Quelques aspects de la pathogénie
d'*Entomophthora coronata* Cost. Kervork.
pour la Fourmi-Manioc de la Guadeloupe :
Acromyrmex octospinosus (Formicidae, Attini)

par A. KERMARREC et H. MAULEON

Station de Zoologie et de Lutte biologique,
Institut national de la Recherche agronomique,
97170 Petit-Bourg, Guadeloupe

Résumé.

La recherche d'agents pathogènes de Fourmi-Manioc de Guadeloupe : *Acromyrmex octospinosus* Reich a permis de mettre en évidence une mycose à *Entomophthora coronata* Cost. Kervork. L'activité pathogène est évaluée et la présence d'une toxine démontrée. La résistance des conidies au dessèchement, aux rayons calorifiques et aux radiations stérilisantes est étudiée.

L'emploi de ce germe entomopathogène en lutte biologique est toutefois déconseillé en milieu tropical où il peut être susceptible de provoquer une mycose chez des Vertébrés.

Summary.

Some aspects of the pathogenicity of *Entomophthora coronata* Cost. Kervork. on the Guadeloupean parasol-ant : *Acromyrmex octospinosus* Reich. (Formicidae, Attini).

A general survey of pathogens of the Parasol-Ant of Guadeloupe led us to the study of the pathogenic action of *Entomophthora coronata* Cost. Kervork. It is shown that this fungus acts with toxic secretions. Conidia resistance to drying, heat and germicidal broad-castings are evaluated. However, the use of this entomopathogenous fungus could be dangerous in tropical areas where it is know to be a possible rhinophycomycosis agent for Vertebrates.

La Fourmi-Manioc de la Guadeloupe : *Acromyrmex octospinosus* Reich (Formicidae, Attini) est élevée en nids artificiels dans lesquels on trouve parfois des individus recouverts d'un feutrage mycélien blanc et fin particulièrement abondant aux articulations et entre les tergites. Des isolats de ce champignon, qui semble être à l'origine de mortalités soudaines dans les conditions du laboratoire, ont donné lieu à des projections caractéristiques de spores en tubes inclinés. Une souche envoyée à l'Institut Pasteur de Paris fut déterminée comme étant : *Entomophthora* (= *Conidiobolus*) *coronata* Cost. Kervork.

L'étude de sa pathogénie pour cette fourmi a été abordée selon les étapes suivantes : mortalité lors du contact avec la culture; mortalité lors du contact avec les spores et mise en évidence d'une action par toxines. Les méthodes utilisées sont présentées pour chaque expérience.

Quelques données sur la rusticité de la souche antillaise de *E. coronata* ont été recherchées = optimum thermique, résistance des spores au dessèchement et à l'irradiation aux ultra-violets, notamment.

La mycose d'*Acromyrmex octospinosus*

Les mycoses de fourmis sont citées rarement dans la littérature et il n'y a que peu de références concernant des Entomophthorales : Schaefer (1941), Rudakov (1962), Wuest et Turian (1967) et Turian et Wuest (1969). Seul Schaefer (1941) fait état de *E. coronata* sur une Camponote (*Camponotus* sp.) du Transvaal. En ce qui concerne les Attines, une infection à *Beauveria* fut décrite au Brésil sur un genre voisin : *Atta sexdens* Argolo Ferrao (1925) : in Gosswald (1938). Signalons encore que *E. coronata* fut trouvée par Prasertphon (1963) sur un autre insecte social : les termites.

Les cadavres porteurs de cette mycose ont l'abdomen distendu et une poudre blanchâtre déborde d'entre les segments. Selon Dieuzeide (1925) et Nirula (1957) les insectes à habitat souterrain atteints de mycose viennent généralement mourir en surface : la majorité des cadavres d'*Acromyrmex octospinosus* furent retrouvés à l'extérieur du nid atteint mais il faut probablement tenir compte des réactions à caractère prophylactique des ouvrières saines qui rejettent cadavres et malades à l'extérieur du nid.

Placées sur des milieux gélosés de culture de *E. coronata* les Fourmis-Manioc ont un comportement de déblaiement accru, conformément aux descriptions de Weber (1972) : découpe du substrat en cubes de 1 à 2 millimètres de côté et entassement de ceux-ci (fig. 1). La présence d'un fragment du champignon cultivé par la Fourmi stimule encore plus leur ardeur dans cette activité. Le contact avec la culture d'*E. coronata* s'accompagne également d'une nette augmentation des processus de toilettes mutuels.

