

# MOLECULAR GENETICS TO DIFFERENCIATE RADULA MORPHOLOGY FROM SPECIES OF YHE FAMILY OF ACHATINIDAE (MOLLUSCA, GASTROPODA, AND PULMONATA) IN DEMOCRATIC REPUBLIC OF CONGO

**Kebolo B Andre<sup>1</sup>, Longo – Mbenza Benjamin<sup>2</sup>, Palata K Vandewalle P<sup>3</sup>, Palat K<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, BP. 190, Kinshasa XI, <sup>2</sup>Walter Sisulu University, Faculty of Health Sciences, Mthatha, South Africa, <sup>3</sup>Université de Liège, Faculté des Sciences, Laboratoire de Morphologie fonctionnelle et évolutive. B-4000 Liège, Belgique*

**Corresponding Author:** Prof Benjamin Longo-Mbenza, E-mail: longombenza@gmail.com

**Submitted:** August 2016, **Accepted:** July 2017

## ABSTRACT

The structure of Radula and the phylogenetic Dendron of selected Congolease Geant Achatinidae, Mollusca, Gastropoda, and Pulmonata (Nails) were differentiated according to their nuclear and mithochondrial genes within Department of Biology, University of Kinshasa, DRC, between 2009 and 2014. Animals were obtained from 4 sites through the West of DRC. Laboratory of Molecular and Systematic Biology, University of Liege, Belgium, used both morphological (Optic and electronic microscopy) and genetic (Cytochrome Oxydase) methods to characterize individuals. Animals were belonging to 2 species of Achatinidae with genes B2A, B3A, and BSA, different from A.fulica. Five species and two sub – species presented homogeneity to some degree according to their phylogenetic polymorphism and specific morphology of Radula.

**Key words:** Geant Nails, Radula, Morphology, Phylogenetic Polymorphism, DR Congo

### Access this article online

**Website:** <https://www.satagroup.org>

**DOI:** 10.18644/jiresh-biotech.0000047

**E-ISSN:** 2413-7669 (Online)

# GENETIQUE MOLECULAIRE POUR LA MORPHOLOGIE DES ESPECES DE LA FAMILLE DES ACHATINIDAE (MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA) EN REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO

Kebolo B Andre<sup>1</sup>, Longo – Mbenza Benjamin<sup>2</sup>, Palata K Vandewalle P<sup>3</sup>, Palat K<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, BP. 190, Kinshasa XI, <sup>2</sup>Walter Sisulu University, Faculty of Health Sciences, Mthatha, South Africa, <sup>3</sup>Université de Liège, Faculté des Sciences, Laboratoire de Morphologie fonctionnelle et évolutive. B-4000 Liège, Belgique

**Corresponding Author:** Prof Benjamin Longo-Mbenza, E-mail: longombenza@gmail.com

**Submitted:** August 2016, **Accepted:** July 2017

## RESUME

La structure de la radula et l'arbre phylogénétique des espèces congolaises d'escargots géants (Achatinidae, Mollusca, Gastropoda, Pulmonota) sur base de gènes mitochondriaux et nucléaires ont été analysés au Département de Biologie de l'Université de Kinshasa entre 2009 et 2014, afin de les différencier. Les escargots ont été récoltés dans 4 sites différents répartis dans deux régions de la RD Congo. L'observation de ces radulas au microscope ordinaire et au microscope électronique à balayage, a révélé que la morphologie de la radula varie en fonction des espèces, et même au sein de l'espèce en fonction de lieu de récolte des animaux. Cette variabilité morphologique était significative et due au polymorphisme génétique ou à la plasticité phénotypique. En effet, l'examen des radulas au microscope électronique a permis d'observer les structures des radulas avec précision. Les individus appartenaient à 2 espèces des Achatinidae: d'une part, les gènes B1A, INO3 et INO4 qui étaient ensemble et formaient un groupe avec *A. banderiana*; d'autre part, les gènes B2A, B3A et B5A formaient un groupe distinct voisin d'*A. fulica*. Ceci constitue un atout majeur pour observer les structures de radula et la biologie moléculaire dans leurs moindres détails, afin d'éviter toute ambiguïté dans la détermination des espèces des Achatinidae. Cinq espèces et deux sous-espèces ont été identifiées, et la phylogénie a révélée une certaine homogénéité entre les individus de différents sites.

**Mots clés:** Escargots géants africains, Radula, Morphologie, Polymorphisme phylogénétique, RD Congo

## 1. INTRODUCTION

Les escargots géants terrestres appartiennent à la Classe des Gastropodes, de la Famille des Achatinidae, Sous-famille des Achatininae (1, 2).

La famille des Achatinidae est représentée en Afrique avec un nombre d'espèces de l'ordre de 200 espèces réparties en 13

genres (3), ou 65 à 80 espèces (2) regroupées en 8 sous-genres d'*Achatina*, selon les auteurs. C'est parmi les achatines que l'on trouve tous les escargots géants d'Afrique. La plupart des gastropodes géants terrestres se rencontre dans la forêt qui, selon Bruggen (3), devrait être considérée comme leur centre de l'évolution.

Actuellement, la répartition des Achatinidés s'étend pratiquement à travers toute l'Afrique subsaharienne, à partir du Sénégal (15°N) dans la région Ouest du lac Tchad, jusqu'au Sud de l'Égypte, Sud de l'Éthiopie et l'Est de la Somalie. Ils s'étendent aussi jusqu'en Afrique du Sud. Toutefois, c'est l'Afrique centrale, de l'Ouest et de l'Est qui présentent la plus grande richesse en Achatinidés. Quant à la diversité des

### Access this article online

**Website:** <https://www.satagroup.org>

**DOI:** 10.18644/jiresh-biotech.0000047

**E-ISSN:** 2413-7669 (Online)

Achatinidae, elle est faible en Afrique australe. La richesse la plus importante des achatinidés concerne surtout deux genres principaux: *Achatina* et *Archachatina* (4).

