

Recherches sur des Bacilles présumés pathogènes pour les glossines. Etude sur *Glossina tachinoides* en République du Tchad

par J. C. MAILLARD (*)

RESUME

Deux *Bacillaceae* ont été isolés d'un couvain d'abeilles mort. Il s'agit de germes intermédiaires entre *B. alvei* et *B. circulans*. Des études bactériologiques et pathologiques ont permis d'étudier ces bacilles et ont prouvé qu'ils ne sont pas pathogènes pour les pupes de *Glossina tachinoides* en République du Tchad.

INTRODUCTION

Deux souches isolées d'un couvain d'abeilles mort nous ont été envoyées des ruchers de Bangui en République Centrafricaine.

Ayant pour objectif la recherche de moyens spécifiques de lutte bactériologique sur le terrain contre les glossines, soit au niveau des adultes, soit directement au niveau des pupes, nous avons entrepris des études bactériologiques et pathologiques sur des pupes de glossines sauvages récoltées sur le terrain.

ETUDE BACTERIOLOGIQUE

Les deux souches étaient lyophilisées en tube :

- l'une nommée : souche « Bangui » (P) que l'on a appelée B (P);
- l'autre : souche « Gruvel Bangui n° 3 » que l'on a appelée GB 3.

On a donc fait une identification comparative sur ces deux souches.

1. Morphologie

a) *Examen direct à l'état frais* : Après réhydratation et ensemencement en milieu liquide bouillon ordinaire.

- B (P) : gros bacilles très mobiles à ciliature péritriche.
- GB (3) : gros bacilles très mobiles à ciliature péritriche.

b) *Coloration de Gram* : sur des frottis effectués à partir de colonies isolées sur milieu solide de gélose ordinaire :

- B (P) : gros bacilles gram +, longs, isolés ou par 2, en forme végétative, spore centrale, ovale, déformante.
- GB (3) : gros bacilles gram +, longs, isolés ou par 2, en forme végétative, spore centrale, ovale, déformante.

c) *Coloration de Moeller* : sur des frottis effectués à partir de colonies isolées sur milieu solide à sporulation type gélose pauvre.

- B (P) : Sporulation importante. Forme végétative à spore centrale, ovale, déformante.
- GB (3) : Sporulation très rapide en moins de 24 heures. Forme végétative à spore centrale, ovale, déformante.

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire de Recherches vétérinaires de Farcha, B.P. 433, N'Djamena, Tchad.

On remarquera que cette coloration, effectuée à partir de culture en bouillon, montre de très nombreuses formes bacillaires végétatives et moins de formes sporulées que sur les frottis à partir de géloses pauvres.

d) *Aspect des colonies sur gélose ordinaire solide :*

— B (P) : Colonies informes assez larges, à centre enfoncé, opaque verdâtre, et à limitation peu précise. Un isolement net est impossible à réaliser même à partir de très grandes dilutions d'inoculum. Ce sont des colonies **mobiles très envahissantes**;

— GB (3) : Grosses colonies crèmes, larges, à surface lisse et luisante. Ce sont des colonies également **mobiles** mais moins envahissantes.

Un isolement net est néanmoins irréalisable.

Il est à noter la présence autour des colonies, de ramifications en traînées, terminées par des colonies plus petites. Il semble que l'on ait le tracé de progression de ces colonies mobiles. Cependant en vieillissant les colonies acquièrent une morphologie qui se rapproche alors de la souche B (P) : colonies diffuses, à centre enfoncé, verdâtres, opalescentes.

e) *Résultats :*

Il ressort de cette étude morphologique que l'on a des bacilles du groupe II (selon la classification de SMITH, GORDON et CLARK) à spore ovale déformante, identiques en général mais un peu différents au point de vue de l'aspect macroscopique des colonies. Dans les deux cas, les bacilles sont plus ou moins mobiles, à croissance très rapide et envahissante.

