

ÉTUDE D'UNE BACTÉRIE AÉROBIE SPOROGENE
ENTOMOPHAGE ET CRISTALLOPHORE ISOLÉE
D'UN POISSON AFRICAIN A MOPTI (République du Mali)

Tilapia zilli (GERVAIS 1848)

par C. TOUMANOFF, J. DURAND et M^{me} A. FRANÇOIS

Il y a déjà plus de dix ans, il était démontré que certains représentants du genre *Bacillus*, plus fréquemment et plus spécialement ceux de l'espèce *B. cereus*, s'avèrent pathogènes pour les insectes, en particulier les insectes Lépidoptères. Cette virulence des bactéries aérobies sporogènes est due surtout à la présence d'inclusions protéiques qui ont leur siège dans le protoplasme bactérien, non loin des spores, ces dernières ayant alors une position oblique. Ces inclusions cristallines ont été constatées le plus souvent chez les *B. cereus*, dont on compte actuellement de nombreuses variétés, que l'un de nous a dénommées pour la première fois « cristallophores » (15).

Il n'entre pas dans nos intentions d'énumérer dans cet exposé toutes ces variétés, dont le nombre a augmenté depuis, et dont nous avons précisé, ainsi que d'autres auteurs, les affinités et les différences tant du point de vue morphologique, biochimique, que la spécificité de leur action sur divers insectes (7, 17, 19).

Une des caractéristiques principales de *B. cereus* est la production de lécithinase qui s'avère toxique pour les insectes, concurremment avec d'autres facteurs, et notamment la formation d'inclusions cristallines, ainsi que l'endo et l'exotoxine produites par ces bactéries (18, 9, 10).

Il est néanmoins certain que l'aptitude à former les inclusions cristallines protéiques toxiques n'est pas l'apanage de *cereus*, et qu'elles peuvent se rencontrer également chez d'autres formes de bacilles, et notamment chez deux bactéries aérobies sporogènes décrites par ANGUS et HEIMPEL sous les noms de *B. entomocidus entomocidus* et *B. entomocidus subtoxicus* (7).

On doit noter, d'autre part, que même certaines formes de *cereus* ont une aptitude moins manifeste que d'autres à produire la lécithinase, et ce fait a été noté dans une des publications antérieures (17).

Il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux concernant la présence dans la nature (eau, sol, débris animaux, végétaux, etc...) de bac-

téries aérobies sporogènes cristallophores qu'il s'agisse de *cereus* ou d'autres formes.

Il est curieux que les bactériologistes s'occupant de l'étude du sol, qui rapportent parfois dans leurs publications des chiffres impressionnants de souches de diverses bactéries aérobies sporogènes, et entre autres de *B. cereus*, ne fassent jamais mention de la présence parmi les cultures qu'ils ont isolées, soit de *cereus* cristallophores, soit d'autres bactéries cristallophores.

Cela donne à penser, ou bien que ces souches cristallophores, pathogènes pour les insectes, sont rares ou inexistantes dans la nature (jamais signalées jusqu'ici comme isolement naturel normal), ou bien, comme l'a affirmé à maintes reprises l'un de nous, que ces bactéries constituent une adaptation au parasitisme quasi-permanent, dont l'effet se traduit par l'accroissement de la virulence dû à des passages successifs sur les insectes.

On peut néanmoins constater que ces germes existent dans la nature, puisqu'une souche cristallophore de *cereus* apparentée au *B. cereus* var. *alesti* fut isolée de l'intestin des abeilles adultes normales qui ont pu absorber des bactéries sporogènes en butinant sur des fleurs contaminées, ou bien en absorbant le germe en question dans un point d'eau qu'elles ont pu visiter pour s'abreuver (20).

Ce préambule nous a paru nécessaire pour mettre en vedette l'importance du fait que nous signalons dans cette note, et qui résulte d'une exploration méthodique de la flore bactérienne de divers poissons africains, du point de vue de la flore bactérienne intestinale considérée comme normale, puisque l'un de nous, en effectuant le recensement de cette flore, s'est adressé surtout à des poissons normaux prélevés dans leurs biotopes naturels, et chez lesquels aucun signe extérieur de maladie n'a été relevé.