Dans le passé, la taxonomie des gastéropodes était largement basée sur les caractères morphologiques du taxon, telles que les caractéristiques de la coquille, l'anatomie interne, incluant la structure de la radula et les détails du système reproducteur. Actuellement, à ces caractères morphologiques, sont aussi associées les caractéristiques moléculaires de l'ADN et de l'ARN (5).

La radula est typique des gastéropodes. C'est une de langue cornée revêtue d'une lamelle, portant plusieurs rangées transversales de petites dents chitineuses, formant une râpe, que l'on trouve dans la cavité buccale des Mollusques, sauf des Lamellibranches ou Bivalves qui sont des organismes filtreurs (6, 7).

La radula fonctionne en faisant des mouvements de va et vient grâce aux muscles qui s'attachent à l'odontophore, sorte de plaque rigide qui supporte la radula. Les dents qui s'usent à l'avant sont remplacées progressivement par de nouvelles dents à l'arrière de la radula (fonctionnement en tapis roulant) (6, 8).

La forme, la taille, la couleur et la disposition des dents de la radula sont des caractères utilisés en systématique pour définir des grands groupes comme des familles, mais aussi des niveaux taxonomiques plus petits comme des genres ou des espèces (9, 7). Toutefois, les questions demeurent sans réponses: une analyse moléculaire produira-t-elle des résultats similaires à ceux de l'anatomie et de la morphologie d'organes peu plastiques comme la radula et l'organisation des organes génitaux des 3 espèces de la famille des Achatinidae (*Mollusca*, *Gastropoda*, *Pulmonata*) En République Démocratique Du Congo? C'est dans ce sens que la structure de la radula et l'arbre phylogénétique des 3 espèces congolaises d'escargots géants (Achatinidae, *Mollusca*, *Gastropoda*, *Pulmonota*) sur base de gènes mitochondriaux et nucléaires, ont été analysés.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Présentation du milieu

Cette étude a été réalisée entre 2009 et 2014 dans deux Provinces: forêt d'Ikalata (Inongo), Province de Bandundu, reclus forestiers du Centre Spirituel de Marenza (Kimwenza), du Prieuré Notre Dame de l'Assomption et de l'entreprise SafGaz, Ville Province de Kinshasa (Figure 1).

#### 2.1.1. Sites de récolte

Les escargots ont été récoltés dans quatre sites de la RDC, à savoir forêt d'Ikalata (Inongo), reclus forestiers du Centre

Spirituel de Manresa (Kimwenza), du Prieuré Notre Dame de l'Assomption (Monastère) et de l'entreprise SafGaz (Figure 1).

La forêt d'Ikalata est située à environ 7 km d'Inongo dans la Province de Bandundu, à 18°17'0.00" longitude Est et à 1°56'0.00" latitude Sud. La végétation est généralement caractérisée par des groupements semi-aquatiques et aquatiques, un faciès arbustif et un faciès arborescent longeant les affluents du lac Mai-Ndombe. Pendant l'exondaison, le groupement à *Loudetia phragmitoides* et *Andropogon schirensis* persiste sur un sol argilo-sableux noirâtre gréseux, d'origine forestière et semble très favorable à certaines espèces, dont *Arachis hypogaea* et *Zea mays*. À côté de ce groupement, il y a celui à *Fimbristylis dichotoma* et *Solenostemon monostachyus* qui prend également possession du substrat boueux du lac Mai-Ndombe (10).

Le reclus forestier du Centre spirituel de Manresa (Kimwenza) est situé à 5 km au Sud-est de l'Université de Kinshasa à 4°27'31" Sud et 15°17'37" Est, à 451 m d'altitude (11) (Figure 1). Ce reclus forestier est caractérisé par trois types de strates: la strate arborescente, la strate arbustive et la strate herbacée. La végétation de cette forêt secondaire est dominée par *Hymenocardia ulmoides* Oliv. et *Caloncoba welwitschii* (Oliv.) Gilg., selon Devred (12).

