

# EFFET DES CHAMPIGNONS SUR LE TAUX D'ÉCLOSION DES ŒUFS D'*Achatina fulica* ET DÉTECTION DE MYCOTOXINES

## EFFECT OF MUSHROOMS ON THE RATE OF HATCHING OF EGG OF *Achatina fulica* AND DETECTION OF MYCOTOXINS

DEDI née K. Y. J.<sup>1</sup>, OTCHOUMOU A.<sup>2</sup> et ALLOU K.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, Université Nangui Abrogoua, UFR-SN.  
01 BP 8133 Abidjan 01, Côte d'Ivoire - Cel. : +225 07 43 06 33  
[mmededijuliette@yahoo.fr](mailto:mmededijuliette@yahoo.fr)

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie et Cytologie Animale, Université Nangui Abrogoua, UFR-SN.  
02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire - Cel. +225 06 401618  
[albertameri@yahoo.fr](mailto:albertameri@yahoo.fr)

<sup>3</sup> 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 - Cel. +225 48 485263  
[kouassi\\_allou@yahoo.fr](mailto:kouassi_allou@yahoo.fr)

### RÉSUMÉ

L'objectif de la présente recherche est de caractériser le potentiel toxigène des souches fongiques productrices de mycotoxines sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*.

A cet effet, l'inoculum pour l'infestation de la sciure de bois stérilisée, a été préparé séparément à partir de la souche pure de chacun des champignons et de l'association des champignons âgés d'une semaine. Chaque entité a été broyée et mélangée dans un erlenmeyer à 600 ml d'eau distillée stérile puis agité pendant une minute. Pour la chromatographie, les œufs désinfectés ont étéensemencés sur les souches individuelles, associées à deux et à trois. Les différentes souches ont été isolées à partir de la litière d'élevage et des substrats d'incubation des œufs d'*Achatina fulica*. L'HPLC a permis l'identification des mycotoxines à partir des souches pures de champignons cultivées en présence des œufs d'*Achatina fulica*. A l'issue de l'inoculation individuelle, les taux d'éclosion auxquels nous sommes parvenus sont compris entre 8,88% et 67,40%. Ces taux d'éclosion sont très faibles lorsqu'il s'agit d'*Aspergillus niger* et assez élevé en présence de *Penicillium* sp. *Penicillium* sp., *Phoma* sp. et *Fusarium oxysporum* occasionnent des taux d'éclosion supérieur à la moyenne. D'autre part, les taux obtenus après les associations sont compris entre 5,18% et 53,32%. En ce qui concerne les mycotoxines, les aflatoxines B1, G1, G2 et l'ochratoxine A ont été détectées au niveau des inoculations individuelles et les aflatoxines uniquement au niveau des associations à des quantités variables et assez faibles. Les mycotoxines produites agissent sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* en les réduisant considérablement par l'intermédiaire des champignons. Seule l'association *Mucor* sp.- *Penicillium decumbens* donne un taux d'éclosion de 53,32% légèrement au dessus de la moyenne et peut être considérée comme une association à caractère bénéfique pour les œufs d'*Achatina fulica*.

**Mots clés :** Inoculation, association, incubation, mycotoxines, pathogène, champignons

### ABSTRACT

The objective of this research is to characterize the potential toxin-producing strains of fungal mycotoxins on hatchability of *Achatina fulica* of eggs.

To this end, the inoculum for infection of the sterilized sawdust was separately prepared from the pure strain of each of the fungi and the association of fungi aged one week. Each entity was ground and mixed in an Erlenmeyer flask in 600 ml of sterile distilled water and stirred for one minute. For chromatography, the disinfected eggs were seeded on individual strains, associated with two and three. The different strains were isolated from breeding litter substrates and incubation of eggs *Achatina fulica*. HPLC allowed the identification

of mycotoxins from pure strains of fungi grown in features of *Achatina fulica* eggs. After individual inoculation, hatching rates we have achieved are between 8.88% and 67.40%. These hatching rates are very low in the case of *Aspergillus niger* and quite high in the presence of *Penicillium* sp. *Penicillium* sp., *Phoma* sp. and *Fusarium oxysporum* cause of hatching rate above average. On the other hand, the levels achieved following associations are between 5.18% and 53.32%. Regarding mycotoxins, aflatoxins B1, G1, G2 and ochratoxin A were detected in individual inoculations and aflatoxins only in associations at varying and quite small amounts. Mycotoxins produced act on hatchability of *fulica Achatina* eggs significantly reducing through fungi. Only *Mucor* sp. - *Penicillium decumbens* association provides a hatching rate of 53.32% slightly above average and can be considered a beneficial nature association for eggs of *Achatina fulica*.

**Keywords:** Inoculation, association, incubation, mycotoxins, pathogenic fungi

## INTRODUCTION

Les moisissures sont un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et, parfois parasites. Ils constituent à ce jour un règne autonome : le règne fongique (Delahaye, 2011). Ce sont des organismes eucaryotes, thallophytes car leur appareil végétatif est un thalle constitué par des filaments mycéliens à croissance apicale, dans toutes les directions à la même vitesse (Guinberteau *et al.*, 2015). Dépourvues de pigments assimilateurs, les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes dépendants d'une source de carbone organique. Globalement peu exigeants sur les conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux les plus divers comme : les céréales, les produits d'origine animale (le lait et la viande) mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition, où elles trouvent une source de carbone et d'azote accessible. Par ailleurs, dans des conditions propices de température, d'humidité, de pH et de composition de substrat, les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines. La synthèse des mycotoxines et leur accumulation dans le milieu peut aussi avoir un effet inhibiteur sur le développement d'autres espèces fongiques (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Les toxines majeures sont produites par des souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (AFSSA, 2006). Toutefois, il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. En effet, une molécule peut-être produite par plusieurs espèces fongiques et, au sein d'une espèce toxigène, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité de produire la (les) mycotoxine(s) (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). La toxicité des mycotoxines dépend du caractère de la molécule en cause, de la fréquence d'exposition et de la quantité absorbée (Quillien, 2002). Les mycotoxines sont supposées être synergiques ou antagonistes. Toutefois, très

peu d'écrits scientifiques traitent de cet aspect toxicologique (Quillien, 2002).