2. Caractères biochimiques

a) *Obtenus à partir d'une série classique en milieu en tubes*

Dans les deux cas, ces souches ne poussent pas sur les milieux artificiels standards de type : Hajna Kligler, mannitol-mobilité, et citrate de Simmons.

La recherche de l'amylase, de la gélatinase, et de la caséine fut difficile à réaliser vu l'extrême envahissement des géloses en boîtes de Pétri par ces germes. Seuls des artifices ont pu inhiber quelque peu cette croissance :

— soit en coulant 1 ml d'alcool après retournement de la géloseensemencée sur une

nappe d'alcool dans le couvercle de la boîte de Pétri;

— soit croissance en vapeur d'alcool après retournement de la géloseensemencée sur une nappe d'alcool dans le couvercle de la boîte de Pétri.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n° I et comparés avec les caractères biochimiques des 2 *Bacillus* du groupe II se rapprochant le plus de nos souches : *B. circulans* et *B. alvei*.

b) *Résultats :*

Il ressort de cette étude biochimique comparative que l'on a bien deux bacilles très proches l'un de l'autre et proches eux-mêmes semble-t-il des bacilles du groupe II types *B. alvei* et *B. circulans*. Pour une étude plus approfondie, la souche fut envoyée à l'Institut Pasteur de Paris. Le Docteur H. de BARJAC, du Laboratoire de lutte biologique contre les insectes, centre d'identification des *Bacillus* répondit :

« L'examen du prélèvement des souches de ruchers de Bangui, a donné les résultats suivants :

— Deux souches de *Bacillus* du groupe II, à spores ovales déformantes, en ont été isolées. Leur croissance saprophyte et leurs réactions biochimiques les distinguent nettement de *B. larvae*, agent de la loque américaine. D'autre part leurs réactions biochimiques ne sont pas non plus typiques de *B. alvei*, reconnu comme étant l'agent de la loque européenne. L'examen bactériologique montre, pour les deux souches isolées, des caractères intermédiaires entre *B. alvei* et *B. circulans*. Ces réactions intermédiaires étant un fait couramment observé dans le genre *Bacillus*. »

Nos résultats semblent donc confirmés : si l'on a une majorité de caractères communs, les rares caractères qui pourraient être véritablement distinctifs sont justement ceux qui sont intermédiaires : il s'agit de :

— la production d'indole spécifique de *B. alvei*;

— la production d'uréase spécifique de *B. circulans*;

— la réaction de VP à 32° C, positive pour *B. alvei* et négative pour *B. circulans* (cf tableau n° I).

TABLEAU N° I

| | B (P) | GB (3) | <i>B. circulans</i> | <i>B. alvei</i> |
|-------------|-------|--------|---------------------|-----------------|
| Anaérobiose | + | + | + | + |
| Oxydase | + | + | + | + |
| Catalase | ± | + | + | + |
| Nitratase | - | - | ± | - |
| Uréase | ± | ± | ± | - |
| Indole | + | ± | - | + |
| VP 32°C | + | ± | ± | + |
| Glucose | + | + | + | + |
| Arabinose | ± | ± | ± | - |
| Xylose | - | - | ± | - |
| Citrate | - | - | ± | - |
| Amidon | + | + | + | + |
| Gélatinase | + | + | ± | + |
| Caséine | - | - | ± | + |
| Lactose | + | + | + | + |
| Esculine | - | - | + | - |

3. Conclusion

Cette étude bactériologique nous a permis de voir que l'on a deux germes similaires ou plutôt **un seul germe évolutif**, évolution se situant entre 2 types de *Bacillus* du groupe II à spore ovale déformante : *B. alvei* et *B. circulans*.

POUVOIR PATHOGENE POUR LES VERTEBRES

Inoculation à des souris et des cobayes de doses de 0,5 et 1 ml de bouillon de culture de 24 heures.

Aucune mortalité dans aucun des lots d'animaux, après 10 jours d'observation.

