LES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES
DANS LA COLONIE D'ABEILLES
(*APIS MELLIFICA* L.)

par

P. LAVIE

Station expérimentale d'Apiculture, Montfavet

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction

PREMIÈRE PARTIE

L'antibiotique du corps d'*Apis mellifica*

- I. — Matériel et techniques.**
- II. — Localisation de l'antibiotique présent chez *Apis mellifica*.**
- III. — Variation de l'activité de l'antibiotique chez *Apis mellifica* suivant différents facteurs.**
- IV. — Purification de l'antibiotique extrait de l'abeille.**
- V. — Action antibiotique in vitro de l'extrait alcoolique d'*Apis mellifica* L. sur quelques bactéries.**
- VI. — Actions diverses des substances extraites des insectes et des abeilles.**

Conclusion de la première partie.

DEUXIÈME PARTIE

- I. — L'antibiotique de la Propolis.**
 - II. — L'antibiotique de la cire d'*Apis mellifica*.**
- Conclusion des chapitres I et II**
- III. — L'antibiotique des pollens récoltés par *Apis mellifica* L.**
 - IV. — L'antibiotique du miel récolté par *Apis mellifica* L.**
 - V. — L'antibiotique de la gelée royale.**

VI. — Actions diverses dues aux substances présentes dans la colonie d'abeilles.

Conclusion de la deuxième partie.

TROISIÈME PARTIE

Les substances antibiotiques chez divers insectes.

Généralités.

I. — Les antibiotiques chez les insectes sociaux.

II. — Les antibiotiques chez les autres insectes.

Conclusion de la troisième partie.

Conclusion générale

Résumé

Summary

Zusammenfassung

Bibliographie

INTRODUCTION

J'ai été amené à étudier les substances antibiotiques chez *Apis mellifica* d'une manière fortuite. Un certain jour, ayant plongé, sans précautions d'asepsie, dans un milieu de culture liquide aéré, des abeilles fraîchement tuées et entières, je n'ai obtenu *aucun développement bactérien*. Quelques essais du même genre furent réalisés par la suite : en voici l'essentiel.

— Si j'ensemence un milieu de culture avec des *pièces thoraciques d'Apis*, je n'obtiens aucun développement bactérien (sauf dans 1 cas sur 6).

— Avec la *tête seule* ou l'ensemble de la *tête plus le thorax* plongés dans un milieu de culture, même résultat négatif. J'en ai conclu que le venin n'était pas en cause.

L'ensemble de ces constatations m'a orienté vers toute une série d'expériences destinées à rechercher l'existence et l'origine d'une substance antiseptique présente sur la surface du corps des insectes et surtout des abeilles.

Depuis 1942, des milliers de substances antibiotiques ont été isolées à partir des animaux ou des végétaux, mais soit que leur activité soit trop faible vis-à-vis des microbes ou que leur toxicité soit trop grande pour l'organisme, la plupart n'ont pas été utilisées, sauf quelques dizaines, en thérapeutique humaine ou vétérinaire. Ce n'est donc pas dans le but principal de fournir un nouvel antibiotique à la médecine que ce travail a été entrepris. La présence de principes antibiotiques chez l'abeille est d'un intérêt plus général et il dépasse également le cadre de la pathologie apiaire. Je pense que l'étude des moyens naturels de *défense biochimique* chez l'insecte revêt une très grande importance en entomologie et même sur un plan plus général dans la défense biochimique des êtres vivants envers les infections microbiennes. PAILLOT (1933) a mis l'accent sur l'importance de l'étude systématique de la pathologie chez l'insecte. Il a affirmé que les premières suggestions d'une lutte biologique en entomologie énoncées dès 1874 par PASTEUR ont été suivies d'échecs répétés simplement à cause de l'utilisation d'une arme dont on ignorait encore le mode d'action. Dès 1924, il a montré l'importance de l'étude comparée des processus de défense des êtres vivants envers les infections microbiennes et cette science, qu'il a appelée *l'immunologie comparée*, intéresse directement ou indirectement l'économie humaine. C'est encore

à PAILLOT principalement que revient le mérite d'avoir soutenu GLASER et ouvert la voie à des idées nouvelles concernant les phénomènes d'immunité humorale qui, affirme-t-il, sont aussi importants que les phénomènes de phagocytose. Nous savons à l'heure actuelle que la lutte biologique au moyen de germes microbiens a fait de grands progrès en entomologie agricole à la suite d'études plus poussées sur la pathologie des insectes. Cependant, je crois que *l'étude systématique de l'immunité naturelle due aux substances antibiotiques présentes chez l'insecte* compléterait heureusement cet ensemble et expliquerait en partie un grand nombre d'échecs restés incompréhensibles.

Comme l'a signalé STEINHAUS (1949) c'est très souvent dans les milieux séricicoles et apicoles que l'on trouve l'origine des travaux sur la pathologie des insectes. Les premières recherches sur le sujet sont celles de WHITE vers 1900. Étant donné leur importance et leur ressemblance avec mes essais préliminaires, je vais les analyser plus en détail.

Si la découverte récente des antibiotiques par FLEMING avait eu lieu vers 1900, il est bien évident que G. F. WHITE aurait poussé plus avant ses investigations sur la flore bactérienne de la ruche et qu'il aurait réalisé une partie du travail que je présente ici. En effet, il a soutenu en 1906 une thèse dont une grande part avait trait à l'inventaire bactérien et fongique de la ruche saine. Si l'on se reporte à cette époque nous ne pouvons qu'admirer les expériences et les résultats obtenus par un auteur qui était loin de posséder le matériel et les techniques dont nous disposons actuellement.

WHITE a tout d'abordensemencé des milieux de culture synthétiques au moyen des différentes substances provenant de la ruche à savoir : des morceaux de rayons de cire, du pollen, du miel, des larves et différentes parties d'abeilles adultes. Il voulait ainsi dresser la nomenclature de la flore normale d'une colonie saine et savoir si certaines espèces, pathogènes pour *Apis mellifica*, n'étaient pas présentes à l'état endémique dans la ruche. Ses résultats peuvent se résumer ainsi :

1° Il remarque que les rayons de cire et le pollen des ruches qui devraient héberger de nombreuses espèces de bactéries en contiennent au contraire très peu. Seules quelques rares espèces sont fréquentes dans les échantillons testés.

2° Il trouve que les miels et les larves d'abeille sont toujours stériles du point de vue bactérien.

3° En ce qui concerne les abeilles adultes, il faut distinguer leur flore externe et leur flore interne.

Extérieurement, les différentes parties de l'abeille n'ont révélé que trois espèces bactériennes, *mais la plupart du temps, il ne se développe rien dans le milieu de culture où l'on plonge les insectes*. Par contre la flore intestinale de l'abeille est très riche et l'on y trouve fréquemment de

nombreuses espèces, notamment des bactéries présentes habituellement dans l'intestin des vertébrés et de l'homme. L'auteur décrit également un anaérobiose constant dans l'intestin de l'abeille et que l'on retrouve dans le pollen stocké dans les cellules.

4° En ce qui concerne *les levures et les champignons* leur présence est plus fréquente que celle des bactéries dans l'intestin de l'abeille, sur les rayons, dans le pollen et le miel.

Nous pouvons constater qu'au cours de ses recherches WHITE n'a éprouvé ni la propolis ni la gelée royale. Il les a cependant étudiées sans qu'il s'en doutât : en effet lorsque l'auteur plonge dans un milieu de culture des morceaux de rayons de cire bâtie, il se trouve que ces rayons sont recouverts en surface d'une mince pellicule de propolis et que *cette matière est seule vraiment en contact avec le milieu de culture, et non la cire*. D'autre part, si l'on dépose des larves dans un milieu de culture (suivant la technique décrite), on dépose également une certaine quantité de gelée royale ou de bouillie alimentaire qui a une action antibactérienne alors que la larve d'abeille *lavée* ne la possède pas, comme nous le verrons plus loin. Il est assez surprenant que la propolis ait été oubliée dans ce travail important, d'autant plus que cette matière considérée comme cicatrisante, figure dans la pharmacopée depuis de nombreux siècles et avait à l'époque déjà fait l'objet de très nombreuses observations et publications.

Après WHITE, il faut attendre 1932 pour trouver dans la bibliographie des travaux se rapportant à notre sujet. Il s'agit des recherches de DOLD et DZIAO qui démontrent la présence, dans le miel, d'un facteur antibactérien : l'inhibine. Nous examinerons ces travaux en détail dans la suite de notre exposé. Ensuite, ce n'est qu'en 1947-1948, que des chercheurs s'intéressent aux substances antibiotiques élaborées par des insectes eux-mêmes. En 1947 LEMAY suppose, grâce à un test de germination des graines, la présence de substances antibiotiques chez les insectes et notamment dans le miel. Cette note est véritablement comme le sent cet auteur « une préface à une série de recherches ». Malheureusement ces essais ont été abandonnés faute de moyens techniques.

C'est à peu près à la même époque, en 1948 que MARIO PAVAN publie ses premiers travaux sur les antibiotiques d'origine animale. Ces recherches apportent vraiment du nouveau sur le sujet et de nombreuses publications se succèdent alors avec un grand nombre d'éléments et des résultats nombreux. Bien entendu PAVAN n'a pas trouvé le premier des antibiotiques dans les substances d'origine animale mais il a su les étudier en détail et passer en revue des animaux appartenant à des ordres très divers. Ceci lui a permis de dresser un véritable catalogue des « antibiotiques animaux ». Je montrerai plus loin l'importance de ces travaux notamment sur *Iridomyrmex Pruinosus humilis* et sur *Mélasoma populi*,

qui lui ont fourni à l'état pur et cristallisé des substances antibiotiques et insecticides.

Dans le domaine séricicole, on trouve les récents travaux du Japonais KOIDSUMI (1957) qui a extrait un principe *antifongique* de la cuticule et de la larve de *Bombyx mori*. Ces recherches feront également l'objet d'une analyse détaillée, car elles sont très proches de celles que j'ai effectuées chez l'abeille.

Je voudrais préciser encore avant d'entrer dans le vif du sujet que je ne suis *pas un bactériologiste de profession*. Je n'ai fait qu'employer les techniques bactériologiques et mycologiques les plus courantes de manière à débrouiller un intéressant problème de la biologie de l'abeille. C'est cette biologie que je voudrais contribuer à éclaircir, et non des problèmes proprement bactériologiques.

PREMIÈRE PARTIE

L'ANTIBIOTIQUE DU CORPS D'APIS MELLIFICA

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A. — Extraction de l'antibiotique par l'alcool éthylique.

Extraction à chaud. — La substance antibiotique du tégument de l'abeille est très facilement extractible par l'alcool éthylique. Il suffit d'épuiser les abeilles par l'alcool bouillant pendant trois heures à l'aide d'un extracteur du type soxhlet, B. B. S. ou kumagawa pour obtenir un extrait actif. En général l'extraction a porté sur des lots de 20 grammes d'abeilles entières traitées par 120 cm³ d'alcool. L'antibiotique est totalement extrait après trois heures de ce traitement. En effet, si l'on soumet à une nouvelle extraction un lot d'insectes déjà épuisés par l'alcool la liqueur obtenue même après concentration, est totalement inactive et n'est plus capable d'inhiber le développement bactérien de nos souches lors de l'épreuve. Après l'extraction, l'extrait brut est porté au bain marie pour évaporer l'alcool. Le résidu est alors repris par l'eau chaude et filtré. La fraction qui passe en solution contient la substance antibiotique, tandis que la fraction solide restée dans le filtre n'a aucune activité. Cette solution aqueuse est ensuite ajoutée en quantités variables aux milieux de cultures pour les épreuves. La solution d'antibiotique est conservée au réfrigérateur et à l'abri de la lumière. Sa couleur est brune, son odeur assez forte, sa saveur acide. La substance en milieu alcoolique ou aqueux chauffée au bain-marie est très attractive pour les butineuses. Par contre, présentée à sec, sur papier filtre, au laboratoire à des abeilles encagées, elle ne se révèle pas attractive du tout. A chaque extraction, on mesure le poids sec de un centimètre cube de la solution aqueuse de manière à pouvoir comparer les extraits entre eux en calculant en unités actives leur pouvoir antibiotique.