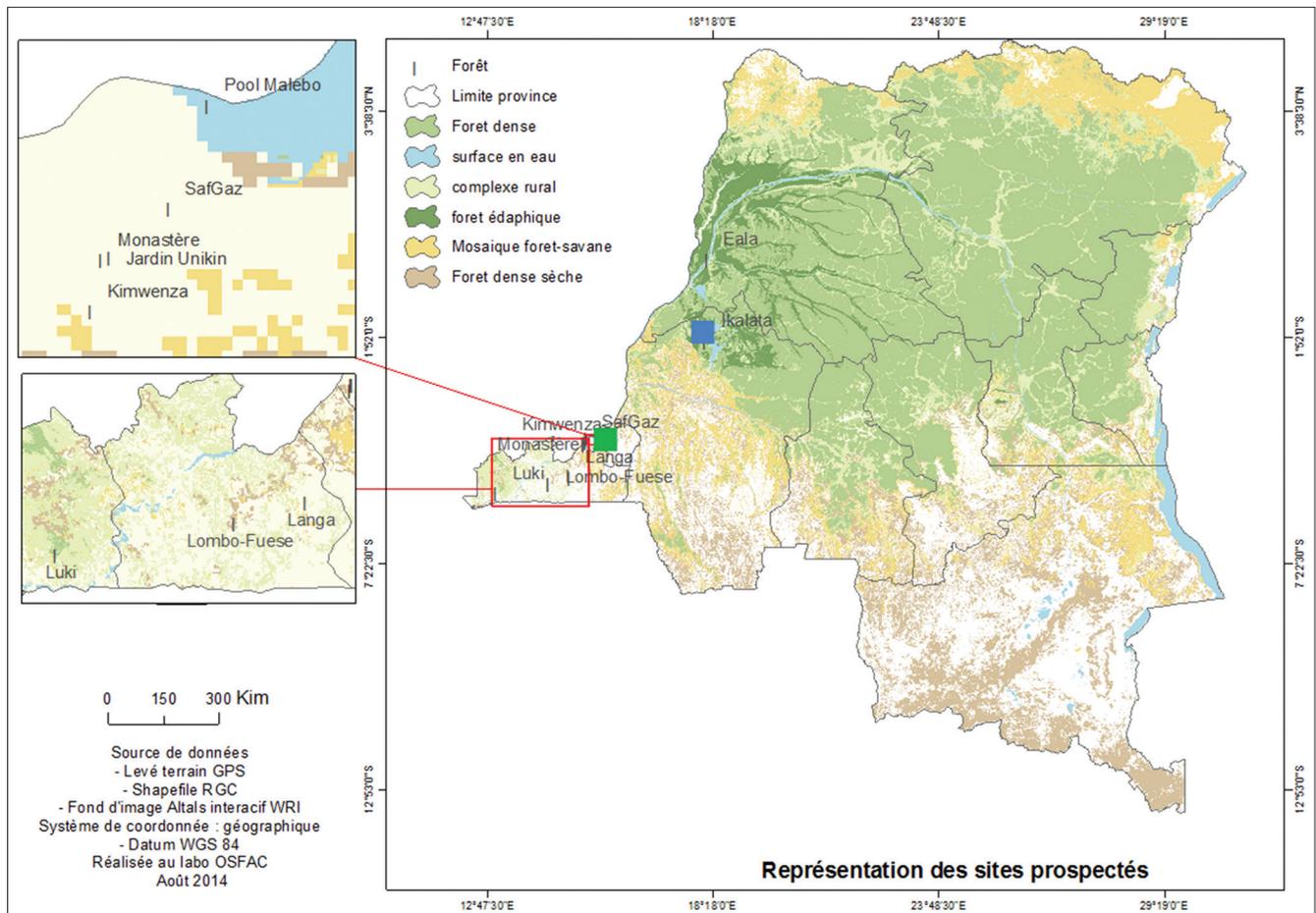
Le reclus forestier du Prieuré Notre Dame de l'Assomption (Monastère) est situé à environ 1 Km au Sud de l'Université de Kinshasa à 4°25'7.80"S et 15°18'4.04"E (11) (Figure 1). Ce site représente un reclus forestier d'une ancienne formation semi-sempervirente dans laquelle on distingue trois types de strates: la strate arborescente, la strate arbustive et la strate herbacée où domine une fabacée, *Millettia laurentii* De Wild. (12).

Le reclus forestier de l'entreprise SafGaz est situé à environ 500 m du pont Matete, à proximité de la rivière Matete, dans la partie-Est de la ville de Kinshasa à 4°22'45.56"S et 15°21'12.16"E (Figure 1). Ce reclus forestier est caractérisé par trois types de strates: la strate arborescente, la strate arbustive et la strate herbacée. La végétation de cette forêt est dominée par *Samanea saman* (Jacq.) Merril, *Xanthosoma mafaffa* et *Cyperus papyrus* L.

Ces trois derniers sites jouissent d'un climat du type AW4 suivant la classification de Köppen, caractérisé par un climat chaud et humide avec deux saisons sèches (de mi-janvier à mi-février et de mi-mai à mi-septembre) et deux saisons pluvieuses (de mi-septembre à mi-janvier et de mi-février à mi-mai) (13).

### 2.2. Récolte des échantillons

La récolte des escargots a été faite à la surface des feuilles mortes, sous le tapis végétal, sur les feuilles, branches et



**Figure 1:** Représentation des sites prospectés (source: OSFAC, 2014). ■ Région de Bandundu (Ikalata). ■ Région de Kinshasa (Kimwenza, Monastère, Safgaz/Safricas)

troncs d'arbres. Cette récolte avait lieu le plus souvent pendant la saison des pluies, car pendant la saison sèche, beaucoup d'escargots s'enterrent.

Après la récolte, les escargots ont été ramenés au laboratoire pour être pesés au moyen d'une balance de précision, Kern 440-35 N (précision = 0,01 g). La longueur et la largeur de chaque escargot ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse (précision = 0,02).

Pour l'identification des spécimens, les critères morphologiques utilisés sont la couleur et l'aspect de la coquille, la forme de l'apex, l'ornementation de la coquille, l'aspect de la suture, la présence ou l'absence de bordure coquillière, la couleur et la texture de la chair et la présence d'un repli dentelé en forme de "V" à l'extrémité de la sole pédieuse (2, 14).