L'aflatoxine B1 est la forme la plus toxique parmi toutes les autres aflatoxines.

La toxicité des aflatoxines G1, B2, et G2 métabolites de l'aflatoxine B1 est respectivement 50, 80 et 90 % moins toxique que celle de l'aflatoxine B1 (Cole et Cox, 1981). Selon Nguyen (2007) et Pfohl-Leszkowicz (1999), la toxicité des aflatoxines s'échelonne dans l'ordre décroissant B1 (100%) ; M1 (80%) ; G1 (50%) ; B2 (20%) ; G2 (10%). Elle cause des pertes énormes en aviculture (Hussein et Brasel, 2001 ; Tedesco *et al.*, 2004) et dans les industries de transformation alimentaire (Kubena *et al.*, 1997). L'ochratoxine A découverte à partir d'un isolat d'*Aspergillus ochraceus* est également une mycotoxine toxique pour l'homme et les animaux (O'callaghan *et al.*, 2003).

La toxigenèse dépend beaucoup plus de la composition chimique de la denrée sur laquelle les moisissures se développent (AFSSA, 2009). Ainsi, la présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu détermine des interactions entre les différentes espèces et entraîne une diminution de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs (Nguyen, 2007). Cependant, une combinaison de plusieurs toxines, à faible dose, peut avoir des effets beaucoup plus néfastes qu'une seule mycotoxine à forte dose. Selon Raut (1993) les escargots géants sont attaqués par des agents pathogènes tels que les champignons pouvant avoir une influence sur leur production.

Ces escargots géants africains sont des mollusques Gastéropodes Pulmonés Stylommatophores. La niche écologique des escargots reste très variée. Les Achatinidae présentent une activité journalière rythmée par le cycle jour-nuit. Ils ont un régime essentiellement végétarien, avec des préférences qui varient avec les besoins du moment (Karamoko *et al.*, 2008 ; Otchoumou *et al.*, 2004a ).

Les champignons se rencontrent partout, dans le sol et dans l'air, sur les vêtements, les plantes, les aliments. Ces derniers sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Ils peuvent être présents seuls ou à plusieurs sur un substrat donné. L'association peut-elle avoir un effet plus ou moins néfaste sur le substrat ?

L'objectif de ce travail a donc été, à partir de la flore fongique des différents substrats, de caractériser le potentiel toxigène des souches fongiques productrices de mycotoxines sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel biologique

Les isolats d'*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium decumbens*, *Mucor* sp., *Phoma* sp., *Penicillium* sp. et *Trichoderma* sp. utilisés dans cette étude ont été obtenus à partir de la litière d'élevage (LE) et des substrats d'incubation

d'œufs d'*Achatina fulica* que sont le sol de forêt vierge (SFV), le sol de plantation (SP), la sciure de bois (SB), le coton hydrophile (CH), et les bourres de noix de coco (BNC) (Tableau 1). La sciure de bois est constituée du mélange des espèces suivantes : l'Iroko (*Milicia excelsa* ou *Milicia regia*), l'Acajou (*Khaya ivorensis* ou *Khaya grandifoliola*) et le Samba (*Triplochiton scleroxylon*) (Dedi, 2007). Ce substrat est choisie pour l'incubation parce qu'il conserve très bien l'humidité qui assure une bonne aération, empêche les œufs de sécher, de se briser et donne le meilleur taux d'éclosion (Codjia et Noumovi 2002).

Ses mycètes ont été identifiés à l'aide des clés d'identification de Barnett et Hunter (1972) ; Champion (1977).

Des substrats sont prélevés avant et après le temps d'incubation des œufs d'*Achatina fulica* qui est de deux semaines. Toutes ses souches ont été repiquées sur milieu PDA à une température moyenne de 28,28°C et utilisées sept jours après.

**Tableau 1** : Isolats des différents champignons utilisés dans cette étude (Dedi, 2007)

**Table 1:** Isolates of different fungi used in this study

Isolats	Substrats	Date d'isolement
<i>Aspergillus niger</i> (An)	BNC	2007
<i>Fusarium oxysporum</i> (Fo)	LE	2006
<i>Mucor</i> sp. (M.sp.)	LE	2006
<i>Phoma</i> sp. (Pho.sp)	SB	2007
<i>Penicillium</i> sp. (P.sp.)	SP	2006
<i>Penicillium decumbens</i> (Pd)	CH	2007
<i>Trichoderma</i> sp. (Tricho. sp.)	SFV	2007

### Méthodes

#### Infestation du substrat d'incubation des œufs

L'inoculum a été préparé à partir des champignons suivants : *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Trichoderma* sp. et *Mucor* sp. Le contenu de deux boîtes de chaque champignon ou de l'association des champignons (champignon + milieu de culture) âgés d'une semaine de culture a été broyé, mélangé à 600 ml d'eau distillée stérile dans un erlenmeyer puis agité pendant une minute. La suspension de spores obtenue a constitué l'inoculum. Trois bacs d'incubation contenant chacun 50 g du mélange homogène «40 g sciure de bois + 10 g maïs» ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30 min à une barre. L'inoculum est bien incorporé sous la hotte au substrat à raison de 200 ml par bac. Chaque champignon a été cultivé individuellement

pour servir de témoin. L'incubation dans les bacs a consisté à enfouir soigneusement 15 œufs provenant de la ponte du jour dans le substrat. Les bacs ont été mis à incuber à 28,28 °C, arrosé si nécessaire avec de l'eau distillée. A chaque inoculation chacun des trois bacs reçoit 15 œufs. Trois essais ont été effectués. Deux semaines après, le nombre de naissains a été déterminé et le pourcentage d'éclosion calculé selon la formule suivante :

