

ACTION DES CHAMPIGNONS ENTOMOPHYTES SUR LES ABEILLES (1)

Par C. TOUMANOFF

L'immunisation est une sensibilisation de diverses cellules. C'est cette sensibilité renforcée (hypersensibilité) des cellules qui semble être la cause principale de l'immunisation et de l'immunité acquise.

S. METALNIKOFF.

Les infections mycosiques des abeilles adultes se rencontrent assez rarement dans la nature. Le plus souvent, on trouve l'infection produite par l'*Aspergillus flavus* Link ; cette maladie est désignée sous le nom d'« aspergillomycose » et a été observée pour la première fois par Maassen.

La facilité avec laquelle les champignons peuvent s'adapter, dans certains cas, au parasitisme chez les insectes, multipliera peut-être le nombre des mycoses chez les abeilles. Les recherches effectuées par quelques auteurs ont permis de constater que les abeilles, ou leurs larves, peuvent s'infecter expérimentalement par certains champignons que l'on ne rencontre jamais normalement comme parasites des abeilles. Ces expériences, quoique encore peu nombreuses, sont assez démonstratives et méritent d'être signalées.

Turesson, qui isola plusieurs champignons de l'estomac des abeilles et des rayons de miel, a fait des essais de contamination avec *Penicillium stoloniferum* et *P. conditaneum*, *Mucor mucedo* et *Cladosporium herbarum*.

Il faisait ses expériences de la façon suivante : il mettait les abeilles dans de petites cages en gaze (destinées à l'élevage des hannetons) et leur donnait comme nourriture du miel mélangé de spores et de mycelium. Ce mélange était établi dans les proportions suivantes : 10 gr. de miel avec 0,1, 0,3 ou 0 gr. 4 ou 0 gr. 8 de culture du champignon dont on veut connaître la virulence pour les

(1) Mémoire couronné par l'Académie vétérinaire de France (prix Urbain Leblanc, 1930).

abeilles. La quantité d'abeilles qu'il mettait à la fois dans une cage était de 9 à 20 ; la durée de l'expérience de 6 à 10 jours.

Il constata qu'au début les abeilles qui étaient nourries avec le miel mélangé de spores et de mycelium devenaient très inquiètes et se montraient plus agitées que d'habitude; plus tard, elles étaient en état de dépression et succombaient à la fin par paralysie. Turesson suppose que les abeilles meurent d'intoxication par différentes substances toxiques élaborées par les champignons.

Les abeilles mortes avaient, dans la plupart des cas, l'estomac très gonflé. D'après ses recherches, les plus toxiques, parmi les champignons étudiés, étaient *Penicillium conditaneum* et *Mucor mucedo*. Chaque expérience était faite avec le contrôle d'abeilles témoins, nourries avec du miel pur. Les abeilles témoins sont toujours restées vivantes plus longtemps que celles qui étaient soumises à l'infection.

Hermann Fielitz a repris les recherches de Turesson en infectant les abeilles avec les champignons isolés par Borchert, des larves et abeilles momifiées. Les expériences portaient sur deux souches de *Mucor mucedo* (souches *a* et *b*), deux souches de *Penicillium glaucum* (P1 et P2) et une souche de *Trichoderma lignorum* (T).

La souche P1 de *Penicillium glaucum* avait été isolée d'une abeille momifiée. Le souche P2, d'une larve momifiée. Les deux souches de *Mucor mucedo* provenaient de larves momifiées trouvées dans des cellules à couvain operculées et non operculées. Le *Trichoderma lignorum* avait été trouvé dans des larves momifiées. Les momies ont montré, d'une façon plus ou moins nette dans beaucoup de cas, les appareils de fructification.

Hermann Fielitz, dans son travail, critique les expériences de Turesson. Il prétend, en se basant sur les données de Borchert, que les abeilles en captivité s'infectent beaucoup plus facilement par les bactéries ou les champignons que les abeilles vivant dans les ruches, encore mieux, peut-être, que celles qui ont la possibilité d'effectuer le vol. C'est dans les conditions normales de leur vie qu'il fallait faire les expériences (1).

Les expériences de Fielitz ont porté sur des abeilles contenues dans des ruches. La plupart des abeilles soumises par lui à des expériences de contamination artificielle étaient très vigoureuses,

(1) Si les expériences d'infection, portant sur des colonies entières, permettent de se rendre compte de l'action des champignons sur les abeilles dans des conditions naturelles, elles ne permettent pas d'établir l'action de ceux-ci sur chaque insecte pris isolément. Elles ne peuvent donc pas donner une idée de la résistance individuelle des abeilles. Les deux manières de procéder ont par conséquent leur intérêt.

par suite du fait que la plupart d'entre elles avaient supporté, au courant de l'année précédente, le *Nosema*. Les abeilles, examinées avant les expériences, montraient en grande proportion des spores du *Nosema* dans leur estomac. Dans une de ses expériences, Fielitz indique l'époque à laquelle il a expérimenté. C'était au mois de mars, au moment où la température extérieure était de 8° et où les abeilles ne quittaient pas encore leurs ruches. Cependant le couvain était déjà présent dans beaucoup de cellules.

Pour obtenir la contamination des abeilles par un champignon déterminé, il agissait de la façon suivante : les rayons de cire déjà préparés par les abeilles étaient couverts d'un milieu nutritif sur lequel les champignons se développent très bien ; ces rayons étaient introduits dans les ruches lorsque les champignons donnaient déjà des appareils de fructification et, par suite, portaient de nombreuses spores.

Le travail de Fielitz comporte 8 expériences sur 8 colonies dont il donne la provenance et la description. Deux expériences ont porté sur le *Penicillium glaucum*, 3 sur le *Mucor mucedo*, 2 sur le *Trichoderma lignorum* et 1 sur un mélange de *Trichoderma lignorum* et de *Mucor mucedo*.

Toutes ces expériences ont démontré que les abeilles ne sont pas passives lorsqu'on introduit dans une ruche un rayon infecté par le champignon. Dès le premier jour, et dans les journées suivantes, les abeilles cherchent à enlever le champignon des cellules du rayon. Ces efforts ne restent pas inutiles et, dans beaucoup de cas, le champignon est, soit complètement, soit partiellement enlevé. Après ce nettoyage, on peut trouver des débris de mycelium et de milieu nutritif sur les planches des ruches.

Nous considérons comme important de présenter dans notre description, d'une façon schématique, les résultats obtenus par Fielitz dans quelques cas particuliers.

