

**EFFET DES SUSPENSIONS DILUTION DE L'INOCULUM
D'*Aspergillus fumigatus* *Penicillium glabrum* ET *Pestalotiopsis* SUR
LE TAUX D'ÉCLOSION DES ŒUFS DE L'ESCARGOT *ACHATINA
FULICA* (BOWDICH, 1820) EN ÉLEVAGE HORS-SOL**

Juliette DEDI^{1*}, Atcho OTCHOUMOU² et Kouassi ALLOU³

¹ *Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales,
Université Nangui Abrogoua, UFR-SN,
01 BP 8133 Abidjan 01, Côte d'Ivoire*

² *Laboratoire de Biologie et Cytologie Animale, Université Nangui Abrogoua,
UFR-SN, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire*

³ *Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Station de Recherche
Marc Delorme, Laboratoire de Défense des Cultures sur le Programme
Cocotier, 07 BP 13 Abidjan 07, Côte d'Ivoire*

* Correspondance, e-mail : mmededijuliette@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Des spécimens d'*Achatina fulica* ayant atteint la maturité sexuelle et issue de plusieurs collectes faites dans les plantations expérimentales de l'Université Nangui Abrogoua d' Abidjan ont été utilisées pour l'élevage hors-sol des escargots. Leur masse corporelle moyenne était de $66,6 \pm 1$ g avec une longueur moyenne de coquille de $8,4 \pm 0,3$ cm. Les plantations expérimentales étaient constituées de la parcelle expérimentale de *Lagenaria siceraria* (pistache), les parcelles de voandzou, de cultivars de bananiers plantains de type faux corne : Orishele et Corne 1 (Musa AAB) et la culture sous serre du manioc éclairée par la lumière naturelle (*Manihot esculenta* Grantz). Les œufs issus des pontes du jour sont mis à incuber sur la sciure de bois stérilisée et infectée avec chacune des suspensions dilution d'*Aspergillus fumigatus*; *Penicillium glabrum* et *Pestalotiopsis* sp. Après deux semaines d'incubation à 28,28 °C, le nombre d'éclos a été dénombré. Aux dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium glabrum* et *Pestalotiopsis* sp. ont eu un effet pathogène sur le taux d'éclosion et cet effet est plus important en présence d'*Aspergillus fumigatus*. Cependant aux dilutions 10^{-5} et 10^{-6} , l'effet de ses trois champignons est très peu significatif sur le taux d'éclosion des œufs.

Mots-clés : *champignons, suspensions dilution, Achatina fulica, œufs.*

ABSTRACT

Effect of dilution of inoculum suspension of *aspergillus fumigatus* and *penicillium glabrum pestalotiopsis* sp. on the rate of outbreak of eggs snail *achatina fulica* (bowdich, 1820) breeding in above ground

Specimens of *Achatina fulica* that have reached sexual maturity and after several collections made in experimental plantations of Nangui Abrogoua University of Abidjan have been used for breeding snails above ground. Their average body weight was 66 ± 1 g with an average length of 8.4 ± 0.3 cm shell. The genital opening of these animals showed a slight protrusion of whitish color, a sign of sexual maturity (Ategbo *et al.*, 2000). Experimental plantations consisted of the experimental plot of calabash (pistachio), plots of Bambara groundnut, plantain cultivars type False horn : Orishele and Horn 1 (Musa AAB) and greenhouse cultivation lit by natural light cassava (*Manihot esculenta* Grantz). The eggs from the laying of the day are incubated on sawdust sterilized and infected with each of the diluted suspensions of *Aspergillus fumigatus*; *Penicillium glabrum* and *Pestalotiopsis* sp. After two weeks of incubation at 28.28°C , the number of hatched were counted. 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} dilutions for *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium glabrum* and *Pestalotiopsis* sp. have a pathogenic effect on hatch rate and this effect is greater in the presence of *Aspergillus fumigatus*. However dilutions 10^{-5} et 10^{-6} the effect of three mushrooms is very significant on the eggs hatching rate.

Keywords : mushrooms, dilution suspensions, *Achatina fulica*, eggs.