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

NN = Nombre de Naissains

TE = Taux d'Éclosion

NO = Nombre d'Œufs

## Identification des mycotoxines par la chromatographie liquide à haute performance

### Préparation des échantillons

Les œufs issus de la/ des ponte (s) du jour ont été lavés délicatement à l'eau du robinet pour les débarrasser des résidus de substrats et d'aliments puis à l'eau distillée. Ils ont été ensuite désinfectés à l'alcool 50° puis rincer à l'eau distillée. Chacune des souches pures a été repiqué seule et associée à deux et à trois sur le milieu PDA à raison de trois boîtes de Pétri stériles par entité en présence de 15 œufs d'*Achatina fulica*. L'incubation dure dix jours.

### Extraction et dosage par CLHP des aflatoxines B1, B2, G1 et G2

Vingt grammes d'échantillon finement broyés ont été mis à dissoudre dans 100 ml de solution hydro - alcoolique (80 ml Méthanol + 20 ml H<sub>2</sub>O) pendant 12 heures. L'extraction et la purification ont été faites selon la norme ISONF EN 14123 test DN 160, adaptée aux conditions du laboratoire. Puis, après attaque, il a été procédé à la filtration sur du papier filtre Whatman dans des erlenmeyers de 100 ml et a constitué le filtrat n°1. A 50 ml du filtrat n°1, 40 ml de réactif de clarification composé de 5 g d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>[P(W<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O) hydraté a été ajouté. Après 15 min, l'extrait a été filtré et recueilli dans une ampoule à décanter et constitue ainsi le filtrat n°2 qui est le trichlorométhane (CHCl<sub>3</sub>). 10 ml de CHCl<sub>3</sub> ont été prélevés à trois reprises ; tous les extraits sont réunis et placés dans un ballon à colle rodé NS29/32 de 50 ml pour l'évaporation à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C.

Le résidu obtenu après évaporation a été dissout dans 400 µl de HCl auquel est ajouté aussitôt 4,6 ml de H<sub>2</sub>O bidistillée ou Lichrosol. Le résidu ainsi traité a été filtré deux fois à l'aide d'un filtre Rezist dans une fiole sèche. 20 ml de ce filtrat final ont été injectés dans la colonne. Au cours de l'analyse des aflatoxines, la lumière du jour a été évité, car l'aflatoxine se décompose progressivement sous l'influence de la lumière ultraviolette.

La colonne analytique utilisée est de type Supelco C18 VP-ODS-2 phase inverse, (154 x 4,6 mm) conditionnée à 40 °C avec une pré-colonne de garde de 10 x 4,6 mm.

La phase mobile est constituée d'un mélange préalable acétonitrile/ méthanol (50/50) et de ce même mélange plus de l'eau (60/40) à un débit de 1 ml min<sup>-1</sup>. La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) a permis une détection par fluorescence (excitation : 365 nm et émission : 440 nm). Le système est équipé d'une pompe qui permet la circulation des solvants dans le circuit et

d'obtenir des gradients des solvants. Le logiciel LC-Solution permet de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données.

Les injections de 100 µl. sont effectuées avec un injecteur automatique. La durée d'acquisition par l'analyse est de 25 min.

Pour la quantification des métabolites, une gamme d'étalonnage est effectuée à l'aide de substances de référence pures (aflatoxine pure).

### Extraction et dosage de l'OTA

Un échantillon de 15 g préalablement broyés et homogénéisés a été mis dans un pot plastique auquel ont été ajoutés 150 ml du mélange méthanol/hydrogénéocarbonate de sodium à 1 % (50/50 ; V/V). Une extraction a été faite à l'aide d'un Ultra Turax pendant 2 min. L'extrait a été centrifugé à 4000 tours/min pendant 5 min puis filtré à travers un papier filtre (185 mm) Whatman (Ref 066082.775) dans une éprouvette de 25 ml. La purification de l'OTA se fait grâce à des colonnes d'immuno-affinité R.Biopharm. Onze ml du filtrat obtenu a été dilué dans 11 ml de tampon Phosphate Butter Saline (PBS) et 20 ml de ce mélange ont été prélevés à l'aide d'une pipette et déposé en haut de la colonne d'immuno affinité à un débit de 2ml/min pour la purification.

La colonne a été ensuite lavée avec 10 ml de PBS (Phosphate Butter Saline) à un débit de 3 ml/min puis avec 1,5 ml du mélange méthanol/ acide acétique en trois étapes de 0,5 ml avec une pause de 1 mm entre chaque étape à un débit de 0,5 ml/min. La colonne retient alors les molécules d'OTA grâce à un gel d'anticorps monoclonaux anti-OTA. L'élution se fait après lavage de la colonne avec 1,5 ml de PBS à un débit de 5 ml/min. L'éluât est évaporé jusqu'à siccité (sécher) sous un flux d'azote à une température d'environ 50 °C. Il est de nouveau dissout dans 250 µl de la phase mobile de la CLHP. L'appareil utilisée pour la Chromatographie Liquide Haute Performance permet une détection par fluorescence (I excitation : 330 nm et I émission : 460 nm) et la technique est la même que précédemment. La colonne analytique utilisée est de type Shim A – Park VP – ODS 250 x 4.6 mm, avec une pré- colonne Shim A GVP-ODS 10 x 4,6 mm. La phase mobile est un mélange acétonitrile /eau/acide acétique (99/99/2 ; V/V/V) à un débit de 1 ml/min et la température de la colonne est de 40 °C.