Extraction à froid. — La macération à froid d'abeilles non broyées dans l'alcool éthylique permet également d'extraire la substance antibiotique. J'ai obtenu des résultats dans ce sens après macération d'abeilles pendant 100 jours à la température du laboratoire. Cette méthode est

capable d'extraire la totalité de l'antibiotique contenu dans les insectes. En effet, des abeilles ayant macéré dans l'alcool pendant 100 jours, rincées, puis mises à macérer à nouveau 8 jours dans l'alcool, puis rincées à l'eau une deuxième fois, il n'est plus possible d'obtenir de substance antibiotique par une extraction à l'alcool bouillant.

J'ai également essayé l'extraction à froid par broyage des insectes dans un mortier en présence d'alcool. Les résultats obtenus sont satisfaisants et il est possible en changeant plusieurs fois le solvant pendant l'opération, d'extraire des quantités d'antibiotiques aussi importantes que par l'ébullition dans un appareil à reflux.

L'extraction par simple lavage des abeilles à l'alcool à 96° a été réalisée de la manière suivante. On dispose les abeilles dans une allonge maintenue verticalement en les tassant légèrement sans toutefois les écraser et l'on fait couler ensuite l'alcool dans le tube. L'alcool récupéré après passage au travers de la masse est versé plusieurs fois sur la colonne d'abeilles et l'on termine par un rinçage avec de l'alcool neuf. Cette méthode qui enlève la quasi totalité de l'antibiotique (comparée à l'ébullition à reflux sur les mêmes abeilles) m'a servi dans certains essais où l'on voulait étudier la présence de l'antibiotique à l'extérieur du corps de l'abeille.

Dans toutes les expériences sur l'activité de l'antibiotique de l'abeille, j'ai utilisé l'extraction alcoolique à chaud ou à froid. Je reviendrai d'ailleurs en détail sur certaines techniques dans les chapitres suivants.

B. — Extraction de l'antibiotique par d'autres solvants que l'alcool.

Tous les extraits ont porté sur des abeilles provenant du même prélèvement, afin de pouvoir comparer les résultats.

Extraction aqueuse. — L'antibiotique de l'abeille s'extraît très difficilement par l'eau bouillante. Avec des abeilles bouillies pendant 3 heures à reflux : l'extrait obtenu, évaporé, repris par l'eau et filtré est très peu actif. Ou bien il est nécessaire d'opérer sur une grande quantité pour obtenir une activité très faible puisque 1 gramme d'extrait sec renferme seulement 1,46 unités active sur *Bacillus subtilis* souche Caron et l'on extrait 8,1 unités actives de 10 grammes d'abeilles.

Extraction acétonique. — L'extraction de l'antibiotique de l'abeille par l'acétone est aussi difficile que l'extraction aqueuse. Tout d'abord l'extraction acétonique à froid en broyant les abeilles dans un mortier ne donne aucun résultat. Les substances extraites d'abeilles bouillies à reflux pendant 1 heure dans l'acétone, ne se révèlent pas antibiotiques. La substance antibiotique doit être modifiée par cette opération. En effet,

si l'on soumet des abeilles déjà épuisées par l'acétone à l'action de l'alcool bouillant pendant 3 heures dans un soxhlet, l'extrait obtenu ne contient aucune trace d'antibiotique. Cependant si l'on extrait un lot d'abeilles par l'acétone au soxhlet pendant 3 heures, on obtient après évaporation, reprise par l'eau et filtration, une fraction contenant un peu de substance antibiotique. Dans l'extrait sec de cette fraction j'ai trouvé 7,64 unités actives par gramme et, 10 grammes d'abeilles correspondant à 45,1 unités. Dans le même lot d'abeilles extrait par l'alcool à chaud le nombre d'unités antibiotiques actives dans 1 gramme d'extrait sec est de 11,62 et dans 10 grammes d'abeilles on a obtenu 279,3 unités actives. C'est-à-dire qu'il existe une différence très considérable entre l'extraction aqueuse ou acétonique d'une part et l'extraction alcoolique d'autre part.

Extraction étherée. — L'extraction par l'éther à froid ou à chaud ne donne pas de résultat. Même après concentration de l'extrait obtenu aucune action antibiotique n'a pu être décelée.

Extraction par le chloroforme. — L'extraction par le CHCl_3 est comparable à l'extraction étherée. Aucun résultat n'a été obtenu même après concentration de l'extrait.

C. — Épreuve bactérienne et détermination de la valeur antibiotique.

Pour déterminer la valeur antibiotique de tous les extraits, je me suis servi de plusieurs souches bactériennes, mais dans un très grand nombre de cas le calcul des unités antibiotiques actives a été chiffré d'après les réactions du *Bacillus subtilis* souche Caron (sauf dans les cas où je précise explicitement qu'il s'agit d'une autre bactérie). Cette bactérie est très facile à cultiver, elle ne présente aucun danger de manipulation et son développement est très rapide. Le *Bacillus subtilis* souche Caron a été cultivé sur une gélose peptonée de la formule suivante :

1 000 cm^3 d'eau,
10 grammes de peptone (Prolabo),
25 grammes de gélose (Prolabo).

Ce milieu est autoclavé 15 minutes à 120° , puis réparti en tubes par quantités de 10 cm^3 .

Pour éprouver un extrait il suffit d'en ajouter une quantité croissante à un certain nombre de tubes de milieu peptoné. En général, j'avais calculé la dilution de matière active dans l'eau de manière à ajouter, à 10 cm^3 de milieu, de zéro à 3 cm^3 d'extrait aqueux. Il ne faut pas dépasser ces 3 cm^3 quitte à concentrer l'extrait, car le milieu, même à 25 grammes de gélose par litre au départ ne se solidifie pas si on le dilue à l'excès. Les tubes témoins sont additionnés d'une quantité d'eau correspondant

au volume des extraits ajoutés. Après cette opération, on autoclave à nouveau les milieux et on laisse refroidir les tubes en position inclinée. Ils sont prêts à être ensemencés. L'ensemencement est réalisé avec la souche Caron de *Bacillus subtilis* provenant d'un repiquage récent datant au maximum de 48 heures ; on porte à l'étuve à 37°. La lecture des résultats a lieu 12 heures plus tard. Dans certains cas où l'interprétation est difficile on prolonge de 24 heures le séjour à 37°. Si à l'examen aucun développement n'est observé dans les tubes contenant un extrait, alors que les témoins sont recouverts d'un voile bactérien épais, on admet que l'on se trouve au-dessus de la *dilution limite*. Pour le calcul en unités biologiques, on dilue du simple au double toute une série de tubes. La *dilution limite correspond au double de celle pour laquelle un développement bactérien commence à se produire*.

Ces unités antibiotiques se calculent d'après l'expression :

$$U = \frac{1\ 000}{C}$$

où C correspond à la quantité d'antibiotique en milligrammes (poids sec) nécessaire pour atteindre la dilution limite.

J'ai préféré employer pour la majorité de mes épreuves la méthode des dilutions, plutôt que la méthode de diffusion sur boîte de gélose. En effet, la plupart des extraits n'étaient pas purifiés et contenaient des substances complexes, notamment des résines se répartissant mal autour d'un disque et donnant des zones d'inhibition très peu nettes ou très irrégulières. Cependant, un certain nombre d'essais ont été réalisés par la méthode de diffusion pour contrôler l'efficacité de quelques extraits.

Mais l'enquête a été étendue à d'autres bactéries et grâce à l'obligeance du Docteur Pierre NICOLLE, j'ai obtenu de l'Institut Pasteur un grand nombre de souches bactériennes diverses et principalement des Entérobactériacées. C'est avec la série de 30 souches du tableau I que j'ai essayé l'activité de toutes les substances extraites de l'abeille et des produits de la ruche. Cependant, la plupart des essais ont été réalisés sur quelques souches bactériennes seulement, notamment à cause de la petite quantité d'extrait dont je disposais parfois. Je me suis souvent servi de *Proteus vulgaris* pour lequel je présenterai fréquemment des calculs d'unités antibiotiques, ainsi que des bactéries pathogènes de la colonie d'abeilles (*Bacillus larvae* et *Bacillus alvei*).

D. — Toxicité pour la souris.

Les essais sur la souris blanche ont montré la non toxicité des extraits antibiotiques de l'abeille lorsque ceux-ci sont administrés par voie buccale. Les souris soumises à un régime standard additionné de l'extrait brut non

purifié ne montrent rien d'anormal par rapport aux témoins, même si l'expérience se prolonge pendant longtemps. La courbe de croissance et la mortalité des animaux traités ne subissent aucun changement significatif et les organes sont indemnes à l'autopsie. Ceci est très intéressant à

TABLEAU I

Souches employées pour les épreuves.

N° référence dans les tableaux.	Souches	
1.....	Salmonella pullorum	N° 1
2.....	Salmonella pullorum	N° 136
3.....	Salmonella pullorum	N° 309
4.....	Salmonella gallinarum	N° 38
5.....	Salmonella gallinarum	N° 47
6.....	Salmonella gallinarum	N° 237
7.....	Salmonella type Dublin	N° 4-54
8.....	Salmonella type Dublin	N° 5-54
9.....	Salmonella type Dublin	N° 7-54
10.....	Escherichia coli	O III = B 4. Ec 5 512
11.....	Escherichia coli	— 5 394
12.....	Escherichia coli	— 5 470
13.....	Escherichia coli	O 55 = B 5. Ec 5 401
14.....	Escherichia coli	— 5 423
15.....	Escherichia coli	— 5 438
16.....	Escherichia coli	O 26 = B 6. Ec 5 434
17.....	Escherichia coli	— 5 449
18.....	Escherichia coli	— 5 474
19.....	Escherichia coli	36
20.....	Escherichia coli	Bordet
21.....	Escherichia coli	B (Demerec et Fano)
22.....	Proteus vulgaris	
23.....	Proteus X 19	
24.....	Proteus V	
25.....	Pseudomonas pyocyanea	3
26.....	Pseudomonas pyocyanea	4
27.....	Pseudomonas pyocyanea	5
28.....	Bacillus subtilis souche Caron	
29.....	Bacillus alvei	
30.....	Bacillus larvae	

constater car la poudre d'abeille *totale* additionnée au régime de la souris s'est révélée toxique dans de nombreuses expériences. Dans ce dernier cas, la courbe de croissance est affectée très sensiblement et les animaux prennent un aspect malingre, le pelage est terne et irrégulier et la mort survient assez rapidement.

E. — Stabilité de l'antibiotique présent chez l'abeille.

L'antibiotique présent chez *Apis mellifica* est thermostable. En effet, l'extrait ajouté au milieu de culture possède la même action, qu'il soit autoclavé un quart d'heure à 120°C ou non. L'action inhibitrice sur les bactéries est la même et il n'y a aucune diminution de cette action après un autoclavage, même prolongé pendant une demi-heure ou trois quarts d'heure à 120°. Lors du fractionnement de l'antibiotique, j'ai contrôlé également qu'une partie de l'extrait distillé à 150° n'avait pas perdu son activité.

L'antibiotique est assez photolabile en milieu aqueux. Cette perte d'activité n'est pas due au vieillissement de la substance, car à l'abri total de la lumière le phénomène ne se produit pas avec la même rapidité. Un extrait conservé *à sec* à la lumière et à la température du laboratoire, perd complètement son activité après 90 jours.

