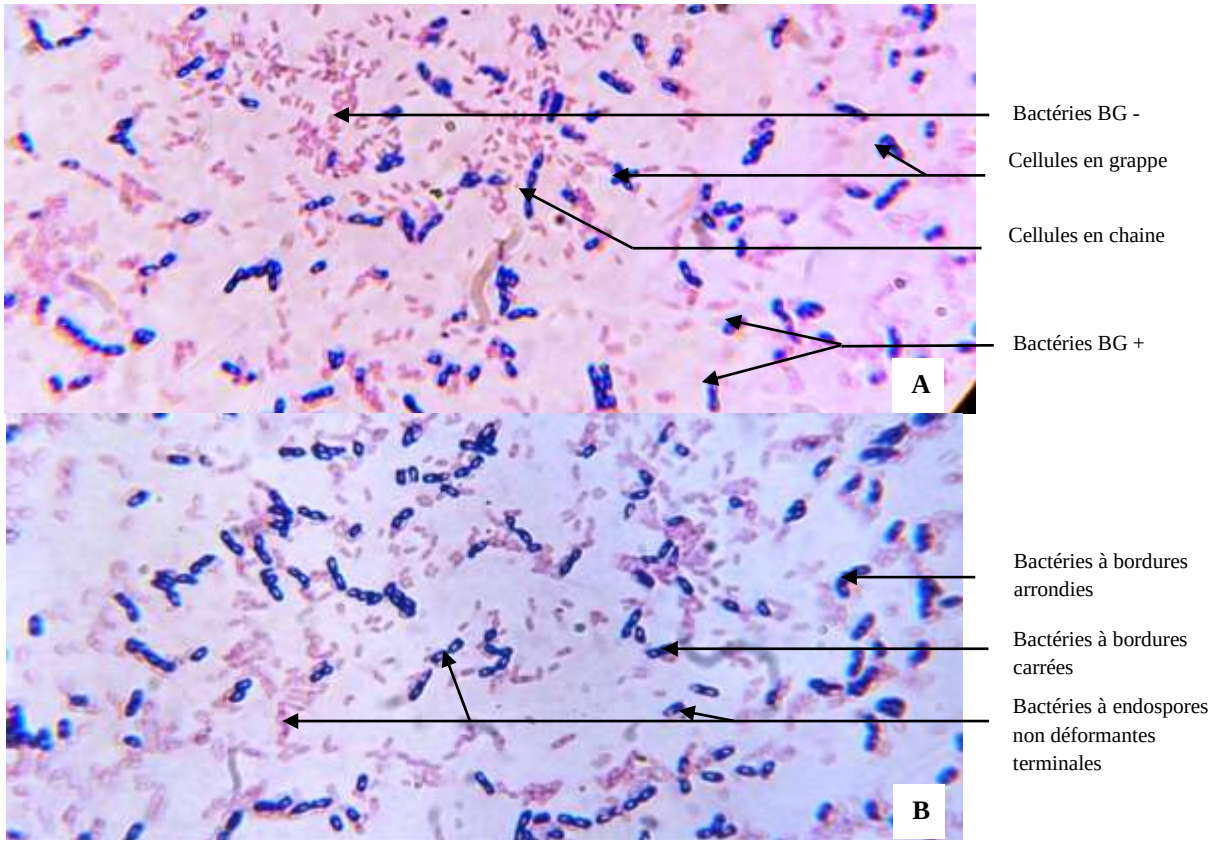


Figure 34 A-B. Observations microscopiques de A) jeunes cultures et de B) vieilles cultures de bactéries isolées à partir de fèves de cacao et utilisant les HAPs majeurs comme source de carbone

1.2. Identification moléculaire des bactéries d'intérêt.

1.2.1. Electrophorèse des produits issus de l'amplification PCR

Les **Figures35A-B** présentent le profil électrophorétique des produits issus de l'amplification PCR de l'ADN de 11 souches bactériennes isolées à partir de fèves de cacao. Les résultats obtenus montrent une bonne amplification de la majorité des souches exceptées la souche HAP7. L'analyse de la migration des produits PCR obtenus a permis de déterminer approximativement 1500 paires de bases (bp) pour toutes les souches testées.

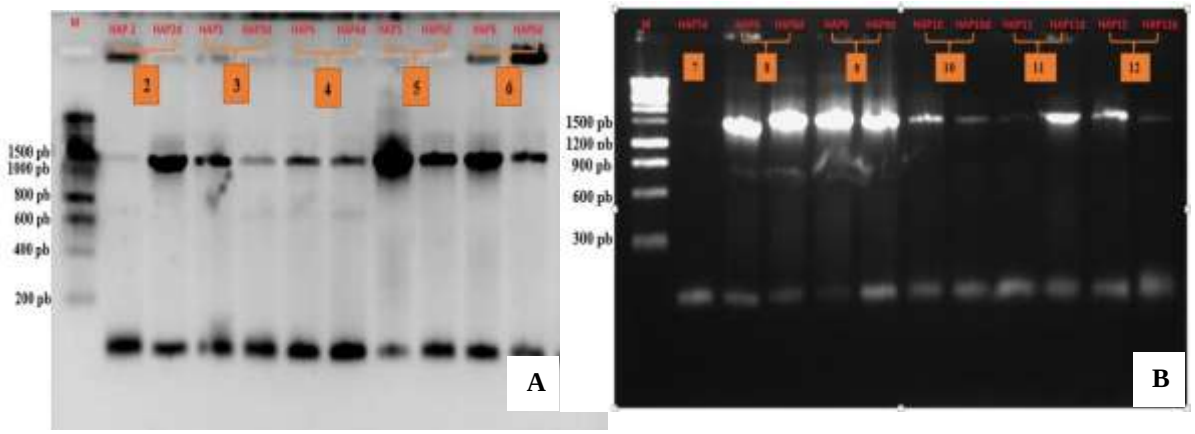


Figure 35A-B. Profils électrophorétiques des produits PCR des ADNr 16S des bactéries isolées à partir de fèves de cacao.

1.2.2. Identification des bactéries d'intérêt par séquençage des ARNr 16S

Les résultats du séquençage des produits PCR d'ADN ont permis d'identifier cinq espèces de bactéries appartenant à trois genres qui sont ***Bacillus***,***Lysinibacillus*** *et* ***Brevibacillus.***Les espèces des bactéries identifiées sont ***Bacillus cereus,Bacillus anthracis***, ***Lysinibacillus sphaericus***, ***Brevibacillus brevis***, ***Brevibacillus laterosporus*** avec des pourcentages de recouvrement respectifs compris entre 97-100, 70, 100, 99 et 100 % (**Tableau XII**). L'appartenance et la phylogénie des souches ont été illustrées via un dendrogramme présenté à la **Figure 36.** Des arbres ont été générés avec 1000 répétitions et les pourcentages (%) au niveau des nœuds représentent les valeurs de probabilité de la robustesse de la similitude.

Tableau XII. Résultats d'identification par séquençage d'ADN des bactéries isolées des fèves de cacao.

Code des souches de bactéries	Proche parent BLAST déterminé (EMBL)	Taux de recouvrement (%)	Pourcentage d'identité (%)	Numéro d'accession
HAP1	*Bacillus cereus*	100	99	NR_115714.1
HAP4		97	96	NR_074540.1
HAP5		100	98	NR_113266.1
HAP6		100	99	NR_112630.1
HAP12		98	99	NR_115526.1
HAP2	*Bacillus anthracis*	70	100	NR_041248.1
HAP8	*Lysinibacillus sphaericus*	100	96	NR_042073.1
HAP9	*Brevibacillus brevis*	99	99	NR_041524.1
HAP10	*Brevibacillus laterosporus*	100	97	NR_112727.1