Pour la quantification des métabolites, des courbes d'étalonnage ont été réalisées à partir de standards purs des différents métabolites. Nous avons utilisé de l'ochratoxine A pure qui a pour numéro CAS 303-6479 (Iarc 1993).

### Analyses statistiques

Concernant les variables taux d'éclosion, mode d'inoculation, l'analyse des variances et des valeurs moyennes a été réalisée avec la procédure GLM du programme SAS (1987) à un critère d'identification au seuil de 5 %. Ceci a permis d'identifier les variables pour lesquelles il y a une différence significative.

### RÉSULTATS

#### Effet des inocula sur le taux d'éclosion des œufs mis à incuber dans la sciure de bois stérilisée

Le tableau 2 donne le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* en présence de chaque champignon. Les taux d'éclosion sont compris entre 8,88 et 67,40 %. Le taux le plus faible est attribué à *Aspergillus niger* et le plus élevé à *Penicillium* sp. *Penicillium decumbens*, *Mucor* sp. et *Trichoderma* sp. présentent des taux inférieurs à 50 %.

Il y'a une différence significative entre les taux d'éclosion des œufs  $P = 0,02 < 0,05$ .

Les taux d'éclosion indexés de la même lettre ne sont pas statistiquement différents (seuil de 0,05) Les résultats consignés dans le tableau 2 montrent que les taux d'éclosion en présence de *Penicillium* sp. (67,40%), *Phoma* sp. (57,40%), *Fusarium oxysporum* (51,84%) sont assez importants à l'exception de ceux obtenus en présence d'*Aspergillus niger* (8,88%), *Penicillium decumbens* (23,33%), *Mucor* sp. (29,62%) et *Trichoderma* sp. (31,10%). Mais statistiquement les taux obtenus en présence de *Penicillium decumbens*, *Mucor* sp. et *Trichoderma* sp. sont identiques d'une part et d'autre part ceux en présence de *Penicillium* sp. et *Phoma* sp. sont identiques. Cependant les taux obtenus en présence d'*Aspergillus niger* et de *Fusarium oxysporum* sont différents des autres. Les taux moyens d'éclosion des œufs infectés d'*Achatina fulica* varient de 8,88 à 67,40% contre un pourcentage moyen d'éclosion de 75,04% pour les témoins.

**Tableau 2** : Pourcentages d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* infectés de champignons  
**Table 2:** Percentages hatching eggs of *Achatina fulica* infected mushrooms

Champignons	Taux moyens d'éclosion après 3 essais (%)
<i>Aspergillus niger</i>	8,88 ± 2,11 <sup>f</sup>
<i>Penicillium decumbens</i>	23,33 ± 3,70 <sup>b</sup>
<i>Mucor</i> sp.	29,62 ± 3,59 <sup>b</sup>
<i>Trichoderma</i> sp.	31,10 ± 4,89 <sup>b</sup>
<i>Penicillium</i> sp.	67,40 ± 2,61 <sup>d</sup>
<i>Phoma</i> sp.	57,40 ± 3,27 <sup>c</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i>	51,84 ± 4,36 <sup>c</sup>
Témoin	75,04 ± 1,78 <sup>a</sup>

#### Effet de l'association de champignons sur le taux d'éclosion

A l'issue de l'association deux à deux des champignons, le tableau 3 présente les différents

résultats obtenus.

Les taux d'éclosion indexés de la même lettre ne sont pas statistiquement différents (seuil de 0,05)

**Tableau 3** : Pourcentages d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* infectés par l'association des champignons  
**Table 3:** Percentages of hatching eggs of *Achatina fulica* infected by the Association of Mushrooms

Champignons associés	Taux moyens d'éclosion après 3 essais (%)
<i>Mucor</i> sp. - <i>Penicillium decumbens</i>	53,32 ± 2,06 <sup>b</sup>
<i>Penicillium</i> sp. - <i>Phoma</i> sp.	46,66 ± 2,59 <sup>c</sup>
<i>Mucor</i> sp.- <i>Fusarium oxysporum</i>	7,4 ± 0,98 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus niger</i> - <i>Penicillium decumbens</i>	8,8 ± 1,58 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus niger</i> - <i>Penicillium decumbens</i> - <i>Mucor</i> sp.- <i>Trichoderma</i> sp.	42,95 ± 1,96 <sup>c</sup>
<i>Aspergillus niger</i> - <i>Penicillium decumbens</i> - <i>Mucor</i> sp.	5,18 ± 1,56 <sup>a</sup>

**Mycotoxines identifiées chez les champignons**

Les aflatoxines et l'ochratoxine A sont les toxines détectées au niveau de chacun et de l'association

des champignons (Tableau 4 ; Tableau 5). Les figures 1 à 6 représentent les différents chromatogrammes.

**Tableau 4 :** Mycotoxines Identifiées et quantifiées à partir de champignons cultivés en présence des œufs d'*Achatina fulica*

**Table 4:** Mycotoxins Identified and quantified from fungi grown the presence of eggs of *Achatina fulica*

	Aflatoxine G2	Aflatoxine G1	Aflatoxine B2 (µg /kg)	Aflatoxine B1	Ochratoxine A
<b>Champignons</b>					
<i>Aspergillus niger</i>	14	N/D	N/D	5,7	0,15
<i>Fusarium Oxysporum</i>	4,227	2,420	N/D	0,564	0,13
<i>Mucor sp.</i>	65	N/D	N/D	N/D	0,09
<i>Penicillium decumbens</i>	174	N/D	N/D	26	N/D
<i>Penicillium sp.</i>	N/D	100	N/D	N/D	0,10
<i>Phoma sp.</i>	N/D	N/D	N/D	392,7	N/D
<i>Trichoderma sp.</i>	34	N/D	N/D	N/D	0,15