Les substances antibiotiques sont *très stables malgré le vieillissement* et principalement si elles sont conservées dans le corps des abeilles. Des prélèvements effectués dans des colonies d'abeilles mortes depuis environ un mois (en partie décomposées) j'ai obtenu un extrait dont $U = 39,37$ et dont 10 grammes de matériel au départ m'ont fourni 8,56 unités actives : c'est autant que la moyenne des essais avec les extraits d'abeilles fraîchement tuées et même plus que certains lots. La substance extraite conservée en milieu aqueux et à 0° ne se dégrade pratiquement pas au cours de plusieurs mois. Par contre, il arrive assez souvent que des *Penicillium* s'y multiplient ; ils modifient alors l'activité de l'antibiotique qui devient rapidement nulle après un tel développement. Pour éviter ces inconvénients, il suffit de conserver les extraits en milieu éthéré, par cette méthode il est possible de les garder plus de deux ans sans altération.

CHAPITRE II

LOCALISATION DE L'ANTIBIOTIQUE PRÉSENT CHEZ APIS MELLIFICA

Sachant que l'abeille recelait une substance antibiotique, j'ai cherché à connaître l'origine de cette substance et dans quelle partie du corps elle était principalement présente. J'ai voulu également en dissocier l'action du venin qui, nous le savons depuis longtemps est antiseptique.

A. — La substance antibiotique est-elle contenue à l'intérieur du corps ou en surface de la cuticule?

Plusieurs expériences m'ont permis d'élucider en partie ce problème ; nous allons en examiner les résultats successivement.

1° Comparaison entre deux extraits alcooliques à chaud d'abeilles totales, l'un pratiqué sur des abeilles intactes non broyées et l'autre sur des abeilles réduites en bouillie au moyen d'un mixer.

Cet essai avait pour but essentiel de prouver que l'antibiotique de l'abeille était présent à la surface du corps de l'insecte. En effet, s'il se trouvait à l'intérieur du corps (glandes, sang ou bactéries intestinales) j'aurais dû en recueillir beaucoup plus dans l'extraction alcoolique d'abeilles réduites en pulpe. Il n'en a rien été ; voici les résultats obtenus :

— Extrait d'abeilles totales non écrasées : 27,02 Unités actives par gramme d'extrait sec.

— Extrait d'abeilles totales écrasées : 28,73 Unités actives par gramme d'extrait sec.

Comme les chiffres ci-dessus nous l'indiquent, il n'y a pas de différence significative entre les deux procédés. J'en déduis que l'antibiotique est localisé principalement à l'extérieur des insectes, puisque je n'en extrais pas des quantités plus importantes lorsque l'alcool bouillant pénètre dans toutes les parties du corps, aussi bien le tégument que toutes les glandes, le sang, et même les bactéries de l'intestin éventuellement productrices d'antibiotiques.

J'ai repris cette expérience en broyant des abeilles au mortier en présence d'alcool *froid* ; dans tous les cas les résultats obtenus sont similaires.

2° Comparaison entre deux extraits alcooliques d'abeilles totales et intactes, l'un pratiqué à chaud, l'autre réalisé simplement par un lavage à froid.

Dans ce dernier cas, les abeilles étaient tassées, mais non écrasées dans une allonge verticale dans laquelle je versais de l'alcool à 96°. Cet alcool traversait assez rapidement la masse des insectes comme un filtre, il était récupéré à la partie inférieure de l'appareil, évaporé et le résidu était repris par l'eau. Le simple lavage des abeilles constituait un procédé plus doux que la macération ou l'ébullition dans l'alcool. Un témoin par contre avait été extrait à l'ébullition pendant 3 heures au soxhlet. Les résultats ne diffèrent guère et l'on peut dire qu'un lavage des abeilles à froid suffit pour extraire la quasi totalité de l'antibiotique présent. (Cet essai ayant été réalisé dans des conditions différentes de l'expérience précédente les chiffres ne sont pas comparables entre eux).

— Extrait d'abeilles dans une allonge : on obtient 2,97 Unités actives par gramme d'extrait sec.

— Extrait des mêmes abeilles par soxhlet : on obtient 3,04 Unités actives par gramme d'extrait sec.

Je peux en déduire *que l'antibiotique se trouve à la surface de la cuticule de l'insecte, puisque son extraction est très rapide par simple lavage à l'alcool froid.*

Cependant, j'ai complété ces essais par des tentatives d'extraction de l'antibiotique par les abrasifs.

3° Essais d'extraction de la substance antibiotique de l'abeille par le charbon activé et par l'aluminium en poudre.

Une mise au point récente de GLENN RICHARDS (1958) sur la cuticule des arthropodes m'a fourni de très précieux renseignements. Nous savons que la cuticule des insectes s'oppose au passage de l'eau, de l'oxygène et des électrolytes. D'après KOIDSUMI, il existe parmi les constituants de la cuticule des traces d'acides gras libres (chez *Bombyx mori* par exemple) qui augmentent sa résistance aux champignons pathogènes. Or la cuticule contiendrait plus de lipides en été qu'au début du printemps et j'ai constaté chez l'abeille, comme on le verra plus loin, des variations de valeur de la substance antibiotique suivant la saison. D'autre part, d'après MUKERJI et CHATTERJEE, il se produirait dans la nature une abrasion de l'épicuticule grâce aux substances abrasives naturelles (particules du sol, de l'air etc.). Cette abrasion de la cuticule lors du vieillissement de l'insecte a semblé intéressante à certains auteurs qui ont démontré par exemple une pénétration plus facile de certains insecticides quand le tégument se trouve partiellement érodé. WIGGLESWORTH (1950) a montré notamment que *Rhodnius* n'était pas sensible à la roténone sauf si on y ajoutait un abrasif. Je pense que la barrière antibiotique ou anti-

fongique qui se trouve à la surface du corps des insectes empêche la pénétration et l'attaque de divers bactéries et champignons pathogènes. Nous verrons plus loin que les très vieilles abeilles qui n'ont presque plus de poils, dont les ailes sont usées et l'épicuticule certainement très abrasée contiennent moins d'antibiotique que les ouvrières plus jeunes et encore intactes. Nous savons également qu'il est très difficile d'opérer l'abeille, celle-ci mourant très rapidement alors que de nombreux insectes sont très résistants à une intervention chirurgicale même importante. On peut supposer que certains de ces insectes ne possèdent pas de revêtement antibiotique et qu'ils se défendent contre les infections par d'autres moyens, tels que l'immunité naturelle, la phagocytose et la production d'anticorps dans le sang. PAILLON signale même l'action bactéricide du sang d'une chenille sur divers bacilles. Chez certains insectes au moins, la cuticule doit protéger contre l'invasion microbienne et les théories de la phagocytose et de la réaction humorale sont sans doute insuffisantes à expliquer à elles seules l'immunité naturelle chez les insectes. Les travaux récents de KOIDSUMI sur l'antifongique de la cuticule des chenilles de *Bombyx mori*, viennent à l'appui de cette thèse ; on sait aussi que les infections chez les insectes sont favorisées par l'intervention de prédateurs provoquant le déclenchement des épidémies, sans doute à cause des blessures à la surface du corps des victimes. Il est également bien établi que l'infection expérimentale réussit mieux lors de l'histolyse des tissus périphériques aux périodes de métamorphose, principalement lors de la transformation de la chenille en chrysalide.

J'ai donc essayé d'extraire, des abeilles vivantes, la substance antibiotique au moyen de poudres abrasives. J'ai employé le charbon activé et la poudre d'aluminium qui avaient donné les meilleurs résultats à GLYNNE-JONES et KOIDSUMI. J'ai soumis à ce traitement chaque fois 30 grammes d'abeilles qui étaient agitées au contact de la poudre pendant 2 heures environ. Les abeilles retrouvaient ensuite la liberté après avoir laissé dans un appareillage spécial la grande majorité de la poudre. Cette poudre était extraite soit par l'eau chaude, soit par l'alcool et après filtration, les résidus étaient mélangés au milieu de culture habituel. Les témoins étaient additionnés d'extrait de charbon activé ou d'aluminium n'ayant eu aucun contact avec les abeilles. Je n'ai pas réussi à extraire d'une façon régulière l'antibiotique de l'abeille par ces méthodes. Cependant l'une de ces extractions par la poudre d'aluminium m'a permis de trouver la valeur de 1,71 Unités *subtilis* et de provoquer un retard de 12 heures dans le développement de *Proteus vulgaris*. Ces échecs s'expliquent par l'examen des travaux de GLYNNE-JONES sur la cuticule de l'abeille. L'auteur dit lui-même que moins de 40 p. 100 de la poudre abrasive est en contact avec la surface cuticulaire totale de l'insecte. En effet la cuticule de l'abeille est ornée de nombreux plis et de poils qui

ne permettent pas l'abrasion de toute la surface. Les particules qui sont plus grandes que $5\ \mu$ sont en contact seulement avec les parties découvertes, tandis que les particules beaucoup plus petites vont se loger dans les replis de la cuticule et ne sont plus récupérées après le traitement. Enfin l'agitation de l'insecte pendant l'opération influe énormément sur les résultats. L'auteur précise encore qu'une suspension aqueuse d'aluminium ou qu'un nuage de charbon activé n'atteint effectivement que 40 p. 100 de la surface de la cuticule de l'abdomen et 20 p. 100 de celle du thorax. Il me semble donc assez difficile d'obtenir un résultat valable par la méthode des abrasifs et nous verrons plus loin que de toute manière la substance antibactérienne se trouve également autre part qu'à la surface du tégument de l'abeille.

4° Valeur antibiotique du sang de l'abeille.

Les expériences précédentes, ainsi que les travaux des auteurs cités me permettent de penser que l'antibiotique de l'ouvrière d'Apis mellifica se trouve bien sur la cuticule, au moins en partie. En fait, je le pensais déjà dès les tout premiers essais, lorsque je plongeais, dans un milieu de culture liquide des fragments de cuticule d'abeilles et qu'ils inhibaient le développement des bactéries ensemencées dans le milieu. En effet, certaines de ces pièces (têtes ou thorax entiers) contenaient peu de sang ; et les glandes n'étant pas écrasées ou pouvait admettre qu'il y avait peu de diffusion dans le milieu aqueux. La cuticule externe au contraire était en contact direct avec le milieu et l'on conçoit que les substances présentes en surface du corps se mêlent plus facilement à celui-ci.

Cependant, j'ai contrôlé directement la valeur antibiotique du sang de l'abeille. Pour cela je prélève du sang sur des ouvrières vivantes, je le dépose en quelques points sur des plaques de gélose, et j'ensemence ensuite après coagulation avec les bactéries toute la surface du milieu. Je me suis servi pour cette épreuve de *Bacillus subtilis* et de *Proteus vulgaris*. Dans tous les cas, le développement a été uniforme et je n'ai jamais pu mettre en évidence la moindre inhibition autour des dépôts de sang. *J'en déduis que le sang de l'abeille n'est pas antibiotique pour ces deux bactéries alors que l'extrait d'abeille entière est toujours actif sur ces deux souches.*

Ce résultat n'est pas général chez les insectes. En effet, PAILLOT a montré l'action bactéricide du sang de la chenille d'*Agrotis pronubana* par exemple. GLASER le premier, dès 1918 avait montré qu'il existait des substances bactéricides dans le sang des insectes non immunisés artificiellement, mais il ajoutait que la présence de telles substances n'est pas constante. Depuis de nombreux auteurs (FRINGS, GOLBERG, ARENTZEN, 1948, OLIVIER 1947) ont également trouvé des corps bactéricides dans le sang des insectes les plus divers et c'est pourquoi leur recherche chez l'abeille était nécessaire.