La mortalité est estimée sur grandes ouvrières seulement, sur dix lots de dix individus par boîte de culture d'*E. coronata* âgée de cinq jours. Les grandes ouvrières

furent retenues pour ces essais car leur emploi permet, d'une part, d'éviter *a priori* un manque d'homogénéité qui accroîtrait la variabilité biologique de la réponse et, d'autre part, les expériences d'infection sont ainsi réalisées sur la forme qui a les rapports les plus fréquents avec le milieu extérieur (éclaireuses, récolteuses, gardiennes).

FIG. 1. — Comportement d'amasement d'*A. octospinosus* sur gélose contaminée par *E. coronata* (C) ; B : gélose contaminée par *Aspergillus* sp. ; A : gélose témoin.

Le tableau I montre la rapidité de l'action létale de la mycose. Les fourmis placées sur la culture d'*E. coronata* n'ont pas survécu plus de cinq jours (TL 50 % :

TABLEAU I. — Pourcentage de mortalité cumulée sur 100 individus en fonction de la nature du substrat sur lequel sont élevées les grandes ouvrières.

Jours	Témoin sec	Gélose avec <i>E. coronata</i>	Gélose seule
0	0	0	4
1	0	2	4
2	3	20	22
3	4	48	38
4	6	82	42
5	9	100	56
6	12		76
7	16		88
8	23		98
9	34		98
10	47		98
11	59		100
15	83		
20	96		
25	99		
30	100

FIG. 2. — Méthode utilisée pour la mise en évidence de la pathogénie des spores : a) boîte de culture d'*E. coronata* ; b) projection des spores ; c) fourmis ; d) réservoir d'humidité.

mis en évidence la persistance de leur pouvoir de germination après 12 jours. La mortalité est moins rapide dans ces conditions (TL 50 % : 6 jours) que dans l'expérience précédente (TL 50 % : 3 jours), car les fourmis étaient alors en contact direct, dans un milieu humide, avec le mycélium, les spores et les excréments.

D'après les expériences suivantes le mode d'action de *E. coronata* est lié à la présence de toxines excrétées :

a) Le filtrat d'une culture agitée (3 jours, eau = 200 ml, maltose : 10 % ; peptone 5 % ; pH : 8,5 ; 678 mg de poids sec de *E. coronata*) est présenté en boisson à la Fourmi. La figure 4 suggère la présence d'un principe toxique *per os*.

b) Si l'on augmente en boîte de Pétri la dose du filtrat incorporé à l'agar des milieux il apparaît (Tableau II) que la mortalité de 100 ouvrières saines et indemnes est accélérée. Les contacts buccaux avec le milieu semblent suffire pour donner ces résultats.

FIG. 3. — Mortalité des ouvrières sous une pluie de spores sur substrat sec et en atmosphère humide : 0 : témoins ; + : traité.

3 jours). Les cadavres sont retirés des boîtes et placés sur un buvard humide pour vérifier le développement effectif de la mycose. Il n'y a pas de mortalité par mycose dans le témoin, mais le substrat engluant est à l'origine d'une longévité plus courte qu'en boîte à fond sec.

Le substrat utilisé pour l'expérimentation ayant des répercussions très importantes on eut recours à la technique de projection des spores (fig. 2) en milieu sec. Une boîte de culture âgée de quatre jours est retournée au-dessus de dix ouvrières et ceci selon cinq répétitions. La figure 3 illustre l'évolution de la mortalité induite par les conidies. Un prélèvement de spores projetées sur le fond des boîtes a

c) Dans ce même filtrat la Fourmi subit un bain forcé de 30 secondes. Ceci pour un lot de fourmis indemnes puis pour un lot de fourmis ayant subi, au bistouri stérilisé, une lésion atteignant l'hypoderme du thorax. D'après le Tableau III, la pénétration de la toxine dans l'hémocoel provoque une mortalité anticipée.

FIG. 4. — Mortalité par prise de boissons sur le filtrat d'une culture d'*E. coronata* (O : traité ; o : témoin).