C'est, en effet, à la suite d'une mission accomplie à Mopti (République du Mali) par l'un de nous (DURAND) qu'a été faite, entre autres, cette constatation que nous avons depuis longtemps retenue, et que nous ne rendons publique qu'actuellement en attendant de pouvoir relater d'autres constatations concernant les multiples autres bactéries qui furent isolées de diverses espèces de poissons de cette région, qui seront rapportées éventuellement.

Si jusqu'ici les éléments recueillis dans ce domaine n'ont pas été publiés, c'est en raison des progrès qui ont été réalisés dans le domaine de la taxonomie bactérienne à laquelle il faut s'adapter afin de rendre utile l'étude qu'on entreprend, et éviter un encombrement de la bibliographie par des descriptions superficielles insuffisantes.

En l'occurrence, nous avons eu affaire à une bactérie aérobie isolée de *Tilapia zilli* (GERVAIS, 1848) pêchée à Mopti, le 7 juillet 1962, dans le Bani, affluent du Niger, en compagnie d'une autre bactérie déterminée comme étant voisine de *Bacillus licheniformis*.

Voici la description des caractères biochimiques de cette souche : on note tout de suite que cette bactérie ne produit pas de lécithinase.

Ce germe présente des caractères très particuliers qui ne permettent pas de l'assimiler à aucun autre germe connu.

La présence de formations cristallines parasporales fait immédiatement penser au groupe *cereus*, auquel il est cependant impossible de l'assimiler du fait qu'il n'a pas de lécithinase.

Sur le plan morphologique, il s'agit là d'une bactérie d'assez grande dimension, de 2 à 5 μ , formant des spores subterminales ou terminales ayant le sporange non enflé. Au moment de la sporogénèse, le bâtonnet est raccourci, les spores sont ovales et mesurent de 1,5 à 2 μ . Les extrémités polaires des spores après leur libération sont plus sombres que le reste du corps, donnant l'impression d'un reliquat bactérien qui demeure sur les deux pôles opposés. Deux inclusions cristallines se forment à l'intérieur des bactéries au moment de la sporogénèse, mais quelquefois on ne voit apparemment qu'une seule inclusion.

Les inclusions cristallines se présentent par deux : l'une, la plus grande, attestant la forme d'un losange, l'autre, plus petite, plutôt une forme irrégulière ou quadrangulaire aux angles arrondis, ou bien nettement triangulaire, qui très souvent demeure attachée à la grande inclusion parasporale.

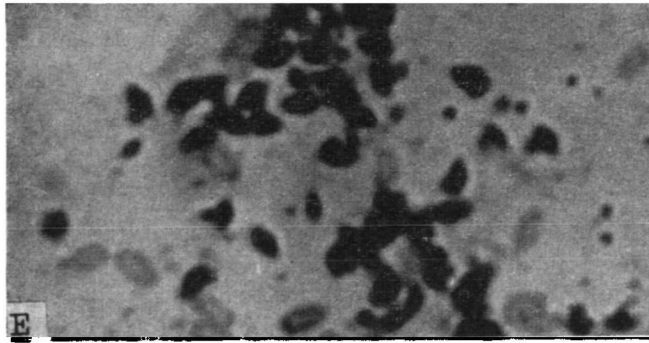
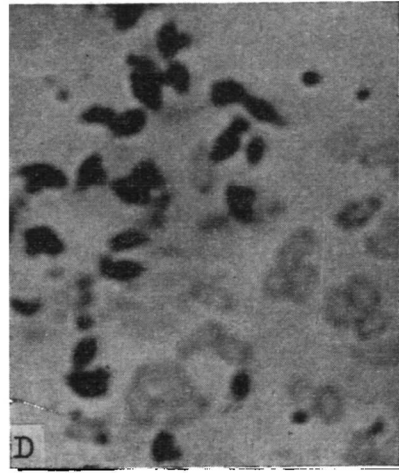
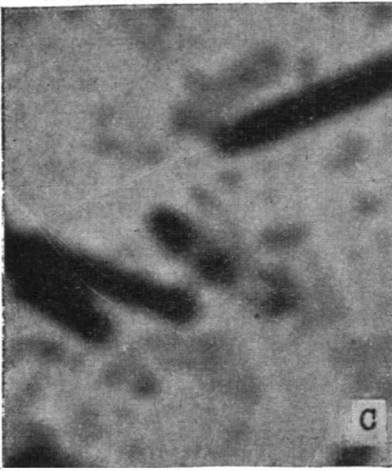
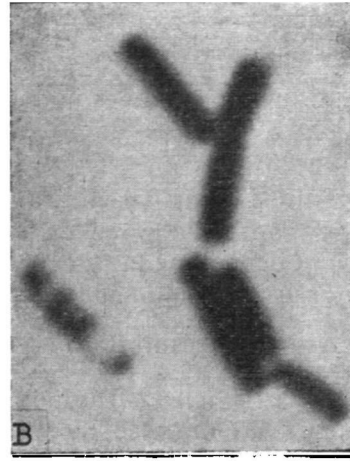
La mobilité est nette sur le milieu mannitol — mobilité moins manifeste à l'examen entre lame et lamelle en milieu liquide. La coloration des cils par la méthode de Leifson qui réussit en général avec les représentants du genre *Bacillus*, n'a pas été nettement réalisée avec cette bactérie. Après cette coloration, on observe chez toutes les bactéries sans exception une auréole rose qui fait penser à l'accolement possible des cils, mais nous ne pouvons pas affirmer avec certitude la présence de cils.