B. — La substance antibiotique est-elle présente dans la tête, le thorax ou l'abdomen et le cas échéant dans quelles proportions?

J'ai cherché à savoir, par la suite, si l'antibiotique de l'abeille était présent dans chacune des parties du corps de l'abeille ou dans l'une d'elles seulement. Pour cela j'ai comparé des extraits d'une part d'abdomens, d'autre part de têtes et de thorax.

1° Comparaison entre l'extrait du complexe têtes et thorax et l'extrait d'abdomens.

Le contenu abdominal pouvait *a priori* jouer un très grand rôle, quatre sources principales étant susceptibles de produire des antibiotiques ou des antiseptiques. *Les glandes diverses de l'abdomen, l'appareil vulnérant, les bactéries intestinales* et également *le contenu du tube digestif*. Il est évident que la nourriture plus ou moins dégradée contenue dans l'estomac et l'intestin pouvait agir sur l'activité des extraits ; nous verrons par la suite que le miel, la gelée royale et principalement le pollen jouent en effet un rôle antibiotique très important dans la colonie d'abeilles. Les bactéries intestinales sont très fréquemment, chez les animaux, productrices d'antibiotiques puissants. Chez l'abeille, des bactéries apparaissent seulement avec le début de la prise de nourriture (la jeune abeille venant d'éclore, d'après BRUCE WHITE, possède un tube digestif stérile). D'après LOTMAR (1946), la flore du tube digestif serait principalement fixée dans la partie pylorique et dans l'ampoule rectale, tandis qu'elle serait absente de l'estomac ou intestin moyen. L'ensemble des glandes à venin est considéré également comme antiseptique par de nombreux auteurs. Cependant, un insecte tué par suite de piqûres d'abeilles se putréfie après sa mort très rapidement ; de même, certaines piqûres d'abeilles sur la peau de l'homme s'infectent parfois à l'endroit de la pénétration de l'aiguillon, les germes n'étant pas inhibés par le venin.

C'est pour toutes ces raisons que j'ai effectué des extractions séparées : d'une part, têtes plus thorax, et d'autre part les abdomens.

Des abeilles ouvrières sont amputées de leur abdomen et l'ensemble tête plus thorax non écrasé est extrait par l'alcool bouillant. La valeur antibiotique de l'extrait est très élevée et l'on obtient des résultats assez surprenants par rapport à l'extrait témoin d'abeilles totales. *Je trouve 32 Unités actives sur Bacillus subtilis par gramme d'extrait sec alors que l'abeille totale renferme 20,1 Unités actives sur la même souche bactérienne.*

Les mêmes abeilles qui m'ont servi pour l'extraction de l'ensemble tête plus thorax m'ont fourni les abdomens. Cet extrait a été obtenu de la même manière et éprouvé également sur *Bacillus subtilis*. *L'abdomen d'ouvrières contient seulement 9,6 Unités par gramme d'extrait sec ; même si*

l'on tient compte des erreurs d'expérimentation la différence est significative et *l'extrait tête plus thorax est environ 3 fois plus actif sur Bacillus subtilis* souche Caron *que l'extrait d'abdomens*. On peut déduire de ces essais que l'abdomen et son contenu ne possèdent pas une grande activité antibiotique, puisque, même si l'on tient compte du venin, du miel, des bactéries présentes, du pollen et des diverses glandes, on n'obtient que fort peu d'unités actives.

FIG. 1. — Valeur antibiotique des extraits suivant différentes parties du corps de l'abeille.
(en abscisse les numéros des souches essayées).

--- extrait têtes + thorax.
— extrait abdomens.

Cependant, j'ai repris ces expériences sur plusieurs souches bactériennes afin de voir si celles-ci avaient une activité parallèle et si nous avions affaire à la même substance active dans l'abdomen d'une part et le reste du corps d'autre part. La figure 1 résume ces travaux pour 10 bactéries éprouvées. Elle montre une similitude d'action des deux extraits avec simplement une différence quantitative. La substance extraite de l'abdomen est toujours beaucoup moins active que celle du complexe tête et thorax, notamment chez *Salmonella* n° 1 et n° 38 *Proteus* X 19 et *Bacillus subtilis* souche Caron. Les souches diverses d'*Escherichia coli* n'ont pas été inhibées (doses d'extrait employées trop faibles), non plus

que *Pseudomonas pyocyanea* V (les extraits ayant été purifiés le nombre d'unités actives semble dans cette expérience très élevé ; cela est dû au poids sec de l'extrait qui contient beaucoup moins d'impuretés que dans les autres expériences).

2° Influence du venin et extractions sur abeilles privées de l'appareil vulnérant.

J'ai effectué de nombreuses extractions sur des lots d'abeilles privées de leurs glandes à venin et de leur aiguillon. Ces expériences m'ont été d'autant plus faciles à réaliser, que je me suis procuré ces insectes en

FIG. 2. --- Comparaison des extraits d'abeille totale et d'abeille privée d'appareil vulnérant (en abscisse les numéros des souches essayées).

--- extrait abeille totale.
— extrait abeille sans dard.

grande quantité auprès d'un apiculteur qui amputait d'innombrables abeilles de leur appareil vulnérant pour l'utiliser en pharmacie. Des essais nombreux me permettent de conclure que *l'activité antibiotique de telles abeilles vis-à-vis de Bacillus subtilis souche Caron est égale ou très voisine de celles d'abeilles entières*. Cependant, si je compare ces deux extraits sur un plus grand nombre de souches bactériennes, des différences apparaissent ; la figure 2 et le tableau II montrent ces divergences, d'ordre quantitatif. Sur la figure 2, j'ai ramené tous les chiffres à des valeurs proportionnelles au chiffre 10 choisi arbitrairement pour l'action des deux extraits sur *Bacillus subtilis*. Cette manière d'opérer permet de mettre en évidence les écarts obtenus sur certaines souches, écarts en géné-

ral peu importants, mais toujours dans le même sens. *Il est assez surprenant de constater que l'extrait d'abeilles sans dard est souvent plus actif que l'extrait d'abeilles entières*, principalement sur *Salmonella gallinarum* n° 237, *Proteus* X 19 et *Pyocyanea* 5. Il faudrait alors admettre que l'ensemble de l'appareil vulnérant, auquel reste collé presque toujours une partie du tube digestif lors du prélèvement contienne des facteurs de croissance favorisant le développement de certaines souches bactériennes. Il est à noter également que le pH du venin est aux environs de 6 et ce n'est pas un tel pH qui peut jouer un rôle inhibiteur.

TABLEAU II

Activité comparée des extraits d'abeilles totales et d'abeilles sans dard.

Souches référence n°	Extrait d'abeilles totales	Extrait d'abeilles s/dard	Observations
1 <i>Salmonella pullorum</i> n° 1.....	+	+ très actif	
4 <i>Salmonella gallinarum</i> n° 237.....	+	+ très actif	
9 <i>Salmonella</i> type Dublin n° 7-54....	+ —	+ —	
10 <i>Escherichia coli</i> o 111 = B4. Ec 5512.....	+ —	+ —	<i>Activité faible</i>
13 <i>Escherichia coli</i> o 55 = B5. Ec 5401.....	+ —	+ —	
16 <i>Escherichia coli</i> o 26 = B6. Ec 5434.....	— —	+ —	
20 <i>Escherichia coli</i> Bordet.....	+ —	+ —	
23 <i>Proteus</i> × 19.....	+	+ très actif	
27 <i>Pseudomonas pyocyanea</i> 5.....	+ —	+	
28 <i>Bacillus subtilis</i> souche Caron.....	+	+	

Cependant ORTEL et MARKWARDT (1955) ont montré à l'inverse que le venin d'abeilles purifié se révélait bactériostatique et souvent bactéricide sur des bactéries pathogènes gram positif ou gram négatif. Le venin serait actif à la dose de 12,5 à 25 mg par ml sur les bactéries gram positif et à la dose de 1 à 10 mg par ml sur les bactéries gram négatif. Mais la sensibilité est très variable parfois entre souches voisines. D'après ces auteurs, l'activité du venin doit être attribuée à une fraction définie du venin purifié, la fraction hémolytique (polypeptides). Si les abdomens d'abeilles pourvus du système vulnérant ne m'ont pas

montré une telle action, on peut supposer que le facteur antibiotique du venin est thermolabile et qu'il est détruit à l'autoclave ; ou bien cette activité peut être masquée par l'action des substances contenues dans l'abdomen de l'abeille.

3° Comparaison entre les extraits séparés de têtes, de thorax et d'abdomens d'abeilles.

Après les deux séries d'expériences précédentes, j'ai été amené à séparer plus exactement chaque partie de l'abeille, notamment j'ai séparé les extraits de têtes et les extraits de thorax pour les comparer avec les

FIG. 3. — Comparaison des extraits de différentes parties du corps de l'abeille.

t. tête
th. thorax
abd. abdomen

extraits d'abdomens. Ces extractions ont été pratiquées sur des ouvrières provenant de la même colonie. La moyenne des résultats obtenue sur *Bacillus subtilis* et sur *Proteus vulgaris* est consignée sur la figure 3.

Les extraits de têtes d'*Apis mellifica* L. se sont montrés et de loin plus actifs que les extraits de thorax et d'abdomens provenant des mêmes prélèvements, sur les deux souches bactériennes éprouvées. La faible quantité d'extrait obtenue malgré la préparation d'un grand nombre de têtes d'ouvrières ne m'a pas permis l'essai avec un plus grand nombre de souches. Les extraits de thorax d'*Apis mellifica* sont moins actifs que les extraits de têtes, mais plus actifs que les extraits d'abdomens, provenant

des mêmes prélèvements, en ce qui concerne les deux souches bactériennes utilisées. La différence de l'extrait de thorax avec l'extrait de tête est surtout très importante dans l'action envers *Bacillus subtilis* (presque cinq fois plus faible) tandis que vis-à-vis de *Proteus vulgaris* l'activité de l'extrait de thorax représente quand même les deux tiers de l'activité de l'extrait de tête. *On peut conclure que le thorax recèle moins de substances antibiotiques que la tête et que cette dernière chez l'abeille est la partie la plus intéressante à ce point de vue.*

Les extraits d'abdomens (sans l'ablation de l'appareil vulnérant) sont nettement pauvres en substances antibiotiques. Ceci est d'ailleurs particulièrement vrai en ce qui concerne l'action sur *Bacillus subtilis*. Car l'action de l'extrait d'abdomen sur *Proteus vulgaris* est presque comparable à celle obtenue avec l'extrait de thorax. Lors de tous les essais effectués avec les extraits abdominaux j'ai constaté des résultats, toujours faibles, mais extrêmement variables. Je pense que cette variabilité est due à l'influence de l'alimentation des insectes et de l'état de réplétion du tube digestif avant le prélèvement.

4° Influence possible des glandes de la tête chez *Apis mellifica*.