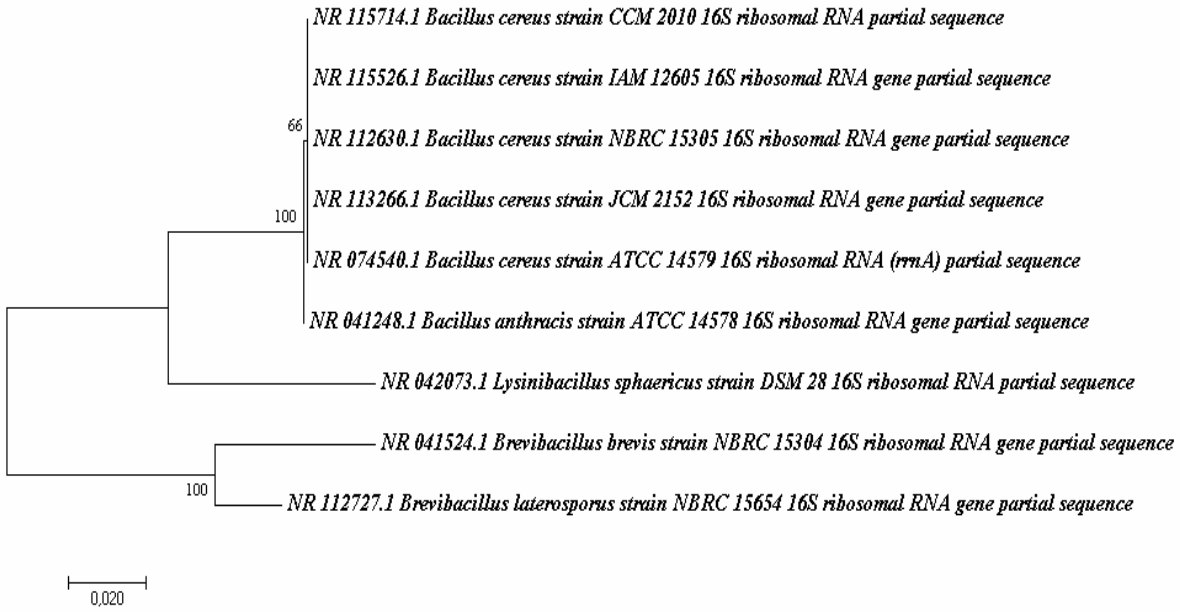
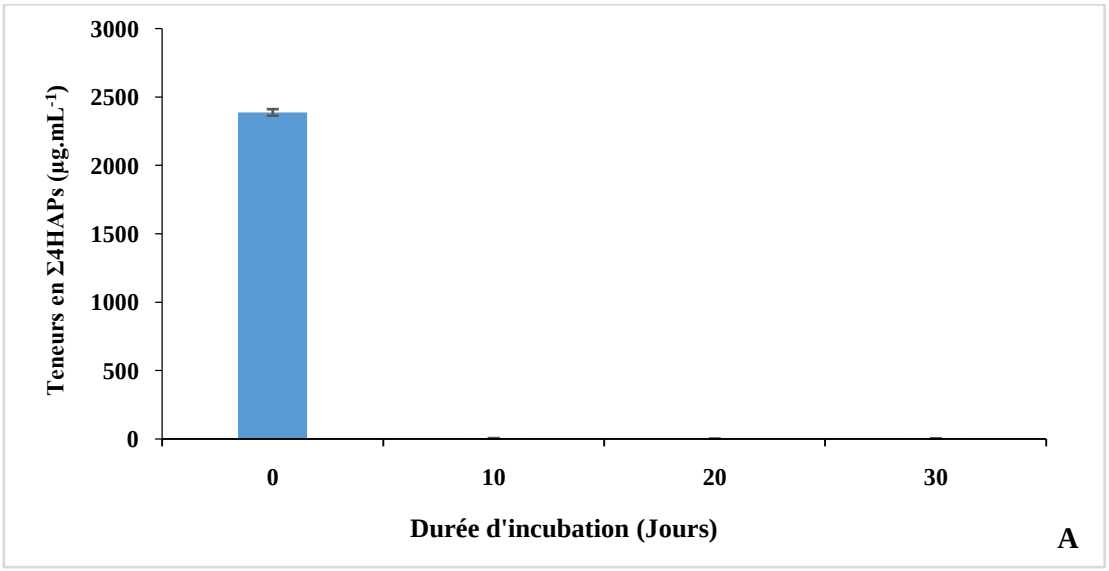
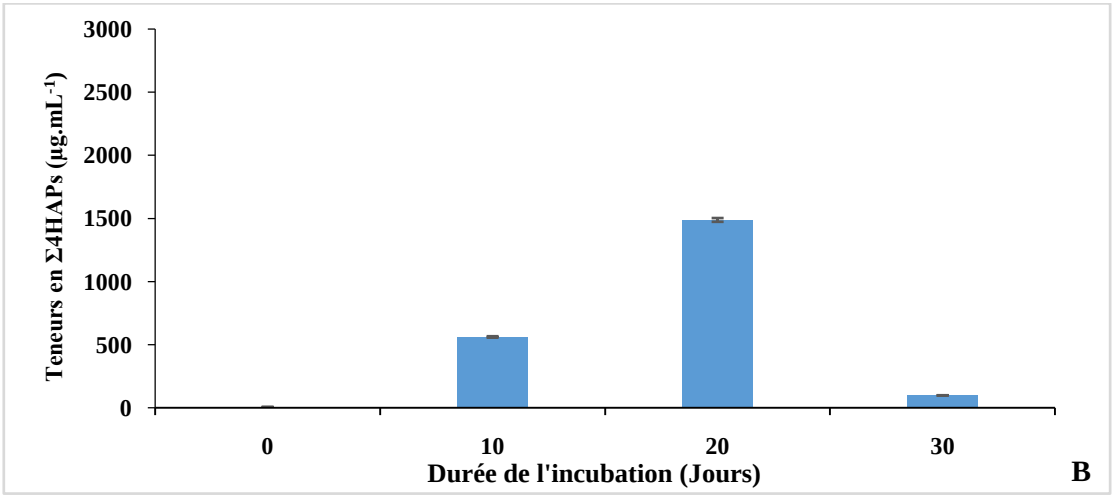


Figure 36. Arbre phylogénétique par la méthode Neighbor-joining basée sur les séquences d'ARNr 16S des souches « HAP » affiliées à *Bacillus sp.*, *Lysinibacillus sp.* et *Brevibacillus sp*. et des espèces apparentées isolées des fèves de cacao contaminées par les HAPs. Bar = 0,020 substitution de nucléotides par site.

1.3. Taux de dégradation des HAPs par le consortium constitué de bactéries d'intérêt

La **Figure 37A-C** présente l'évolution des teneurs en HAPs au cours du temps d'incubation du milieu réactionnel. La **Figure 37A** montre que la concentration en HAPs initiale du surnageant du milieu a été d'environ 2388,4±23,9 $\mu g.mL^{-1}$. A partir de 10 jours d'incubation du mélange réactionnel jusqu'à la fin du test (30 jours), cette teneur en HAPs chute et avoisine des valeurs quasi nulles. Avant incubation du mélange réactionnel, le culot bactérien est exempt de HAPs (**Figure 37B**). Cependant au bout de 10 et 20 jours d'incubation, la teneur en HAPs du culot bactérien a augmenté pour atteindre respectivement 560,9±5,6 et 1487,4±14,9 $\mu g.mL^{-1}$. Par la suite à 30 jours d'incubation, la teneur en HAPs décroit et chute en dessous de 100 $\mu g.mL^{-1}$. La **Figure 37C** présente l'évolution de la teneur en HAPs globale du milieu réactionnel. Les résultats obtenus montrent que les HAPs sont essentiellement présent dans le surnageant à une teneur de 2394,2±23,9 $\mu g.mL^{-1}$ au début des tests. Cette teneur en HAPs chute brutalement pour atteindre 568,1±5,7 $\mu g.mL^{-1}$ en 10 jours d'incubation avant d'amorcer une croissance pour atteindre 1489,5±14,9 $\mu g.mL^{-1}$ en 20 jours d'incubation. Dix jours plus tard, une nouvelle chute de la teneur en HAPs du mélange réactionnel a été observée avec un niveau de 104,5±1,0 $\mu g.mL^{-1}$.





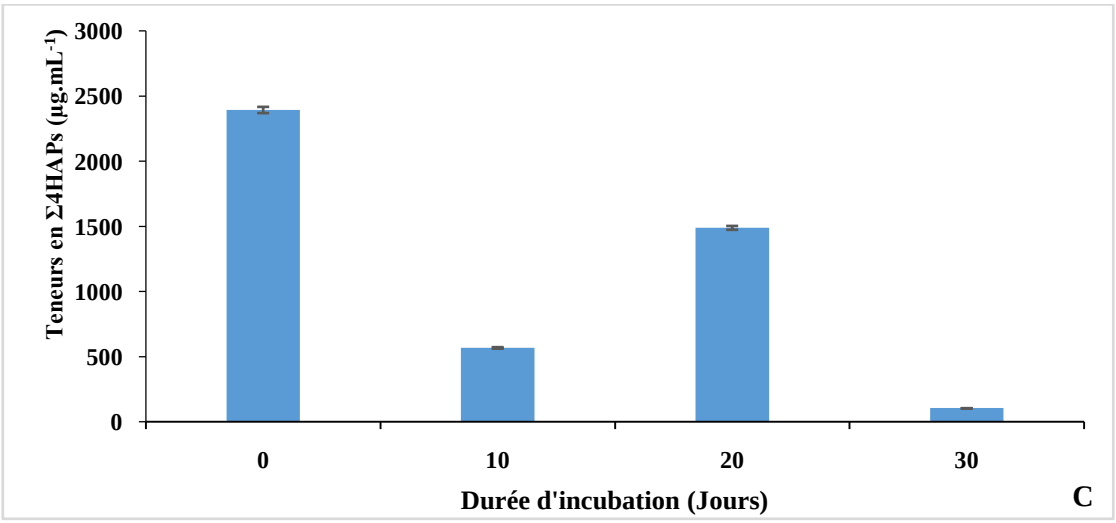


Figure 37A-C. Evolution de la teneur en HAPs du A) Surnageant, B) Culot Bactérien et du C) milieu réactionnel au cours de l'incubation d'un milieu de culture enrichi en HAPs

2. DISCUSSION

L'observation macroscopique des colonies bactériennes sur une culture microbienne enrichie en HAPs comme seule source de carbone a mis en évidence plusieurs caractéristiques morphologiques. La sélection de certaines souches bactériennes à partir de la flore bactérienne contaminant les fèves à forte teneur en HAPs laisse à penser que les souches sélectionnées présentent un potentiel de tirer un profit énergétique du métabolisme des HAPs (**Ban-Koffi *et al*., 2013 ; Outtara *et al*., 2011 ; Moscoso *et al*., 2012 ; Das *et al*., 2017**). La description de la majorité des colonies bactériennes a présenté diverses caractéristiques macroscopiques. Tant dans la taille, la coloration, le contour, l'aspect, la brillance, ces colonies ont montré une diversité bactérienne sur les cultures. En effet, des colonies de coloration jaune, beige ou blanche ont été obtenues sur la culture. La diversité de la coloration des colonies traduit le métabolisme microbien spécifique à chaque souche bactérienne. Ces diverses colorations peuvent être dues à la sécrétion de différents pigments (**Moscoso *et al*., 2012 ; Parab et Phadke, 2017 ; Amini *et al*., 2017**). En effet, la présence de colonies jaunes peut s'expliquer par la production de carotènes par certaines souches bactériennes dont les colonies apparaissent jaunes sur les boites de Pétri (**Bhat *et al*., 2013 ; Vachali *et al*., 2012**). Le développement de cette coloration jaune des colonies de bactéries croissant sur milieu de culture enrichi en HAPs a été préalablement observée par **Amini *et al*. (2017)** concluant à une utilisation des HAPs par ces microorganismes à des fins énergétiques.Par ailleurs, **Gupte *et al*. (2016**) ont démontré que certaines bactéries capables de métaboliser les HAPs comme le phénanthrène produisent des enzymes appartenant aux di-oxygénases. La catéchol-2,3-dioxygénase en particulier qui catalyse la dégradation du catéchol provoque l'apparition d'un pigment jaune appelé semi-aldéhyde 2-hydroxymuconique. Le catéchol étant l'un des produits intermédiaires apparaissant couramment lors de la dégradation des HAPs par certaines bactéries **(Gupte *et al*., 2016 ; Amini *et al*., 2017 ; Bibi *et al*., 2018 ; Hassanshahian *et al*., 2015)** estnaturellement présent dans les fèves de cacao sous forme de catéchine ou diphénol (**Oracz et Nebesny, 2016)**. Ceci peut expliquer la coloration jaune de certaines colonies bactériennes qui peut être due à la production d'une dioxygénase dans la culture. Au total la combinaison et la discrimination des caractéristiques morphologiques des colonies bactériennes analysées a permis de dénombrer 12 souches de bactéries sur les cultures enrichies en HAPs. Ceci laisse suggérer que la croissance des douze souches de bactéries est due à leur capacité de tirer l'énergie nécessaire à leur croissance à partir des HAPs.