Ces animaux eurent une période de 2 jours après l'inoculation, pendant laquelle ils étaient prostrés, très nerveux et au pelage hérissé frissonnant, ceci étant dû probablement à une réaction exothermique.

L'absence de pouvoir pathogène pour les vertébrés laisse donc espérer, si pathogénicité de ces germes pour les glossines il y a, que l'on a une éventuelle possibilité de **spécificité pour les invertébrés**.

ETUDE PATHOLOGIQUE SUR LES INSECTES

1. Matériel et méthodes

Cette étude consiste à infester des pupes présumées saines et d'âge inconnu (étant récoltées sur le terrain) par ces souches de *Bacillus* à partir de cultures en bouillon.

L'essai est fait par immersion des pupes dans les bouillons de culture pendant des temps plus ou moins longs; on admet que la pénétration dans les pupes a dû se faire par les pores stigmatiques (respiratoires). Pour chaque souche, on a procédé à une immersion rapide d'une minute et à une immersion longue de 10 minutes. Les pupes sont mises à développer dans des tubes de verre de 22 × Ø 2, bouchés avec du coton. Puis ces tubes sont alors laissés en position horizontale, les pupes étant étalées, dans une chambre humide à une température ambiante de 28-30° C; ceci afin de pallier au phénomène de dessiccation.

Il n'est pas nécessaire que cette expérience se développe en milieu stérile, car en application sur le terrain, les pupes se développent dans un milieu naturel ambiant qui, lui, n'est

pas stérile et donc avant l'infestation les pupes n'ont pas été stérilisées extérieurement.

On a travaillé sur des lots de 30 pupes et on a mené parallèlement des lots témoins sains.

2. Résultats

Après 20 jours d'expérience, lorsqu'il n'y a plus eu de naissance, on a obtenu les résultats suivants regroupés dans le tableau n° II.

Si on fait les moyennes des lots à immersion rapide, on s'aperçoit que l'on a sensiblement les mêmes pourcentages de naissances comme de mortalités, pour les deux souches et les témoins.

3. Discussion

— Les mouches malformées ne proviennent pas forcément de l'infestation, car il existe déjà à l'état naturel un pourcentage de mouches qui naissent malformées et ne vivent pas.

— Le dessèchement comme le pourrissement peuvent être dus au temps écoulé, si les pupes sont ou étaient déjà mortes en début d'expérience. Cependant, comme elles étaient fermées, il est possible aussi que leur mort soit due aux bacilles, mais vu le pourcentage de naissances, ceci est improbable.

— Dans ce genre de recherche, si l'on voulait être rigoureux, il entre en jeu un grand nombre de paramètres. En fait, on n'a pas à en tenir compte car, lors d'une éventuelle application par pulvérisation sur le terrain, ces données importent peu, seul le résultat compte. Une comparaison entre les lots infestés et les lots sains est suffisante pour en déduire l'éventuel pouvoir pathogène des bacilles sur les pupes, quel que soit leur âge, le moment de la pupaison où l'infestation est plus favorisée, la mortalité naturelle due aux infections bactériennes ou mycéliennes primaires.

— Le problème est de savoir :

- Si les 100 p. 100 de mortalité des lots infestés par immersion longue sont dus à la durée de cette immersion provoquant l'asphyxie des pupes, ou si au contraire cette durée a permis aux bacilles de pénétrer dans les pupes et de les tuer;

- Si le cas sus-cité était exact, on comprendrait le pourcentage élevé de naissances des

lots infestés par immersion courte au cours de laquelle les bacilles n'auraient pas eu le temps de pénétrer dans les pupes. Par contre, si on s'aperçoit que dans ces lots les bacilles ont bien pénétré, vu le pourcentage de naissances, comparé à celui des lots témoins, on pourra dire que ces bacilles ne sont pas pathogènes. N'étant donc pas pathogènes, les 100 p. 100 de mortalité des lots infestés par immersion longue ne sont pas dus aux bacilles qui auront pénétré dans les pupes, mais à l'asphyxie de celles-ci au cours d'une immersion de 10 minutes. Une nouvelle étude bactériologique, effectuée en cours d'expérience, va nous permettre d'éclaircir ce problème.