I - INTRODUCTION

Les escargots appartiennent à l'Embranchement des mollusques. Ils sont de la Classe des Gastéropodes terrestres. L'orifice génital de ces animaux présente une légère saillie de couleur blanchâtre, signe de leur maturité [1]. Les champignons filamenteux microscopiques, sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle. Ils sont qualifiés d'organismes hétérotrophes. Cosmopolites, ils sont retrouvés partout dans la nature. Ils jouent un rôle essentiel de recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes [2]. Les spores, éléments de survie sont moins hydratées, généralement moins de 50 % d'eau, quantité encore plus réduite chez les sclérotés. Le développement des champignons exige donc beaucoup d'eau et d'oxygène, mais également une source de carbone organique, puisqu'ils ne peuvent effectuer la photosynthèse [3]. La plupart des champignons utilisent des sucres simples comme le glucose ou le fructose.

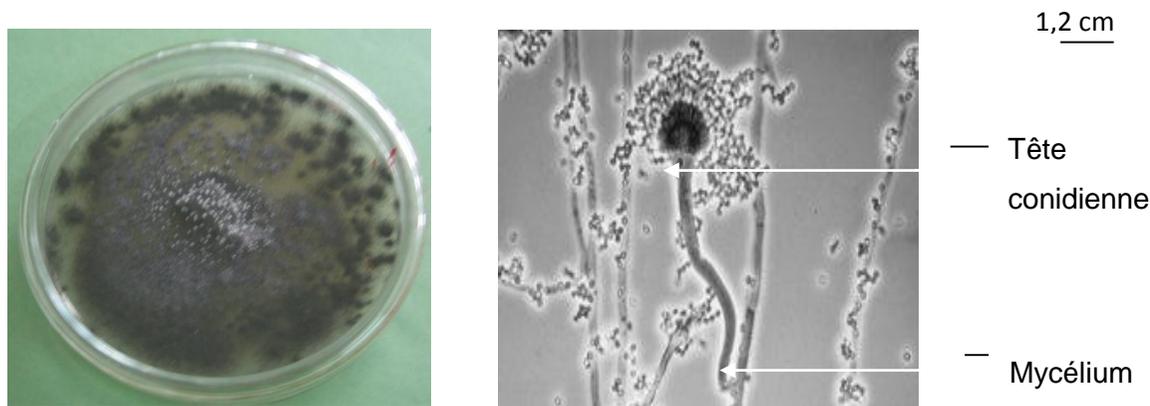
Mais dans la nature, ils se trouvent fréquemment en présence de polysaccharides qu'ils doivent d'abord dégrader avant de les absorber. Pour cela, ils excrètent dans le milieu extérieur des enzymes digestives qui dégradent ces sucres complexes en sucres simples, assimilables pour l'organisme [4]. La multiplicité des milieux colonisés par les différentes espèces atteste d'une remarquable capacité d'adaptation des champignons. L'hétérotrophie vis-à-vis du carbone impose aux champignons trois modes de vies que sont la nécrotrophie (ou saprophytisme), la biotrophie (ou parasitisme) et la symbiose. Le champignon de l'espèce *Candida albicans* peut provoquer la mort chez les escargots [5]. Quant à *Fusariumoxysporum* il parasite les embryons des œufs causant les "pontes roses" caractérisées par la modification de la coloration typiquement blanc-jaunâtre d'une ponte saine [5]. Les escargots appartiennent à l'Embranchement des mollusques. Ils sont de la Classe des Gastéropodes terrestres. L'hermaphrodisme chez l'escargot n'est pas simultané mais protérandrique. Les produits mâles arrivent à maturité avant les produits génitaux femelles [6]. Pour la reproduction naturelle des escargots, bien qu'hermaphrodite, l'accouplement est nécessaire. La reproduction est donc croisée. Pour pondre, l'escargot creuse un nid dans le sol meuble et humide et y enfouit les œufs pour l'incubation. Les naissains éclosent seuls du nid. Les œufs pondus sont recouverts d'un mélange de mucus et de terre qui permet de les conserver humides. Les géniteurs ne contribuent pas à la vie de leur progéniture. [7].