N/D = Non Détecté

**Tableau 5 :** Mycotoxines identifiées et quantifiées à partir de l'association champignons cultivés et le taux d'éclosion des œufs

**Table 5:** Mycotoxins identified and quantified from the association cultivated mushrooms and egg hatchability

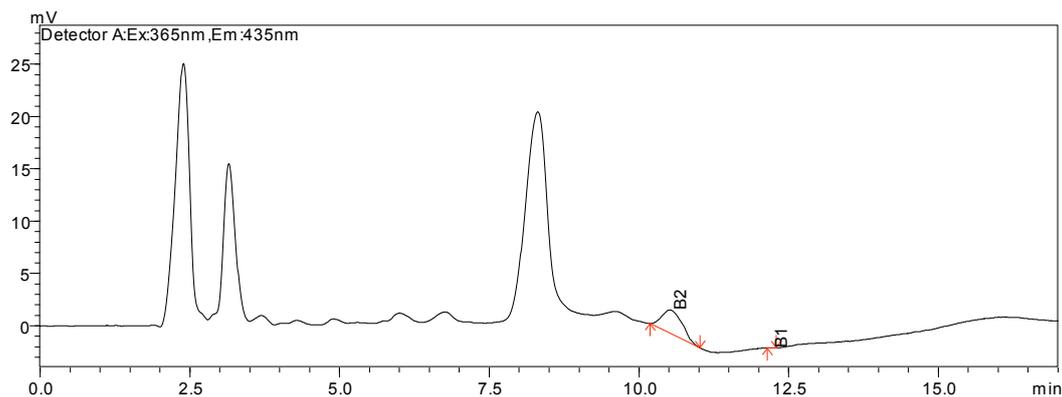
	Mycotoxines (µg /kg)			
Aflatoxines	G2	G1	B2	B1
<b>Champignons</b>				
<i>Mucor sp. - Penicillium decumbens</i>	0,035	2,202	N/D	0,162
<i>Penicillium sp. - Phoma sp.</i>	N/D	N/D	0,090	0,014
<i>Mucor sp.- Fusarium oxysporum</i>	4,128	N/D	0,081	1,784
<i>Aspergillus niger- Penicillium decumbens</i>	3,199	0,026	N/D	N/D
<i>Aspergillus niger- Penicillium decumbens-</i>				
<i>Mucor sp.- Trichoderma sp.</i>	4,224	N/D	0,094	0,008
<i>Aspergillus niger- Penicillium decumbens-</i>				
<i>Mucor sp.</i>	0,037	2,049	0,001	0,730

**Chromatogrammes des différentes associations**

Name	Ret Time	Area	Concentration (µg/kg)	LD	LQ
G2	7,469	6998	0.035	0.0025	0.0084
G1	8,919	406599	2.202	0.11	0.38
B2	12.471	38	0	0.00003	0.0001
B1	15.292	1103	0.162	0.006	0.02

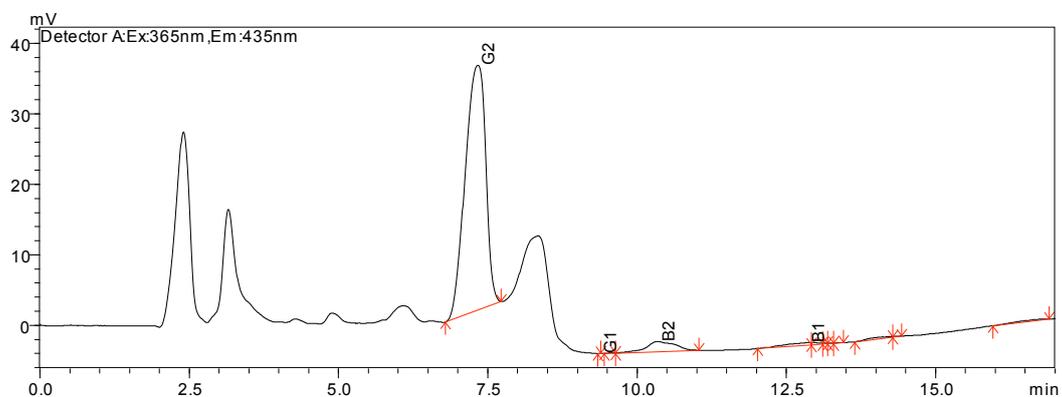
LD = Limite de Détection

LQ = Limite de Quantification



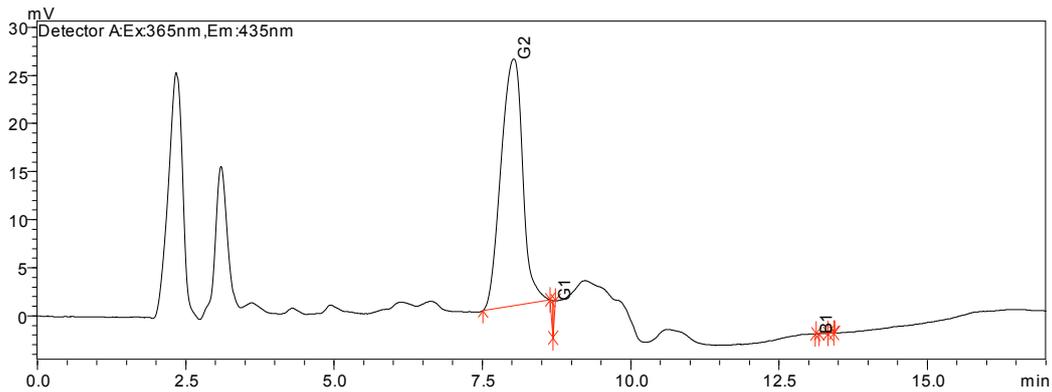
**Figure 1:** Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Mucor* sp. + *Penicillium decumbens*  
**Figure 1:** Chromatogram of aflatoxins identified at *Mucor* sp. + *Penicillium decumbens*

Name	Ret Time	Area	Concentration (µg/kg)	LD	LQ
G2	7,469	0	0	0.0025	0.0084
G1	8,919	0	0	0.11	0.38
B2	12.471	54486	0.09	0.00003	0.0001
B1	15.292	96	0.014	0.006	0.02



**Figure 2 :** Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Penicillium* sp. + *Phoma* sp.  
**Figure 2:** Chromatogram of aflatoxins identified at *Penicillium* sp. + *Phoma* sp.