En infectant les abeilles d'une colonie très vigoureuse qui a supporté le *Nosema* et la dysenterie au courant de l'année précédente, par l'introduction d'un rayon infesté dans la ruche, il constate qu'après trois jours les abeilles ont commencé à enlever le mycelium. Peu à peu, au bout de neuf jours, la moitié du mycelium a été enlevé par les abeilles. Vers le 16^e jour, il introduisit un nouveau rayon infesté. Il continua ses observations pendant 57 jours. Ce n'est que le 25^e jour qu'il trouva une abeille morte entourée par un champignon. La méthode d'isolement a permis de constater que l'abeille était infestée par le *T. lignorum*.

Le couvain, dans les rayons infestés ou non, était parfaitement sain et ne présentait aucun signe de maladie.

La deuxième expérience avec le *T. lignorum* d'une autre origine a donné les mêmes résultats. L'expérience a permis de trouver une abeille morte dans une cellule ; cette abeille était momifiée ; il isola encore de son corps le *T. lignorum*.

Des expériences de même nature étaient faites avec le *P. glaucum*. Comme dans l'expérience précédente, les abeilles ne sont pas restées inactives lors de l'introduction dans la ruche du rayon infecté. Ces expériences, de durée assez longue, n'ont pas permis de constater dans la ruche la présence de larves ou d'abeilles malades ou mortes. Ceci dans les rayons infestés et non infestés.

Procédant de la même façon avec le *Mucor mucedo*, l'auteur a trouvé, dans la première expérience, au 27^e jour, trois nymphes et quelques abeilles mortes. Il isola de ces nymphes le *Mucor mucedo*. Deux autres expériences avec le *M. mucedo* furent négatives. La dernière a donné des résultats positifs avec présence dans les cellules operculées et non operculées de nymphes mortes. L'isolement a encore donné la culture pure de *M. mucedo*.

De toutes ses expériences, Fielitz a conclu que les champignons étudiés par lui ne peuvent pas provoquer une épidémie dans la ruche, mais que certains de ces champignons peuvent infester les abeilles (*M. mucedo*, *T. lignorum*) et provoquer leur mort.

Il ressort, d'autre part, de ces expériences que les colonies nombreuses dans lesquelles on introduisait le champignon en état de fructification, portant une énorme quantité de spores, ne montraient qu'une faible quantité d'abeilles ou de larves mortes. Cette quantité était tellement faible, par rapport au nombre d'individus existant dans une colonie, qu'il est vraiment difficile de parler d'une véritable maladie causée chez les abeilles par les champignons en question. Se basant sur ces expériences, on peut dire qu'il est très difficile d'infester les abeilles par les champignons étudiés par Fielitz. Elles permettent, d'une part, d'établir le degré de résistance des colonies contre les champignons et, d'autre part, quelles sont les espèces à redouter. C'est pour cette raison que les données expérimentales doivent être multipliées sans cesse.

Parmi les recherches qui furent faites pour l'étude expérimentale des mycoses, nous pouvons citer encore celles de Maassen et de Vincens.

Maassen a fait des essais d'infection des abeilles par l'*Aspergillus flavus* en fournissant aux abeilles du miel mélangé avec des spores de ce champignon. Vincens (1925) a fait des expériences sur le même sujet. Il a fait des recherches de même ordre que Maassen.

Cet auteur a été plus heureux que le précédent. Il est arrivé à infester les abeilles en leur fournissant comme nourriture un mélange de spores et de miel. Il a fait des expériences dans de petites ruches. Cependant il ne mentionne pas, dans sa description, l'espèce du champignon avec laquelle il a expérimenté (*Aspergillus* sp.). Il indique que les abeilles infestées commençaient à apparaître dans la ruche et même succombaient 48 heures après avoir absorbé le mélange indiqué. L'examen microscopique de l'intestin a permis de constater souvent, chez les abeilles mortes ou malades, la présence d'une certaine quantité de mycelium. Dans le jabot et d'autres parties de l'intestin, il trouva le mycelium en quantités moindres que dans l'estomac. L'estomac, dans certains cas, était gonflé de telle façon qu'il s'appliquait presque entièrement contre les parois du corps, obstruant les trachées qui se trouvent près de ces parois. Ceci, d'après Vincens, amenait l'asphyxie des abeilles.

Cette asphyxie présente des symptômes semblables à ceux du « mal de mai » (paralyse) et de la nosérose, où les spores de parasites remplissent souvent l'estomac et le rendent beaucoup plus volumineux que d'habitude.

Vincens tenta aussi des expériences d'infection des abeilles par le *Beauveria bassiana* Vuillemin (*Botrytis entomophytes* des anciens auteurs), agent de la maladie des vers à soie connue sous le nom de muscardine. Ce champignon a été décrit par Beauverie. Il provoque une maladie très dangereuse des vers à soie, causant une mortalité excessive.

Pour ses expériences, Vincens prend des champignons cultivés sur pomme de terre et riches en spores. Il fait un mélange de cette culture avec du miel épais qu'il met ensuite dans un abreuvoir siphoné dont le bassin est garni d'étoffe pour éviter, ou comme il dit, réduire au minimum, les possibilités d'infection par l'extérieur.

Il constata que dans les ruchettes contenant les abeilles en expérience, les décès ont commencé à se produire vers le 3^e jour et se sont succédés ensuite jusqu'au 6^e jour. Il indique qu'aucune abeille nourrie par le miel contaminé n'est restée vivante.

En disséquant les abeilles, l'auteur constate la présence de mycelium portant souvent des appareils sporifères dans la cavité du corps et contre le revêtement de tissu graisseux qui double intérieurement les segments. Il trouva le mycelium également dans le tube digestif, le plus souvent dans l'intestin grêle, dans le jabot, l'œsophage et moins souvent dans l'estomac. Les masses

de mycelium peuvent encore obstruer l'estomac comme il l'avait indiqué pour l'*Aspergillus*.