TABLEAU II. — Influence de la concentration du milieu gélosé en filtrat de culture d'*E. coronata* sur la mortalité de *A. octospinosus* en temps léthal pour 50 % de la population (en jours)

Dose	75 %	50	25	5	0.5	0
TL 50 %	1	4	6	9	12	11

TABLEAU III. — Influence du contact cuticulaire avec le filtrat sur la mortalité selon l'état de la cuticule en temps léthal pour 50 % de la population (en jours)

	Cuticule thoracique	Témoin sec	Témoin bain eau distillée	Bain dans le filtrat
TL 50 %	<div> <div></div> <div>sans lésion</div> </div> <div> <div></div> <div>avec lésion</div> </div>	<div>9</div> <div>7</div>	<div>8</div> <div>8</div>	<div>8</div> <div>2</div>

Résistance des conidies aux facteurs de l'environnement

La croissance de *E. coronata* sur milieux gélosés additionnés de malt et peptone s'effectue aisément. Elle est rapide à la température du laboratoire (23 °C) : une croissance radiale moyenne de 15 mm par jour est classique.

Sur un milieu malté et peptoné (agar : 20 % ; malt : 10 % ; les croissances sont évaluées pour trois répétitions à 12 — 17 — 22 — 28 — 32 et 37 °C. Il apparaît que la température optimale se situe vers 28 °C (Tableau IV), les fortes températures bloquent la croissance et les faibles la ralentissent. L'effet des températures élevées est connu (Hall et Bell, 1961; Renoirte *et al.*, 1965) et se trouve confirmé ici pour la souche guadeloupéenne.

TABLEAU IV. — Expansions radiales journalières moyennes de *E. coronata* sur milieu malté-peptoné à diverses températures

Températures	12 °C	17 °C	22 °C	28 °C	32 °C	37 °C
Expansion radiale (mm par jour)	2,1	7,5	9,0	22,5	18,5	7,0

croissances
arrêtées

La survie des conidies projetées en milieu sec a été étudiée en retournant pendant quelques heures des boîtes de culture d'*E. coronata*. Le couvercle, blanchi de spores est alors recouvert par un fond de boîte de Pétri sec et stérile et laissé dans l'ambiance du laboratoire : 23 °C et 60 % HR. Des prélèvements à l'aide d'un bloc d'agar de taille définie (4 mm³) y sont faits tous les deux jours en tamponnant (en trois endroits écartés de 120°) le couvercle afin de vérifier le maintien du pouvoir germinatif.

Au bout d'une semaine en milieu sec la conidie perd son pouvoir germinatif (Tableau V).

TABLEAU V. — Perte du pouvoir germinatif des conidies d'*E. coronata* et influence sur le retard à leur germination lors d'une exposition à 60 % HR

	Durée en jours du séjour des conidies sur verre sec (60 % HR, 23 °C)					
	0	2	4	6	8	10
Nbre de colonies viables sur 4	4	4	4	3	2	0
Retard moyen à la germination (en jours)	0	1,3	1,8	3,4	2,0	—

La résistance des conidies d'*E. coronata* aux rayons solaires stérilisants a été estimée à l'aide d'un tube à ultra-violets neuf de 40 cm du type « General Electric Germicidal » émettant entre 2 400 et 2 600 Å° et placé à 50 cm des spores sous un réflecteur confectionné en papier aluminium ménager. Les conidies furent exposées soit sur substrat sec (verre), soit sur un milieu humide (culture). La température au niveau des conidies n'a jamais dépassé 27 °C. Les cinq prélèvements de spores à réensemencer pour vérifier leur vitalité furent effectués selon la méthode d'échantillonnage précédente et les expansions radiales moyennes des cinq cultures filles évaluées le deuxième jour de la culture (Tableau VI).

Un milieu humide protège donc mieux la spore de l'irradiation qu'un substrat sec.

La spore projetée de *E. coronata* possède une résistance d'une semaine à la dessiccation et une température de croissance optimale proche de la température du

milieu subtropical antillais dont l'humidité ambiante quasi-permanente, protégerait également le germe contre les effets stérilisants d'un ensoleillement direct, occasionnel dans les sous-bois de nidification d'*A. octospinosus*.

TABLEAU VI. — Expansions radiales moyennes (en mm) au 2^e jour suivant l'ensemencement de conidies exposées pendant des durées croissantes aux rayons stérilisants sur milieux sec et humide

Substrat	Temps d'exposition (secondes)					
	Témoin	10	30	60	150	240
Milieu sec	17,5	4,0	3,8	2,5	1,2	0,0
Milieu humide		13,8	14,0	11,8	13,0	9,2

Discussion

En conclusion, il apparaît que *E. coronata* est un agent pathogène pour *A. octospinosus* : les spores provoquent la mort de la Fourmi et un principe toxique agit par ingestion ou par pénétration cuticulaire dans l'hémocoel selon les mêmes processus que pour d'autres insectes.