Toutes les autres espèces à sporanges non enflés, « non swollen » (suivant l'expression des auteurs de langue anglaise) se trouvent éliminées par différents caractères (A. M. C., action sur les citrates, transformation des nitrates en nitrites, action sur les sucres et en particulier sur le mannitol, l'arabinose, le saccharose).

Si les caractères biochimiques de routine permettent d'assurer « grosso modo » la position spécifique de cette bactérie, il faut avoir recours, plus spécialement lorsqu'il s'agit de bactéries aérobies cristallophores, à l'étude des inclusions toxiques qui peuvent être différentes dans diverses souches bactériennes.

Il est important de procéder à l'étude de la solubilité des inclusions cristallines dans diverses conditions de pH, des propriétés qu'attestent les protéines extraites de ces inclusions, leur teneur en azote et en phosphore, et aussi leur composition en acides aminés, pour ne citer que les principaux caractères à mettre en évidence sur le plan biochimique plus complet que celui que nous offre la technique de routine bactériologique.

Les connaissances plus approfondies rendent plus aisée la comparaison d'une souche avec celles qui sont déjà connues, et cela, en utilisant les techniques modernes, comme l'ont fait FITZ-JAMES et YOUNG (3) en



- Fig. A. — Aspect d'une culture de 24 heures avec un début de sporulation (gross. $\times 1.000$).
- Fig. B. — Aspect de quelques bacilles dont un à gauche en voie de formation d'une spore et deux inclusions cristallines (gross. env. $\times 5.000$).
- Fig. C. — Le même germe avec au centre un bacille formant la spore et ayant apparemment une seule inclusion cristalline (gross. env. $\times 5.000$).
- Fig. D et E. — Photomicrographies montrant les inclusions protéiques cristallines. On remarque de grands cristaux avec les petits qui sont accolés à leurs bords, ou bien les cristaux du même type séparés les uns des autres voisinant avec de nombreuses spores. On remarquera sur le bas de la figure D les deux cristaux (grand et petit) accolés (gross. env. $\times 8.000$).

apportant des données nouvelles et vraiment originales pour la définition du genre *Bacillus* dans son ensemble et des diverses espèces qui le composent.

Afin d'avoir des indications complémentaires sur cette souche, nous l'avons adressée pour examen au Dr. FITZ-JAMES, dont la notoriété en ce qui concerne la structure physico-chimique des inclusions protéiques des *cereus* entomophages est bien connue.

Voici les résultats d'études qu'il nous a communiqués :

« *Extraction* : Tamponnés avec un tampon tris-mercaptoethanol, les deux cristaux se dissolvent, les grands à pH 10,2 et les petits à pH 11,4-11,8 (lorsqu'ils sont séparés promptement).

« Les extraits bruts présentent à pH 10,2 un simple sommet de migration, à pH 11,8 un sommet double. Ceux-ci apparaissent avoir des migrations distinctement différentes. Les images de l'ultra-centrifugation restent à analyser.