Les résultats des observations microscopiques après les tests de coloration de Gram ont révélé différentes cellules bactériennes confirmant une diversité bactérienne comme les études macroscopiques des colonies l'avaient laisser présager. La morphologie, le mode d'association et le Gram des cellules testées sont comparables à celles mises en évidence lors de plusieurs études de culture d'un consortium de bactéries sur milieu enrichi en HAPs **(Chadli*et al*., 2013 ;Moscoso *et al*., 2012**). La coloration de Gram en particulier a permis du point de vue de la morphologie cellulaire des germes en culture de noter la présence de cocci ou de bacilles avec des tailles plus mou moins variables, des cellules de Gram – et Gram +, individuelles ou associées en grappe et en chainette qui opèrent au sein des consortia dégradant les HAPs. L'obtention des cellules de coloration Gram – indique la présence de cellules dont les parois sont riches en lipopolysaccharides (LPS) tandis que la présence de cellules dont les parois sont pauvres en LPS est marquée par les cellules de coloration violette (Gram+). L'analyse combinée de diverses caractéristiques bactériennes tant macro et microscopiques laisse à penser à la présence de plusieurs genres bactériens souvent cités dans des études semblables tels que *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp*., *Rhodococcus sp*. ou *Staphylococcus sp.*. En effet, selon diverses études bactériologiques les *Pseudomonas* seraient des bactéries Gram négatif, les *Staphylococcus*, des cocci Gram positif assemblés en grappe et les *Bacillus,* des bacilles de Gram variable selon leur âge et leur état de vie **(Shida *et al*., 1996 ; Smith & Hussey, 2005).** Par ailleurs, les analyses microscopiques en particulier ont mis en évidence des cellules bactériennes présentant des endospores ovales ou rondes, non déformantes. La présence de tels types de cellules bactériennes suggère la présence de *Bacillus sp*.. La présence des souches appartenant au genre Bacillus pourrait s'expliquer par la croissance majoritaire de ces bactéries à la fin de la fermentation des fèves de cacao comme cela a été préalablement démontré par plusieurs études (**Yao *et al*., 2017 ; Kouamé *et al*., 2015 ; Ban-Koffi *et al*., 2013 ; Ouattara *et al*., 2008)**. Par ailleurs, plusieurs études en lien avec l'écologie microbienne des fèves de cacao fermentées et séchées ont clairement conclu au développement massif des formes sporulées des *Bacillus sp*. **(Guéhi *et al*., 2010b ; Ban-Koffi *et al*., 2013 ; Ouattara *et al*., 2011 ; Hamdouche *et al*., 2015)**. En effet, les propriétés d'acidiphilie et de thermophilie doublée d'une physiologie variable des Bacillus leur permettent de croître dans des conditions inhibitrices des autres microorganismes. Malgré cela, le rôle réel de ces bactéries en l'état actuel des connaissances dans la fermentation du cacao ne se limite qu'à la production d'enzymes pectinolytiques **(Ouattara *et al*., 2008).**

En vue de vérifier la présomption d'identification induite par les caractéristiques macro et microscopiques, une identification basée sur les techniques moléculaires a été

entreprise. Les profils électrophorétiques des produits PCR des ADNs des différentes souches bactériennes ayant poussé sur milieu enrichi en HAPs ont présenté des bandes uniques et intactes d'environ 1500 paires de bases. Ce résultat montre qu'il n'y aurait donc pas eu de dégradation, ni de contamination des ADNs extraits. Les amorces étant universelles, les amplifications d'ADN réalisées ont permis de confirmer que la majorité des germes analysés sont des souches bactériennes (**Wu *et al*., 2013 ; Amini *et al*., 2017 ; Das *et al*., 2017**). Les résultats du séquençage et l'établissement de la phylogénie des germes analysés ont permis de confirmer la présence d'une diversité d'espèces appartenant à divers genres bactériens. Ainsi au niveau du genre *Bacillus* les espèces comme *Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Lysinibacillus sphaericus, Brevibacillus brevis, Brevibacillus laterosporus* ont été déterminés. Les enrichissements successifs des milieux de culture utilisés pour isoler les espèces bactériennes dominées par les Bacillus n'est pas surprenant. En effet, le haut potentiel de dégradation des HAPs de plusieurs espèces appartenant au genre *Bacillus* a été préalablement décrit par plusieurs études **(Wu *et al*., 2013 ; Kuppusamy *et al*., 2016 ; Folwell *et al*., 2016 ; Reddy*et al*., 2017 ; Abdelhaleem *et al*., 2019)**. D'autres études ont particulièrement étudié les capacités de dégradation des HAPs de *Bacillus cereus* sur différentes matrices biologiques (**Bibi *et al*., 2018 ; Das *et al*., 2017**).

Les résultats des tests de dégradation ont montré une chute brutale de la teneur en HAPs du surnageant du milieu réactionnel en seulement 10 jours d'incubation. Par ailleurs, l'augmentation du taux de captations des HAPs atteignant 1487,4±14,9 $\mu g.mL^{-1}$ dans le surnageant de lessivage du culot bactérien montre que les cellules bactériennes constituant le consortium microbien auraient capté jusqu'à près de 62,27 % des HAPs du milieu réactionnel. Cette capacité de fixer les HAPs des *Bacillus* a été montrée par leur capacité à sécréter des agents tensioactifs favorisant la solubilisation des HAPs à haut poids moléculaire (HAPs-HPM) en vue d'augmenter leur biodisponibilité et leur bioaccessibilité pour leur dégradation (**Toledo *et al*., 2006 ; Guermouche, 2014**). En effet, la diminution du taux de HAPs du culot bactérien au $10^{ième}$ jour d'incubation du mélange réactionnel, suivi d'une évolution en cloche jusqu'au $30^{ième}$ jour, montre bien les cycles de dégradation des HAPs par le consortium dans le mélange réactionnel qui se résume en trois phases : fixation, solubilisation, puis dégradation. Parallèlement à cela, l'on observe une évolution absolument décroissante de la teneur en HAPs du surnageant du milieu réactionnel à partir du $10^{ème}$ jour d'incubation. Au total, l'évolution de la teneur en HAPs dans le mélange réactionnel très intimement analogue au taux des HAPs captés par le culot bactérien confirme bien le cycle de fixation, suivi de la solubilisation et de la dégradation des HAPs. En effet, le principe de dégradation des HAPs

par les bactéries serait qu'elles utilisent préférentiellement les HAPs de faibles poids moléculaires comme source de carbone avant les HAPs lourds, qu'elles dégradent par cométabolisme (**Ghosal *et al*., 2016 ; Zhu *et al*., 2016**). Cependant cette préférence des HAPs de faible poids moléculaire par les bactéries pourrait être due à leur forte solubilité dans le milieu réactionnel constitué, comme cela a été montré par des études antérieures (**Stringfellow et Aitken, 1995**). En fait, la dégradation préférentielle d'un HAP plus soluble pourrait réprimer la sécrétion d'enzymes capables de dégrader les HAPs à haut poids moléculaires donnant lieu à une sorte de latence (**Lotfabad et Gray, 2002)**. Enfin la configuration moléculaire respective liée à la présence des régions de baie ou de fjord de certaines molécules des HAPs pourrait expliquer leur relative métabolisation par les différentes espèces de *Bacillus* (**Tarantini, 2010**). Mais comme nous sommes en présence d'un consortium bactérien dont le dynamisme biodégradant des HAPs peut être très variable selon les interactions bactériennes des souches, la dégradation observée ne pourra être complètement élucidée. Une étude plus approfondie pourrait apporter plus amples informations sur le comportement de chaque souche bactérienne du consortium obtenu à partir de l'enrichissement des milieux de culture en HAPs comme seule source de carbone. Au total, l'on est au moins en mesures et en condition de dire, au regard de l'évolution de la teneur en HAPs du mélange réactionnel réalisé, que les HAPs sont dégradés par les bactéries endogènes des fèves de cacao à des fins énergétiques.

CONCLUSION PARTIELLE

Ce chapitre de l'étude a pour objectif de déterminer le potentiel de dégradation des HAPs par la flore bactérienne endogène des fèves de cacao. Les résultats obtenus ont permis de déterminer une large diversité bactérienne associée aux fèves de cacao fortement contaminé en HAPs. En effet, leur sélection à partir de milieux de culture successifs enrichis en HAPs suivie d'études macroscopiques des colonies et microscopiques des cellules des bactéries endogènes ont mis en relief diverses souches bactériennes. L'identification moléculaire de ces souches a confirmé ces observations culturales avec la prédominance de plusieurs espèces appartenant aux genres *Bacillus sp.*, *Lysinibacillus sp.* et *Brevibacillus sp*. L'on a en effet noté la présence de *Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Lysinibacillus sphaericus, Brevibacillus brevis et Brevibacillus laterosporus*. Mis en coculture dans un milieu liquide contenant des HAPs comme seules sources de carbone, les bactéries identifiées ont prouvé leur capacité à dégrader les HAPs. Ce qui montre leur haut potentiel d'être

utilisées en consortium comme une sérieuse alternative de biodégrader les HAPs des fèves de cacao.