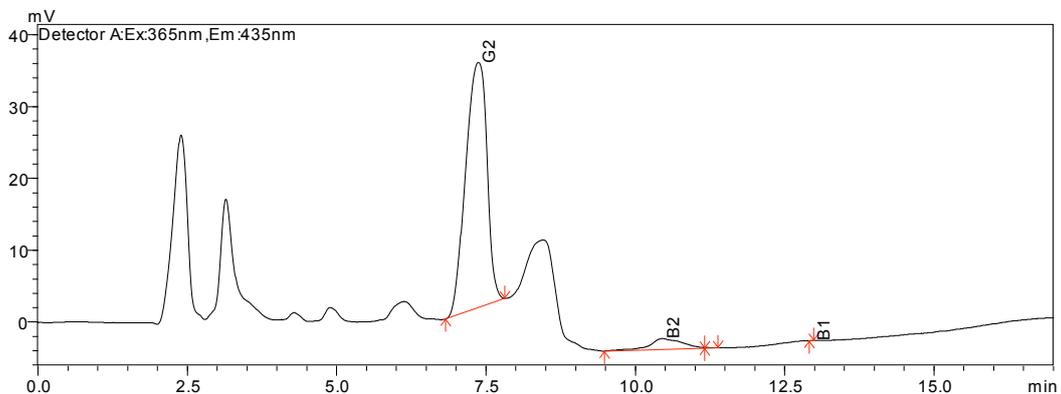
Name	Ret Time	Area	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LD	LQ
G2	7,469	831309	4.128	0.0025	0.0084
G1	8,919	16	0	0.11	0.38
B2	12.471	48793	0.081	0.00003	0.0001
B1	15.292	12148	1.784	0.006	0.02



**Figure 3 :** Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Mucor sp.* + *Fusarium oxysporum*

**Figure 3:** Chromatogram of aflatoxins identified at *Mucor sp.* + *Fusarium oxysporum*

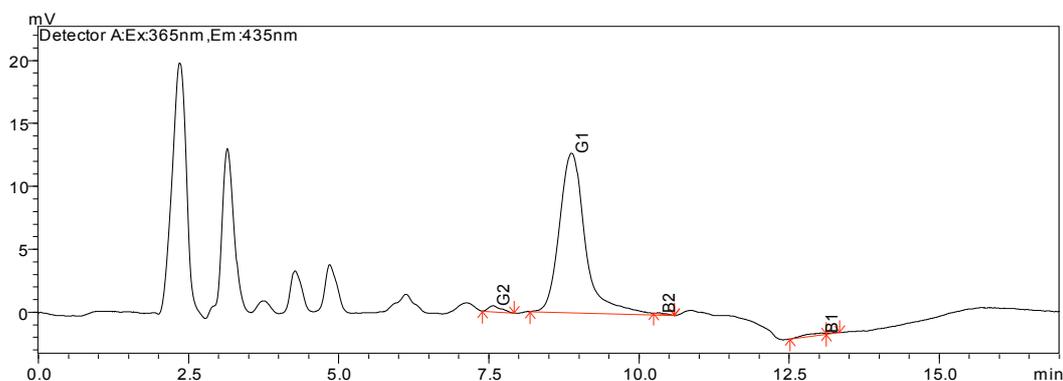
Name	Ret Time	Area	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LD	LQ
G2	7,469	644186	3.199	0.0025	0.0084
G1	8,919	4801	0.026	0.11	0.38
B2	12.471	0	0	0.00003	0.0001
B1	15.292	3	0	0.006	0.02



**Figure 4:** Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau d'*Aspergillus niger* + *Penicillium decumbens*

**Figure 4:** Chromatogram of aflatoxins identified at *Aspergillus Niger* + *Penicillium decumbens*

Name	Ret Time	Area	Concentration (µg/kg)	LD	LQ
G2	7,469	850721	4.224	0.0025	0.0084
G1	8,919	0	0	0.11	0.38
B2	12.471	56674	0.094	0.00003	0.0001
B1	15.292	53	0.008	0.006	0.02



**Figure 5 :** Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau d'*Aspergillus niger* + *Penicillium decumbens* + *Mucor* sp. + *Trichoderma* sp.

**Figure 5:** Chromatogram of aflatoxins identified in *Aspergillus Niger* + *Penicillium decumbens* + *Mucor* sp. + *Trichoderma* sp

Name	Ret Time	Area	Concentration (µg/kg)	LD	LQ
G2	7,469	7452	0.037	0.0025	0.0084
G1	8,919	378313	2.049	0.11	0.38
B2	12.471	758	0.001	0.00003	0.0001
B1	15.292	4965	0.730	0.006	0.02

**Figure 6 :** Chromatogramme des aflatoxines identifiées au niveau de *Aspergillus niger* + *Penicillium decumbens* + *Mucor* sp.

**Figure 6:** Chromatogram of aflatoxins identified in *Aspergillus Niger* + *Penicillium decumbens* + *Mucor* sp.

## DISCUSSION

Après l'inoculation des œufs avec chaque champignon, il y a eu production de mycotoxines par chacun d'eux. La présence de ces toxines a eu un effet assez négatif sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*. Les aflatoxines produites restent très peu toxiques pour les œufs d'*Achatina fulica* en présence de l'association *Aspergillus niger*-*Penicillium decumbens*-*Mucor* sp.-*Trichoderma* sp. Les œufs mis à incuber en présence de ses 4 champignons donnent un taux d'éclosion de 42,95<sup>a</sup> ± 1,96 %. Ceci est du probablement à la quantité d'AFB1 (0,008 µg /kg) qui est très faible.