La mycose, obtenue par Vincent, rappelle par son aspect extérieur les mycoses naturelles que l'on observe chez les autres hyménoptères. Voici la description qu'il en donne :

« Quelques jours après la mort de l'insecte, un mycélium blanc apparaît en arrière de chaque segment abdominal qu'il borde postérieurement d'une frange blanche continue. La segmentation se trouve ainsi mise en évidence par la succession régulière des bandes transversales blanches et brunes. Peu à peu, ces franges se rejoignent, en même temps qu'elles s'épaississent et qu'un gazon fructifère blanc, de plus en plus dense, se forme à la surface de tout le corps qu'il ne tarde pas à recouvrir d'un épais manteau blanc à surface pulvérulente. »

Le cadavre de l'insecte présente l'aspect caractéristique de la muscardine. L'auteur suppose que *B. bassiana*, qui n'était pas connu chez les abeilles, peut infester celles-ci. Il ne serait, d'après lui, pas étonnant que certaines mycoses connues et non étudiées encore chez les abeilles, soient dues au *B. bassiana*. Les résultats obtenus par Vincens sont intéressants, surtout par le fait qu'il a obtenu des mortalités excessives chez les abeilles avec lesquelles il a expérimenté. Ses expériences avec l'*Aspergillus* ont donné des résultats contraires à ceux de Maassen, qui n'est pas arrivé à infester les abeilles en leur faisant ingérer des spores d'*Aspergillus*.

RECHERCHES PERSONNELLES

Personnellement, j'ai fait un assez grand nombre d'expériences sur l'infection des abeilles par les champignons entomophytes.

J'ai expérimenté jusqu'à présent avec les champignons suivants : *Aspergillus flavus* Link, représenté par deux souches : souche A, isolée des larves d'abeilles momifiées par l'aspergillomycose et souche B, isolée de vers à soie atteints de la maladie qui porte chez eux le même nom. Deux autres champignons, *Isaria (Spicaria) farinosa* et *Beauveria bassiana*, provenaient des vers à soie (1).

(1) Les larves d'abeilles qui m'ont servi pour l'isolement de l'*Aspergillus* (souche A) m'ont été envoyées par M. Mikhailoff de la station expérimentale d'apiculture de Toulou en Russie. La souche B d'*Aspergillus* et les deux autres champignons m'ont été donnés par le Dr Tateiwa de la station de sériculture de Tokio.

Conditions des expériences. Matériel et technique

Mes expériences ont été faites sur des abeilles provenant de colonies saines du rucher expérimental de l'École Vétérinaire d'Alfort.

Les abeilles en expérience étaient placées dans des cages Roubaud (1). L'emploi de ces cages en tulle (14 cm. de longueur et 8 cm. de largeur, sur 4 cm. 1/2 de hauteur) est extrêmement pratique, car les abeilles peuvent y vivre pendant un temps tout à fait suffisant pour les expériences, elles ne s'abîment pas les ailes et y vivent beaucoup mieux que dans les cages de Benton (pour les reines) que j'ai essayées également au début.

Les champignons destinés aux expériences étaient cultivés sur le milieu de Sabouraud. Les spores, provenant de cultures très riches, étaient prélevées à la surface du milieu nutritif à l'aide d'une spatule en platine et mélangées avec une quantité déterminée de sirop de sucre. Le sirop était composé de 2 parties d'eau pour 1 partie de sucre et était toujours soumis à une ébullition de 20 minutes avant son emploi.

Pour réaliser l'infection, du coton, imbibé d'une émulsion de spores dans de l'eau sucrée ou du miel dilué, était placé sur le tulle des cages. Le mélange était composé, approximativement, de 0 gr. 1 de spores du champignon pour 1 cm² de sirop.

Les expériences ont été faites surtout à la température du laboratoire ; quelques-unes cependant étaient faites à l'étuve, à 30° (surtout avec *Aspergillus flavus*).

J'ai fait aussi des essais d'infection en nourrissant les abeilles avec du miel dilué dans de l'eau (1 partie de miel, 2 parties d'eau).

J'ai examiné ensuite le contenu intestinal (œsophage, jabot, estomac et intestin grêle) des abeilles en expérience, ainsi que le contenu de la cavité générale (corps gras et sang). Les examens étaient faits entre lame et lamelle dans de l'eau physiologique et du lactophénol.

Vitalité des abeilles normales dans les cages Roubaud

Les essais sur la vitalité des abeilles dans des cages ont démontré que celle-ci dépend de facteurs différents. Cette vitalité dépend surtout de la température et de l'époque à laquelle les abeilles ont été prélevées de la ruche.

(1) Ces cages ont été employées par le Prof. Roubaud pour l'élevage des gloses et moustiques. Leur description a été donnée dans le *Bull. de la Soc. de pathol. exot.*, X, 1917, p. 629 et dans le *Précis de microscopie* du Dr Langeron, 4^e édition, Paris, Masson, 1925, p. 785.

Le maximum de vitalité, pour les abeilles prélevées des ruches au début de la période d'hivernage, était de 16 jours. Les abeilles prélevées de la ruche, au mois de juillet, dans les mêmes conditions, vivent moins longtemps.

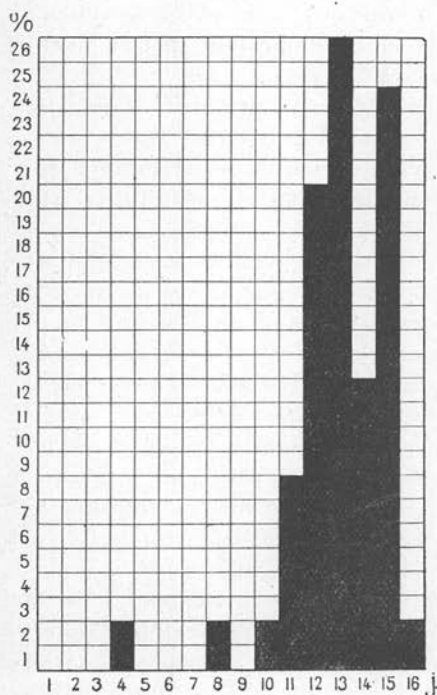


DIAGRAMME 1. — Mortalité des abeilles normales prises dans la ruche au mois de février et placées dans des cages. (Pourcentage établi sur 100 abeilles). Température du laboratoire en février 1927 (18-24°).

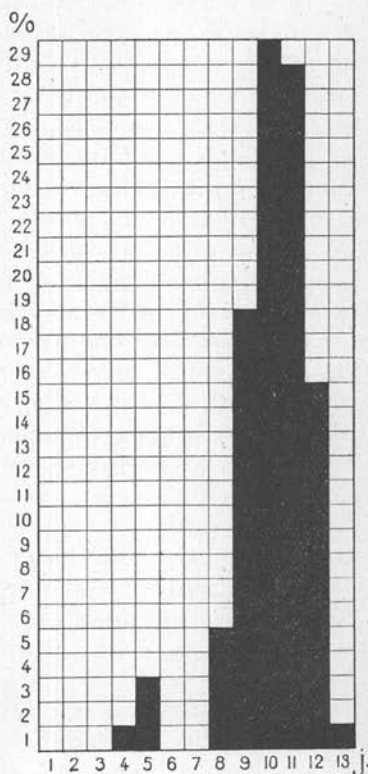


DIAGRAMME 2. — Mortalité des abeilles prélevées dans les ruches au mois de juillet et au début d'août. Température du laboratoire (18-24°).