Achatina fulica pond 60 à 200 œufs par ponte (**Figure 3**) et la durée d'incubation est d'environ 15 jours [8]. Le poids des œufs varie de 0,3 à 0,8 g avec des jeunes escargots très fragiles. Il peut se reproduire 6 à 7 fois par an et devient adulte en 8 mois, pèse 32 g et mesure 6 cm de longueur de coquille [9]. Il est actif la nuit et se réfugie sous abri durant le jour. *Achatina fulica* atteint la maturité sexuelle à 2 mois d'âge et les premières pontes surviennent à 3 ans. Le développement de l'achatiniculture en Côte d'Ivoire pourrait constituer une stratégie de choix. En effet, l'élevage des escargots permettrait d'une part la conservation des populations naturelles d'escargots en diminuant le recours au ramassage et d'autre part d'avoir une production régulière tout au long de l'année. L'achatiniculture permettra d'offrir aux consommateurs des produits dont la qualité organoleptique serait même supérieure aux escargots de ramassage. Ceci est possible parce que la croissance des escargots d'élevage est continue, régulière et donnera des mollusques qui seront bien charnus. Cette activité peut également contribuer à la création d'emplois pour les jeunes. Une population d'escargots en perpétuelle évolution reste toutefois liée au taux d'éclosion et au nombre d'œufs pondus. *Achatina fulica* est connu pour ces nombreuses pontes renfermant beaucoup d'œuf. Mais, il se trouve que le taux d'éclosion n'est pas proportionnel au nombre d'œufs pondus. Le but de notre étude est de savoir parmi ces trois champignons lequel réduit le plus le taux d'éclosion des œufs de *Achatina fulica*.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

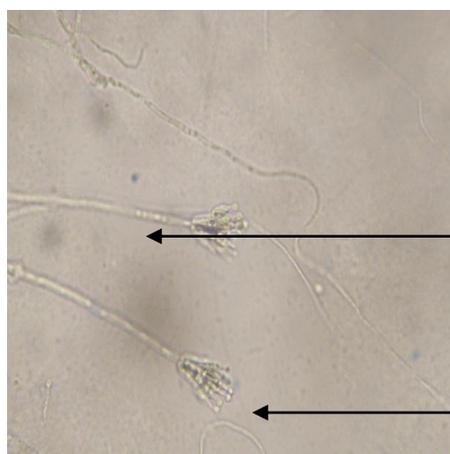
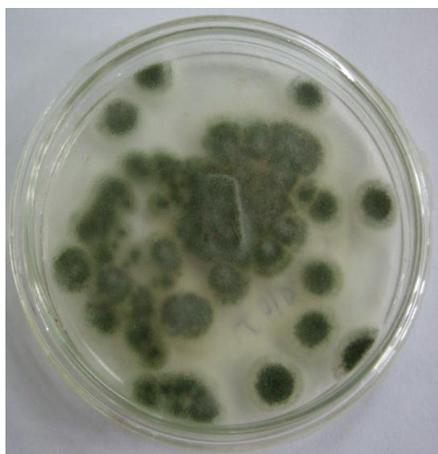
II-1. Matériel biologique

Aspergillusterreus, *Penicillium sp1*, *Penicillium sp2*, *Phoma sp.*, *Trichoderma sp.*, champignon D₁, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, champignon D₄, *Fusarium oxysporum*, *Fusariumsolani*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Penicillium glabrum*, Champignon D₂, *Fusariumsp.*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus sp.*, Champignon D₃, *Pestalotiopsis sp.* constituent l'ensemble des champignons microscopiques isolés au cours des études réalisées par [10]. Parmi tous ses mycètes, *Aspergillus fumigatus* (**Figure 1**) isolé du sol de plantation ; *Penicillium glabrum* (**Figure 2**) du sol de forêt vierge, de la sciure de bois, du coton hydrophile et des bourres de coco et *Pestalotiopsis sp.* (**Figure 3**) des bourres de coco ; sont utilisés dans cette présente étude. Ses trois souches ont été repiquées sur milieu PDA sous la hotte dans des boîtes de Pétri stériles et mise à incuber à une température moyenne de 28,28°C et utilisées après sept jours. Les œufs utilisés sont issus des pontes (**Figure 4**) du jour des escargots de l'espèce *Achatina fulica* matures collectés dans les plantations expérimentales de l'Université Nangui Abrogoua (**Figure 5**) et repartis dans deux bacs d'élevage. Ces mollusques sont nourris de feuilles de papayer (*Carica papaya*), de laitue (*Lactuca sativa*) et de choux (*Brassica oleraceae.*) (**Figure 6**). La nourriture est renouvelée tous les deux jours après avoir débarrassée la litière de toutes les impuretés. S'il y a des pontes, les œufs sont récupérés à l'aide d'une cuillère appropriée et dénombrés.