Vingt-cinq spécimens de chaque site ont été disséqués selon les méthodes préconisées par Beaumont *et al.* (15). La mise en évidence de la langue cornée (radula) a été effectuée suivant la procédure classique, et la radula a été observée au microscope optique au Département de Biologie de

l'Université de Kinshasa et au microscope électronique à balayage (SEM; Jeol JSM-35 operating at 25 kV) du Musée Royal de l'Afrique Centrale de Tervuren (Belgique). Treize escargots géants dont dix de l'espèce *Achatina bandeirana* et trois de l'espèce *Limicolaria flammea*, appartenant à la famille des achatinidae, et issus des œufs pondus en captivité, ont été soumis à un suivi durant une période allant de juin 1995 à août 1997, au Département de Biologie de l'Université de Kinshasa. L'âge de la maturité sexuelle pour ces deux espèces a été atteint à 18 mois, et le nombre moyen d'œufs pondus était respectivement de  $42,4 \pm 0,35$  et  $37,5 \pm 0,39$ . Toutefois, le poids moyen obtenu après l'âge de la maturité sexuelle était respectivement de  $53,15 \pm 0,49$  g et  $46,14 \pm 0,42$  g.

Tenant compte de ces résultats, et dans le souci d'approfondir notre étude, 754 autres escargots appartenant à la même famille des achatinidae, ont été récoltés entre 2009 et 2014 dans quatre régions de l'ouest du pays (Equateur, Bandundu, Kinshasa, Kongo Central), parmi eux, seuls 26 individus ont produit 222 œufs, et les autres ont été utilisés pour les analyses morphologiques (externe et interne), avec l'appui des analyses moléculaires.

Le kit “DNeasy Tissue”(Quiagen#69506) a été utilisé pour l'extraction d'ADN total à partir des échantillons des escargots géants. L'amplification des gènes a été obtenue par la technique de FICHA Polymerase Chain Reaction(PCR). L'arbre phylogénétique a été produit à partir de 16 séquences de la cytochrome oxydase et la méthode de distance (Neighbour – Joining) pour différentes espèces appartenant à la famille des Achatinidae.

Cette génétique moléculaire a utilisé le Cytochrome Oxydase 1 (COI) (Laboratoire de Systématique Moléculaire, Dr Alain Vanderpoorten, Université de Liège, Belgique).

La méthode du Maximum de Vraisemblance a été utilisée. Le programme PAUP et la méthode de reconstruction ont servi à calculer le coefficient de similarité  $I > 0.97$ .

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Récolte des animaux

Au total, 449 spécimens ont été récoltés dans quatre sites, dont 158 spécimens dans la forêt d'Ikalata, 46 dans le recû forestier de Kimwenza, 170 spécimens dans le recû forestier du Monastère et 75 individus dans le recû forestier de l'entreprise SafGaz.

#### 3.2. Identification des animaux

L'examen des caractères morphologiques de la coquille a permis de déterminer les espèces, *Achatina balteata* (Reeve, 1849) de la forêt d'Ikalata (Inongo) (Figure 2), *Achatina bandeirana* (Morelet, 1886) du recû forestier du Monastère (Figure 1) et *Archachatina marginata suturalis* (Philippi, 1849) du recû forestier de l'entreprise SafGaz (Figure 3).

#### 3.3. Etude de la radula

Au total, 100 radulas ont été examinées au microscope optique, à raison de 25 radulas par population et par site.

##### 3.3.1. Observation au microscope optique (grossissements 4 X et 10 X)

###### 3.3.1.1. Forêt d'Ikalata à Inongo (province de Bandundu)

La radula est formée de dents uniformes et disposées en rangées parallèles. La forme de dents est plus ou moins polygonale aux contours irréguliers. Des sillons constitués de petites dents de forme triangulaire sont disposés verticalement entre les dents. Chaque dent repose sur une plaque basale irrégulièrement polygonale (Figure 6).



Figure 2: *Achatina balteata* (Forêt d'Ikalata)



Figure 3: *Achatina bandeirana* (Recû forestier de Kimwenza)



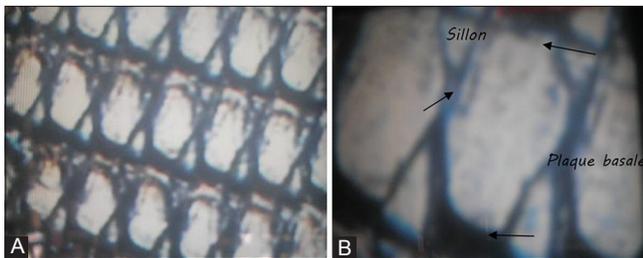
Figure 4: *Achatina bandeirana* (Recû forestier de Monastère)

###### 3.3.1.2. Recû forestier du Centre spirituel de Marenza de Kimwenza

La radula est formée de dents plus ou moins allongée, disposées parallèlement sur des rangées. Chaque dent repose



**Figure 5:** *Archachatina marginata suturalis* (Recrû forestier de SafGaz)



**Figure 6:** Radula de *Achatina balteata*, Forêt d'Ikalata. A. Gross= 4 X Photo 640. B. Gross= 10 X Zoom Photo 640.

sur plaque basale irrégulièrement polygonale portant une dent conique (Figure 7).

### 3.3.1.3. Recrû forestier du Prieuré Notre Dame de l'Assomption du Monastère

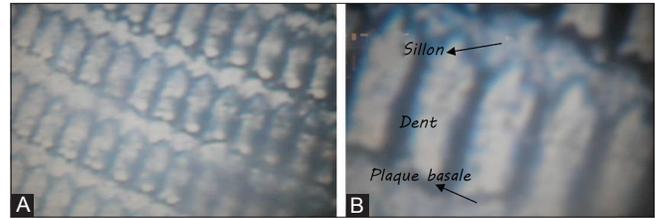
La radula est formée des rangées de dents constituées chacune d'une plaque basale irrégulièrement polygonale portant une dent conique. On observe des sillons verticaux formés de petites dents plus ou moins rectangulaires entre les dents (Figure 8).