Ainsi, Yendol *et al.* (1968) et Prasertphon et Tanada (1969), indiquent que *E. coronata* et *E. apiculata* donnent en milieu liquide des toxines efficaces sur *Galleria mellonella* et *Musca domestica*. Jonsson (1968) précise que la quantité de toxines émises dépend de la souche et du milieu. Elles agissent après injection ou pénétration du champignon dans l'hôte. Un travail plus récent, Yendol et Rosario (1972), compare chez *Reticulitermes flavipes* (Koller) les diverses méthodes d'inoculation expérimentale qui ont été, ou pourraient être, utilisées dans l'évaluation de la virulence des *Entomophthora* : la méthode de la culture renversée est opposée à celle de la mise en contact direct avec la culture. Ces auteurs observent également une mortalité plus rapide lors du contact direct avec le milieu de culture. L'augmentation de l'inoculum et la présence d'une mycotoxine doivent être à l'origine de cette différence.

L'intérêt théorique de cette mycose dans les conditions climatiques de la Guadeloupe, pour la lutte contre cette Fourmi est réel. Les travaux de Yendol (1968) et de Sawyer (1929, 1931) montraient déjà que *E. coronata* est l'espèce la plus active, et la plus tolérante aux facteurs physicochimiques du milieu, que son usage en lutte intégrée avec des insecticides est préférable à celui d'*E. apiculata* ou *E. virulenta*. Toutefois, la littérature médicale mentionne qu'en zone tropicale *E. coronata* peut être à l'origine de rhinophycomycoses de vertébrés. Cette phycomycose

nasofaciale humaine, qui reste rare, fut décrite par divers auteurs (Martinson, 1963; Bras *et al.*, 1965; Renoirte *et al.*, 1965; Andrade *et al.*, 1967).

Cette infection n'est cependant pas exclusive de l'homme, mais apparaît sur d'autres vertébrés : une nouvelle mycose nasale et labiale du cheval est signalée au Texas par Bridges *et al.* (1962), puis par Chauhan *et al.* (1973); la mort d'une Souris lui est imputée dans des expériences d'inhalation (Lowe et Kennel, 1972). Une issue fatale est connue à ce jour pour l'homme (Renoirte *et al.*, 1965) et des cas humains existent en Afrique, en Inde, en Colombie, en Jamaïque, au Brésil, etc. Cette mycose tropicale frappe surtout les adultes actifs, mais n'est pas contagieuse. Une enquête menée auprès des Instituts Pasteur de la Guadeloupe et de la Guyane est restée négative quant à son incidence dans la zone française (Drouhet, comm. pers.). Le seul cas antillais connu reste donc celui de l'île Cayman au Sud de Cuba (Bras *et al.*, 1965).

Bien que les vertébrés touchés par cette mycose présentaient probablement un terrain favorable à l'inoculum (Heimpel, 1971), il nous paraît indispensable de souligner les risques que pourraient présenter l'emploi de cette espèce d'Entomophthorale dans la lutte biologique en climat tropical.

Seuls des essais de pathogénie pour les vertébrés du type de ceux faits par Soper et Bryan (1974) avec *E. thaxteriana* permettraient d'apprécier la réalité du danger de la souche guadeloupéenne de *E. coronata*.

REMERCIEMENTS

Nous remercions : MM. Latgé, Remaudière, Hurpin et Ferron pour la détermination de l'agent pathogène et les conseils de rédaction du manuscrit ; le D^r Lefichou pour la documentation médicale ; M. Messiaen pour ses conseils de mycologue et le P^r Drouhet pour sa communication personnelle.

Bibliographie

- ANDRADE (A. S.), PAULA (L. A.), SHERLOCK (I. A.) et CHEEVER (A. W.), 1967. — Nasal granuloma caused by *Entomophthora coronata*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, 31-33.
- BRAS (G.), GORDON (C. C.), EMMONS (C. W.), PRENDEGAST (K. M.) et SUGAR (M.), 1975. — A case of Phycomycosis observed in Jamaica, infection with *E. coronata*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 141-145.
- BRIDGES (C.), ROMANE (W.) et EMMONS (C.), 1962. — Phycomycosis of horses caused by *Entomophthora coronata*. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 140, 673-677.
- CHAUHAN (H. V.), SHARMA (G. L.), KABRA (D. S.), MALHOTRA (F. C.) et KAPUR (M. L.), 1973. — A fatal cutaneous granuloma due to *Entomophthora coronata* in a mare. *Vet. Rec.*, 92, 425-427.