Nous venons de voir que la tête était et de très loin la partie la plus riche en substance antibiotique chez l'ouvrière d'abeille. On peut se demander si cette substance antibiotique est produite par des glandes cuticulaires, en quelque sorte un « ectoantibiotique », ou si au contraire il s'agit d'une sécrétion des glandes de la tête ou du thorax. En effet, même s'il s'agissait d'une sécrétion des glandes nourricières, mandibulaires ou salivaires, il serait possible que l'antibiotique se retrouve, en moins grande quantité, sur le reste du corps où les ouvrières le répandraient par léchage. Ceci expliquerait que la tête soit la plus riche en substance antibiotique, puis le thorax et enfin l'abdomen. L'antibiotique ainsi répandu constamment à la surface de tout le corps pourrait nous apparaître alors comme une sécrétion cuticulaire. Les travaux de A. MAURIZIO (1958), nous apportent ici une indication. En effet, cet auteur obtient l'inhibition de la germination des pollens au moyen de la sécrétion des glandes pharyngiennes. Il existe même un rapport entre le développement de ces glandes et leur action inhibitrice. Au contraire les glandes salivaires des mandibules, de la tête et du thorax n'ont pas cette action. La nourriture larvaire et le miel possèdent également un principe thermostable inhibiteur de la germination des pollens. Or A. MAURIZIO a essayé sur ces mêmes pollens l'antibiotique extrait de l'abeille, que je lui avais envoyé et elle a pu y retrouver également le facteur inhibiteur de la germination des pollens. *Il y aurait donc au moins une propriété commune entre l'extrait alcoolique d'abeille (antibiotique) et la sécrétion des glandes pharyngiennes.* Ces faits n'auraient rien de

surprenant puisque la présence d'antibiotiques dans la salive chez d'autres animaux est un fait très banal. Cependant, il ne faut pas oublier que les antibiotiques excrétés par le tégument lui-même sont également une réalité : à ce sujet il suffit de se reporter par exemple aux travaux de BURTENSHAW (1942) sur des antibiotiques de la surface de la peau humaine.

J'ai éprouvé la valeur antibiotique des glandes pharyngiennes et des glandes mandibulaires de l'ouvrière sur *Bacillus subtilis*. Pour ces essais je prélève les glandes que je dépose par groupes de six un même point sur la surface d'un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. Ce milieu est ensuite ensemencé avec une suspension de la bactérie et la lecture des résultats est faite 12 heures plus tard. Le tableau III résume les essais concernant les ouvrières orphelines maintenues à l'étuve et des ouvrières prélevées dans une ruche pourvue d'une reine. L'on remarque les principaux faits suivants :

TABLEAU III

*Action des glandes de l'abeille ouvrière sur Bacillus subtilis
souche Caron.*

Age des ouvrières conservées à l'étuve en l'absence de reine	Valeur antibiotique des glandes pharyngiennes	Valeur antibiotique des glandes mandibulaires
Naissantes.....	—	—
2 jours.....	+ inhibition de 5 mm	—
4 jours.....	+ inhibition de 5 mm	—
6 jours.....	+ zone d'inhibition faible (2 mm) mais persistante après 36 heures	—
9 jours.....	+ zone d'inhibition faible (2 mm) s'affaiblit après 36 heures	—
Ouvrières prises au hasard dans une colonie avec reine.....	+ inhibition de 6 mm	—

— Les glandes mandibulaires de l'ouvrière d'été ne possèdent jamais de facteur antibiotique.

— Les glandes pharyngiennes au contraire sont très fortement inhibitrices envers le *Bacillus subtilis*, sauf si elles proviennent d'abeilles naissantes.

— L'apparition du principe antibiotique dans ces dernières glandes est rapide, puisque dès l'âge de deux jours chez l'ouvrière il est aussi actif qu'il le sera par la suite.

— Chez les abeilles orphelines (maintenues en étuve) à partir du 6^e jour l'activité antibiotique des glandes est plus faible. Cependant les abeilles prélevées au hasard dans une ruche non orpheline possèdent des glandes pharyngiennes dont le taux d'antibiotique est plus élevé.

Ces expériences complètent les indications précédentes sur l'action

possible des glandes pharyngiennes chez l'ouvrière. Nous verrons dans le chapitre suivant que la quantité d'antibiotique présent chez l'abeille est fonction de divers facteurs. Par exemple on peut supposer que le changement d'état physiologique de ces glandes rend compte en grande partie des différences suivant l'âge de l'insecte. Cependant la présence d'une sécrétion cuticulaire est toujours possible et celle-ci vient peut-être s'additionner à celle des glandes pharyngiennes.

Une chose est certaine, c'est que *la substance antibiotique de l'abeille est déposée à la surface du corps et répartie sur l'insecte tout entier*. Cependant, si l'origine principale se trouve dans les glandes pharyngiennes, on peut demander pourquoi les mâles constamment léchés par les ouvrières ne recèlent jamais de substance antibiotique.

CHAPITRE III

VARIATION DE L'ACTIVITÉ DE L'ANTIBIOTIQUE CHEZ APIS MELLIFICA SUIVANT DIFFÉRENTS FACTEURS

J'ai étudié l'action antibiotique des extraits d'abeilles en fonction de différents facteurs, dont trois des plus importants : caste, stade et âge de l'insecte, ont été groupés sur le tableau IV. Ce tableau très résumé a l'avantage de donner une bonne vue d'ensemble de la question, mais nous allons procéder à une analyse plus détaillée.

A. — Variation en fonction de la caste

1° Action des extraits de mâles d'abeilles.

Nous venons de voir à la fin du chapitre précédent que les mâles ne contenaient pas de substance antibiotique. En effet, l'extrait alcoolique de mâle d'*Apis mellifica* est totalement inactif sur notre série de

TABLEAU IV
*Tableau comparatif de l'action antibiotique
des extraits abeilles en fonction du stade et de la caste.*

Caste	Stade et Age						
	Larves sans gelée royale		Nymphes		Insectes parfaits		
	Jeunes	Agées	Juvéniles	Agées	Insectes naissants	Insectes âge moyen	Insectes très âgés
Mâle	—	—	—	—	—	—	—
Reine	—	—	—	—	—	vierge + —	féconde +
Abeille ouvrière	—	—	—	—	—	+ sauf dans cer- tains cas étudiés en détail	+ — peu actif
Ouvrière pondeuse	Néant				+ — mais plutôt bactériostatique que bactéricide		

— L'extrait ne contient pas de substance antibiotique.

+ L'extrait contient des substances antibiotiques et est actif.

+ — L'extrait contient des substances antibiotiques mais, il est d'une activité faible.

bactéries. J'ai essayé les extraits de mâles naissants, de mâles âgés de quelques jours et de vieux mâles, les résultats n'ont jamais varié : ils sont négatifs (tableau IV). *Je puis conclure à l'inactivité antibiotique des extraits de mâles chez l'abeille*, et cela vis-à-vis de 28 souches bactériennes éprouvées. Ceci est très important, car nous allons voir que *toutes les femelles en contiennent* ou peuvent en contenir sauf dans quelques cas bien précis que nous examinerons plus loin.

2° Action des extraits de reines d'abeilles.

L'extrait alcoolique de reine chez Apis mellifica s'est montré antibiotique vis-à-vis de Bacillus subtilis et vis-à-vis de huit autres souches éprouvées.

FIG. 4. — Action de la substance antibiotique de la reine d'*Apis mellifica* (épreuve *B. subtilis*).

- a : reines naissantes, nymphes et larves.
- b : reines vierges (sans contact avec les ouvrières).
- c : reines vierges (ayant eu contact avec les ouvrières).
- d : reines fécondes.

par la suite (fig. 4 et 5). J'ai effectué un certain nombre d'expériences avec les extraits de reines, mais il est difficile d'obtenir les insectes en quantité suffisante, principalement des reines fécondes. Cet état de fait m'a interdit souvent de répéter les essais. Les extractions et les épreuves ont été pratiquées de la même manière qu'avec les ouvrières d'abeilles. *Les reines fécondes contiennent en moyenne 10,10 Unités antibiotiques subtilis*. Etant donné le nombre restreint des essais, il est impossible de comparer ce chiffre avec le chiffre moyen de la valeur antibiotique

des extraits d'ouvrières. Cependant, nous pouvons le considérer comme très voisin.

La présence d'antibiotique chez la reine varie en fonction des contacts qu'elle a eus ou non avec les ouvrières. La figure 4 montre l'activité de l'extrait de reine en rapport avec ce dernier facteur. J'ai tout d'abord constaté l'inactivité des *larves* et *nymphes* de reines à tous les stades. De même les reines naissantes nées à l'étuve, n'ayant eu aucun contact avec les ouvrières ne recèlent pas de substances antibiotiques. Quant aux

FIG. 5. — Comparaison de l'action antibiotique de l'extrait ouvrière et de l'extrait de reines fécondes (en abscisse les numéros des souches éprouvées).

---- extrait d'ouvrière.
 ——— extrait de reine.

reines vierges, on trouve deux cas bien distincts. Tout d'abord si l'on conserve ces reines en dehors du contact des ouvrières (leurs cadavres sont alors d'après PAIN (1957) peu ou pas attractifs pour les ouvrières et n'empêchent pas leur développement ovarien), elles contiennent très peu d'antibiotique (3,83 Unités subtiles). Au contraire, si les reines vierges sont conservées en présence d'ouvrières, les phénomènes sont inversés, (les reines vivantes ou leurs cadavres sont alors attractifs pour des ouvrières, inhibent leur développement ovarien) et elles recèlent le double de substances antibiotiques (6,03 Unités subtiles). Si les reines fécondes âgées contiennent 10,1 Unités subtiles cette quantité s'expliquerait par

les contacts et les échanges continuels pendant *plusieurs années* entre ouvrières et reines. On peut conclure de ces expériences : *la présence des ouvrières favorise la production de substances antibiotiques chez la reine.*

Les essais de l'antibiotique des reines ont porté également sur les huit souches suivantes :

- *Pseudomonas pyocyanea* 4
- *Salmonella pullorum* N° 1
- *Proteus vulgaris*
- *Escherichia coli* O 111 = B4. 5512.
- *Escherichia coli* O 55 = B5. 5401.
- *Escherichia coli* Bordet
- *Escherichia coli* B (Demerec et Fano).
- *Bacillus alvei*.

Ces résultats sont juxtaposés à ceux obtenus avec des extraits d'ouvrières dans la figure 5. Dans cette figure toutes les valeurs sont notées en ramenant arbitrairement la valeur U à 10 pour *Bacillus subtilis*, ce qui permet de comparer les deux extraits. Leur activité est presque semblable, sauf deux particularités très nettes. Pour une inhibition correspondant à 10 unités *subtilis*, les extraits des ouvrières contiennent respectivement 40 unités *Proteus vulgaris* et 40 unités *Bacillus alvei*. La reine, pour 10 unités *subtilis* ne renferme que 15 unités *Bacillus alvei* et 15 unités *Proteus vulgaris* : son antibiotique est donc relativement beaucoup moins actif sur ces deux souches, alors qu'il suit de très près celui des ouvrières pour toutes les autres bactéries. Cette différence entre la substance antibactérienne de l'ouvrière et de la reine s'explique assez facilement par l'origine des deux substances comme nous allons le voir maintenant.

J'ai montré dans le chapitre précédent que la glande pharyngienne de l'ouvrière possédait un facteur antibiotique et que la glande mandi-

TABLEAU V

*Action antibiotique des diverses parties du corps
chez la reine d'abeille sur Bacillus subtilis.*

Organes examinés chez des reines vierges et fécondes	Valeur antibiotique
Tube digestif.....	—
Ovaires.....	—
Spermathèque.....	—
Glandes labiales.....	—
Glandes pharyngiennes.....	—
Glandes mandibulaires.....	+
Hémolymphe.....	—
Cœur.....	—
Cerveau.....	—

bulaire par contre était inactive. J'ai voulu savoir s'il en était de même chez la reine. L'essentiel des expériences est noté sur les tableaux V et VI. D'après le premier tableau nous constatons que *seule la glande mandibulaire possède le principe antibiotique*. Il existe donc une différence fondamentale entre la reine et l'ouvrière, *chez la reine la glande mandibulaire est développée et seule elle produit une substance antibiotique, tandis que chez l'ouvrière c'est la glande pharyngienne qui est développée et qui produit la substance antibiotique*. Le tableau VI donne les principaux résultats obtenus en éprouvant la valeur antibiotique des glandes mandibulaires de reines suivant différents facteurs. Ces épreuves ont été effectuées de la même manière que celles qui avaient été pratiquées sur les glandes des ouvrières (chapitre II) ; cependant les glandes royales ont été déposées sur le milieu de culture par groupes de quatre seulement. Les résultats confirment ceux obtenus avec les extraits de reines entières et nous ont précisé l'importance de certains facteurs. Voici les principaux faits à retenir :

TABLEAU VI

Valeur antibiotique des glandes mandibulaires chez la reine en fonction de quelques facteurs (sur Bacillus subtilis).