« *Recristallisation* : Extrait à pH 10,2. Protéine amorphe à pH 11,8. Les microcristaux sont observés (observation en contraste de phase et au microscope électronique).

« La protéine pH 10,2 est soluble dans l'acide phosphotungstique.

« Étudiée en acide phosphotungstique, elle présente un double sommet possible, et dans le tampon pH 10,2, un sommet simple (observation au microscope électronique, ultra-centrifugation).

« Les protéines à pH 11,8 sédimentent en ultra-centrifugation en présentant un double sommet et se recristallisent comme un microcristal simple.

« Analyse (préliminaire) de la protéine cristalline séparée (separated cristal-protein) :

1° Protéines pH 10,2 — N : P = 120 : 1.

En admettant une teneur en azote de 16%, cela ferait une teneur en phosphore de 0,13%.

2° Protéines pH 11,8 — N : P = 50 : 1.

En admettant une teneur en azote de 16%, cela ferait une teneur en phosphore de 0,27%.

D'après l'avis de FITZ-JAMES, cette souche ressemblerait à *B. cereus* var. *gallieriae* de l'U. R. S. S. (SCHWETSOVA) toutefois, elle produit la protéine parasporale de dimensions moléculaires différentes. Selon FITZ-JAMES, une comparaison immunologique entre ces deux bactéries serait intéressante.

De l'ensemble des faits que nous avons exposés, résultant des caractères biochimiques de routine ainsi que des observations de FITZ-JAMES, on peut conclure qu'il s'agit, en l'occurrence, d'une bactérie aérobie sporogène de type spécial, pouvant être considérée comme une forme nouvelle, mais les détails d'ordre taxonomique seront rapportés ultérieurement.

Les bactéries aérobies sporogènes à inclusions cristallines n'étant

	24 heures	48 heures	3 jours	10 jours	15 jours	30 jours
Glucose	+					
Lactose	(+)	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>
Hajna	Glucose ...	+				
	Lactose ...	—				
	SH ₂	—	SH ₂ —	—	—	—
Simmons	— (p. cult.)			—	—	—
Esculine	Traces	<i>Id.</i>	(+)	+		
Urée	—					
Indole	—					
Rouge méthyle	+					
A.M.C.	+					
Mannitol	(+)	+				
Mobilité	+					
État frais	Peu mobiles					
<i>Sucres :</i>						
Arabinose	—	—	+	—	—	—
Amidon	+					
Dulcitol	—	—	—	—	—	—
Galactose	+	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	(+)
Glycérine	—	—	—	(+) tr. faib.	<i>Id.</i>	(+)
Lévilose	+					
Mannite	—	—	—	—	—	(+)
Maltose	+	—				
Saccharose	(+)	+	<i>Id.</i>	+		
Xylose	(+)	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>
Pommes de terre ...	Cult. faible, blanche et mate	Beige, milieu inchangé	<i>Id.</i>	Aspect craquelé	<i>Id.</i>	Aspect craquelé, milieu brun
Petit lait tournesolé.	Pas de vir.	<i>Id.</i>	Bleu intense	<i>Id.</i> , pellic. bleues	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>
Lait tournesolé	Vir. 0 Dig. 0	Palissement fond du tube Dig. 0	<i>Id.</i>	Blanchiment fond du tube 1/2	Dig. 2/3 liquide rougeâtre	Dig. 3/4
Gélose V. F.	Anaérobie facultatif					
Sérum coagulé	Pas de liq.	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	Tr. lég. déb. liq.	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>
Sérum Loeffler	Pas de liq.	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	Lég. déb. liquéf.	Liq. accentuée	Liquéfaction stoppée
Gélose sérum	Bonne culture bl. mate et grasse, catalase +.					
Bouillon ordinaire ..	Cult. moy.					
	Léger trouble uniforme du milieu Dépôt floconneux au fond du tube					
Gélose au rouge neutre.....	Vir. 0 Gaz 0	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>
Gélose à l'œuf	Lécith. — Bonne culture brillante bl. aspect granuleux	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>
Gélatine nutritive...	Pas de liq.	<i>Id.</i>	Liq. tot.			
Nitrites	—					
Gélose ordinaire	Bonne culture blanche en pellicule					
Caractères morph. ...	Bactéries Gram positif 0,8 μ à 1 μ × 2 à 5 μ Colonies blanches Spores sub-terminales Nombreux cristaux					
Origine	<i>Tilapia Zilli</i> (Gervais) 1848 Intestin MOPTI, 7 juillet 1962					

connues que comme parasites d'insectes, nous avons pensé qu'il s'agissait, dans notre cas, d'une bactérie entomopathogène.