### 3.3.1.4. Recrû forestier de l'entreprise SafGaz (ville de Kinshasa)

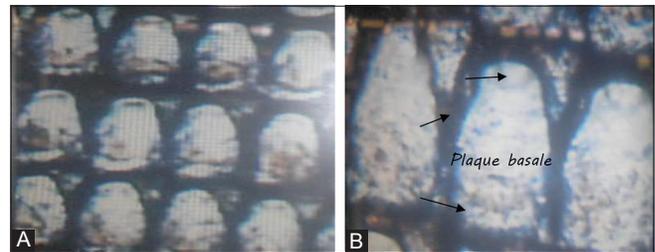
La radula est formée des rangées de dents constituée chacune d'une plaque basale irrégulièrement polygonale portant une dent conique. Des sillons verticaux constitués de petites dents sont disposés verticalement entre les dents (Figure 9).

## 3.2.2. Observation au microscope électronique à balayage

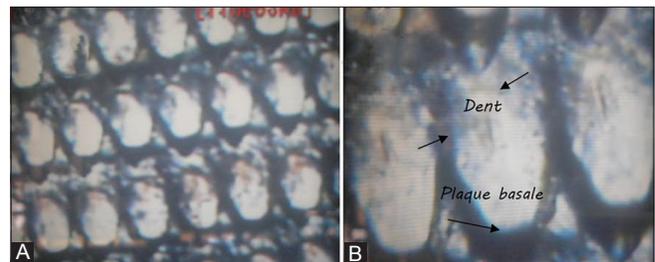
Au total, 75 radulas de *Achatina balteata*, *A. bandeirana* et *Archachatina marginata suturalis* ont été observées au microscope électronique à balayage. Ces radulas ont d'abord été observées au microscope optique (Figures 6 - 9), puis au microscope électronique à balayage (Figures 10 - 12).



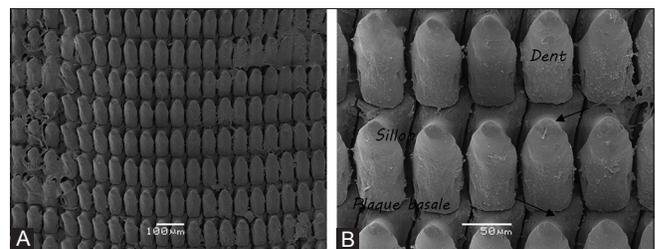
**Figure 7:** Radula de *Achatina bandeirana*, Forêt de Kimwenza. A. Gross= 4 X Zoom Photo 640. B. Gross= 10 X Zoom Photo 640



**Figure 8:** Radula de *Achatina bandeirana*, Forêt de Monastère. A. Gross= 4 X Zoom Photo 640. B. Gross= 10 X Zoom Photo 640



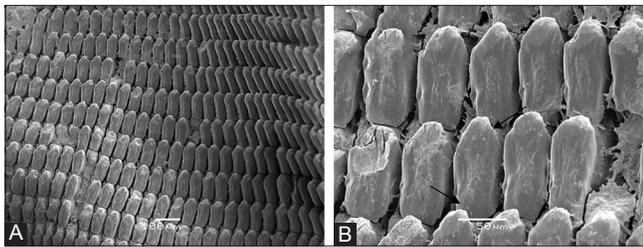
**Figure 9:** Radula de *Archachatina marginata suturalis*, Forêt de l'entreprise SafGaz. A. Gross= 4 X Photo 640. B. Gross= 10 X Zoom Photo 640



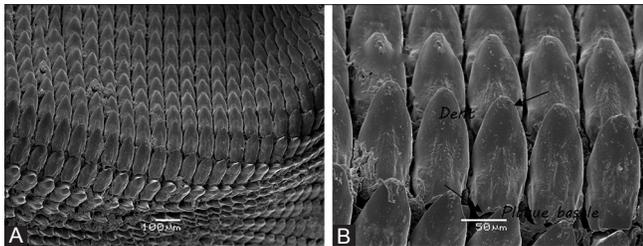
**Figure 10:** Radula de *Achatina balteata*, Forêt d'Ikalata (Inongo). A. Echelle = 100µm. B. Echelle = 50 µm

### 3.3.2.1 Forêt d'Ikalata à Inongo

L'examen des radulas de l'espèce, *Achatina balteata* au microscope à balayage, montre des dents de forme pentagonale, avec un sommet plus ou moins arrondi, aux contours réguliers. La partie basale est aplatie, et repose sur une plaque (Figure 10).



**Figure 11:** Radula de *Achatina bandeirana*, Forêt de Monastère. A. Echelle = 100µm. B. Echelle = 50 µm.



**Figure 12:** Radula de *Archachatina marginata suturalis*, Forêt de l'entreprise SafGaz. A. Echelle = 100 µm. B. Echelle = 50 µm

### 3.3.2.2. Forêt relictuelle de notre Dame de l'Assomption de Monastère

L'observation des radulas l'espèce, *Achatina bandeirana* au microscopique à balayage, a révélé la présence des dents plus ou moins parallépipédiques, aux contours irréguliers dans la partie supérieure, et aplatie dans la partie basale. Les dents sont disposées sur des rangées parallèles (Figure 11).