Reines élevées sans ouvrières		Reines en présence d'ouvrières jeunes			Reines avec ouvrières adultes		
Age des reines vierges (en jours)	Valeur antibiotique et inhibition	Age des reines vierges (en jours)	Temps de contact avec les ouvrières (en jours)	Valeur antibiotique	Age des reines vierges (en jours)	Temps de contact avec les ouvrières (en jours)	Valeur antibiotique
Naissantes.	—						
5 à 6	—	6	5	+ (3 mm)	4	3	+ (2 mm)
8	+ —	7 à 9	8	+ (3 mm)	5 à 6	5 à 6	+ (5 mm)
9	+ (2 mm)	10 à 11	9 à 10	+ (10 mm)	8 à 9	8	+ (6 mm)
10	+ (2 mm)	16 à 17	16	+ (7 mm)	10 à 11	10	+ (15 mm)
11	+ (6 mm)						
					Reines fécondes de 2 ans	2 ans	+ (13 mm)

— Les glandes mandibulaires chez la reine sont très fortement inhibitrices envers *Bacillus subtilis*, sauf si elles proviennent de reines naissantes.

— L'apparition du principe antibiotique dans ces glandes (4 jours après la naissance dans les meilleures conditions) est moins rapide que l'apparition du facteur antibiotique dans les glandes pharyngiennes de l'ouvrière (2 jours après la naissance).

— Chez les reines vierges, l'influence des ouvrières est importante. Le principe antibiotique qui apparaît seulement le 8^e ou 9^e jour si les reines sont isolées, apparaît le 6^e jour déjà si les reines sont accompagnées de jeunes abeilles (1 jour au début de l'expérience). Si les jeunes ouvrières

sont remplacées par des abeilles plus âgées et prises dans une ruche, la substance apparaît dans la glande mandibulaire des reines dès le 4^e jour (3 jours en présence des ouvrières). Il est donc évident que si la substance antibiotique peut se former chez des reines isolées, elle apparaît d'autant plus rapidement que celles-ci se trouvent en contact avec des ouvrières et principalement des ouvrières d'âge moyen.

— *Les zones d'inhibition sur les milieux sont proportionnelles à l'âge des reines vierges*, lorsque les autres conditions sont les mêmes (nutrition, présence des accompagnatrices etc.).

— *Chez les reines fécondes âgées de deux ans la valeur antibiotique est aussi importante et parfois plus* que celle de reines vierges de 10 jours en contact avec des ouvrières depuis 10 jours (bien souvent 2 glandes suffisent à créer une zone d'inhibition importante, 5 à 6 mm).

— *La nutrition influe également sur la sécrétion de l'antibiotique*. En effet, si l'on conserve des reines vierges pendant 16 jours avec des ouvrières ayant 1 jour au début de l'expérience et que l'on donne comme nourriture d'un côté du candi et de l'eau et de l'autre du candi, de l'eau et du pollen, on s'aperçoit que les glandes mandibulaires des reines nourries au pollen sont deux fois plus inhibitrices pour *Bacillus subtilis* que les glandes des reines privées indirectement de matière azotée. Cet ensemble d'expériences a permis également de rapprocher la valeur antibiotique des glandes mandibulaires et leur pouvoir attractif vis-à-vis des ouvrières. *Les glandes qui sont attractives pour les jeunes ouvrières contiennent de l'antibiotique. Les zones d'inhibition sont proportionnelles à l'attractivité des glandes* et lorsque l'attractivité est nulle (reines naissantes par exemple), la substance antibiotique est absente (LAVIE et PAIN 1959). Au contraire, le développement des ovaires chez la reine n'a aucun rapport avec la valeur antibiotique et l'attractivité des glandes mandibulaires. Nous avons vu plus haut (tableau V) que les ovaires des reines vierges ou fécondes ne sont jamais doués de propriétés antibiotiques et n'attirent pas les jeunes ouvrières.

En résumé, l'on peut dire que le facteur antibiotique de la reine est différent de celui de l'ouvrière et qu'il n'est pas produit par les mêmes glandes. Cependant, la majorité de la substance antibactérienne chez la reine est présente dans la tête comme chez l'ouvrière, le thorax en contenant moins que la tête et l'abdomen moins que le thorax. *Enfin comme chez l'ouvrière la majorité de la substance antibiotique est répandue à la surface du corps de la reine.*

3° Action des extraits d'abeilles orphelines.

L'extrait alcoolique d'ouvrières orphelines est également actif sur Bacillus subtilis, mais son activité est différente de celle de l'antibiotique d'abeilles non orphelines. En effet, le développement de la bactérie est

retardé et il n'y a aucun voile bactérien pendant les 24 heures qui suivent l'ensemencement dans les tubes contenant l'extrait. Au bout de 36 heures toutefois le voile se forme dans tous les tubes même dans ceux contenant une grande quantité d'extrait. *Il y a donc un ralentissement du développement bactérien mais pas d'inhibition totale.* Ces ouvrières ont été prélevées dans diverses ruches, orphelines depuis des périodes plus ou moins longues, et cependant les résultats obtenus sont toujours les mêmes.

4° Action des extraits alcooliques d'ouvrières adultes d'*Apis mellifica*.

L'extrait d'ouvrières est de loin le plus intéressant à étudier. En effet, il est possible d'en obtenir de grandes quantités et, sauf dans des cas bien précis, *il est toujours actif si l'on prélève des abeilles d'âge moyen dans une colonie saine et possédant une reine.* Ces extraits agissent sur les 30 souches du tableau I d'une manière plus ou moins efficace, mais toujours comparable d'un essai à un autre.

5° Les variations en fonction de la caste sont-elles dues à des différences dans le système glandulaire des individus?

Nous savons qu'il existe de grandes différences entre l'abeille ouvrière, la reine et le mâle en ce qui concerne les glandes céphaliques (LEUENBERGER, SNODGRASS).

TABLEAU VII

	Mâle	Reine	Ouvrière
Activité antibiotique des extraits de l'insecte total	—	+ principalement avec la présence des ouvrières	+ principalement en l'absence de la reine
Glandes nourricières ou pharyngiennes	O	peu développées	très développées
Glandes mandibulaires	peu développées	très développées	développées
Glandes labiales ou glandes salivaires ou glandes post-cérébrales	très petites	normales	normales

J'ai groupé sur le tableau VII la valeur antibiotique des extraits et l'état des glandes suivant la caste. L'examen de ce tableau montre effectivement que les mâles aux glandes très peu développées sont exempts d'antibiotique. Je pense que les différences existant entre la production d'antibiotique entre la reine, l'ouvrière et le mâle sont dues à la diversité du développement de leur système glandulaire. Le tableau nous montre également que chez la reine, ce sont les glandes mandibulaires qui sont développées et qui sont antibiotiques, tandis que chez l'ouvrière ce sont les glandes pharyngiennes qui sont les plus grosses et qui jouent un rôle

antibiotique. D'autre part, nous avons vu que la valeur des extraits de reines varie suivant les échanges et les contacts avec les ouvrières. Nous verrons également que la valeur antibiotique des ouvrières est fonction de la présence ou de l'absence de la reine.

B. — Variation en fonction du stade.

J'ai étudié l'action antibiotique des abeilles au cours de leur développement.

En ce qui concerne les *larves* d'ouvrières de tous âges, il est impossible de mettre en évidence la moindre inhibition, même avec des extraits très concentrés. Lors de ces expériences les larves ont été débarrassées de la gelée royale par un rapide lavage à l'eau afin d'éviter l'action antibiotique propre de cette substance que nous étudierons plus loin. Les larves sont ensuite soit broyées dans un mixer, soit conservées entières, pour l'extraction alcoolique. De toutes manières les résultats sont négatifs, et les *larves ne contiennent pas de substance antibiotique* soit sur leur cuticule, soit à l'intérieur de leur corps.

Les larves de reines et les larves de mâles de tous âges, sont également dépourvues de substance antibiotique.

Les nymphes d'abeilles des diverses castes fournissent des extraits inactifs, qu'elles soient jeunes et blanches ou très âgées et proches de la naissance.

L'abeille naissante qui n'a pas eu de contact avec les abeilles adultes (abeilles nées en étuve) ne contient jamais de substance antibiotique.

Mais les abeilles ouvrières adultes contiennent des quantités d'antibiotique variable en fonction de leur âge.

C. — Variation en fonction de l'âge de l'ouvrière adulte et recherche de l'âge optimum pour la production d'antibiotique.

Nous avons vu que l'abeille naissante n'a jamais d'antibiotique. Mais dès qu'elle atteint l'âge de 24 heures, il est possible d'en extraire presque le quart de celui trouvé dans les abeilles prélevées dans les conditions optimales. Cependant, il faut attendre le 4^e jour ou le 5^e jour après la naissance pour obtenir des extraits très actifs. *Le maximum d'action des substances extraites se rencontre chez les abeilles de 7 à 11 jours et principalement chez les abeilles de 8 à 10 jours.* Après le 12^e jour ou le 14^e jour l'activité des extraits décroît rapidement. De vieilles butineuses ou de très vieilles abeilles élevées en serre fournissent une substance 8 fois moins active que l'extrait d'abeille de 8 jours. La figure 6 résume ces mesures. On pourrait expliquer la disparition progressive de cette substance avec l'âge par l'absence de sécrétion à partir du 12^e jour par l'abrasion pro-

FIG. 6. — Valeur antibiotique de l'extrait d'ouvrière en fonction de l'âge. (épreuve *B. subtilis*), (en abscisse, âge de l'abeille en jours). — a : butineuses d'âge inconnu. — b : très vieilles abeilles capturées en serre.

FIG. 7. — Influence de la présence de la reine chez la jeune abeille (épreuve *B. subtilis*).
--- abeilles avec reine depuis la naissance. — abeilles orphelines depuis la naissance.
a : abeilles naissantes. — b : abeilles de 2 et 3 jours. — c : abeilles de 7 et 8 jours.
d : abeilles de 12 et 13 jours.

gressive du tégument ou par ces deux facteurs. Certains échantillons de vieilles abeilles ne contiennent plus du tout d'antibiotique. Nous verrons plus loin que les abeilles d'hiver ressemblent aux vieilles abeilles d'été.

J'ai étudié le phénomène de la « maturation » de l'antibiotique suivant l'âge de l'abeille ouvrière aussi bien en présence qu'en l'absence de la reine. Les résultats globaux sont analogues, car s'il y a une action de la reine, comme nous verrons plus loin, elle ne modifie pas la forme de la courbe

FIG. 8. — Influence de la présence de la reine chez la jeune abeille (épreuve *B. proteus*).

--- abeilles avec reine depuis la naissance.

— abeilles orphelines depuis la naissance.

a : abeilles naissantes.

b : abeilles de 2 et 3 jours.

c : abeilles de 7 et 8 jours.

d : abeilles de 12 à 13 jours.

tout au moins en ce qui concerne les épreuves avec *Bacillus subtilis* (voir figure 7). Avec *Proteus vulgaris*, je constate un déplacement de la courbe d'activité des extraits et l'activité de l'antibiotique est alors plus grande s'il provient d'abeilles âgées de 2 à 3 jours : elle décroît ensuite en fonction de l'âge (voir figure 8).