Le pourcentage de la mortalité des abeilles normales dans les cages est exprimé par les diagrammes ci-dessous :

Comme on le voit, la mortalité des abeilles placées dans des cages diffère, dans les mêmes conditions, lorsqu'on les prend de la ruche à des époques différentes. Les abeilles prises des ruches au mois de février vivent mieux dans des cages que celles prises

aux mois de juillet et août. Dans le premier cas, entre le 1^{er} et le 10^e jour, 6 p. 100 seulement d'abeilles ont été trouvées mortes. Le maximum de la mortalité a été le plus élevé entre 11-15 jours (68 p. 100). Enfin, une grande partie des insectes mouraient les 15^e et 16^e jours, après la mise en cages.

Par contre, pour les abeilles prélevées dans les ruches au mois de juillet et au début d'août, on observe 9 p. 100 d'abeilles mortes entre le 4^e et le 8^e jour. Le maximum de la mortalité se place entre 9 et 12 jours. Toutes les abeilles mouraient généralement 13 jours après leur introduction dans les cages.

La mortalité plus prononcée des abeilles normales, dans des cages, pendant les mois de juillet et août trouverait, me semble-t-il, son explication dans l'épuisement général des habitants des colonies pendant la période des mois de juillet et août, qui constitue le moment du travail le plus intense.

Les expériences ont permis de constater, d'autre part, que les abeilles vivent relativement peu de temps dans des cages à 30° et au-dessus. Leur vitalité dans ces conditions dépasse rarement 8 jours et elles peuvent même mourir plus tôt. Les essais sur la vitalité des abeilles dans des cages étaient faits à l'abri de la lumière. Pour cela, les cages étaient couvertes par des cartons. Je me suis aperçu que lorsqu'on ne prend pas cette précaution, les abeilles vivent moins bien, meurent plus vite et sont généralement plus agitées et inquiètes. Les données sur la vitalité ne concernent donc que les abeilles mises à l'abri de la lumière.

Je dois noter aussi une autre condition qui joue un rôle important pour la vitalité des abeilles placées dans des cages : c'est le degré d'acidité ou d'alcalinité du sirop de sucre employé pour leur nourriture. Le hasard m'avait montré que lorsqu'on nourrit les abeilles avec du sirop exposé longtemps à l'air libre, sirop fermenté par les levures, très acide, celles-ci meurent très vite (1).

(1) Les expériences au sujet de l'action de pH du sirop sur la vitalité des abeilles placées dans des cages peuvent avoir un intérêt dans la pratique apicole. Souvent les apiculteurs nourrissent, avant ou pendant l'hivernage, les abeilles avec du sirop sucré exposé à l'air, fermenté et acidifié par les levures. Cette nourriture par le sirop très acide doit sûrement exercer une répercussion défavorable sur les abeilles vivant dans des conditions naturelles et, s'il n'entraîne pas toujours leur mort (ce qui peut se produire néanmoins), il les affaiblit en les rendant moins réfractaires aux infections naturelles. Cela est d'autant plus probable que les apiculteurs ont signalé assez souvent que le sirop fermenté affaiblissait les colonies en hivernage.

Quelques essais, faits sur la nutrition des abeilles par des levures du genre *Torula* ajoutées au sirop, m'avaient permis de constater que les abeilles en expérience mouraient plus vite que les abeilles témoins. La mort précoce des abeilles nourries par les levures doit être probablement attribuée aussi à l'action fermentative, qui peut se manifester dans l'intestin des insectes. Le Prof. Henry, qui a fait aussi avec les levures des expériences restées inédites, est arrivé à des conclusions analogues.

Des expériences systématiques, qui feront plus tard l'objet d'une publication, ont démontré que les abeilles vivent le mieux en captivité lorsqu'elles sont nourries avec du sirop dont le *pH* varie de 6,8 à 7,2 ou mieux, avec le sirop légèrement alcalin (*pH* 7,2). Le sirop acide (*pH* 4,4-6,0), ou très alcalin (*pH* 7,2-8,4) exerce une très mauvaise répercussion sur la vitalité des abeilles dans les conditions expérimentales.

1. Expériences d'infection des abeilles par *Aspergillus flavus* Link.

Les expériences, exécutées avec la technique exposée plus haut, furent faites à la température du laboratoire (de 18-24° C) et à l'étuve à 30°. Les deux souches mentionnées plus haut se sont montrées toutes deux extrêmement pathogènes pour les abeilles.

Voici, à titre d'exemple, quelques expériences :

Expérience A. — Quinze abeilles sont nourries avec un mélange de sirop et de spores de champignon (souche A). Cinq jours après, toutes les abeilles sont mortes. Les insectes de la cage-témoin survivent plusieurs jours. L'examen microscopique révèle la présence dans l'estomac de nombreux filaments. L'examen du sang d'un des insectes mourant a révélé la présence de nombreuses spores dans la cavité générale. Les coupes pratiquées chez cet insecte ont permis de constater que les hyphes ont pénétré dans les cellules de l'estomac et dans la cavité générale. Chez cette abeille, ayant présenté une infection généralisée, l'estomac était déjà entièrement envahi par le champignon, et ses parois, à l'endroit de pénétration des hyphes, ont été disloquées et digérées complètement. L'insecte restait immobile et présentait seulement des convulsions, ne pouvant plus marcher. Chez les autres insectes, le sang était libre de spores et les hyphes du champignon étaient localisées dans la lumière de l'estomac et dans l'intestin grêle (1).

Expérience B. — Vingt abeilles sont nourries de sirop renfermant des spores d'*Aspergillus flavus* Link (souche B). 48 heures après, 10 sont mortes. Ces 10 abeilles furent examinées ; les hyphes se trouvaient en grand nombre dans l'estomac et l'intestin grêle, mais l'examen des coupes n'a pas permis de constater la pénétration des hyphes, à travers les cellules stomacales, dans la cavité générale du corps. Les abeilles-témoins survécurent pendant quelques jours.