### 3.3.2.4. Forêt relictuelle de l'entreprise SafGaz

L'examen des radulas de l'espèce, *Archachatina marginata suturalis* au microscope électronique à balayage, a révélé des dents plus ou moins allongées, aux contours réguliers, avec un sommet plus ou moins pointu et une base large plus ou moins déprimée reposant sur une plaque. Toutes les dents sont disposées sur des rangées parallèles (Figure 12).

Cinq espèces et deux sous-espèces ont été identifiées, et la phylogénie a révélée une certaine homogénéité entre les individus de différents sites. Certaines séquences étaient exploitables selon l'arbre phylogénétique (Figure 13) et le fichier de séquences): les individus appartiennent à 2 espèces: d'une part, B1A, INO3 et INO4 sont ensemble et forment un groupe avec *A. banderiana*; d'autre part, B2A, B3A et B5A forment un groupe distinct voisin d'*A. fulica*. La première branche en haut concerne les échantillons provenant de la Tanzanie (Afrique de l'est). La deuxième branche concerne les échantillons provenant du Ghana et du Bénin (Afrique de l'ouest). La troisième branche concerne les échantillons en provenance de la RDC (Afrique Centrale).

Les échantillons de la RDC ont été récoltés dans quatre régions de l'ouest de la RDC, à savoir la ville de Mbandaka

(province de l'Equateur), l'ancienne province de Bandundu, la ville de Kinshasa et la province du Kongo Central.

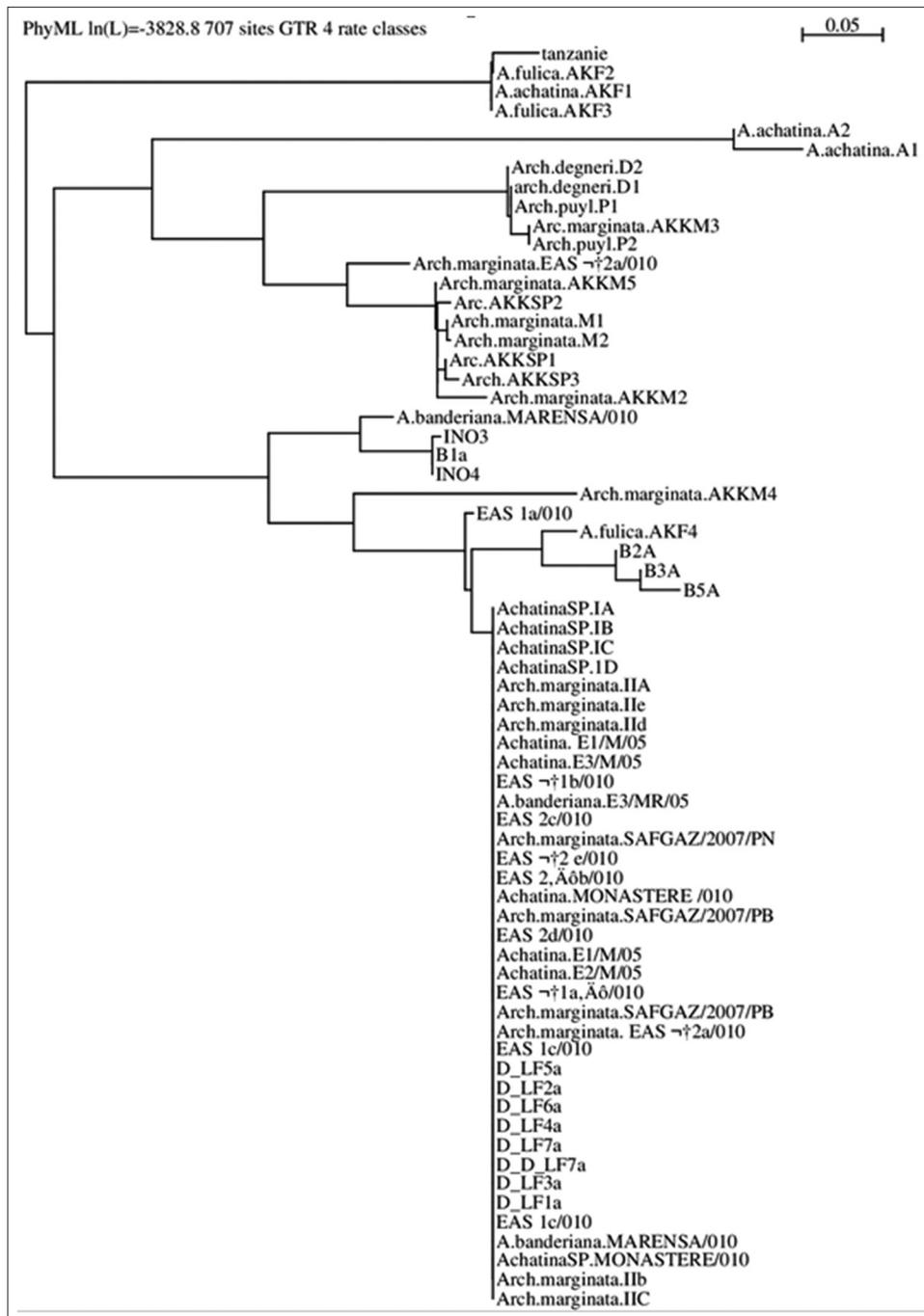
## 4. DISCUSSION

L'étude des caractères morphologiques des escargots géants récoltés dans la forêt d'Ikatala (Inongo), les recrûs forestiers de Monastère et de l'entreprise SafGaz a confirmé l'appartenance de ces animaux respectivement aux espèces *Achatina balteata*, *Achatina bandeirana* et *Archachatina marginata*. Ces espèces se différencient les unes par rapport aux autres en fonction des sites. Ceci corrobore avec les arguments de Fraga (16), selon lesquels, certaines espèces peuvent être classées par leur habitat typique, c'est-à-dire par leur adaptation à des conditions de vie particulières. D'autres par contre, peuvent avoir des coquilles qui se ressemblent, sans toutefois appartenir à la même espèce ou au même genre.