Afin de vérifier cette supposition, nous avons éprouvé son action sur les vers à soie.

Pour cela, ont été utilisées des cultures âgées de deux mois, qui furent administrées aux vers en humectant des feuilles de mûrier avec les suspensions bactériennes (une culture dans 10 ml d'eau physiologique stérile).

Les résultats ont été très spectaculaires, et la paralysie chez les insectes survenait dans un délai de 4 à 10 heures, la mort se produisant de 4 h 30 à 24 heures au plus tard après les repas infectants, et les symptômes d'infection comparables à ceux décrits par divers auteurs à la suite d'infection par les bactéries entomopathogènes du même type.

Il apparut de ces essais que nous étions en présence, dans ce cas, d'une souche pathogène pour les insectes, et vraisemblablement se trouvant dans le tube digestif du poisson à la suite d'une ingestion occasionnelle.

On pourrait se demander à la faveur de quelle circonstance peut se produire la présence de bactéries cristallophores dans la flore bactérienne d'un poisson africain.

Il est possible que la bactérie ait pu pénétrer dans le canal alimentaire du poisson lorsqu'il s'est trouvé au fond de l'eau ou près des berges, en contact avec des débris de larves de Lépidoptères mortes de la flacherie. Il est devenu porteur de germe soit en les ingérant, soit à la faveur de leur pénétration avec le courant d'eau. Les insectes morts de la flacherie, comme on le sait, sont souvent accrochés à des branches d'arbustes, d'arbres, ou bien aux herbes qui peuvent tomber dans les ruisseaux.

Un autre moyen de pollution de l'eau par les germes entomophages est certainement l'inondation des terrains avoisinant les affluents du Niger, inondation qui s'observe couramment en saison de pluies et qui peut submerger les cadavres d'insectes morts au cours des épizooties.

On peut donc dire qu'il n'est nullement surprenant de trouver dans le tube digestif d'un poisson un germe entomopathogène cristallophore.

Le poisson porteur de ce germe, *Tilapia zilli*, comme tous ses congénères, est très vorace et est notamment connu comme culiciphage très utile.

Il nous a été impossible d'expérimenter avec *Tilapia*, mais les expériences faites avec *Carassius auratus* nous ont permis de constater que ces poissons s'attaquent très volontiers à des chenilles de *Bombyx mori* qu'ils mordillent, blessent, puis dévorent. Ces poissons s'attaquent également à des cadavres d'insectes morts d'infections expérimentales par des germes entomopathogènes.

S'il en est ainsi dans les conditions expérimentales, il doit en être de même dans la nature. L'apparence du *Tilapia* porteur du germe cristallophore infectieux n'autoriserait pas à le considérer comme malade.

Nous considérons que l'isolement a été fait d'un poisson sain.

Toutefois, pour avoir une idée de l'effet de ce germe sur les poissons, nous avons fait des essais de contamination sur *Carassius auratus*. Sur trois poissons, un mourut avec signes de paralysie et scoliose, les deux autres morts respectivement, l'un au bout de 45 jours, et l'autre au bout de 4 mois, ne présentèrent aucun signe particulier permettant d'admettre une infection. Les *Carassius* pouvant être conservés dans les aquariums très longtemps, il n'est pas à exclure certain effet pathogène de notre germe sur les poissons en se basant sur la paralysie observée chez le premier poisson et aussi sur la mort des autres. La mort n'a pas été accompagnée de la pullulation des bactéries dans la cavité générale, et on ne pourrait affirmer d'une manière certaine son effet pathogène sur les poissons.