CONCLUSION GENERALE, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

L'objectif principal de cette étude a été de contribuer à l'amélioration de la qualité sanitaire des fèves de cacao produites en Côte d'Ivoire. Au terme de l'étude, il ressort qu'une méthode analytique de détermination des HAPs contaminant les fèves de cacao a été validée. Fiable, peu couteuse, respectueuse de l'environnement et facilement transposable en routine, cette méthode analytique est en parfaite conformité avec les critères de performance du règlement Européen 836/2011. Par ailleurs, les résultats d'analyse des échantillons de fèves de cacao préparées selon un itinéraire technique post récolte spécifique et contrôlé ont montré qu'excepté le séchage et le stockage, les traitements technologiques post récolte du cacao n'influencent pas la formation des HAPs dans les fèves. En ce qui concerne le séchage, l'utilisation de feux de bois favorise la formation des HAPs dans le cacao. Aussi, le stockage des fèves fermentées et séchées à proximité de la fumée de feu de bois et/ou des sources fumigènes entrainent en l'occurrence de fortes teneurs en HAPs dans le cacao. Au total, la fumée de feu de bois apparait comme le principal facteur responsable de la présence des HAPs dans le cacao pendant les traitements technologiques post récolte. Fort heureusement, près de 90 % des HAPs contaminants sont présents sur la coque des fèves de cacao. Ainsi donc, l'opération de décorticage des fèves permet de réduire sensiblement le niveau de contamination en HAPs dans les produits dérivés du cacao comme le beurre, la masse, la liqueur et le chocolat. De plus, cette étude a mis en relief une autre alternative biologique de maitriser la présence des HAPs dans le cacao par l'utilisation d'un consortium de bactéries appartenant à trois principaux genres dont *Bacillus*, *Lysinibacillus* et *Brevibacillus*. L'utilisation des outils moléculaires a permis d'identifier diverses espèces dont *Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Lysinibacillus sphaericus, Brevibacillus brevis* et *Brevibacillus laterosporus*. Le consortium bactérien constitué présente un haut potentiel de dégradation des HAPs à haut poids moléculaires. Ce qui constitue une excellente et efficace alternative de bio-décontamination des fèves de cacao de qualité sanitaire altérée par de fortes teneurs en HAPs.

Plusieurs perspectives de recherche peuvent être conduites à partir de cette étude :

- Détermination des mécanismes et des métabolites mis en jeu lors de la dégradation des HAPs par les microorganismes endogènes du cacao ;
- Transfert de la méthode validée des HAPs dans les laboratoires en Côte d'Ivoire ;
- Réalisation des tests de décontamination des fèves de cacao contaminées par les HAPs en condition réelle par l'utilisation des bactéries étudiées.

En vue d’améliorer durablement la qualité sanitaire du cacao Ivoirien et produits dérivés en termes de contaminants chimiques, les producteurs de cacao devraient être sensibilisés sur les conditions adéquates de séchage et de stockage de leur production en vue de limiter l’apparition des HAPs dans leur production.

REFERENCES BIBILOGRAPHIQUES

Aaslyng, M. D., Duedahl-Olesen, L., Jensen, K., & Meinert, L. (2013). Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef and chicken barbecued at home by Danish consumers. *Meat Science*, 93, 1, 85–91

Abdelhaleem, H. A., Zein, H. S., Azeiz, A. Z. A., Sharaf, A. N., & Abdelhadi, A. A. (2019). Identification and characterization of novel bacterial polyaromatic hydrocarbon-degrading enzymes as potential tools for cleaning up hydrocarbon pollutants from different environmental sources. *Environmental Toxicology and Pharmacology*.67, 108-116

Abdel-Shafy, H. I., &Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, 107–123. doi: 10.1016/j.ejpe.2015. 03.011

Abouo, N. V., Kassi, B. A., Soro, D., Assidjo, N. E., Amani, N. G., & Yao, B. K. (2015). Influence de séchage solaire et micro-onde sur le profil en acides gras des extraits de beurre de cacao (*Théobroma cacao* L.).*European Scientific Journal*, 11, 12, 263-273

Afoakwa, E. O., Ofosu-Ansah, E., Takrama, J. F., Budu, A. S. & Mensah-Brown, H. (2014). Changes in chemical quality of cocoa butter during roasting of pulp pre-conditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 21, 6, 2221–2227.

Afoakwa, E. O., Quao, J., Takrama, J., Budu, A. S., & Saalia, F. K. (2013). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 6, 1097-1105.

Afoakwa, E.O., (2010). Chocolate Science and Technology (1st ed). *Wiley-Blackwell*, West-Sussex, UK.

Aikpokpodion, P. E., Oduwole, O. O., & Ademola, S. M. (2013). Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cocoa Beans obtained from Selected Cocoa Producing States in Nigeria. *Journal of Scientific Research & Reports*, 2, 2, 612-625

Ake-Assi, Y., Biego, G. H. M., Sess, A. D., Koffi, K. M., Kouame, P., Bonfoh, B., Akpagni, H., & Aussuet, E. (2012). Validation of a Method for the Quantification of PolycyclicAromatic Hydrocarbons in Fish. *European Journal of Scientific Research*, 74, 1, 69-78.

Akmel, D. C., Assidjo, E. N., & Yao, B. (2008). Effets des dispositifs de séchage à l'air libre sur la qualité des fèves de cacao bord champ. *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologie*, 11, 45-58.

Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., & Jackson, V. A. (2017). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. *Environmental Management*, 60, 4, 758-783. DOI 10.1007/s00267-017-0896-2

Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghloul, S., Sawaya, W., Ahmed, N., & Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, 22, 12, 2028–2035.

Alomirah, H., Al-Zenki, S., Husain, A., Sawaya, W., Ahmed, N., Gevao, B., & Kannan, K. (2010). Benzo [a] pyrene and total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in vegetable oils and fats do not reflect the occurrence of the eight genotoxic PAHs.*Food Additives and Contaminants*, *27*, 6, 869-878.

Al-Rashdan, A., Helaleh, M.I., Nisar, A., Ibtisam, A., & Al-Ballam, Z. (2010). Determination of the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread using gas chromatography mass spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 8p. doi:10.1155/2010/821216

Amini, I., Tahmourespour, & Abdollahi (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Pseudomonas species, *Pollution*,3, 1, 9-19.https://doi.org/10.7508/pj.2017.01.002

Amoah-Awua, W. (2014). Methods of cocoa fermentation and drying. In R. Schwan, & G. Fleet (Eds.), Cocoa and Coffee Fermentations. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Amzad, Hossain, M., & Salehuddin, S.M. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible oils by gas chromatography coupled with mass spectroscopy. *Arabian Journal of Chemistry*, 5, 3, 391–396.

Anastasi, A., Tigini, V., & Varese, G. C. (2013). The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi. In*Fungi as Bioremediators*, 29-49. Springer, Berlin, Heidelberg.

Anga, J-M. (2016). Injecting Innovation to Sustain the Future Supply of Cocoa, presentation at the World Cocoa Conference 2016, 23 May 2016. http://www.cocoaconnect.org/sites/default/files/Monday%20-%20Opening%20Session%20-%2011.00%20-%20Dr.%20Jean-Marc%20Anga%20-%20ICCO.pdf (consulté le 03 Mars 2019)

Arana-Sánchez, A., Segura-García, L. E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E., & Gschaedler-Mathis, A. (2015). Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 2, 359-369.

Ardhana, M.M., & Fleet, G.H. (2003). The microbial ecology of cocoa beans fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 87-99.

Ashraf, M.W., &Salam, A., (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in vegetables and fruits produced in Saudi Arabia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 4, 543–547.

Ban-Koffi, L., Ouattara, G. H., Karou, T. G., Guehi, S. T., Nemlin, J. N., & Diopoh, J. K. (2013). Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. *AgronomieAfricaine*, 25, 2, 159-170.

Bansal, V., & Kim, K. H. (2015). Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *EnvironmentInternational*, *84*, 26-38.

Banzio, D. (2003). "Comprendre et opérer dans les filières café et cacao en dix modules", Ed. Eburnie, Abidjan

Barel, M. (2013). Qualité du cacao. L'impact du traitement post-récolte. Edition Bialec Quae, Nancy, France, 1-77.

Bayoumi, R. A. (2009). Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. *Journal of Applied Sciences Research*, 5, 2, 197–211

Beckett, S. T., Fowler, M. S., & Ziegler, G.R. (2017). Beckett's industrial chocolate manufacture and use, 5th edn. *Wiley-Blackwell*, Oxford, 801p.

Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of Cocoa - A review, *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108-116. http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007

Bhat, W., Boutin, G., Rufiange, A. et Nourani, A. (2013). La caséine kinase 2 s'associe au facteur de réassemblage Spt2 / Sin1 de la chromatine de levure pour réguler sa fonction dans la répression de la transcription parasite. *Biologie Moléculaire et Cellulaire*,*33*, 21, 4198-4211.

Bhattacharya, S., Angayarkanni, J., Das, A., & Palaniswamy, M. (2012). Mycoremediation of benzo(a)pyrene by Pleurotus ostreatus iso- lated from Wayanad district in Kerala, India. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 2, 2, 84–93

Bibi, N., Hamayun, M., Khan S. A., Iqbal, A., Islam, B., Shah, F., Khan, M. A., & Lee, I.-J. (2018). Anthracene biodegradation capacity of newly isolated rhizospheric bacteria*Bacillus cereus*S_{13}.*PLoSONE,* 13, 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201620

Bigot, C. (2015) Discrimination issue de fruit de l'agriculture biologique par analyse comparative de leurs communautés microbienne. Thèse de doctorat, Ecole National supérieure Agronomique, Montpellier, 237p.

Bordenave, A. (2015). Traitement in situ des HAPs par co-infection air-vapeur : mécanismes physico-chimiques et optimisation énergétique. Thèse de Doctorat en Science et Technologie, UniversitéMichel de Montaigne - Bordeaux 3, France, 262p.