- DIEUZEIDE (R.), 1925. — Les champignons entomophytes du genre *Beauveria* (Vuillemin). Contribution à l'étude de *Beauveria effusa* Vuill. parasite du Doryphore. *Ann. Epiphyties*, 2, 185-219.
- GOESWALD (K.), 1938. — Über den insektentötenden Pilz *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Bisher Bekanntes und eigene Versuch. *Arb. Biol. Reich. amst.*, 22, 399-452.
- HALL (I. N.) et BELL (J.), 1961. — Further studies on the effect of temperature on the growth of some entomophthoraceous fungi. *J. Insect Pathol.*, 3, 289-296.
- HEIMPEL (A. M.), 1971. — Safety of insect pathogens for man and vertebrates. In : Microbial control of Insects and Mites. Burges et Hussey, Ed., *Academic Press*, Publ., London and New York.
- JONSSON (A. G.), 1968. — Protease production by species of *Entomophthora*. *Appl. Microbial.*, 16, 450-457.
- LOWE (R. E.) et KENNEL (E. W.), 1972. — Pathogenicity of the fungus *Entomophthora coronata* in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes taeniorhynchus* Mosq. *News*, 32, 614-620.
- MARTINSON (F.), 1963. — Rhynophycomycosis. *J. Laryngol. Otol.*, 77, 691-705.
- NIRULA (K. K.), 1957. — Observations on the green muscardine fungus in populations of *Oryctes rhinoceros* L. *J. Econ. Entomol.*, 50, 767-770.
- PRASERTPHON (C.), 1963. — Pathogenicity of different strains of *Entomophthora coronata* Cost. Kervork. for larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. *J. Invertebrate Pathol.*, 5, 174-181.
- PRASERTPHON (C.) et TANADA (Y.), 1969. — Mycotoxine of Entomophthoraceous fungi. *Hilgardia*, 39, 581-600.
- RENOIRTE (R.), VANDEPILLE (J.), GATTI (P.) et WERTH (R.), 1965. — Phycomycose nasofaciale (Rhynophycomycose) due à *Entomophthora coronata*. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, 58, 847-862.
- RUDAKOV (O. L.), 1962. — Mikozy murav'ev (Predvany scobshchenie). Sb. entomol. rabot. akd. nauk. Kirghizsk. SSR. Kirghizsk, otb. Vses. *Entomol. obshch.*, 1, 128-130.
- SAWYER JR. (W. H.), 1929. — Observations on some entomogenous members of the Entomophthoracea in artificial culture. *Amer. J. Bot.*, 16, 87-121.
- SAWYER JR. (W. H.), 1931. — Studies on the morphology and development of an insect-destroying fungus, *Entomophthora sphaerosperma*. *Mycologia*, 23, 411-432.
- SCHAEFFER (E. E.), 1941. — A fungus of the family *Entomophthoraceae* found on sugar ants (*Camponotus* sp.). *Bothalia*, 4, 237-249.
- SOPER (R. S.) et BRYAN (T. A.), 1974. — Mammalian safety of the Aphid attacking fungus *Entomophthora* nr. *thaxteriana*. *Environ. Entomol.*, 3, 346-347.
- TURIAN (G.) et WUEST (J.), 1969. — Mycoses à Entomophthoracées frappant des populations de fourmis et de drosophiles. *Bull. Soc. Entomol., Suisse*, 42, 197-201.
- WEBER (N. A.), 1972. — The fungus culturing behaviour of ants. *American Zoologist*, 12, 577-587.

- WUEST (J.) et TURIAN (G.), 1967. — Une épizootie à *Tarichium* (Entomophthoraceae) sur la larve de *Ocnogyna parasita* Hbn. (Lépid. Arcctiidae). *Mitt. Schweiz. ent. Gesell.*, 40, 96-99.
- YENDOL (W. G.), 1968. — Factors affecting germination of *Entomophthora conidia*. *J. Invertebrate pathol.*, 10, 116-121.
- YENDOL (W. G.), MILLER (E. M.) et BEHNKE (C. N.), 1968. — Toxic substances from entomophthoraceous fungi. *J. Invertebrate Pathol.*, 10, 313-319.
- YENDOL (W. G.) et ROSARIO (S. B.), 1972. — Laboratory evaluation of methods for inoculating termites with entomophthoraceous fungi. *J. Econ. Entomol.*, 65, 1027-1029.
-