a : Colonies mycéliennes d'*Aspergillus fumigatus* unisériée (G x 400) b : Mycélium et tête conidienne

Figure 1 : Structure macro et microscopique d'*Aspergillus fumigatus*



1,07 cm

Conidiophores

Verticille

a : Colonie mycélienne de *Penicillium glabrum*

b : Conidiophores lisses, avec au sommet verticille (G x 400)

Figure 2 : Structure macro et microscopique de *Penicillium glabrum*



1,16 cm

Conidie

a : Colonie mycélienne de l'extrémité *Pestalotiopsis sp*

b : Conidies avec filaments à des conidies (G x 400)

Figure 3 : Structure macro et microscopique de *Pestalotiopsis sp*



0,5 cm



Figure 4 : Œufs d'une ponte d'*Achatina fulica* [10]



Bac

Achatina fulica

1,4 cm



Figure 5 : Specimens d'*Achatina fulica* collectés dans les plantations expérimentales de l'Université Nangui Abrogoua d'Abidjan [10]

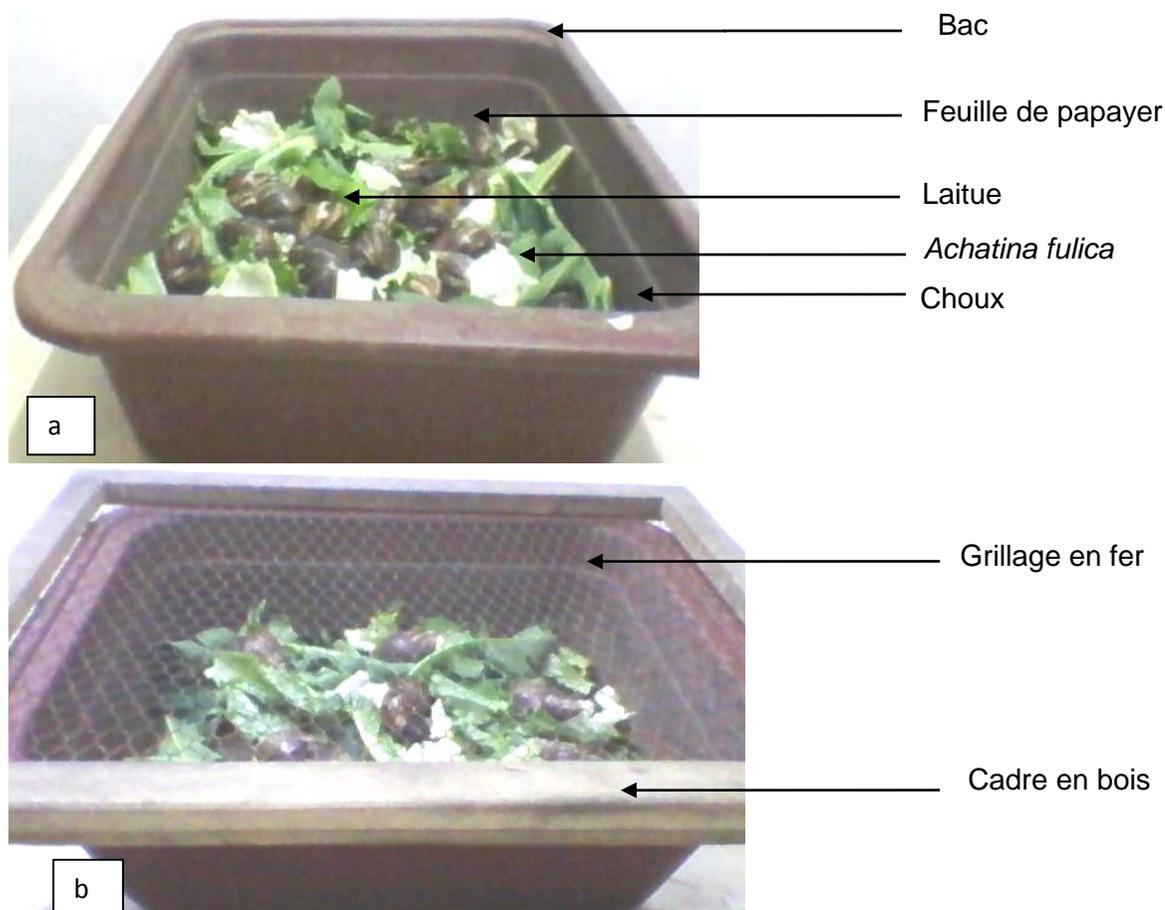


Figure 6 : Bacs d'élevage des escargots [10]

a : Bac d'élevage sans couvercle contenant les escargots et leur aliment

b : Bac d'élevage avec couvercle contenant les escargots et leur aliment

II-2. Préparation de l'inoculum

La souche pure de chacun des trois champignons a été repiqué sur milieu de culture PDA solidifié dans des boîtes de Pétri à raison de trois boîtes par champignon. Au bout d'une semaine d'incubation à 28,28 °C, la surface de la culture pure (trois boîtes de Pétri) de chaque champignon à savoir *Aspergillus fumigatus*, *Pestalotiopsis sp.* et de *Penicillium glabrum* a été raclée à l'aide d'une spatule métallique stérile et mis séparément dans des erlenmeyers contenant 10 mL d'eau distillée stérile puis agité pendant 1 min avec le vortex pour obtenir une suspension de spores. La suspension obtenue a été transvasée dans un Becher stérile, puis son volume est complété à 100 mL. La solution ainsi obtenue est diluée au 1/10 soit 10^{-1} et constitue la solution mère.