Nous savons depuis longtemps par les travaux de RÖSCH (1925, 1927) qu'il existe chez les ouvrières une division du travail en fonction de leur âge. Celles-ci commencent par des travaux intérieurs et terminent ensuite leur vie à l'extérieur comme butineuses. Ces notions assez rigides ont d'ailleurs été corrigées par les travaux de RIBBANDS (1952) et LIN-

DAUER (1952) qui ont montré qu'une plus grande plasticité existait en fait. D'autre part, nous savons que *les glandes pharyngiennes chez l'abeille subissent des variations au cours de sa vie adulte*. Tout d'abord, du 1^{er} au 10^e jour environ, l'abeille reste à la ruche et développe ses glandes salivaires au maximum surtout dans les tout premiers jours, ce qui lui permet de soigner le couvain ; dans la deuxième partie de sa vie du 10^e au 20^e jour environ, les glandes salivaires régressent et l'abeille devient alors cirière, et enfin gardienne. Dans la troisième période de sa vie, après le 20^e jour et jusqu'à la mort, l'ouvrière devient butineuse et ses glandes salivaires sont complètement régressées. Si l'on compare cette « maturation » physiologique de l'ouvrière et la production d'antibiotique en fonction de l'âge, on s'aperçoit que le *maximum de sécrétion de la substance antibiotique apparaît au moment même où l'individu a des glandes pharyngiennes très développées et où il doit soigner les larves*. D'autre part, lorsque l'ouvrière devient butineuse, vers la fin de sa vie, elle possède de moins en moins de substance antibiotique et l'on remarque à ce moment que ses glandes salivaires sont complètement régressées. *L'influence du changement d'état physiologique chez l'ouvrière serait donc déterminante sur la production de l'antibiotique*. Nous savons également d'après BOUIN et VELU (1915) et PAILLOT (1933) que *l'importance de l'âge est grande chez les insectes où l'on veut déclencher une infection expérimentale*. Il existe peut-être une immunité naturelle variable en fonction de l'âge, semblable à celle qui a été trouvée chez l'abeille. PAVAN (1952) a montré aussi chez *Iridomyrmex humilis* des faits semblables. Chez cet insecte, les larves, les nymphes et les ouvrières naissantes ne contiennent pas d'antibiotique. Il est nécessaire que les fourmis sortent du nid ou que leur pigmentation apparaisse pour que leur extrait devienne actif sur les bactéries. D'autre part, PAVAN précise que la quantité d'iridomyrmécine est variable chez la fourmi adulte en fonction du stade physiologique, de l'emplacement géographique et de la manière dont on effectue les prélèvements. Les résultats obtenus chez l'ouvrière en fonction de l'âge sont en accord avec l'action antibiotique de ses glandes pharyngiennes.

D. — Influence de la présence de la reine sur l'antibiotique de l'ouvrière.

La présence de la reine parmi les ouvrières influe d'une manière très nette sur la valeur des extraits antibiotiques. J'ai fait naître à l'étuve un certain nombre d'ouvrières : après la naissance la moitié de ces abeilles sont encagées en présence de la reine et les autres sont placées dans une cagette sans reine. Des échantillons sont ensuite prélevés à divers âges, extraits par l'alcool à chaud et éprouvés sur *Bacillus subtilis* souche Caron et sur *Proteus vulgaris*. Les courbes des graphiques 7 et 8 résument

les résultats. Il est évident que la *présence de la reine gêne ou inhibe partiellement la production d'antibiotique chez l'ouvrière*, le nombre d'unités antibiotiques extraites étant toujours *supérieur* (au même âge) *lorsque les ouvrières sont maintenues orphelines depuis leur naissance*. Sur les deux graphiques apparaît la même différence, qu'il s'agisse d'une souche bactérienne ou de l'autre. Nous avons déjà vu que *l'inverse* se produit lors de l'extraction de l'antibiotique présent chez la reine : il faut que cette dernière soit en contact avec les ouvrières pour que son propre antibiotique se développe en grande quantité.

E. — Variation en fonction de la saison.

J'ai prélevé des abeilles dans les mêmes ruches à différentes périodes de l'année dans la région parisienne. La figure 9 représente la moyenne

FIG. 9. — Valeur antibiotique de l'extrait d'abeille en fonction de la saison (épreuve *B. subtilis*).

de ces essais sur plusieurs ruches. Chaque colonie suit la même progression au cours de l'année. *Les abeilles contiennent peu d'antibiotiques dans les périodes hivernales de repos* (novembre et février). Cette substance devient très abondante au début de la période de ponte et d'activité (début avril) pour atteindre son maximum à la mi-juin lors du développement complet de la colonie d'abeilles. On peut commenter ces résultats de diverses manières. Tout d'abord, il est certain que l'hiver les prélève-

ments portent sur de vieilles ouvrières et comme les abeilles très âgées contiennent moins d'antibiotique, on pourrait conclure à la seule influence de l'âge. Mais il est possible également que la nutrition hivernale très différente de celle de la belle saison joue un rôle non moins important. (En effet, nous verrons plus loin l'influence de la nourriture.) De même la présence de la reine inhibe partiellement la production d'antibiotique chez l'ouvrière. Or l'été les abeilles sortent, séjournent moins à l'intérieur de la ruche et sont de ce fait beaucoup moins au contact de la reine, tandis que pendant le repos hivernal où le groupe est bien homogène et plus restreint l'influence de la reine doit être très importante. Enfin, il est encore possible que la présence ou l'absence du couvain ait une influence sur la présence d'antibiotique chez l'ouvrière, puisque la principale différence entre la colonie en hiver ou en activité réside justement dans l'absence ou la présence d'un couvain abondant. Cette dernière hypothèse n'est cependant pas vérifiée et je suppose que nous avons sans doute affaire à une combinaison de plusieurs de ces facteurs. Il est d'ailleurs bien certain que les glandes pharyngiennes des abeilles dans la ruche sont plus développées en hiver qu'en été. Ceci a été vérifié par de nombreux auteurs principalement MAURIZIO (1954), HESS (1942). On devrait alors trouver une valeur de l'antibiotique supérieure en hiver chez l'ouvrière et il n'en est rien. Je pense que *le fait d'avoir des glandes très développées* (mais non fonctionnelles, puisqu'il n'existe pas de couvain à cette époque) *n'est pas en corrélation obligatoire avec l'activité du point de vue antibactérien*. Il est sans doute nécessaire que la glande soit *en plein fonctionnement* pour fournir une quantité d'antibiotique importante, mais elle ne l'emmagasinerait pas au cours de l'hiver.

F. — Variation en fonction du régime alimentaire.

Dans ce domaine, quelques expériences m'ont permis de mettre en évidence l'influence de la nourriture chez l'ouvrière adulte privée de reine. La figure 10 résume les essais effectués sur *Bacillus subtilis* souche Caron et sur *Proteus vulgaris* ; d'une part, avec les extraits d'abeilles carencées n'ayant aucune nourriture protéique depuis leur naissance, et d'autre part, avec les extraits d'abeilles soumises à un régime riche en pollen. Les résultats montrent l'importance de la qualité de la nutrition chez la jeune abeille sur la production de substances antibiotiques (figure 10). En effet, que j'aie affaire à une souche bactérienne ou à l'autre, *on trouve environ deux fois moins d'unités antibiotiques dans les extraits provenant des ouvrières carencées en protéines*. Je dois signaler une fois de plus la similitude de ces travaux avec ceux de PAIN (1951)

sur le développement des ovaires de l'ouvrière en fonction de l'alimentation chez la jeune abeille privée de reine.

FIG. 10. — Influence de la nutrition chez l'abeille sur la valeur antibiotique des extraits (épreuve *B. subtilis* et *B. proteus*).

A et C : abeilles carencées en pollen.

B et D : abeilles ayant eu une alimentation riche en pollen.

G. — Variation en fonction de la race, de l'origine géographique et de la colonie.

Je viens de démontrer que la valeur antibiotique des extraits d'ouvrières adultes était très variable suivant de multiples facteurs, âge, nourriture, orphelinage plus ou moins récent, saison. Pour toutes ces raisons, il m'a été difficile d'isoler et de comparer entre eux deux derniers facteurs : race et origine diverses. J'ai dû éliminer d'abord tous les prélèvements faits par des tiers et prélever moi-même les échantillons dans des conditions rigoureuses. Tous les prélèvements ont été effectués sur des ruches appartenant au laboratoire de Bures situées dans des régions différentes, mais surveillées par nos soins.

Sur un nombre de lots suffisants, j'ai pu me rendre compte qu'il n'existe pas de différence significative entre les trois races d'abeilles les plus communément rencontrées dans les ruchers français : abeilles noires,

abeilles italiennes, et *abeilles caucasiennes*. Cependant, il apparaît que les abeilles noires contiendraient souvent un peu moins de substance antibiotique que les deux autres races et que les italiennes en contiennent souvent le plus. Mais malgré ces petites différences, il semble exister une grande uniformité entre les races, tout au moins chez *Apis mellifica* L. (voir figure 11). Je n'ai malheureusement pas eu l'occasion d'essayer les telliennes et les chypriotes.

Les expériences concernant l'influence de l'emplacement géographique des ruches, ou l'influence de colonie à colonie sont résumées dans

FIG. 11. — Influence de la race chez l'abeille sur la valeur antibiotique (épreuve *B. subtilis*).
a : race noire. b : race italienne. c : race caucasienne.

les figures 12 et 13. On peut remarquer que les prélèvements ont été effectués dans des régions à miellées très différentes : Bassin parisien (forêts et plaines), vallée du Rhône (fruitiers), collines de l'Hérault (romarins), vallée du Gard (robiniers), la Crau (prairies irriguées). Malgré cet échantillonnage, il n'est pas possible de trouver d'écart entre les valeurs antibiotiques des différents extraits. Je précise d'ailleurs à ce sujet qu'il ne faut pas comparer les chiffres des graphiques 12 et 13 entre eux, les extraits ayant été préparés à un an d'intervalle et d'une manière légèrement différente. En revanche, il peut exister de grandes différences entre les colonies d'un même rucher. Ces écarts paraissent surpasser de beaucoup ceux qui pourraient être dus aux différences de positions géographiques. En d'autres termes, les différences individuelles sont trop fortes et le matériel trop « impur » pour qu'on puisse apprécier des diffé-

FIG. 12. — Influence de l'origine (ruches et régions différentes) sur la valeur antibiotique de l'abeille (épreuve *B. subtilis*).

a : ruche n° 153, Rambouillet	} Région parisienne.
b : ruche n° X, Gif-sur-Yvette	
c : ruche n° 93, Bures-sur-Yvette	
d : ruche n° 62, Montfavet	} Région Sud-Est.
e : ruche n° 27, Montpellier

FIG. 13. — Influence de l'origine (ruches et régions différentes) sur la valeur antibiotique de l'abeille (épreuve *B. subtilis*).

a : ruche n° 317, Fontarèches	} Gard.
b : ruche n° 314, Fontarèches	
c : ruche n° 5, Pognadorresse	
d : ruche n° 1, Le Merle	} Bouches-du-Rhône.
e : ruche n° 3, Château Saffren	
f : ruche n° 14, Château Saffren	
g : ruche n° 1, Cantarel	} Vaucluse.

rences géographiques ou même raciales si elles existent. Par exemple, (figure 13) dans un de nos ruchers de la Crau à Château Suffren, on a pu mettre en évidence entre les ruches n° 3 et n° 14 une valeur allant du simple au triple pour des prélèvements fait le même jour à la même heure et dans les mêmes conditions. En dehors de quelques faits de ce genre, je dois préciser que dans la majorité des cas, les chiffres sont presque toujours assez voisins. Ces résultats nous indiquent que les récoltes variées, qualitativement, quantitativement et échelonnées dans le temps, depuis mars (romarin) jusqu'en août, septembre (Crau), n'ont aucune influence sur la sécrétion de l'antibiotique de l'abeille.