Les dents sont uniformes sur la radula de chaque espèce étudiée, excepté *A. bandeirana*. En effet, chez cette dernière, deux formes de dents ont été observées sur deux structures différentes de radulas (Figures 7 et 8), correspondant ainsi à deux populations d'*A. bandeirana*, récoltées sur deux sites différents. Comme nous pouvons le constater, pour une même espèce récoltées dans deux milieux différents, il y a deux structures différentes de radulas. Ainsi, nos résultats rejoignent ceux de Padilla (8). Ainsi, d'après cet auteur, la variabilité morphologique des radulas ne se rencontre pas chez toutes les espèces. En outre, cette variabilité est due au polymorphisme génétique (différents génotypes produisant des morphologies alternatives) ou à la plasticité phénotypique (un seul génotype capable de produire des morphologies différentes).

L'examen au microscope électronique à balayage des radulas d'*Achatina. balteata*, *A. bandeirana* et *Archachatina marginata suturalis*, a révélé avec beaucoup de précision la forme et la taille de dents pour chaque espèce (Figures 11, 12, 10), et qui, du reste, diffèrent d'une espèce à l'autre. L'uniformité de dents dans chaque espèce est aussi de mise dans le cas présent. Les radulas de ces espèces ont d'abord été observées au microscope optique avant de l'être au microscope électronique à balayage. Il était donc question de comparer les structures pour mettre en évidence tous les détails susceptibles de révéler des différences entre les deux.

Quant à la disposition des dents, il convient de signaler la présence des sillons verticaux par rapport aux rangées de dents sur les radulas, lesquels ont été observés aisément au microscope optique chez toutes les espèces et sous-espèces (Figures 6, 8 et 9), excepté chez une (Figure 7). Cette structure n'a pas été observée au microscope électronique. Cela semble paradoxal lorsque l'on considère



**Figure 13:** Arbre phylogénétique des achatines avec 4 classes d'achatines selon les gènes isolés

pouvoir de résolution du microscope électronique. En principe, les détails qui sont peu visibles au microscope optique sont observés avec beaucoup de clarté, du fait de leur agrandissement au microscope électronique. Ainsi, donc l'observation de ces sillons en microscopie optique pourrait être considérée comme des artéfacts, lesquels ne sont pas mis en évidence par le microscope électronique à balayage. Ceci confirme les observations faites par Afiademanyo (17).

En outre, les observations faites au cours de cette étude montrent que l'espace entre les rangées de dents est plus important chez *A. balteata* (Figure 10), et l'est moins chez *A. bandeirana* (Figure 11) et chez *Archachatina marginata suturalis* (Figure 12). Ceci atteste que nous avons en présence 3 espèces différentes.

En rapport avec ces observations, Nybakken (9), Waren (18), Kawamura *et al.* (19), supposent que la structure de la radula

est constante au sein des espèces. Cependant, des différentes formes de radulas ont été trouvées au sein des espèces pendant l'ontogenèse, dans des habitats différents (20), ou quand les individus consomment des aliments différents (21, 22). Ces observations concordent à celles faites au cours de notre étude.

En ce qui concerne la disposition des dents de radulas de ces trois espèces, observée au microscope optique, nos résultats montrent qu'elle est uniforme (Figures 6, 8, 9), sauf pour le cas de l'espèce, *A. bandeirana* (Figure 7), récoltée dans le site de Kimwenza. La différence entre les deux dispositions tient du fait qu'il n'y a pas de sillons disposés verticalement par rapport aux rangées de dents, comme dans le cas de *A. balteata*, *Archachatina marginata suturalis*, et une des populations de *A. bandeirana* récoltée dans le site de Kimwenza. Mais, au regard des observations faites au microscope électronique, lesquelles ne révèlent aucun détail sur les sillons visibles au microscope optique, la disposition des dents semble être uniforme chez toutes les espèces de notre étude. Les échantillons de la RDC ont été récoltés dans quatre régions de l'ouest de la RDC, à savoir la ville de Mbandaka (province de l'Equateur), l'ancienne province de Bandundu, la ville de Kinshasa et la province du Kongo Central.

Les résultats sur les analyses moléculaires (phylogénie) montrent que les échantillons récoltés à Mbandaka, à Kinshasa et au Kongo Central appartiennent à un même groupe tout à fait homogène, et aucune des séquences d'ADN produites lors de ces analyses ne correspondait aux séquences des échantillons de la Tanzanie, du Ghana et du Bénin. Par contre, le résultat sur les échantillons récoltés à Bandundu (Inongo et Bolobo) montre que les individus appartiennent à 2 espèces: d'une part, B1A, INO3 et INO4 (espèce *Achatina balteata*) sont ensemble et forment un groupe avec l'espèce *Achatina bandeirana*, récoltée à Kinshasa (RDC), d'autre part, B2A, B3A et B5A (espèce *Achatina schweinfurthii*) forme un groupe distinct, voisin d'*Achatina fulica* de l'ouest de l'Afrique. Les séquences de ce dernier groupe ne s'apparentent ni à celles des échantillons récoltés à Mbandaka, à Kinshasa, au Kongo Central, ni à celles des échantillons provenant de la Tanzanie, du Ghana et du Bénin. Donc, les échantillons provenant de la RDC semblent former un groupe à part par rapport aux groupes des pays précités.