Expérience C. — 10 abeilles sont infectées par des spores d'*Asper-*

(1) J'ai examiné au total le sang et le contenu de l'intestin et de la cavité générale de 120 abeilles (60 infectées par la souche A et 60 par la souche B). L'infection généralisée n'a été reconnue que chez une seule abeille et doit, par conséquent, se produire très rarement. Au moment où ce travail était rédigé, j'ai fait un certain nombre d'expériences supplémentaires (qui ont porté sur 30 abeilles) au sujet de l'action de l'*Aspergillus* et j'ai pu constater un autre cas d'infection généralisée.

gillus flavus (souche A) mélangées avec du sirop de sucre, à la température de 30°. 40 heures après, 8 abeilles meurent. Trois jours après, toutes sont mortes. Les hyphes sont trouvées en abondance dans l'intestin grêle et l'estomac. Pas de mycélium dans la cavité générale des insectes malades. Le contrôle a duré 8 jours.

Expérience D. — 10 abeilles sont infectées par *Aspergillus flavus* (souche B). Trois jours après, 3 abeilles sont mortes ; cinq jours après, toutes sont mortes. Le mycélium est assez abondant dans l'intestin. Pas de mycélium dans la cavité générale des abeilles malades. Chez les abeilles mortes, le mycélium est constaté dans la cavité générale 24 heures après la mort.

Les abeilles de la cage-témoin vivent pendant 7 jours, une meurt le 5^e jour.

La majorité des expériences à la température du laboratoire et à l'étuve ont donné des résultats à peu près identiques à ceux qui sont cités plus haut. Dans un certain nombre, cependant, une partie des abeilles soumises à l'infection vivaient tout aussi longtemps que les témoins. Ainsi, sur un total de 200 abeilles infectées à la température du laboratoire, 22 vécurent aussi longtemps que les témoins. Elles se comportaient tout à fait comme les abeilles normales. Le contenu intestinal des insectes ayant survécu à l'infection a été examiné : 8 de ces abeilles étaient porteuses d'hyphes dans l'estomac et l'intestin ; 14 en étaient exemptes, malgré l'ingestion de nombreuses spores que j'ai pu retrouver dans l'intestin. Cela prouve que les abeilles possèdent, d'une part, une résistance individuelle (peut-être une immunité acquise) contre l'intoxication par le champignon et, d'autre part, que les spores du champignon ne germent parfois pas dans le contenu intestinal des abeilles en expérience. Il est possible que les conditions de l'intestin des abeilles ne soient pas toujours favorables pour que la germination puisse se réaliser.

La mortalité des abeilles, à la suite de l'infection par *Aspergillus flavus*, comme il résulte de l'ensemble de mes expériences, se manifeste entre 24 heures et 6 jours. Les diagrammes ci-dessous montrent le pourcentage de la mortalité.

Ce pourcentage a montré qu'un certain nombre d'insectes meurent déjà 24 heures après le commencement de l'expérience. A la température du laboratoire, dans les premières 48 heures, 20 p. 100 des abeilles meurent, 50 p. 100 du 3^e au 4^e jour et enfin 30 p. 100 les 5^e et 6^e jours après le commencement des expériences. A la température de 30°, j'ai trouvé 28 p. 100 des abeilles mortes après les 48 premières heures, 48 p. 100 les 3^e et 4^e jours, et enfin 24 p. 100

le 5^e jour. La mort, à l'étuve, se produisait toujours au maximum 5 jours après le commencement des expériences. Les abeilles témoins, à 30°, mouraient entre 6-10 jours ; la mort n'a pas été signalée avant.

Le pourcentage précité n'est valable que pour les abeilles mortes à la suite des expériences ; celles qui ont survécu pendant le temps du contrôle n'entrent pas ici en considération.

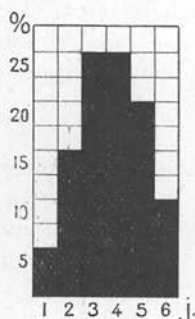


DIAGRAMME 3. — Mortalité chez les abeilles nourries avec du sirop contenant des spores de champignon et placées au laboratoire. (Pourcentage établi d'après 100 abeilles).

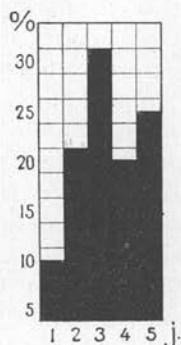


DIAGRAMME 4. — Mortalité chez les abeilles infectées placées dans une étuve à 30° (Pourcentage établi d'après 50 abeilles).

II. Expériences avec *Beauveria bassiana* et *Isaria farinosa*

Les expériences avec *Beauveria bassiana* étaient faites à la température du laboratoire. Ce champignon pousse très bien sur les milieux de culture, à des températures comprises entre 9 et 28°. A la température du laboratoire (18-24°), la croissance s'effectue très bien et l'infection d'autres insectes se produit facilement. La technique de mes expériences était la même que pour celles qui ont été effectuées avec l'*Aspergillus*.

Mes expériences ont montré que les abeilles meurent après avoir absorbé un sirop renfermant les conidies de ce champignon, mais que son action sur les abeilles était beaucoup moins forte que celle de l'*Aspergillus*.

Voici, à titre d'exemple, quelques expériences faites avec *Beauveria bassiana* :

1° 18 octobre 1927. — Dix abeilles sont nourries avec du sirop mélangé des spores de *Beauveria bassiana*. Quatre jours après, une abeille meurt. Cinq autres abeilles vivent aussi longtemps que

les témoins (15 jours). Chez les abeilles mortes, examinées aussitôt après la mort, les hyphes sont trouvées en très petite quantité dans l'intestin. Les abeilles ayant survécu ont l'intestin exempt d'hyphes ; de nombreuses conidies sont présentes.

2° 4 mars 1927. — Six abeilles sont nourries avec un mélange de sirop et de conidies de *Beauveria bassiana*. Trois jours après le commencement de l'expérience, trois abeilles meurent. Toutes les autres restent vivantes pendant 10 jours. Dans les témoins, une abeille sur six meurt 10 jours après le commencement de l'expérience. Chez trois abeilles mortes, les hyphes sont signalées en très petit nombre dans l'intestin. Parmi les abeilles qui ont survécu et ont été examinées le 10^e jour, chez l'une les hyphes étaient signalées ; deux en étaient exemptes.

3° 6 mars 1927. — Dix abeilles en expérience. Quatre jours après, 4 abeilles meurent. Six jours après, 2 meurent encore ; 4 restent vivantes aussi longtemps que les témoins. Examinées le 8^e jour, elles montrent l'absence d'hyphes dans le tube digestif plein de spores.

Ces expériences, répétées plusieurs fois, ont toujours donné des résultats identiques. Sur 100 abeilles qui ont été mises en expérience, 48 seulement ont été trouvées mortes et présentaient des hyphes dans le tube digestif, les autres ont vécu aussi longtemps que les témoins et ne se sont pas infectées.