*Penicillium* sp. - *Phoma* sp. associés produisent une quantité totale d'aflatoxine de 0,104 µg /kg avec 0,014 µg /kg pour l'AFB1. Ses quantités restent très faibles au vu des normes. Les œufs mis à incuber en présence de ses deux champignons donnent un taux d'éclosion de 46,66<sup>a</sup> ± 2,59% dû probablement à la faible toxicité de cette association. Ses deux associations avec des champignons différents produisent pratiquement le même effet sur les œufs. Le champignon réagit probablement en fonction de celui qu'il a en face.

*Mucor* sp. - *Penicillium decumbens* associés produisent une quantité totale d'aflatoxine qui est

de 2,399 µg /kg avec 0,162 µg /kg pour l'AFB1. Le taux d'éclosion des œufs en présence de ses 2 champignons est de  $53,32^b \pm 2,06\%$ . Ce taux au dessus de la moyenne pourrait s'expliquer par le fait qu'aucun de ses deux champignons se soient arrivés à neutraliser l'autre malgré la quantité d'AFB1 qui est un peu plus élevée que celle des deux premières associations. Cette troisième association *Mucor* sp. - *Penicillium decumbens* pourrait être qualifiée d'association à caractère bénéfique pour les œufs. Les taux d'éclosion en présence de chacun des deux champignons restent faibles. Mais associés, le taux est au dessus de la moyenne.

Compte tenu du fait que les quantités d'aflatoxines détectées soient toutes en dessous de la norme fixée par la réglementation européenne, il y a probablement eu antagonisme entre les deux champignons ce qui a conduit à une additivité des taux d'éclosion.

Dans le monde vivant, l'association pose toujours un problème de compétition pour l'espace, la nourriture et la production de mycotoxines. Selon Pfohl - Leszkowicz (2001) et Tabuc (2007), la présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs et la toxicité de la matière contaminée (Miller, 1991). Les résultats obtenus au cours du travail sont en accord avec cette affirmation. La toxicité des aflatoxines G1, B2 et G2 sont respectivement 50, 80 et 90% moindre que celle de l'AFB1 (Cole et Cox, 1981). Cette assertion confirme également les résultats. *Aspergillus niger*- *Penicillium decumbens*- *Mucor* sp. associés produisent une quantité d'aflatoxine totale qui de 2,817 µg /kg et celle de l'AFB1 est de 0,730 µg /kg toutes selon (C.E. 2007) sont respectivement inférieures à la norme (4 µg /kg et 2 µg /kg).

Les œufs mis à incuber en présence de ses 3 champignons donnent un très faible taux d'éclosion de  $5,18^a \pm 1,56\%$ .

*Mucor* sp.- *Fusarium oxysporum* associés produisent une quantité d'aflatoxine totale qui de 5,993 µg /kg > 4 µg /kg avec 1,784 µg /kg pour AFB1. En présence de ses deux champignons le taux d'éclosion est de  $7,4^a \pm 0,98\%$ . L'effet de l'AFB1 bien qu'inférieur à 2 µg /kg agit négativement sur les œufs en réduisant considérablement les taux d'éclosion dans les deux associations.

*Aspergillus niger*- *Penicillium decumbens* associés produisent une quantité d'aflatoxine totale qui

de 3,225 µg /kg. Les œufs mis à incuber en présence de ses deux champignons donnent un taux d'éclosion de  $8,88^a \pm 1,58\%$ . L'AFB1 n'a pas été détecté ici. Mais le pouvoir pathogène et antagoniste d'*Aspergillus niger* a pris le dessus dans l'association ce qui pourrait expliquer le faible taux d'éclosion obtenu. Selon Howell, (2003) il est reconnu comme une espèce toxique, pathogène et est très rapidement envahissant. En sa présence, les œufs qui éclosent, donnent de très petits naissains qui après deux semaines d'incubation restent enfermés dans leur coque. Les œufs non éclos se ramollissent (Dedi et al., 2012). Ses dires confirment le résultat. *Aspergillus niger* seul ou associé a été très pathogène pour les œufs d'*Achatina fulica*.

Au niveau moléculaire, les mycotoxines agissent en inhibant la synthèse des protéines, de l'ADN et l'ARN, et inhibent également la duplication de l'ARN (Peter, 2003). La vitellogenèse est la formation et l'accumulation du vitellus qui se situe dans le cytoplasme de l'œuf et il sert de réserve nutritive à l'embryon qui l'utilisera pour l'édification de ses tissus.

Les protéines faisant parti des réserves nutritives, lorsque leur synthèse est inhibée, il y a arrêt du développement puis la mort de l'embryon car privé de ses réserves. Ceci pourrait expliquer le très faible taux d'éclosion des œufs en présence :

- d'*Aspergillus niger* où a été détecté un fort taux d'aflatoxine B1 ;
- de l'association *Aspergillus niger* - *Penicillium decumbens*-*Mucor* sp. où les aflatoxines G2, G1, B2 et B1 ont été détectés ;
- de l'association *Mucor* sp.-*Fusarium oxysporum* où sont présents les aflatoxines G2, B2 et B1.