## 5. CONCLUSION

Au vue de nos observations sur les radulas des trois espèces, *Achatina balteata*, *Achatina bandeirana* et *Archachatina marginata suturalis*, au microscope optique et électronique à balayage, la forme et la taille des dents et leur disposition ont une valeur systématique, en particulier chez les Pulmonés (7). En effet, la forme des dents de ces trois espèces diffèrent les unes des autres. La taille des dents de l'espèce *Archachatina*

*marginata suturalis* est plus grande que celle des espèces *Achatina bandeirana* et *Achatina balteata*. En revanche, la taille des dents d'*A. bandeirana* est plus grande que celle des dents d'*A. balteata*. Tous ces critères pris ensemble, attestent donc la présence de trois espèces différentes.

L'observation des radulas des espèces *Achatina balteata*, *Achatina bandeirana* et *Archachatina marginata suturalis* au microscope ordinaire et électronique à balayage, a révélé que la morphologie de la radula varie en fonction des espèces, et même au sein de l'espèce en fonction de lieu de récolte des animaux. Cette variabilité morphologique est due au polymorphisme génétique ou à la plasticité phénotypique.

L'examen des radulas au microscope électronique a permis d'observer les structures des radulas avec précision. Ceci constitue un atout majeur pour observer les structures dans leurs moindres détails, afin d'éviter toute ambiguïté dans la détermination des espèces.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pilsbry HA. A review of the land mollusks of the Belgian Congo chiefly based on the collections of the American Museum Congo expedition, 1909-1915. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 1919; XL: 1-369.
2. Bequaert JC. Studies on the *Achatinidae*, a group of african land snails, *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 1950; **105**: 1-216.
3. Bruggen AC van. Aspects of the diversity of the land mollusks of the Afrotropica Region. *Revue de Zoologie Africaine* 1986; **100**: 29-45.
4. Raut SK and Barker GM. *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as Pests in Tropical Agriculture. In: Barker G.M. (ed.). *Molluscs and crop pest*. CAB International, Wallingford, U. K. 2002: 55-114.
5. Bouchet P and Rocroi JP. Classification and nomenclator of the gastropod families. *Malacologia* 2005; **47**: 1- 397.
6. Hunt S et Nixon M. A comparative study of protein composition in the chitin-protein complexes of the beak, pen, sucker disc, radula and oesophageal cuticle of cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1981; **68**: 535-546.
7. Lévêque C. Mollusques. Morphologie et Anatomie. Caractères généraux. In: Flore et Faune aquatiques de l'Afrique Sahelo-soudanienne. Ed. IRD 1980; 283-305.
8. Padilla DK. Form and function of radula teeth of herbivorous molluscs: Focus on the future. *American Malacological Bulletin* 2003; **18** (1), 2.
9. Nybakken J. Ontogenic change in the *Conus* radula, its form, distribution among the radula types, and significance in systematics and ecology. *Malacologia* 1990; **32**: 35-54.
10. Belesi KH. Etude floristique phytogéographique et phytosociologique de la Végétation du Bas-Kasai en République Démocratique du Congo, Thèse Doctorale, Université de Kinshasa, 2009.
11. Bamps.... Flore du Congo belge et du Rwanda Urundi, index des lieux de récolte. *Bull Jard Bot Nat Bruxelles*, 1968.
12. Devred R. Carte des sols et de la végétation du Congo Belge et du Rwanda-Urundi, 2. Mvuazi. A et B. Notice explicative de la carte des sols et de la végétation. INEAC, Bruxelles, 1954.
13. Bultot F. Notice de la carte des climatiques du Congo belge et du Ruanda-Urundi. in: Atlas général du Congo, fasc. 33, Acad. Roy. Sci. Co, 1954.
14. Abbott RT. Compendium of landshells. American Malacologists, Melbourne, FI, As New, Wdj, Cloth, 1989.
15. Beaumont A, Cassier P. Travaux pratiques de Biologie animale: Zoologie, Embryologie, Histologie. Dunod, Paris, 1970.

16. Fraga de Azevedo J, Medeiros, Lidia do Carmo M. Bases pour la classification des Gastéropodes pulmonés d'eau douce: sur la nécessité d'uniformiser les méthodes de classification. *Acta Tropica* XVI
17. Afiademanyo KM. Les escargots géants du Togo (*Gastropoda, Achatinidae*): taxonomie, biogéographie et ethnomalacologie. Thèse de doctorat en Sciences de la vie, Université de Lomé, Togo, 2005.
18. Waren.... Ontogenic changes in the trochoidean (Archaegastropoda) radula, with some phylogenetic interpretations. *Zoologica Scripta* 1990; **19**: 179-187.
19. Kawamura T, Takami H, Roberts RD, and Yamashita Y. Radula development in abalone *Haliotis discus hannanai* from larva to adult in relation to feeding transitions. *Fisheries Science* 2001; **67**: 596-605.
20. Reid DG and Mak YM. Indirect evidence for ecophenotypic plasticity in radular dentition of *Littoraria* species (Gastropoda: Littorinidae). *Journal of Molluscan Studies* 1999; **65**, 355.
21. Padilla DK. Inducible phenotypic plasticity of the radula in *Lacuna* (Gastropoda: Littorinidae). *Veliger* 1998; **41**: 201-204.
22. Padilla DK. Food and environmental cues trigger an inducible offense. *Evolutionary Ecology Research* 2001; **3**: 15-25.