ETUDE BACTERIOLOGIQUE

1. Matériel et méthode

On a prélevé en cours d'expérience, vers le 10^e jour, lorsque les pupes étaient encore vivantes, une pupa dans chacun des lots, infestés par immersion rapide. On a regroupé les 2 pupes de chaque lot d'une même souche et des lots témoins.

On a obtenu trois séries de deux pupes. Chaque série a été broyée dans un tube de bouillon de culture ordinaire qui a été laissé à l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

Après ce délai, les trois milieux présentaient des cultures riches. Les bouillons étaient troubles.

A partir de chacun des trois bouillons de culture, on a fait un isolement sur gélose ordinaire en boîte de Pétri.

2. Résultats

Après 24 heures d'étuve à 37° C, on a obtenu les résultats suivants :

a) *Témoins* : nombreuses colonies, différentes en pigmentation et en importance. Nombreux réseaux mycéliens.

b) *Souche B (P)* : colonies différentes en forme, en pigmentation. Envahissement de toute la boîte par une nappe unie formée de colonies larges, informes, verdâtres. L'aspect est identique à celui obtenu lors des isollements de la souche pure. On a des colonies mobiles.

c) *Souche GB 3* : colonies différentes en forme et en pigmentation. Envahissement de

TABLEAU N° II

| Lots de 30 pupes | | Souche G B 3 | | | Souche B (P) | | | Témoins sains | |
|---------------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|-----------|
| | | Lot 1 immersion longue | Lot 2 immersion rapide | Lot 3 immersion rapide | Lot 1 immersion longue | Lot 2 immersion rapide | Lot 3 immersion rapide | Lot 1 | Lot 2 |
| Pourcentage de naissances | Pourcentage de Mouches normales | 0 } | 51 } | 44 } | 0 } | 50 } | 60 } | 50 } | 59 } |
| | Pourcentage de Mouches malformées (ailes atrophiquées ou non dépliées) | 0 | 22 | 23 | 0 | 7 | 37 | 24 | 19 |
| Pourcentage de mortalités | Pourcentage de pupes desséchées | 43 } | 10,5 } | 13,5 } | 41 } | 16,5 } | 0 } | 8 } | 6,5 } |
| | Pourcentage de pupes pourries | 100 } | 27 } | 33 } | 100 } | 43 } | 3 } | 26 } | 22 } |
| | | | 16,5 } | 19,5 } | 59 } | 26,5 } | | 18 } | 15,5 } |

toute la boîte (moindre que pour la souche B (P) par une nappe unie, formée de grosses colonies blanchâtres à surface lisse brillante. Les plus âgées sont verdâtres, informes, à centre enfoncé, comme pour la souche B (P). On distingue les fameuses colonies mobiles avec leur « traînée de progression ».

Là encore, l'aspect des colonies est identique à celui obtenu lors de l'isolement de la souche pure.

On retrouve dans ces isolements :

- de nombreux germes saprophytes de glosines;
- quelques champignons;
- les mêmes germes pour les lots infestés que ceux des souches pures.

3. Discussion

Les germes semblent avoir bien pénétré à l'intérieur des pupes et, vu le pourcentage de naissances, on serait tenté d'affirmer que les bacilles ne sont pas pathogènes pour les pupes.

Mais ces *Bacillus* sont des germes qui sporulent. Il est donc possible que, n'ayant pas pénétré à l'intérieur des pupes, ils aient sporulé à l'extérieur, vu les conditions défavorables à leur développement et que, lorsqu'ils ont été remis en bouillon ordinaire, les spores restées sur la paroi extérieure des pupes aient redonné des formes végétatives.