Selon Peter (2003), le deuxième mécanisme à travers lequel agissent les mycotoxines est le déclenchement de la mort programmée des cellules (apoptose). Cette mort se caractérise par la rétraction de la cellule, la pycnose du noyau, une condensation de la chromatine, le clivage de l'ADN en fragments. Ce deuxième mécanisme moléculaire expliquerait le dessèchement des œufs en présence d'*Aspergillus niger*, *Penicillium decumbens*, *Mucor* sp. et *Trichoderma* sp. lors de l'inoculation individuelle. Ce dessèchement est lié à la réaction de chaque champignon malgré que l'inoculation soit faite dans les mêmes conditions.

## CONCLUSION

Les mycotoxines identifiées et quantifiées au cours de notre étude étaient à très faibles doses dans l'ensemble. Mais malgré cela, elles ont agi en réduisant fortement le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*. A très faible dose les taux restent plus ou moins significatifs. Seule l'association *Mucor* sp.- *Penicillium decumbens* donne un taux d'éclosion supérieur à la moyenne (50 %) qui est de 53,32 % qui peut être considéré comme une association à caractère bénéfique pour les œufs d'*Achatina fulica*. La présence simultanée de plusieurs champignons sur le même substrat a eu un effet négatif sur le taux de production de mycotoxines par ces derniers qui par moment a eu un petit effet positif sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica*.

Les différents taux d'éclosion des œufs en présence d'*Aspergillus niger* seul ou associé restent très faibles à l'exception de l'association *Aspergillus niger*-*Penicillium decumbens*-*Mucor* sp.-*Trichoderma* sp.

## REFERENCES

- AFSSA. 2006. "Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique"
- AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). 2009. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animales. Rapport final 13-45.
- Barnett H. L., Hunter B. 1972. Illustrated genera of imperfecti fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, USA, (1972) 241.
- Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz A. 2002. Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec & Doc, 5 p.
- Champion R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) 147, rue de l'Université, 75338 Cedex 07, (1997) 398.
- Codjia J. T. C., Noumvi C. G. N. 2002. Guide technique d'élevage N°2 sur les escargots géants. Éditeur B.E.D.I.M, Gembloux. 8 p.
- Cole R. J., Cox R. H. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites, New York: Academic Press, 894-897.
- C.E. 2007. Rapport portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs / *Off Union Eur*, PP. 1-255.
- Dedi K. J. 2007. 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), 54p.
- Dedi J., Otchoumou A., Allou K. 2012. Identification de mycotoxines à partir d'*Aspergillus niger* et *Penicillium decumbens* en présence d'œufs d'*Achatina fulica*. Revue CAMES – Serie A, Sciences et Médecine 13 (2) : 86-90.
- Delahaye A., (2011). Généralités sur les champignons microscopiques, 5 p.
- Guinberteau J., Joly P., Nicot J., Olivier J. M. 2015. « Champignons »
- Encyclopædia Universalis* [en ligne], 16p URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/champignons/>
- Hoffman T., Pirie N. 2014. *Achatina fulica* giant African snail. Animal diversity Web. [http://animaldiversity.org/accounts/Achatina\\_fulica/](http://animaldiversity.org/accounts/Achatina_fulica/)
- Howell C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Diseases: Journals of American Phytopathological Society 87: 4-10.
- Hussein S. H., Brasel J. M. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology., 167, 101-134.
- IARC, (1993). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, volume 56, IARC, Lyon. 33 p.
- Karamoko M., Kouassi K. D., Kouassi K. P., Otchoumou A. 2008. Inventaire des végétaux sauvages consommés par l'escargot *Limicolaria flammea* (Müller)

- 1774) et préférences alimentaires. *Livestock Research for Rural Development* 20 (12)
- Kubena L. F., Phillips T. D. 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 807– 820.
- Miller J. D. 1991. Significance of grain mycotoxins for health and nutrition. In: *Fungi and Mycotoxins in Stored Products*. Champ, B R, Highley, E, Hocking, A D and Pitt, J I (eds). ACIAR Proceedings. Canberra, Australia, 36: 126-135.
- Nguyen M. T. 2007. Identification des espèces des moisissures potentiellement productrices des mycotoxines dans les riz commercialisés dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, 147 p.
- O'callaghan J., Caddick H. X. et Dobson A. D. W. 2003. A polyketide synthase gene required for achatoxin biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology*, 149: 345-349.
- Otchoumou A., Dupont-Nivet M., Dosso H. 2004a. Les escargots comestibles de Côte d'Ivoire: effet de quelques plantes, d'aliments concentrés et de la teneur en calcium alimentaire sur la croissance d'*Archachatina ventricosa* (Gould 1850) en élevage hors sol en bâtiment. *Tropicicultura* 22 (3) 127-133.
- Peter S. 2003. Comment agissent les mycotoxines au niveau moléculaire. *Feedind Times*, 7 (3) 11 p.
- Pfohl-Leszkowicz A. 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation : évolution et gestion des risques, Ed. lavoisier Tec et Doc, Paris., 42 – 47 pp.
- Pfohl-Leszkowicz A. 2001. Définition et origins des mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Tec & Doc, PP. 3-14.
- Quillien J.F. 2002. Les mycotoxines. Flair Flow Europe 4. INRA France. PME 3 : 24 p.
- Raut S. K. 1993. Quelques pathogènes d'*Achatina* et leur influence sur la production d'escargots géants africains / Some pathogens of *Achatina* and their influence on the production of giant African Snails. Bulletin semestriel d'information sur le mini-élevage BEDIM (FAO / CTA / IMT), 2 (2) : 9 -10. Quelques
- Rowson B., Warren & Ngereza C. 2010. Les mollusques terrestres de l'île de Pemba, à Zanzibar, en Tanzanie et son statut de île océanique *Zookeys* 70. doi : 10, 3897.
- Tabuc C. 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat : Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT)- Université de BUCAREST. Spécialité : Pathologie, mycologie, génétique et nutrition 190p.
- Tedesco D., Tava A., Galletti S., Tameni M., Varisco G., Costa A., Steidler S. 2004. Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 2239–2247.