Bratinova, S., Karasek, L., Buttinger, G., & Wenzl, T. (2015). Report on the 17th inter-laboratory comparison organized by the European Union Reference Laboratory for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (EURL PAHs). *Joint Research Center (JCR) Technical Report*, European Commission, EUR 27573. https://doi.org/10.2787/071922

Britt, P. F., Buchanan, A. C., Owens Jr, C. V., & Skeen, J. T. (2004). Does glucose enhance the formation of nitrogen containing polycyclic aromatic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in the pyrolysis of proline? *Fuel*, 83, 11-12, 1417-1432.

Burchiel, S. W., & Luster, M. I. (2001). Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clinical Immunology*, 98, 1, 2-10.

Caligiani, A., Marseglia, A., & Palla, G. (2016). Cocoa: Production, Chemistry, and Use. *Encyclopedia of Food and Health*, 6p. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00177-X

CAOBISCO (Association Française du Chocolat, Biscuit et Confiserie) (2011). Guide to Good Hygiene Practices (Revision ed.). Brussels, Belgium: CAOBISCO. Clapperton, J. F. (1994). A review of research to identify the origins of cocoa flavour characteristics. Cocoa Growers' Bulletin, 48, 7-16.

CAOBISCO/ECA/FCC (Association Française du Chocolat, Biscuit et Confiserie/ European Cocoa Association/ Federation of Cocoa Commerce) (2015). Cocoa Beans: Chocolate and Cocoa Industry Quality Requirements, 104p.

Chadli, A., Baba Hamed, M. B., &Kihal, M. (2013). Characterization of indigenous and adapted hydrocarbon degrading bacteria isolated from landfill leachate from ain temouchent engineered landfill, Algeria. *Journal of Environmental Science and Engineering*, A2, 537-548.

Chen, B. H., & Chen, Y. C. (2001). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the smoke from heated model lipids and food lipids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 11, 5238-5243.

Ciecierska, M., & Obiedzinski, M. W. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from unconventional sources. *Food Control*, 30, 2, 556–562.

Codex Alimentarius (2001). Codex Standard for Cocoa Butter 86-1981, Rev.1-2001.

Coe, S. D., & Coe, M. D. (2007). The True History of Chocolate. Thames and Hudson, New York.

Cook, L.R. (1984). Chocolate Production and Use. Harcourt Brace Jovanovitch, New York.

Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Nester, M.A., Efraim, P.,& Taniwaki, M.H. (2013). Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. *Analytical Methods. Food Chemistry*, 136, 100-104.

Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J.L., Fungaro, M.H.,& Taniwaki, M.H. (2011). Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 141-144.

Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Skovmand-Larsen, M., Swiergers, J. H., Petersen, G. B. & Nielsen, D. S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation technique on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306-316.

Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiergers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H. & Nielsen, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using Pichia kluyveri and Kluyveromyces marxianus in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 1, 103-116.

Cros, E., Jacquet, M., Lowor, S., Takrama, J.S., Vrielink, T., Misnawi, Heistek, R., Ismayadi, C., Wayudi, T., Fallo, J., Nyassé, S., & End, M. J. (2010). Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) contamination of cocoa beans, *16th International Cocoa Research Conference*, 783-788

Crown, P.L., (2013). Pre-hispanic Use of Cocoa, Chapiter 1, Part I, Chocolate in Health and Nutrition, *Humana Press*, 3-10.

Cryer, N., Turnbull, C., Lahive, F., Daymond, A., End, M., & Hadley, P. (2012). Cadmium Uptake and Partitioning within the Cocoa Plant.Actes de la 17ième Conférence internationale sur le cacao, Yaoundé, Cameroun. COPAL, Nigéria (sous presse).

Cryer, N.C., Turnbull, C.J., Lahive, F.M., Daymond, A.J., End, M.J., & Hadley, P. (2012). Cadmium Uptake and Partitioning within the Cocoa Plant. Proceedings of the 17th International Cocoa Conference, Yaounde, Cameroon. COPAL, Nigeria.

Cuatrecasas, J., (1964). Cacao and its allies. A taxonomic revision of the genus Theobroma. Contribution U.S. National Museum., 35, 379-614

Dano, S. D., Manda, P., Dembélé, A., Abla, A. M-J. K., Bibaud, J. H., Gouet, J. Z., & Sika, C. B. Z. M. (2013). Influence of Fermentation and Drying Materials on the Contamination of Cocoa Beans by Ochratoxin A, *Toxins*, 5, 2310-2323. doi:10.3390/toxins5122310

Danyi, S., Brosea, F., Brasseur, C., Schneider, Y-J., Larondelle, Y., Pussemier, L., Robbens, J., De Saeger, S., Maghuin-Rogister, G., & Scippo, M-L. (2009). Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector, *Analytica Chimica Acta*, 633, 293–299. Doi:10.1016/j.aca.2008.11.049

Das, M., Bhattacharya, A., Banu, S., & Kotoky, J. (2017). Enhanced biodegradation of anthracene by Bacillus cereus strain JMG-01 isolated from hydrocarbon contaminated soils. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, *26*, 5, 510-525.

de Lima, R. F., Dionello, G. R., Peralba, M. D. C. R., Barrionuevo, S., Radunz, L. L.,& Júnior, F. W. R. (2017). PAHs in corn grains submitted to drying with firewood. *Food Chemistry*, 215, 165-170. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.164

De Melo Pereira, G. V., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Lara, J. M. R. A., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60-66.

Ding, J., Chen, B., & Zhu, L. (2013). Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Phanerochaete chrysosporium in aqueous solution. *Environmental Chemistry*, 58, 6, 613–621

Dost, K., & Ideli, C. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV–Vis detection. *Food Chemistry*, 133, 193–199

Doumbia, M., & Kouassi, Y. (2009). Evaluation des délais de validité des traitements insecticides des stocks de café et de cacao en vigueur au Port Autonome d'Abidjan en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 23, 1369-1376

Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A.K. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 143–152

Edwards, S. C., Jedrychowski, W., Butscher, M., Camann, D., Kieltyka, A., Mroz, E.,Flak, E., Li, Z., Wang, S., Rauh, V., & Perera, F. (2010). Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland.*Environmental Health Perspectives*, 118, 9, 1326-1331.

El Sheikha, A. F., Condur, A., Metayer, I., Nguyen, D. D., Loiseau, G., & Montet, D. (2009). Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt. *Yeast,* 26, 567-573

El-Sheekh, M., Ghareib, M., & El-Souod, G. (2012). Biodegradation of phenolic and polycyclic aromatic compounds by some algae and cyanobacteria. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 03. https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000133.

Esposito, M., Citro, A., Marigliano, L., Urbani, V., Seccia, G., Marotta, M. P., & de Nicola, C. (2015). Influence of different smoking techniques on contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked Mozzarella di Bufala Campana. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 1, 97–104

European Commission (EC) (2005). Commission regulation (EC) No. 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Official Journal of the European Union*, L 34/3

European Commission (EC) (2006). Commission regulation (EC) no 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5-24.

European Commission (EC) (2007). Commission Regulation (EC) No 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L88, 29-38

European Food Safety Authority (EFSA) (2008). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *EFSA Journal* 724, 1-14.

European Union (EU) (2000). Directive 2000/36/EC of the European Parliament and of the Council of 23rd June 2000 relating to cocoa and chocolate products intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, 197, 19–25.

European Union (EU) (2011a). Commission regulation (EC) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, L215, 4p.

European Union (UE) (2011b). Commission Regulation (EU) No 836/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs Text with EEA relevance. *OfficielJournalof the European Union*, L 215, 9–16.

European Union (EU) (2015a). Commission regulation (EU) 2015/1933 of 27 October 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa fiber, banana chips, food supplements, dried herbs and dried spices. *Official Journal of the European Union*, L 282/11, 3p.

European Union (EU) (2015b). Commission Regulation (EU) 2015/1125 of 10 July 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in Katsuobushi (dried bonito) and certain smoked Baltic herring. *Official Journal of the European Union*, L 184, 11.7.2015

Farhadian, A., Jinap, S., Abas, F., & Sakar, Z. I. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21, 606-610

Farhadian, A., Jinap, S., Faridah, A., & Zaidul, I.S.M. (2012). Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo [a] pyrene, benzo [b] fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. *Food Control*, 28, 2, 420–425

Farhadian, A., Jinap, S., Hanifah, H.N., & Zaidul, I.S. (2011). Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chemistry*, 124, 1, 141–146.

Fasano, E., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gandara, J. (2016). Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods, *Food Control*, 59, 581-590

Folwell, B. D., McGenity, T. J., & Whitby, C. (2016). Biofilm and Planktonic Bacterial and Fungal Communities Transforming High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 2288–2299. https://doi.org/10.1128/AEM.03713-15

Fuxing Kang, Dongsheng Chen, Yanzheng Gao, & Yi Zhang, (2010). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.),*BMC Plant Biology*, 10, 210

Garnier, R. (2010). Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs). Diplôme Inter-Universitaire (DIU) de toxicologie médicale. 2009-2010, 44p.

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review.*Frontiers in Microbiology*, 7, 1369. doi: 10.3389/fmicb.2016.01369

Grabulos, J. (2011). Procédure pour la détermination de 4 PAHs dans les produits carnés fumés (Benzo(a)Anthracène, Chrysène, Benzo(b)Fluoranthène, Benzo(a)pyrène). Projet AFTER (FP7 n°245025), Deliverable D.1.2.3.12, SOP: Anti-Nutri-Meatfish-001-fr.

Grossman-Greene, S., & Bayer, C. (2009). A Brief History of Cocoa in Ghana and Côte d'Ivoire. Tulane University-Payson Center for International Development © November.

Gueguen, M., & Jaquet, J. (1982). Etudes sur les caractères culturaux et la morphologie de Geotrichum candidum Link. Le Lait, INRA Editions, 62, 621-622, 625-644.

Guehi, T. S. (2003). Etude de l'origine et des conditions de fonctionnement de l'activité lipasique impliquée dans la formation des acides gras libres du cacao marchand. Thèse de Doctorat, Montpellier 2, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier. 151p.