A l'aide d'une pipette graduée stérile, 1 mL de la suspension est prélevé et transféré dans un tube à essai stérile contenant 9 mL d'eau distillée stérile affecté du numéro correspondant à la dilution 10^{-2} . Par le même procédé, toutes les dilutions jusqu'à 10^{-6} sont obtenues. Une pipette stérile est utilisée par inoculum. Pour chaque pathogène, cinq tubes à essai contenant chacun 9 mL d'inoculum a été préparé. La suspension de spores est bien incorporée sous la hotte à 30 g du substrat sciure de bois stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 30 min à une barre à raison de 15 mL par bac à l'aide d'une spatule stérilisée (à chaque champignon sa spatule). Une ouverture est faite dans le substrat humide et 15 œufs de la ponte du jour y sont mis à incuber. Les enceintes témoins reçoivent le même nombre d'œufs et la même quantité d'eau. Après deux semaines d'incubation, le nombre de naissains a été déterminé et le pourcentage d'éclosion calculé selon la formule suivante :

$$TE (\%) = \frac{NN}{NO} \times 100 \quad (1)$$

NN = Nombre de Naissains ; *TE* = Taux d'Éclosion ; *NO* = Nombre d'œufs

II-3. Analyse statistique

Une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA1) a été faite afin d'apprécier l'impact des champignons sur le taux d'éclosion des œufs de l'escargot géant Africain *Achatina fulica* à différentes suspensions dilutions grâce au logiciel Statistica version 7.1. En cas de différence au seuil $\alpha = 0,05$ le test de Newman et Keuls a servi à classer les moyennes.

III - RÉSULTATS

III-1. Inoculation du substrat d'incubation avec les différents inocula

Le taux d'éclosion moyen sur la sciure de bois en présence d'*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium glabrum* et de *Pestalotiopsis sp.* est consigné dans le **Tableau 1**. Il n'y a pas de différence significative entre *Penicillium glabrum* et *Pestalotiopsis sp.* aux dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} mais une différence existe entre ses deux champignons et *Aspergillus fumigatus* $P = 0,001 < 5 \%$. Aux dilutions 10^{-5} et 10^{-6} , il n'y a pas de différence significative entre *Aspergillus fumigatus* et *Penicillium glabrum* mais une différence existe entre eux et *Pestalotiopsis sp.* $P = 0,01 < 5 \%$. A la dilution 10^{-2} , le taux d'éclosion est le plus faible. Au fur et à mesure que la dilution baisse, il y a une augmentation du taux d'éclosion.