Nous avons constaté également qu'un certain effet pathogène, quoique faible, fut exercé par ce germe sur l'écrevisse américaine, fait qui ne sera relaté que plus tard.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANGUS (T. A.). — An bacterial toxin paralysing silkworm larvæ. *Nature*, 173. 1954, 545-546.
2. FITZ-JAMES (P. C.), TOUMANOFF (C.) et YOUNG (E. I.). Localization of a toxicity for silkworm larvae in the parasporal inclusions of *Bacillus cereus* var. *alesti*. *Canad. J. Microbiol.* 4. 1958, 385-392.
3. FITZ-JAMES (P. C.) et YOUNG (E. I.). — Comparison of species and varieties of the genus *Bacillus*. Structure and nucleic acid content of spores. *J. Bact.* Baltimore, 78. 1959, 743-754.
4. HANNAY (C. L.) et FITZ-JAMES (P. C.). — The protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. Berliner. *Canad. J. of Microbiol.* 1. 1955, 694.
5. HANNAY (C. L.). — Inclusions in bacteria. In : *Bact. Anatomy, Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 6. 1956, 1004.
6. HEIMPEL (A. M.) et ANGUS (T. A.). — Recent advances in our knowledge of some bacterial pathogens of insects. *Proc. 10th intern. Congr. Ent.* Montréal, 4. 1956-1958 a, 711-722.
7. HEIMPEL (A. M.) et ANGUS (T. A.). — The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. *Canad. J. Microbiol.*, 4. 1958 b, 311-319.
8. HEIMPEL (A. M.) et ANGUS (T. A.). On the taxonomy of certain entomogenous crystalliferous bacteria. *J. Insec. Path.* 2. 1960 b, 311-319.
9. KRIEG (A.). — *Bacillus thuringiensis* Berliner. Über seine Biologie Pathogenie und Anwendung in der biologischen Schädlingsbekämpfung. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* Berlin-Dahlem 103. 1961, 1-79.
10. KRIEG (A.) et HERFS (W.). — Empfindlichkeit verschiedener Insektenarten gegenüber den « Exotoxinen » von *Bacillus thuringiensis*, Berliner.

11. KRIEG (A.). — Bioassay and standardization of *Bacillus thuringiensis*. Préparation : Spore-endotoxine-complex. *Entomophaga*, 10 (1), 1956, 49-54.
12. TOUMANOFF (C.). — Description de quelques souches entomophytes de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'œuf. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 85. 1953, 90-98.
13. TOUMANOFF (C.). — L'action de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago sur les chenilles de *Galleria mellonella* L. et *Hyponomeuta cognatella* Hb. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 86. 1954 a, 570-579.
14. TOUMANOFF (C.). — L'effet des antibiotiques sur les souches entomophytes ou non de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 87. 1954, 370.
15. TOUMANOFF (C.). — Au sujet de souches cristallophores entomophytes de *cereus*. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 88. 1955, 644-653.
16. TOUMANOFF (C.) et VIRAT (B.). — Action des antibiotiques et des sulfamides *in vitro* sur les bactéries aérobies sporogènes. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 88. 1955, 563-575.
17. TOUMANOFF (C.) et LE COROLLER (Y.). — Contribution à l'étude de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. cristallophores et pathogènes pour les larves de lépidoptères. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 96. 1959, 680-688.
18. TOUMANOFF (C.), VAGO (C.) et GLADILINE (C.). — Recherches sur l'effet toxique de *Bacillus cereus* var. *alesti* vis-à-vis des vers à soie. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 86. 1954, 438-445.
19. TOUMANOFF (C.) et DURAND (J.). — Virulence comparée pour les vers à soie (*Bombyx mori* L.) de quelques variétés de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. entomophages et cristallophores et de leurs inclusions cristallines. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 100. 1961, 290-306.
20. TOUMANOFF (C.). — Description d'un *Bacillus cereus* cristallophore du tube digestif de l'abeille normale. *Annales de l'Abeille*. 6. 1963, 4, 257-266.
21. YOUNG (E. I.) et FITZ-JAMES (P. C.). — Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus* var. *alesti*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6. 1959 a, 483-498.

* * *

Institut Pasteur, Service d'Entomologie médicale et de Pathologie des Insectes et O.R.S.T.O.M.