Ces expériences démontrent que la germination des spores de *Beauveria bassiana* ne s'effectue pas dans le tube digestif de toutes les abeilles qui ont été nourries avec du sirop additionné de spores. Elles ont démontré, d'autre part, que ce champignon n'est pas toujours pathogène pour les abeilles. Je n'ai jamais, en outre, rencontré l'infection généralisée des insectes par *Beauveria bassiana* ou par *Isaria farinosa* ; leur action pathogène relative doit être attribuée surtout à l'intoxication.

Les expériences avec *Isaria farinosa* ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec *Beauveria bassiana*. Ce champignon était aussi très peu pathogène pour les abeilles. Voici les résultats de quelques expériences :

1° 1^{er} mars 1928. — Douze abeilles sont nourries avec du sirop de sucre additionné de spores du champignon (*Isaria farinosa*). Trois jours après, trois abeilles meurent. Le 4^e jour, trois meurent encore. Six vivent pendant 10 jours. L'examen de l'estomac, de l'intestin grêle et du jabot, ne permet pas de constater la présence des hyphes. Les abeilles mortes les quatre premiers jours possèdent des hyphes en très petit nombre dans l'intestin postérieur et l'intestin grêle.

2° 1^{er} mars 1928. — Six abeilles sont infectées dans les mêmes conditions que dans l'expérience 1. Deux jours après, une abeille meurt. Le 3^e jour, deux encore sont malades. Les abeilles mortes et malades montrent la présence d'hyphes dans leur tube digestif. Deux abeilles ont survécu pendant huit jours. L'examen du contenu intestinal est négatif. Parmi les témoins, une abeille est morte le 6^e jour et deux le 8^e.

3° Huit abeilles sont soumises à l'infection le même jour que dans les expériences précédentes. Trois jours après, deux abeilles sont très malades ; des hyphes sont trouvées dans leur estomac. Six autres vivent 10 jours ; examinées le 10^e jour, elles ont l'intestin libre d'hyphes ; de nombreuses spores sont retrouvées dans le tube digestif. Dans les témoins, la mortalité ne commence qu'à partir du 10^e jour.

Dans chacune de ces expériences, je n'ai jamais constaté la mort de la totalité des abeilles, à la suite d'infection expérimentale. Toujours, le plus grand nombre restait vivant. L'intoxication ne se réalise donc pas toujours. Sur un total de 70 abeilles mises en expérience, 32 seulement étaient trouvées mortes avant les témoins, 38 mouraient à la même époque que les abeilles normales. Chez quelques-unes des abeilles ayant survécu à l'ingestion des spores, les hyphes étaient signalées dans l'estomac en petit nombre, ce qui n'a pas empêché ces abeilles de vivre tout aussi longtemps que les témoins.

Les résultats obtenus par moi sont contraires à ceux qui ont été publiés par Vincens en ce qui concerne l'infection des abeilles par *Beauveria bassiana*. Je crois que Vincens avait surtout examiné les abeilles mortes, chez lesquelles le mycelium avait traversé les parois de l'intestin *post mortem* ; c'est pour cela qu'il conclut que l'infection est toujours généralisée chez les abeilles.

Chez les abeilles malades, infectées par *Isaria* ou *Beauveria*, que j'ai étudiées personnellement, je n'ai jamais pu trouver le mycelium dans la cavité du corps avant, ou tout de suite après, la mort des insectes. Par contre, chez celles qui étaient examinées deux ou trois jours après leur mort, on pouvait constater un mycelium assez abondant dans la cavité générale.

Je crois que l'action pathogène très faible de *Beauveria bassiana* et *Isaria farinosa* résulte de l'action toxique de ces champignons pour les abeilles, action qui ne se manifeste, d'ailleurs, que lorsque les spores arrivent à germer dans le tube digestif. Les observations montrent, en outre, que la germination des spores s'effectue inconstamment dans l'intestin, où elles ne trouvent pas toujours des conditions favorables.

Ces deux champignons, très pathogènes et spécifiques aux points de vue de leur action pour les larves de Lépidoptères, ne sont que peu toxiques pour les abeilles et ne provoquent jamais chez elles d'infection généralisée.

Expériences avec les filtrats d'*Aspergillus flavus* et *Beauveria bassiana*

Comme je l'ai déjà indiqué plus haut, la mort des abeilles à la suite d'infection par les champignons doit s'expliquer, d'après mon opinion, surtout par des phénomènes d'intoxication. Pour prouver cette hypothèse, j'ai fait un certain nombre d'expériences au sujet de l'action des filtrats de champignons sur les abeilles. Ces expériences ont été faites avec des filtrats d'*Aspergillus flavus* et de *Beauveria bassiana*.

Pour préparer ces filtrats, j'ai pris des cultures relativement jeunes sur gélose Sabouraud. Ces cultures présentaient un mycelium abondant avec un petit nombre de conidiophores. Le mycelium était prélevé avec précaution à la surface du milieu, de façon à ne pas entraîner avec lui de gélose. Dès qu'il était détaché, il était mis dans un mortier où il était broyé dans de l'eau ordinaire ou de l'eau physiologique stérile. L'opération a été faite dans des conditions réalisant la plus grande propreté ; le mortier était flambé au préalable, le mycelium était enlevé à l'aide d'instruments stérilisés.

Le liquide obtenu était filtré à travers une bougie Chamberland L. 3. Après une épreuve de stérilité par ensemencement sur gélose Sabouraud et sur agar ordinaire, les filtrats ont été donnés aux abeilles en mélange avec du sirop. Le pH des filtrats variait de 6,8 à 7,2.

Les filtrats ainsi obtenus se sont montrés toxiques pour les abeilles.

I. Expérience avec le filtrat d'*Aspergillus flavus*

A. Trois cultures d'*Aspergillus flavus* Link, âgées d'un mois, composées de mycelium abondant et de très peu de conidies, sont broyées, reprises par 100 cm³ d'eau physiologique, puis filtrées à travers une bougie Chamberland (L. 3). Après l'épreuve de stérilité par ensemencement, le filtrat est mélangé avec du sirop de sucre à volume égal (sirop : 1 partie de sucre, 1 partie d'eau). Le coton imbibé de ce mélange fut placé sur le tulle des cages contenant les abeilles.

Soixante abeilles sont en expérience, au nombre de 20 par cage ;

Soixante abeilles servent de témoins. Vingt abeilles sont mortes les deux premiers jours, vingt-quatre les deux jours suivants et le reste deux journées plus tard ; parmi les témoins, on n'enregistra que 5 morts après 7 jours de séjour dans les cages.