D'autre part, il suffirait peut-être qu'un seul germe se trouve au niveau des pores stigmatiques et qu'il pénètre pour que l'infestation se fasse, rien ne s'opposant à sa pénétration. Il

semble donc que les pupes aient bien été infectées intérieurement. Pour en avoir le cœur net, on a refait exactement la même expérience avec des pupes prélevées le 15^e jour de l'expérience, mais avant de les ensemercer dans les bouillons ordinaires, on a procédé à leur stérilisation extérieure par immersion rapide dans l'alcool et on a obtenu exactement les mêmes résultats. Donc les bacilles ont bien pénétré à l'intérieur des pupes au cours de l'infestation par immersion rapide.

CONCLUSION

Sans aucun doute maintenant, on peut affirmer que les *Bacillus* (espèces *alvei* - *circulans* présumées par l'Institut Pasteur et par nous) ne sont absolument pas pathogènes pour les pupes des mouches tsé-tsé de la République du Tchad.

L'immersion longue a donc tué les pupes par asphyxie et, vu le pourcentage élevé de naissances des lots infestés par immersion rapide et des lots témoins (cf tableau n° III), on peut sans aucun doute maintenant affirmer que les *Bacillus* (espèces *alvei-circulans* présumées par l'Institut Pasteur de Paris et par nous) ne sont pas pathogènes pour les pupes des mouches tsé-tsé *Glossina tachinoides* de la République du Tchad.

TABLEAU N° III

| | Pourcentage de naissances | Pourcentage de mortalités |
|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Souche G B 3 | 70 | 30 |
| Souche B (P) | 77 | 23 |
| Témoins | 76 | 24 |

SUMMARY

Research on pathogenic supposed *Bacillus* for *Glossina* sp., with *G. tachinoides* in Chad Republic

Two *Bacillaceae* have been isolated from dead bees. Bacteriological and pathological studies proved that these intermediate germs between *B. alvei* and *B. circulans* are not pathogenic for pupae of tsetse-flies *Glossina tachinoides* in Chad Republic.

RESUMEN

Búsquedas sobre *Bacillus* presumidos patógenos para con las glosinas

Se aislaron dos *Bacillaceae* de una cresa de abejas muerta. Se trataron de germen intermediarios entre *B. alvei* y *B. circulans*. Estudios bacte-

riológicos y patológicos permitieron estudiar dichos bacilos y probaron que estos no son patógenos para con las pupas de *Glossina tachinoides* en República de Chad.

BIBLIOGRAPHIE

1. AIME (M.) et ANGELLOZ-NICAUD (E.). Les maladies des abeilles et la micrographie apiaire. 2^e éd. Paris, La Maison Rustique, 1947.
2. BAYLEY (L.). La loque européenne des abeilles. *Bull. O.I.E.*, 1960, **53** : 339-347.
3. BAYLEY (L.). Identification du *Streptococcus Pluton* (White). Rapport des Journées Internationales de Pathologie Apicole. Madrid, 20-23 sept. 1961. *Bull. O.I.E.*, 1961, **55** : 1764-1766.
4. DUMAS (J.). Bactériologie médicale, Paris, Flammarion, 1951, pp. 517-520.
5. HEGH (E.). Les tsé-tsé. Bruxelles, Ministère des Colonies, 1929, T. 1, 742 p.
6. POLTEV (V.I.). Nature de la loque européenne et lutte contre cette affection. *Bull. O.I.E.*, 1960, **53** : 364-366.
7. Rapport annuel de l'Institut d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux. I.E.M.V.T. Laboratoire de Farcha - Tchad. 1968, T. I, pp. 205-208.
8. TOMASEC (I.). Loque européenne. Résultats des expériences effectuées en Yougoslavie. *Bull. O.I.E.*, 1960, **53** : 374-381.
9. TOMASEC (I.). Recherches sur l'étiologie de la loque européenne. Rapport des Journées Internationales de Pathologie apicole, Madrid. *Bull. O.I.E.*, 1961, **55** : 1761-1763.