Guehi, T. S., Dingkuhn, M., Cros, E., Fourny, G., Ratomahenina, R., Moulin, G., & Vidal, A. C. (2007). Identification and Lipase-producing Abilities of Moulds Isolated from Ivorian Raw Cocoa Beans. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3, 6, 838-843.

Guehi, T. S., Dingkuhn, M., Cros, E., Fourny, G., Ratomahenina, R., Moulin, G., &Vidal, A. C. (2008). Impact of cocoa processing technologies in free fatty acids formation in stored raw cocoa beans. *African Journal of Agricultural Research*, 3, 3, 174-179.

Guehi, T. S., Bi Zahouli, I., Ban-Koffi, L., Monke, A. F., & Nemlin, J. G. (2010a). Performance of different drying methods and their effects on the chemical quality attributes of raw cocoa material. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1564-1571.

Guehi, T. S., Dabonne, S., Ban-Koffi, L., Kedjebo, D. K., & Zahouli, G. I. B. (2010b). Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 3, 163-171.

Guermouche M'Brassi, A., (2014). Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Thèse de Doctorat, , Département de Biotechnologie, Université d'Oran, 166p.

Gupte, A., Tripathi, A., Patel, H., Rudakiya, D., & Gupte, S. (2016). Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs): A Perspective, *The Open Biotechnology Journal*, 10, 2, 363 - 378

Hamdouche, Y. (2015). Discrimination des procédés de transformation post-récolte du Cacao et du Café par analyse globale de l'écologie microbienne. Thèse de doctorat, Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier, 318p.

Hamdouche, Y., Guehi, T. S., Durand, N., Kedjebo, K. B. D., Montet, D., & Meile, J. C. (2015). Dynamics of microbial ecology during cocoa fermentation and drying: Towards the identification of molecular markers, *Food Control*, 48, 117 - 122.

Hassanshahian, M., Abarian, M., & Cappello, S. (2015). Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems - New Advances and Technologies, Chapter: Biodegradation of Aromatic Compounds, In*Technology,* 109-123.

Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. International *Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87.

Holm, C.S., Aston, J.W., & Douglas, K. (1993). The effects of the organic acids in cocoa on flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 65–71.

Houessou, J. K., Maloug, S., Leveque, A.-S., Delteil, C., Heyd, B., & Camel, V. (2007). Effect of Roasting Conditions on the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content in Ground Arabica Coffee and Coffee Brew.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9719–9726.

Houessou, J. K. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee: development of analytical methods and study of the roasting process. Thèse de Doctorat, AgroParisTech, 272p.

Huang, M., & Penning, T. (2014). Processing contaminants – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 416-423. doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00212-2

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1983). The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC. Monographs. Lyon, France, p32-35

International Cocoa and Coffee Organization (ICCO)(2017). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLIII, No. 1, Cocoa year 2016/17, published: 28-02-2017

International Cocoa and Coffee Organization (ICCO)(2018). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, vol. XLIV - N ° 2 - Année cacaoyère 2017/2018, consulté le 29/10/2018

International Organisation for Standardisation (ISO) (1980-12-01). Cocoa beans—determination of moisture content (routine method) ISO 2291:1980: International Organization for Standardization

International Organisation for Standardisation (ISO) (2016–04) Animals and vegetables fats and oils-determination of polycyclic aromatic Hydrocarbons. ISO 15753:2016: International Organization for Standardization.

International Program on Chemical Safety (IPCS) (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons selected non-heterocyclic; <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202. htm>.

Ishizaki, A., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S., & Kataok, H. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection.*Journal of Chromatography A*, 1217, 5555–5563. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.068

Janoszka, B. (2011). HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry*, 126, 3, 1344–1353

Jedrychowski, W. A., Majewska, R., Spengler, J. D., Camann, D., Roen, E. L., & Perera, F. P. (2017). Prenatal exposure to fine particles and polycyclic aromatic hydrocarbons and birth outcomes: a two-pollutant approach. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 90, 3, 255-264.

Jedrychowski, W. A., Perera, F. P., Majewska, R., Mrozek-Budzyn, D., Mroz, E., Roen, E. L., Agata, S., & Jacek, R. (2014). Depressed height gain of children associated with intrauterine exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and heavy metals: the cohort prospective study. *Environmental Research*, 136, 141-7.

Jinap, S., Kamaruddin, S. & Radiah, O. (1993). Changes in some physico-chemical properties of cocoa beans during maturation. *Asociation of Southeast Asian Nations Food Journal*, 4: 134-138.

Kadri, T., Rouissi, T., Brar, S. K., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review.*Journal of environmental sciences*, 51, 52-74. http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023

Kamenan, B. K., Ekoun, P. M., & Gbaha, P. (2018). Séchage des fèves de cacao dans un séchoir solaire indirect à circulation forcée d'air. *Revue Cames – Sciences Appliquées et de l'Ingénieur*, 2, 2, 15-19

Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C. H., Greenberg, A., & Rothman, N., (2001). Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 5, 423–436.

Kédjébo, K. B. D. (2016). Effet des traitements technologiques post-récolte sur la contamination du cacao (*Théobroma cacao* L.) par les moisissures mycotoxinogènes et l'ochratoxine A. Thèse de Doctorat, Université Nangui ABROGOUA, Abidjan, 195p.

Kedjebo, K. B. D., Guehi, T. S., Kouakou, B., Durand, N., Aguilar, P., Fontana, A., & Montet, D. (2015). Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin A in raw cocoa beans.*Food Additives & Contaminants: Part A*,33, 1, 157-166. https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1112038

Kennedy, A. J. (1995). Cacao *Theobroma cacao* (Sterculiaceae). In: Longman (eds), London. *Evolution of Crops*, 472-475p

Koné, K. M. (2017). Influence des traitements technologiques post-récolte sur la formation des composées d'arômes du cacao (*Théobroma cacao* L.) Dynamisme et diversité des microorganismes impliqués. Thèse de Doctorat, Université Nangui ABROGOUA, Abidjan, 199p.

Koné, K. M., Guehi ,T. S., Durand, N., Ban-Koffi, L., Berthiot, L., Fontana-Tachon, A., Brou, K., Boulanger, R., & Montet, D. (2016). Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International*, 9p.

Kongor, E. J., Hinneh, M., Van de Walle, D., Afoakwa E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (Theobroma cacao)bean flavour profile - A review. *Food Research International,* 82, 44–52

Kouadio, A. K. A., Sadat A. W., Assidjo, N. E., & Kouame, L. P. (2015). Etude de la qualité physico-chimique et mycologique du cacao (Theobroma cacao) produit dans les zones de Yamoussoukro et Soubré (Côte d'Ivoire). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 13, 1, 330-340

Kouakou, B. J., Irie, B. Z., Dick E., Nemlin, G., & Bomisso, L. E. (2013). Caractérisation des techniques de séchage du cacao dans les principales zones de production en Côte d'Ivoire et détermination de leur influence sur la qualité des fèves commercialisées. *Journal of Applied Biosciences, 64*, 1, 4797-4812.

Kouamé, M.L., Goualié, G.B., Adom, N.J., Koua, A.G., Ouattara, G.H., Doué, G., & Niamké, L.S. (2015). Diversity of microbial strains involved in cocoa fermentation from sud-comoé (Côte d'Ivoire) based on biochemical properties, *European Scientific Journal*, 11, 18.

Krysiak, W. (2011). Effects of convective and microwave roasting on the physicochemical properties of cocoa beans and cocoa butter extracted from this material, *Grasas y Aceites*, 62, 4, 467-478.

Kumar, S., Negi, S., & Maiti, P. (2017). Biological and analytical techniques used for detection of polyaromatic hydrocarbons, *Environmental Science and Pollution Research*, 25810-25827. https://doi.org/10.1007/s11356-017-0415-2

Kumari, R., Chaturvedi, P., Ansari, N. G., Murthy, R. C., & Patel D. K. (2012). Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies, *Journal of Food Science,* 77, 1, 34-40

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). Bioaugmentation with novel microbial formula vs. natural attenuation of a long-term mixed contaminated soil e treatability studies in solid-and slurry-phase microcosms. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 1-15.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee Y. B., Naidu R., & Megharaj, M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168, 944–968. https://doi.org/10.1016/j. chemosphere.2016.10.115.

Lagunes-Gálvez, (2005) : Contribution à l'étude de la fermentation de la fève de cacao : Impact sur la qualité. Thèse de Doctorat, Montpellier 2, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier. p7-14.

Lagunes-Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 1, 124-130.

Le Nguyen, D.D. (2008). Détermination de l'origine géographique des poissons par l'obtention de l'empreinte génétique de leur communauté bactérienne par PCR-DGGE. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 233p.

Ledesma, E., Rendueles, M., & Díaz, M. (2014). Benzo (a) pyrene penetration on a smoked meat product during smoking time. *Food Additives &Contaminants: Part A*, 31, 10, 1688–1698.

Ledesma, E., Rendueles, M., & Diaz, M. (2015). Spanish smoked meat products: Benzo(a)pyrene (BaP) contamination and moisture, *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 87–94

Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28, 3, 457-464.

Liendo, R., Padilla, F. C., & Quintana, A. (1997). Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of Theobroma cacao L. *Food Research International*, *30*, 9, 727-731.

Lima, L.J.R., Almeida, M.H., Nout, M.J. & Zwietering, M.H., (2011). Theobroma cacao L., "The Food of the Gods": Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans, with Particular Reference to the Impact of Fermentation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 8, 731-761

Lin, G. F., Weigel, S., Tang, B., Schulz, C., & Shen, J. H. (2011). The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in Peking duck: Relevance to food safety assessment. *Food Chemistry*, 129, 2, 524–527.

Loor, R.G. (2007). Contribution à l'étude de la domestication de la variété de cacaoyer Nacional d'Équateur : recherche de la variété native et de ses ancêtres sauvages. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique De Montpellier Supagro, France. 10, 17, 18p.