Tableau 1 : Taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* en présence de l'inoculum dilué de chacun des champignons

Dilutions	Taux d'éclosion (%)					H ₂ O
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
Champignons						
<i>Aspergillus fumigatus</i>	9	19	25	55	69	90
<i>Penicillium glabrum</i>	20	35	46	65	70	90
<i>Pestalotiopsis Sp.</i>	29	42	49	75	88	95

IV - DISCUSSION

Le taux élevé d'éclosion des œufs de *Achatina fulica* aux dilutions 10⁻⁵ et 10⁻⁶ avec *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium glabrum* et *Pestalotiopsis sp.* pourrait s'expliquer par le fait qu'à ses dilutions, le nombre de spores présents dans les suspensions est de plus en plus faible et leur effet est réduit sur le taux d'éclosion. *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium glabrum* et *Pestalotiopsis sp.* peuvent être considérés comme non pathogènes pour les œufs de l'escargot *Achatina fulica* à ses dilutions. Au niveau des dilutions 10⁻², 10⁻³ et 10⁻⁴, il existe un effet pathogène de *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium glabrum* et *Pestalotiopsis sp.* sur le taux d'éclosion des œufs de *Achatina fulica*. Cet effet néfaste est très marqué en présence d'*Aspergillus fumigatus*. Ce champignon est cosmopolite et le plus fréquemment incriminé en pathologie humaine et animale. Les souches d'*Aspergillus fumigatus*, isolées à partir de l'environnement, peuvent produire des toxines [11]. Pour notre étude il a été isolé du substrat sol de plantation. Ce champignon est le producteur reconnu d'un grand nombre de mycotoxines dont la gliotoxine qui est une toxine qui joue un rôle essentiel dans sa pathologie. Sa production à travers *Aspergillus fumigatus* au cours de l'incubation des œufs pourrait expliquer le faible taux d'éclosion des œufs obtenu au cours du travail, compte tenu du fait que la gliotoxine inhibe la phagocytose par les macrophages et induit l'apoptose des cellules [12]. Selon [13], le faible taux d'éclosion pourrait s'expliquer par le passage des spores à travers la coquille souillée, notamment en cas de microlésions de la coquille par les structures spécialisées du champignon.

En absence de mycotoxines, l'infection des œufs peut se produire si des conidies du champignon germent sur les œufs et que des hyphes pénètrent par les pores de la coquille ou par d'éventuelles fissures [14]. Selon [15], plusieurs études ont montré que le succès de l'infection à *Pestalotiosis* nécessite une voie d'entrée chez l'hôte occasionné par une blessure. Tout ceci peut également expliquer les faibles taux d'éclosion des œufs obtenus au cours de l'étude. *Penicillium glabrum* est un champignon ubiquiste et cosmopolite et se trouvent sur un large éventail de substrats [16]. Selon [17], ce contaminant fongique ne semble pas produire de mycotoxines connues qui pourraient menacer la sécurité alimentaire et la santé des consommateurs. Malgré cela sa présence n'est toujours pas sans effet sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*. La présence de champignons ne signifie pas nécessairement l'élaboration de mycotoxines, mais qu'un potentiel de production existe [18].

V - CONCLUSION

Au terme de notre étude, l'effet d'*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium glabrum* et *Pestalotiopsis sp.* sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* a été évalué. Aux dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} les taux d'éclosions sont assez faibles en présence des trois champignons. Mais avec *Aspergillus fumigatus* à la dilution 10^{-2} le taux d'éclosion est très très faible par rapport au témoin probablement dû à la production de la gliotoxine au cours de l'incubation des œufs. Aux faibles dilutions 10^{-5} et 10^{-6} l'effet des champignons est réduit sur le taux d'éclosion par rapport au témoin. L'effet des champignons est lié à la quantité de spores présentes dans les différentes suspensions.