B. Le mycelium de trois cultures d'*Aspergillus flavus*, âgées de 16 jours, sert, comme dans l'expérience précédente, pour la préparation du filtrat. Il est mélangé avec le sirop de sucre dans la proportion d'une partie de filtrat pour deux parties de sirop. Quarante abeilles sont en expérience ; quarante servent de témoins. Le 3^e et 4^e jour, dix abeilles meurent. Toutes sont mortes le 8^e jour.

Dans les cages témoins, sept abeilles sont trouvées mortes le 9^e jour après le commencement des expériences.

II. Expériences avec les filtrats de *Beauveria bassiana*

Voici, à titre d'exemple, deux des 10 expériences faites à ce sujet :

A. Dix abeilles sont nourries avec du sirop de sucre auquel est mélangé le filtrat préparé de la même façon que les filtrats d'*Aspergillus flavus* (trois cultures de *Beauveria bassiana* âgées de 2 semaines).

24 heures après le commencement de l'expérience, une abeille meurt. 2 jours après deux meurent. Toutes sont mortes le 5^e jour. Dans les témoins, une seule abeille fut trouvée morte le 7^e jour après le commencement de l'expérience. Quatre autres abeilles moururent le 10^e jour quand l'expérience était terminée.

B. Dix abeilles sont nourries par le même filtrat dans les mêmes conditions que dans l'expérience A. 2 jours après, deux abeilles sont trouvées mortes ; le 3^e jour une encore meurt. Le 5^e jour, toutes sont mortes.

La mortalité à la suite de l'intoxication par les filtrats de *Beauveria bassiana* et par *Aspergillus flavus* est exprimée par les diagrammes qui suivent.

Comme on le voit dans ces diagrammes, les abeilles nourries avec le sirop additionné de filtrat d'*Aspergillus* meurent entre 24 heures et 8 jours. Le maximum des abeilles mortes se trouve entre 1-4 jours (59 p. 100). Le reste (41 p. 100) meurt entre le 5^e et 8^e jour.

Les insectes nourris par le filtrat de *Beauveria* meurent plus vite. Sur 100 abeilles qui étaient en expérience, 55 p. 100 étaient trouvées mortes entre 1-4 jours et 45 p. 100 moururent le 5^e jour.

Il est intéressant de noter que l'ingestion du filtrat de *Beauveria* entraîne la mort de 100 p. 100 des abeilles, tandis que l'ingestion des spores est parfois inefficace. Ceci résulte, d'une part, de la non-germination des spores dans un grand nombre de cas et, d'autre part, lorsque celles-ci germent, la quantité de mycelium est probablement parfois insuffisante pour que l'intoxication puisse se produire. On peut encore supposer que les substances toxi-

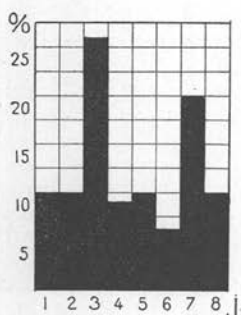


DIAGRAMME 5. — Pourcentage de la mortalité des abeilles nourries avec du sirop additionné de filtrat d'*Aspergillus flavus*.

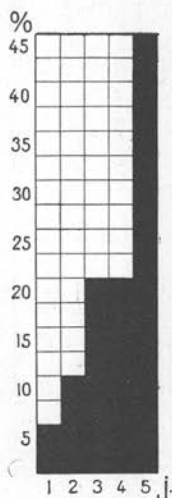


DIAGRAMME 6. — Pourcentage de la mortalité chez les abeilles nourries avec du sirop additionné de filtrat de *Beauveria bassiana*.

ques ne sont pas facilement libérées par certains champignons et que leur libération résulte de l'action des sucs digestifs sur les hyphes, action qui peut être variable selon l'espèce de champignon employée.

Symptômes résultant de l'intoxication chez les abeilles

Les abeilles nourries de sirop additionné de spores de champignons ou de filtrats accusent des symptômes d'intoxication tout à fait semblables. Certaines abeilles, au début de l'intoxication, deviennent très agitées. Elles courent très vite dans les cages, exécutant un va-et-vient continu. Cette phase d'agitation, qui a été déjà observée par Turesson, n'est pas accusée par toutes les

abeilles et, chez certaines d'entre elles, la maladie progresse sans que ce symptôme ait pu être signalé.

Les insectes dont l'intoxication est déjà très avancée se montrent très las, fatigués et se déplacent très difficilement dans les cages. Les abeilles fortement intoxiquées se traînent sur le fond de la cage et, épuisées, tombent, soit sur le côté, soit sur le dos, lorsqu'elles essayent de remonter les parois, mourant dans ces positions. La mort est précédée de convulsions des pattes et de l'abdomen. Chez les cadavres, les pattes sont fortement serrées contre le thorax.

Un de effets de l'intoxication est la suppression de la capacité de voler. J'ai constaté que lorsqu'on met en liberté des abeilles intoxiquées par les champignons ou les filtrats de ceux-ci, elles tombent par terre, faisant de vains efforts pour s'envoler. Un certain nombre d'entre elles réussissent à s'envoler (moins intoxiquées ou plus résitantes), mais leur vol ne dure que peu de temps — quelques secondes à quelques minutes — après quoi elles tombent de nouveau par terre pour y rester définitivement sans pouvoir reprendre le vol.

Par contre, les abeilles témoins, prises au même moment, s'envolent presque immédiatement, se dirigeant vers la fenêtre du laboratoire. Quelquefois, mais très rarement, certaines abeilles témoins tombent par terre aussitôt après leur mise en liberté, mais pour reprendre leur vol peu de temps après ; cela résulte probablement de l'affaiblissement pendant le séjour dans les cages.

Il faut noter que la perte de la capacité de vol est un de symptômes qui permet de distinguer les abeilles malades dans la nature. Ce symptôme accompagne toutes les maladies connues des abeilles (*Nosema*, acariose, etc...).

Parfois, dans la nature, au mois de mai ou même avant, on trouve devant les ruches des abeilles isolées ou en groupes, faisant de vains efforts pour s'envoler ou entrer dans les ruches. Les apiculteurs, qui connaissent cette maladie, l'ont désignée sous le nom de « mal de mai ». Dans les cas où ces abeilles ne sont pas infectées de *Nosema* ou d'acariose, elles sont vraisemblablement, dans un grand nombre de cas, intoxiquées par des champignons divers.