Lotfabad, S. K., & Gray, M. R. (2002). Kinetics of biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 361–366.

Lowor, S.T., Jacquet, M., Vrielink, T., Aculey, P., Cros, E., & Takrama, J. (2012). Post-harvest sources of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of Cocoa beans: A simulation. *International Journal of AgriScience*, 2, 11, 1043-1052.

Luzardo, O. P., Rodríguez-Hernández, Á., Quesada-Tacoronte, Y., Ruiz-Suárez, N., Almeida-González, M., Henríquez-Hernández, L. A., Zumbado, M., Boada, L. D. (2013a). Influence of the method of production of eggs on the daily intake of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine contaminants: An independent study in the Canary Islands (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 60, 455–462.

Luzardo, O. P., Zumbado, M., & Boada, L. D. (2013). Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and organohalogenated contaminants in selected foodstuffs from Spanish market basket: Estimated intake by the population from Spain.*Journal of Food, Agriculture & Environment,11*, 3-4, 437-443.

Machado, M. A., Cardoso, M. D. G., Dórea, H. S., Emídio, E. S., Silva, M. M. S., Anjos, J. P. D., Saczk, A. A., & Nelson, D. L. (2014). Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. *Food Chemistry*, 146, 65–70.10.1016/j.foodchem.2013.08.113

Maharaj, R., Kerr, K., & Ramdwar, M. (2014). Quality and HACCP-Based Compliance for Primary Processing of Fineor Flavour Cocoa Beans in Trinidad. Proc. IIIrd Int. Conf. on Postharvest and Quality Management ofHorticultural Products of Interest for Tropical Regions, *Acta Horticulturae*,1047, 221-230.

Manda, P., Dano, D. S., Ehile, E. S. J., Koffi, M., Amani, N., & Assi, Y. A. (2012). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) content in foods sold in Abobo market, Abidjan, Côte d'Ivoire. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4, 6, 99–105.

Martens, H., Michiels, C., Rousseau, J-P. & Astruc, L., (2011). Cocoa a lever for development. © CTB-BTC, Belgian development agency, February 2011

McGrath, T. E., Chan, W. G., & Hajaligol, M. R. (2003). Low temperature mechanism for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 66, 1-2, 51-70.

McGrath, T., Sharma, R., & Hajaligol, M. (2001). An experimental investigation into the formation of polycyclic-aromatic hydrocarbons (PAH) from pyrolysis of biomass materials. *Fuel*, 80, 12, 1787-1797.

Menzie, C.A., Potocki, B.B., & Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science & Technology*, 26, 7, 1278-1284.

Minifie, B. W. (1989). Chocolate, Cocoa, And Confectionery: Science and Technology Third Edition, AVI Van Nostrand Reinhold, New York, 899p.

Misnawi, (2012). Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter. *International Food Research Journal*, 19, 4, 1589-1594.

Moreno, C., Romero, J., & Espejo, R.T. (2002). Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus Vibrio. *Microbiology*, 148, 1233-1239.

Moret, S., & Conte, L. S. (2002). A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils. *Journal of Separation Science*, 25, 1-2, 96–104.

Moscoso, F., Teijiz, I., Deive, F.J., &Sanroman, M.A. (2012). Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresource Technology*. 119, 270-276.

Mossu, G., (1990). Le cacaoyer. Institut de Recherches de Café et du Cacao. Editions Maisonneuve et Larousse, 159p.

Mounjouenpou, P., Mbang, J.A.A, Guyot, B. & Guiraud, J-P. (2012). Traditional procedures of cocoa processing and occurrence of ochratoxin - A in the derived products, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,* 4, 2, 1332-1339.

Muntean, N., Muntean, E., & Duda, M. (2013). Contamination of some Plant origin food products with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bulletin UASMV serie Agriculture*, 70, 2, 383–386.

Naccari, C., Cristani, M., Giofrè, F., Ferrante, M., Siracusa, L., & Trombetta, D. (2011).PAHs concentration in heat-treated milk samples. *Food Research International*, 44, 3, 716–724.

Nechadi, A. (2011). Développement et validation d'une méthode d'échantillonnage et d' analyse des nitrosamines dans l'HPLC-MS. Mémoire de maîtrise en Chimie, Université du Québec, Montréal, 135p.

Neela, V., Ghaznavi-Rad, E., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Nor Shamsudin, M., Van Belkum, A., & Karunanidhi, A. (2013). Frequency of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the noses of Malaysian chicken farmers and their chicken. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, 14, 3, 226-231.

NF V03-110 (1998). Analyse des produits agricoles et alimentaires : Procédure de validation intra-laboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. Paris Edition AFNOR, 40p.

Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 168–186.

Nieva-Cano, M.J., Rubio-Barroso, S., & Santos-Delgado, M.J., (2001). Determination of PAH in food samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction without sample clean-up. *Analyst*, 126, 8, 1326–1331.

Nogbou, A. L. I., Akmel, D. C., Brou, K., & Assidjo, E. N. (2015). Étude du séchage microonde par intermittence sur la qualité physicochimique des fèves de cacao, *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologie*, 26, 18-35

Oke, D. O., & Omotayo, K. F. (2012). Effect of forced-air artificial intermittent drying on cocoa beans in South-Western Nigeria. *Journal of Cereals and Oilseeds*, *3*, 1, 1-5.

Olatunji, O. S., Fatoki, O. S., Ximba, B. J., & Opeolu, B. O. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible oil: Temperature effect on recovery from base hydrolysis product and health risk factor. *Food and Public Health*, 4, 2, 23–30

Olesen, L. D., Navaratnam, M., Jewula, J., & Jensen, H. (2015). PAH in Some Brands of Tea and Coffee. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35, 1, 74–90

Olsson, A. C., Fevotte, J., Fletcher, T., Cassidy, A., Mannetje, A. T., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Rudnai, P., Lissowska, J., Fabianova, E., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., Brennan, P.,& Boffetta, P. (2010). Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: a multicenter study in Europe. *Occupational and Environmental Medicine*, 67, 2, 98-103.

Onyango, A. A., Lalah, J. O., & Wandiga, S. O. (2012). The effect of local cooking methods on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contents in beef, goat meat, and pork as potential sources of human exposure in Kisumu City, Kenya. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 32, 5, 656–668.

Onyemaechi, E. C., Ndudi, O. J., & Okaliwe, E. F. (2018). Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Hardwood, Palmwood and Softwood-Smoked Fish. *International Journal of Ecotoxicology and Ecobiology*, *2*, 4, 178.

Oracz, J., & Nebesny, E. (2016). Antioxidant Properties of Cocoa Beans (Theobroma cacao L.): Influence of Cultivar and Roasting Conditions. *International Journal of Food Properties*, 19,1242–1258. https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1071840

Orecchio, S., & Papuzza, V., (2009). Levels, fingerprint and daily intake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bread baked using wood as fuel. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 2, 876–883.

Ouattara, H. G., Ban-Koffi, L., Karou, G. T., Sangare, A., Niamke, S. L., & Diopoh, J. K. (2008). Implication of Bacillus sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1753-1760

Ouattara, H. G., Reverchon, S., Niamke, S. L., & Nasser, W. (2011). Molecular identification and pectate lyase production by Bacillus strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiology*, 28, 1-8

Owusu-Boateng, G., & Owusu, S. K. (2015). Methods of cocoa harvesting to drying of bean in Ghana and polycyclic aromatic hydrocarbon concentration in the nib and shell of the cocoa bean. *Academia Journal of Agricultural Research*, 3, 9, 176-183.

Papalexandratou, Z., Camu, N., Falony, G., & De Vuyst, L. (2011a). Comparison of the bacterial species diversity of spontaneous cocoa bean fermentations carried out at selected farms in Ivory Coast and Brazil. *Food Microbiology*, 28, 5, 964-973.

Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H. M.,&De Vuyst, L. (2011b). Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7698-7714. Doi : 10.1128/AEM.05523-11

Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae, Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus fermentum, and Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiology*, 35, 2, 73-85.

Parab, V., & Phadke, M. (2017). Study of mixed Polycyclic Aromatic Hydrocarbon degradation by bacteria isolated from hydrocarbon contaminated sites. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*,11, 3, 32-41. Doi : 10.9790/2402-1103023241.

Paris, A., Ledauphin, J., Poinot, P.,& Gaillard, J. L. (2018). Hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les fruits et légumes: origine, analyse et occurrence. *Pollution de l' Environnement*,234, 96-106.

Pereira, F. B., Gomes, D. G., Guimaraes, P. M. R., Teixeira, J. A., & Domingues, L.(2012) Cell recycling during very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial Saccharomyces cerevisiae strain PE-2. *Biotechnology Letters*, 34, 45–53

Pereira, G. V. M., Miguel, M. G. C. P., Ramos, C. L., & Schwan, R.F. (2013). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 15, 5395–5405.

Perelló, G., Martí-cid, R., Castell, V., Llobet, J. M., & Domingo, J. L. (2009). Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, hexachlorobenzene and polycyclic aromatic hydrocarbons in various foodstuffs before and after cooking. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 4, 709–715.

Planhol, X. (1947). Le cacao en Côte d'Ivoire : étude de géographie régionale. *In: L'information géographique*. 11, 2, 50-57. doi : 10.3406/ingeo.1947.5249

Powis, T. G., Cyphers, A., Gaikwad, N.W., Grivetti, L., & Cheong, K. (2011). Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 8595–8600.

Pozdnyakova, N. N. (2012). Involvement of the ligninolytic system of white-rot and litter-decomposing fungi in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Research International*, 2012. doi:10.1155/2012/243217

Prabhakaran Nair, K. P. (2010). Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In *The agronomy and economy of important tree crops of the developing world*. Elsevier Inc. (Chapter 5),131–180

Purcaro, G., Moret, S.,& Conte, L. S. (2013). Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 105, 292-305

Ramalhosa, M.J., Paíga, P., Morais, S., Ramos, S., Delerue-Matos, C., & Oliveira, M. B. A. P., (2012b). Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three pelagic fish species from Atlantic Ocean: inter-specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2, 162–167

Ramalhosa, M. J., Paíga, P., Morais, S., Sousa, A. M., Gonçalves, M. P., Delerue-Matos, C., & Oliveira, M. B. P. P. (2012a). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: optimization and validation of microwave-assisted extraction. *Food Chem*istry, 135, 1, 234–242.