RÉFÉRENCES

- [1] - J. M. ATEGBO, D. ZONGO et K. L. DRAMANE, Influence density of breeding on the performances of the reproduction of the snail *Achatina achatina* (Linné). Annals of agronomic sciences of Bénin: (2) 1 (2000) 85 - 101.
- [2] - D. CHABASSE, J. P. BOUCHARA, L. De GENTILE, S. BRUN, B. CIMEN, P. PENN, Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Edition Bioforma. Paris. (2002) 25 : 26 - 45.
- [3] - N. DECHAMPLAIN et L. GOSSELIN, Les champignons mycorrhiziens. Université Laval, (2002)12 p.
- [4] - P. MAZLIAK, Nutrition et métabolisme. Physiologie Végétale, Collection Méthodes. Hermann, 293, rue Lecourbe, 75015 Paris, (1981) 349 p.

- [5] - M. J. MATEO, Les ennemis des escargots. Héliciculture à St Jory (31). Gireaud. 42 chemin de la plaine 31790 St Jory. Toulouse, (2006) 10 p.
- [6] - A. OTCHOUMOU, M. DUPONT-NIVET, et K. N'DA, H. DOSSO, L'élevage des escargots comestibles Africains : Effets de la qualité du régime et du taux de calcium alimentaires sur les performances de reproduction d'*Achatina fulica* (Bowdich 1820). Livestock Research for Rural Development. 17 (2005a) (118).
- [7] - R. COWIE, "*Achatina fulica* (mollusc)" (On-line). Global Invasive Species Database. Accessed March 06, 2014 (2010) at <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=64&fr=1&sts=sss&lang=N>.
- [8] - K. N'GUESSAN, W. B. VANGAH, et G. KONAN, L'élevage des escargots, INADES FORMATON Côte d'Ivoire, Verantwoordeli—jkeuitgeve (1995) 30 p.
- [9] - S. E. UPATHAM, M. KRUAATCHUA et V. BAIDIKUI, Cultivation of the giant African Snail, *Achatina fulica*. J. Cci; Soc. Thailand 14: (1988) 25-40.
- [10] - K. J. DEDI, Inventaire et influence des champignons d'une litière d'élevage et de substrats sur la durée d'incubation et le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* Bowdich. DEA. Option : Biologie et Protection des Végétaux. Université d'Abobo-Adjamé (Côte d'Ivoire), (2007) 54p.
- [11] - S. PEPELJNJAK, Z. SLOBODNJAK, M. SEGVIC, M. PERAICA, and M. PAVLOVIC, The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. Hum.Exp.Toxicol. 23 (1), (2004) 15-19.
- [12] - S. THIERRY, Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de Chlamydophilapsittaci chez les oiseaux. T H È S E pour obtenir le grade de docteur délivré par L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. (2011) 214p.
- [13] - C. BOISSIEU, L. CORRAND, et J. L. GUERIN, L'aspergillose, (2009) 2p.
- [14] - R. A. KUNKLE, FUNGAL diseases. In Y. M. SAIF (ed.), Diseases of poultry 11th Edition lin Microbiol Rev 1999 avril; 12 (2): (2003) 310-50.
- [15] - J. G.ESPINOSA, et E. X. BRICENO, Canker caused by *Pestalotiopsis* sp. And *Truncatella* sp. In Chile. Plant Dis. 92 (10) (2008) 1407-1414.
- [16] - R. JEEWON, E.C. Y. LIEW, J. A. SIMPSON, I. J. HODGKISS, and K. D. HYDE, Phylogenetic signifiacnce of morphological character in the taxonomy of *Pestalotiops* species. Mol. Phylogenet. Evol. 27 : (2003) 372-383.
- [17] - J. I. PITT, A.D.HOCKING, Champignons et altération des denrées alimentaires, Deuxième édition. Blackie académique et professionnel. (1997)
- [18] - N. BELKACEM, Les mycotoxines : production et voie de biosynthèse Institut National Polytechnique de Toulouse (2008) 25p.