Il y a des raisons de croire que les mycoses des abeilles (comme l'avait supposé Zander) sont une des maladies englobées sous le nom générique de « mal de mai ». Ce nom ne doit, à mon point de vue, être attribué qu'aux maladies dont les causes sont obscu-

res. Mes expériences et celles de mes prédécesseurs permettent de conclure que toutes les fois que l'on trouve dans le tube digestif des abeilles malades les hyphes des champignons, la maladie peut être attribuée à leur action nocive.

Essais d'infection du couvain par les champignons

J'ai fait aussi un certain nombre d'essais d'infection de larves par les champignons qui ont été employés pour l'infection des abeilles. Les expériences consistaient à ajouter, dans des cellules à couvain, les spores des champignons.

Pour cela, les rayons contenant le couvain étaient enlevés des ruches. Sur les parois verticales le nombre des rangs d'alvéoles mis en expérience étaient comptés et marqués ; de même sur les parois horizontales des rayons.

Les alvéoles étaient marquées par un mélange de gouache et de vernis de couleur de telle sorte que les larves qui avaient servi pour l'expérience pouvaient être facilement reconnues et suivies ultérieurement.

Pour réaliser l'infection, les émulsions de spores (1) provenant des cultures étaient mises dans des alvéoles contenant les larves.

Les expériences ont montré que les abeilles enlevaient, 24 heures après le commencement des expériences, la majorité des larves soumise à l'infection.

Voici, à titre d'exemple, une expérience faite avec l'*Aspergillus flavus* souche A, isolé des larves d'abeilles momifiées.

1° 18 juin 1928. — 28 larves se trouvant dans les alvéoles (âgées de 4-5 jours approximativement) reçoivent dans leur gelée une émulsion épaisse de spores dans de l'eau physiologique. 24 heures après, 21 larves sont enlevées par les abeilles ; celles qui restent se métamorphosent normalement, les abeilles sortent des cellules.

2° 17 juin 1928. — 30 larves reçoivent dans les alvéoles une émulsion riche en spores de *Beauveria bassiana*. 24 heures après, 24 larves sont enlevées par les abeilles. Les 6 qui restent se transforment en abeilles adultes. Aucune larve malade ou morte n'a été observée.

3° 15 juin 1928. — 35 larves reçoivent dans les cellules des conidies d'*Isaria farinosa*. 26 larves sont enlevées 24 heures après ; 9 se transforment en abeilles adultes.

Dans aucun cas je n'ai pu constater l'infection des larves par

(1) Émulsions faites dans l'eau physiologique stérile.

les champignons, les expériences étant répétées plusieurs fois. Un certain nombre des cellules contenant les larves en expérience étaient chargées de pollen ; dans d'autres la reine a pondu et plusieurs générations de couvain se sont succédé dans les cellules sans qu'il y ait eut infection des larves.

Les résultats ont toujours été négatifs, même avec l'*Aspergillus flavus* qui, dans les conditions naturelles, comme on le sait, peut infecter les larves provoquant la maladie désignée sous le nom de « steinbrut » par les auteurs allemands.

Cette maladie a été signalée par moi à deux reprises en France et dans un cas (un rucher à Charmes, Allier) dans une colonie où elle présentait un caractère extrêmement grave. La colonie se dépeuplait et m'a été envoyée à Alfort. Malgré mes efforts pour la conserver, elle a péri en l'espace de 4 mois.

La maladie, qui existe dans la nature sous une forme parfois bénigne, ne peut donc pas être facilement produite expérimentalement et il faut supposer qu'il existe un certain nombre de facteurs qui lui permettent d'apparaître et de prendre une allure grave dans les conditions naturelles d'existence des colonies.

RÉSUMÉ

1° Parmi trois champignons : *Beauveria bassiana*, *Isaria farinosa* et *Aspergillus flavus*, Link, seul le dernier s'est montré très pathogène pour les abeilles.

2° Certaines abeilles cependant ont été trouvées extrêmement résistantes à l'*Aspergillus flavus*.

3° Deux autres champignons : *Beauveria bassiana* et *Isaria farinosa* sont peu et inconstamment toxiques pour les abeilles, malgré leur virulence considérable pour d'autres insectes (chenilles de lépidoptères).

4° L'infection généralisée des abeilles n'a été observée que dans deux cas exceptionnels avec l'*Aspergillus flavus* uniquement. Cette forme d'infection n'avait pas encore pu être constatée.

5° La germination des spores de champignons ne s'effectue pas chez toutes les abeilles en expérience : chez certaines elle ne se produit pas.

6° L'action pathogène des champignons sur les abeilles consiste presque exclusivement dans leur toxicité. Les abeilles meurent d'intoxication par les produits élaborés et secrétés par le mycelium, ou libérés par celui-ci sous l'action des sucs digestifs.

7° Les filtrats de deux champignons : *Aspergillus flavus* et *Beauveria bassiana*, se sont montrés très toxiques pour les abeilles.

8° Les symptômes, pour les abeilles intoxiquées expérimentalement, soit par les hyphes, soit par les filtrats, sont semblables à ceux qu'on observe chez les abeilles atteintes dans la nature par diverses maladies.

9° Les essais d'infection des larves par les trois champignons précités, n'ont donné jusqu'à présent que des résultats négatifs.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNAUD (M.). — Recherches préliminaires sur les champignons entomophytes. *Ann. des Epiphyties*, N° 1, 1927.
- FIELITZ (H.). — Untersuchungen über die Pathogenität einiger in Bienenstock vorkommenden etc. *Centrlbl. für Bakt.*, II Abt., LXVI, 1926.
- MAASSEN. — *Mitteil. aus der Kaiser. Biolog. Amt für Land und Forst.*, Hutin, 15 avril 1919.
- METALNIKOFF (S.) et TOUMANOFF (K.). — Experimental Researches on the Infection of *Pyrausta nubilalis* Hübn. by entomophytic fungi. *Scientific Rep. Intern. Live stock Exposition*, I, U. S. Yards. Chicago, 1927.
- TURESSON. — The toxicity of moulds to the honey-bee and the cause of bee-paralysis. *Svensk. Botan. Tidschr.*, II, 1917 (cité d'après Zander, *Die Bienenkrankheiten*, G. Ulmer, Stuttgart).
- VINCENS (F.). — Sur l'aspergillomycose des abeilles. *C. R. Acad. Sc.*, CLXXVII, 1923, p. 540-542.
- Sur une muscardine à *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. produite expérimentalement sur des abeilles. *C. R. Acad. Sc.*, CLXXVII, 1923, p. 713-715.