Raters, M., & Matissek, R. (2014). Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Cocoa and Chocolate Samples by an HPLC-FD Method, *Journal of Agriculture and Foods Chemistry (JAFC)*, 62, 10666 - 10671.

Reddy, P.V., Karegoudar, T.B., Monisha, T.R., Mukram, I., & Nayak, A.S. (2018). Biodégradation du fluoranthène par *Paenibacillus sp*. souche PRNK-6 : une voie de minéralisation complète. *Archives of Microbiology*, 200, 1, 171-182. https://doi.org/10.1007/s00203-017-1431-9

Reineccius, G. A., Andersen, D. A., Kavanagh, T. E., & Keeney, P. G. (1972). Identification and quantification of the free sugars in cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 2, 199-202.

Rezki-Bekki, M. A. (2014). Production de métabolites par les levures : caractérisation et identification des arômes et des alcools. Thèse de l'Université d'Oran d'Algérie, Oran, 161p.

Rivier, M., kebe, F., & Goli, T. (2009). Fumage de poisons en Afrique de l'Ouest pour les marchés locaux et d'exportation. Rapport de l'Agence Universitaire de la Francophonie. 19p.

Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., & Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food chemistry*, 132, 1, 277-288.

Romero-Cortes, T., Robles-Olvera, V., Rodriguez-Jimenes, G., & Ramírez-Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 2, 339-347.

Rosalía, G. G. G., Molina, F. J. J., Aguilar, P., Salazar, W., Durand, N., Bastide, P., & Macia, el. (2014). Determination of chemical compounds associated with sensory characteristics of wet processed coffee. *Revista de la Facultad de Agrononia Universidad del Zulia*. 1, 712-718.

Rose, M., Holland, J., Dowding, A., Petch, R. S., White, S., Alwyn, Q., & Mortimer, D. (2015). Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 1–9.

Rozentāle, I., Stumpe-Vīksna, I., Začs, D., Siksna, I., Melngaile, A., & Bartkevičs, V. (2015) Assessment of dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat products produced in Latvia. *Food Control*, 54, 16–22.

Sadowska-rociek, A., Cieślik, E., & Sieja, K. (2015). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate using the combination of Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe method and dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54, 4, 289-297.

Saltini, R., Akkerman, R., & Frosch, S. (2013). Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. *Food Control*, 29, 167–187.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 12, 5463-5467.

Schwan, R. F., de Melo, G. V., & Fleet, G. H. (2014). Microbial activities during cocoa fermentation. *In Cocoa and coffee fermentations*, CRC Press, 129-192.

Scientific Committee on Food (SCF) (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific

Committee on Food, European. Website: ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf (EU Standing Committee on Foodstuffs, 2002)

Semanová, J., Sklaršová, B., Šimon, P., & Šimko, P. (2016). Elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked sausages by migration into polyethylene packaging, *Food Chemistry*, 201, 1–6.http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.057

Sengun, I. Y., Yildiz Turp, G., Icier, F., Kendirci, P., & Kor, G. (2014). Effects of ohmic heating for pre-cooking of meatballs on some quality and safety attributes. *LWT – Food Science and Technology*, 55, 1, 232–239

Seo, J., Young, S.K., & Qing, X.L. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 1, 278–309

Servent, A., Boulanger, R., Davrieux, F., Pinot, M-N., Tardan, E., Forestier-Chiron, N., & Hue, C. (2017). Assessment of cocoa (Theobroma cacao L.) butter content and composition throughout fermentations, *Food Research International*, 107, 675-682. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.070

Sharma, R. K., Chan, W. G., & Hajaligol, M. R. (2006). Product compositions from pyrolysis of some aliphatic α-amino acids. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 75, 2, 69-81.

Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., & Komagata. K. (1996). Proposal for two new genera, Brevibacillus gen. nov. and Aneurinibacillus gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 939–946.

Silva, I.S., Grossman, M., & Durranta, L.R. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very low oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 2, 224–229

Silva, S. A., Sampaio, G. R., & Torres, E. A. F. S. (2017). Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydro- carbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chemistry*, 221, 809–814.

Singh L., Varshney J. G. & Agarwal T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons formation and occurrence in processed food.*Food Chemistry*, 199, 768-781.http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.074

Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram Stain Protocols. *American Society for Microbiology*, 9p.

Sotelo, A., & Alvarez, R.G. (1991). Chemical composition of wild Theobroma species and their comparison to the cacao bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 11, 1940–1943.

Srivastava, S., & Kumar, M. (2019). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): ASustainable Approach. *Sustainable Green Technologies for Environmental Management*, 111-139. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8_6

Stringfellow, W. T., & Aitken, M. D. (1995). Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 357–362

Sundiata, I.K. (1974). Prelude to Scandal: Liberia and Fernando Po, 1880- 1930. *The Journal of African History*, 15, 1, 98.

Tam, N.F.Y., Chan, M.N., & Wong, Y.S. (2010). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized microalgal beads. *Trans Ecol Environ, Waste Manag Environ*, 140, 391–402. doi:10.2495/WM100351

Tarantini, A. (2010). Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) en mélanges. Thèse de docteur en biologie, Ecole Doctorale Ingénierie pour la santé, la cognition et l'Environnement, 174p.

Tfouni, S. A., Souza, N. G., Neto, M. B., Loredo, I. S., Leme, F. M., & Furlani, R. P. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. *Food Chemistry*, 116, 391-394.

Tfouni, S.A., & Toledo, M.C.F., (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. *Food Control*, 18, 8, 948–952

Toledo, F.L., Calovo, C., Rodelas, J., & Gonzales-Lopez, J. (2006). Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 244-252.

Torres-Moreno, M., Torrescasana, E., Salas-Salvadó, J., & Blanch, C. (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry, 166*, 125-132.

Uche, E. C., & Dadrasnia, A. (2017). Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons: Biodegradation of Hydrocarbons.*Environmental Footprints and Eco-design of Products and Processes*, 105- 136. Doi: 10.1007/978-981-10-0201-4_3

Ukiwe, L. N., Egereonu, U. U., Njoku, P. C., Nwoko, C. I., & Allinor, J. I. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation techniques: a review. *International Journal of Chemistry*,*5*, 4, 43.

Unwin, J., Cocker, J., Scobbie, E., & Chambers, H. (2006). An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK.*Annals of Occupational Hygiene*,*50*, 4, 395-403.

Vachali, P., Bhosale, P.,& Bernstein, P. S. (2012). Microbial carotenoids. In: Barredo J-L (ed) Microbialcarotenoids from fungi: methods and protocols.*Humana Press*,Springer, New York, 41–59

Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K., Schneider, J. (1995). Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions*, 97, 131–148

Watson, R.R., Preedy, V. R., & Zibadi, S. (2013). Chocolate in Health and Nutrition.*Nutrition and Health*, 7, Doi: 10.1007/978-1-61779-803-0_2.

Whitefield, R. (2005). Making Chocolates in the Factory. *Kenedy's Publications Ltd*, London, UK.

Whymper, R. (1912) Cocoa and Chocolate. *Their Chemistry and Manufacture*. Churchill, London.

Wu, M., Chen, L., Tian, Y., Ding, Y., & Dick, W. A. (2013).Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two differentculture media. *Environmental Pollution*, 178, 152-158.http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.004

Xu, F.L., Wu, W.J., Wang, J.J., Qin, N., Wang, Y., He, Q.S., He, W., & Tao, S. (2011). Residual levels and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater fishes from Lake Small Bai- Yang-Dian, Northern China. *Ecological Modelling*, 222, 275–286.

Yao, W., Goualié, B., Ouattara, H., & Niamké, S. (2017). Growth capacity of bacillus potential starter strains isolated from cocoa beans fermentation under culture stress conditions. *Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 18, 2, 201-211.

Yu, Y., Jin, Q., & Wang, X. G. (2013). Research Article Rapid assay of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by HPLC with FLD detection without clean-up, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5,10, 409–414.

Zachara, A., Galkowska, D., & Juszczak, L. (2017). Method validation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by HPLC-FLD. *Food Analytical Methods*, 10, 1078–1086. https://doi.org/10.1007/s12161-016-0673-5

Zahouli, G. I. B., Guehi, T. S., Fae, M. A., Ban-Koffi, L., & Nemlin, J. G. (2010). Effect of Drying Methods on the Chemical Quality Traits of Cocoa Raw Material. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2, 4, 184-190.

Zelinkova, Z., & Wenzl, T. (2015). EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements: analytical approach and occurrence. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32, 11, 1914-1926.

Zhang, S., Ning, Y., Zhang, X., Zhao, Y., Yang, X., Wu, K., Yang, S., La, G., Soleil, X., & Li, X. (2015). Contrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *105*, 228-232. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.09.012.

Zhu, X., Ni, X., Waigi, M., Liu, J., Sun, K., & Gao, Y. (2016). Biodegradation of mixed PAHs by PAH-degrading endophytic bacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*, 8, 805.

Ziegenhals, K., Speer, K., & Jira, W. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate on the German market.*Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*,4, 2, 128-135.

Zyzelewicz, D., Oracz, J., Krysiak, W., Budryn, G., & Nebesny E. (2017). Effects of various roasting conditions on acrylamide, acrolein and polycyclic aromatic hydrocarbons content in cocoa bean and the derived chocolates. *Drying Technology*, 35, 3, 363–374.

ANNEXES

Annexe1 : Ustensiles utilisés pour la préparation et la consommation du cacao dans l'antiquité

Annexe 2 : Découvertes de vaisselle servant à la préparation de boisson à base de cacao

Annexe 3 : Interface de traitement des pics de séquençage sur le logiciel BioEdit

PUBLICATIONS ISSUES DES TRAVAUX DE RECHERCHE DE LA THESE