II. — Variation en fonction de l'état pathologique de la colonie d'abeilles.

FIG. 14. — Comparaison entre abeilles provenant de colonies malades et les abeilles provenant de colonies saines. (épreuve *B. subtilis*). — a : abeilles saines (moyenne de 10 lots). — b : Loque américaine. — c : Loque européenne. — d : Acariose. — e : Nosemose.

Dès le début de ces recherches, j'ai voulu étudier ce qui se passait dans la ruche malade à un degré plus ou moins grave. En effet, je n'étais pas éloigné de penser que si la maladie s'installe dans la ruche, principalement s'il s'agit d'une maladie microbienne, c'est parce que celle-ci

ne pouvait plus se défendre naturellement contre l'infection et que la substance antibiotique devait manquer ou disparaître en partie. Dans cette intention, j'ai éprouvé les extraits d'abeilles adultes, provenant de ruches atteintes des maladies suivantes :

- Loque américaine due à *Bacillus larvae* } Infections
- Loque européenne due à *Bacillus alvei* } microbiennes
- Acariose due à *Acarapis woodi* } Infestations dues, l'une à un
- Nosémose due à *Nosema apis* } acarien, l'autre à un sporozoaire.

Les résultats sont consignés et comparés à ceux qui ont été obtenus sur des ruches saines sur la figure 14. Contrairement à toute attente, il se trouve que *les abeilles atteintes de maladies contiennent autant de substance antibiotique que les abeilles saines et parfois beaucoup plus*. Dans le cas des

FIG. 15. — Action de l'antibiotique de l'abeille sur les souches pathogènes de la ruche, comparée à *B. subtilis* (en abscisse les numéros des souches essayées). — extrait d'abeilles saines. extrait d'abeilles provenant d'une ruche atteinte de Loque américaine.

abeilles atteintes de loque européenne et d'acariose les chiffres sont semblables à ceux des abeilles saines. Pour les abeilles nosémosées la quantité d'antibiotique est assez élevée.

En ce qui concerne les abeilles dont la colonie est atteinte de *loque américaine*, il peut paraître à première vue surprenant que *l'extrait antibiotique atteigne une activité toujours plus importante que chez les abeilles saines*. Mais on peut supposer que les abeilles atteintes par une maladie produisent des quantités plus grandes d'antibiotique pour lutter contre les bactéries pathogènes à l'intérieur de la ruche. Dans un autre chapitre concernant l'action des produits de la ruche et de l'extrait d'abeille sur *Bacillus alvei* et *Bacillus larvae*, j'ai étudié plus en détail l'action de certains extraits d'abeilles sur *Bacillus larvae*. La figure 15 montre qu'un *extrait d'abeilles provenant d'une colonie atteinte de loque américaine contient deux fois plus d'unités actives sur Bacillus larvae* qu'un extrait provenant d'une colonie d'abeilles saines.

CHAPITRE IV

PURIFICATION DE L'ANTIBIOTIQUE EXTRAIT DE L'ABEILLE

A. — Neutralisation des extraits d'*Apis mellifica* L.

J'avais trouvé dès le début de mes expériences que les extraits d'abeilles en solution aqueuse plus ou moins concentrée avaient un pH plus ou moins acide. Mais disons tout de suite que les quantités de ces liqueurs mélangées au milieu de culture ne modifiaient guère le pH propre de celui-ci. Cependant, j'ai neutralisé des extraits aqueux avant de les additionner aux milieux et je les ai comparés avec des témoins dont l'extrait n'avait pas été ajusté à la neutralité. *Les résultats sont identiques et ce n'est pas l'acidité libre de la substance qui est responsable de l'action antibiotique vis-à-vis des bactéries utilisées.*

B. — Fractionnement de l'antibiotique présent chez l'abeille.

Je suis parti d'un extrait alcoolique à chaud d'ouvrières. J'ai tout d'abord réalisé les premiers fractionnements consignés sur la figure 16, c'est-à-dire que j'ai concentré l'extrait alcoolique, lequel m'a donné un précipité A qui a été repris par l'eau chaude. D'autre part, la liqueur alcoolique est additionnée de cinq fois son volume d'éther, il se forme à nouveau un précipité B qui est repris également par l'eau chaude et il reste une liqueur que l'on évapore au bain-marie. Cet extrait C sec, est repris par l'eau chaude. On voit que *l'antibiotique de l'abeille est alcoolosoluble, éthéro-soluble et soluble dans l'eau chaude.* Mais nous savons déjà qu'il est impossible *d'extraire directement* l'antibiotique de l'abeille par l'éther. Il est donc nécessaire que l'extraction alcoolique précède la purification par l'éther. Entre la liqueur alcoolique simplement évaporée et reprise par l'eau chaude et l'extrait C, on s'aperçoit que la concentration de l'antibiotique augmente sensiblement puisque *la valeur de U passe de 8 à 50.* L'extrait alcoolique des mêmes abeilles évaporé à sec avant d'être repris par l'éther, puis évaporé à nouveau et repris par l'eau chaude nous donne une valeur intermédiaire $U = 19,23$. J'ai pu essayer grâce au professeur LEDERER, toute une série de fractions effectuées sur l'extrait C. La figure 17 donne un résumé d'ensemble de ces recherches. L'emploi de la chromatographie, de la distillation fractionnée (sous 0,03 de

FIG 16. — Premiers fractionnements de l'antibiotique extrait chez *Apis mellifica*.

Fig. 17. --- Fractionnements de l'antibiotique abeille d'après J. LEDERER.
+ Fractions actives, — Fractions inactives.

pression) et de la saponification de certaines de ces fractions nous a donné des résultats intéressants. *C'est la fraction acide de l'extrait C qui est active*, quoique la substance acide obtenue par saponification de la fraction neutre (inactive) le soit aussi. Donc une partie de l'acide antibiotique doit être à l'état de combinaison inactive. La chromatographie de cette fraction acide indique que seuls les éluats à l'éther entraînent la substance active. La distillation fractionnée de ces éluats ne donne aucun résultat et la substance semble détruite au cours de ce traitement. Par contre la substance présente dans l'éluat éthéré peut être estérifiée par action du diazométhane : cet ester méthylique n'est plus antibiotique, il suffit de le saponifier pour retrouver l'activité inhibitrice sur le développement des bactéries. Enfin, la chromatographie sur acide silicique de cet ester méthylique n'a pas permis d'isoler une fraction active.

Il résulte de tout ce travail que l'antibiotique présent chez l'abeille est contenu dans la fraction des acides gras saponifiables.

C. — Comparaison de l'antibiotique des abeilles avec certaines substances voisines.

1° Les travaux de KOIDSUMI (1957) sur l'action antifongique des lipides de la cuticule chez les insectes fournissent des points de comparaison intéressants. En effet, cet auteur trouve que l'extrait de la cuticule des larves de *Chilo simplex* Butl. et *Bombyx mori* L. recèlent des lipides fongicides et fongostatiques. Il montre que les exuvies des vers à soie ont les mêmes propriétés. J'ai reproduit le tableau de KOIDSUMI concernant le fractionnement de ses extraits (figure 18). Sur cette figure, il faut tenir compte que les extraits D et F se sont montrés les plus actifs sur les champignons testés. Il est facile de voir que ces extraits proviennent d'extractions par la vapeur d'eau (fractions volatiles) ou bien sont éthéro-solubles. *Ces substances sont en majorité des acides gras volatils* et l'auteur précise même qu'il s'agirait d'*acides gras saturés à chaîne de moyenne longueur, tels que l'acide caprique (C 10) ou caprylique (C 8)* présent à l'état libre. L'auteur japonais précise que ces acides sont présents à l'état libre dans la cuticule de l'insecte mais que la méthode d'extraction suffit à les modifier en hydrolysant leurs esters. On peut noter également que ces corps sont thermostables (extraction par distillation). Les recherches de KOIDSUMI vont de pair avec l'étude des constituants et de la structure du tégument du ver à soie par SHIKATA (1954). Il trouve notamment dans l'analyse des exuvies de la dernière mue des acides gras volatils en C₈ ou C₁₀ à l'état libre.

2° Tous ces faits s'accorderaient assez bien avec les travaux ayant trait aux acides gras de la peau humaine et de la chevelure. ROTHMAN, SMILJANIC, SHAPINO et WEITKAMP ont trouvé que les acides saturés (des

Fig. 18. — Extraction et fractionnement de l'antifongique présent dans les exuvies de *Boubyx mmi* d'après KOLDSUMI.

séries C 7 à C 11) affectaient le développement de *Microsporon audouini*, champignon responsable de la teigne tonsurante dans la chevelure humaine. Les premiers travaux concernant l'action bactéricide de la peau humaine remontent à 1908-1919 avec LANDAU et CHEN YU HSIANG. Ceux-ci avaient montré que des bactéries déposées sur la peau et ensemen-cées ensuite sur milieu de culture repoussaient très mal. Parmi les nombreux chercheurs ayant abordé ce problème c'est MARCHIONINI (1929) qui le premier a attribué ce pouvoir bactéricide de la peau à un « manteau d'acides » et non plus à la sueur comme l'avaient pensé les premiers auteurs. L'ensemble des travaux sur cette question démontre qu'en général les bactéries sont plus facilement détruites par l'action des acides gras que ne le sont les champignons. Il apparaît également que les antifongiques les plus actifs seraient principalement des acides gras saturés de courtes chaînes carbonées, volatils et hydrosolubles (travaux de STOKOL, WYSS, FOLEY). Au contraire BURTENSHAW (1942) a établi que l'action bactéri-cide de la peau humaine est sous la dépendance directe de ses acides gras non saturés.

3° Les recherches très poussées de M. PAVAN sur les antibiotiques d'origine animale ont abouti aux résultats suivants. Prenons l'exemple de l'antibiotique extrait d'*Iridomyrmex humilis* : le fractionnement conduit à un corps cristallisé appelé iridomyrmécine de formule brute $C_{10}H_{16}O_2$ à point de fusion 60°-61°C, liposoluble, soluble seulement à 2 p. 1000 dans l'eau. Le principe antibiotique résiste à 120°C, pendant 30 minutes. Cette substance est une lactone où figure le groupement -CO-O-CH³.

4° *Conclusion du chapitre IV.* — J'ai volontairement limité ma bibliographie sur ce sujet et analysé seulement les travaux en rapport étroit avec mes recherches.

En effet, en ce qui concerne les antibiotiques produits par les animaux, et même simplement les substances antibiotiques produites par les téguments, les travaux sont très nombreux. D'après la plupart des auteurs, il est établi que de nombreux corps antibiotiques ou antifongiques sont présents sur le revêtement des êtres vivants (cuticule ou peau). Ils présentent en commun les caractères suivants :

Corps dérivés d'acides gras à chaîne de carbone courte ou moyenne saturés ou non saturés, volatils, liposolubles, très faiblement hydrosolubles et thermostables. Ces acides gras peuvent être isolés de la cuticule de certains insectes à l'état libre et ces corps sont très fréquemment constitués de huit ou dix atomes de carbone.

CHAPITRE V

ACTION ANTIBIOTIQUE IN VITRO DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE D'APIS MELLIFICA L. SUR QUELQUES BACTÉRIES

A. — Résultats et interprétations.

J'ai éprouvé *in vitro* les substances extraites de l'abeille sur les 30 souches bactériennes dont la liste figure au tableau I. Au cours de nombreux essais, je me suis aperçu que certaines souches réagissaient toujours

FIG. 19. — Valeur antibiotique de l'extrait de l'abeille ouvrière vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes (en abscisse les numéros des souches éprouvées).

de même que certaines autres très voisines, par exemple les trois souches de *Salmonella pullorum* ont les mêmes réactions l'une par rapport à l'autre, de même les *Salmonella gallinarum*, les *Salmonella* type *Dublin*. Chez les *Escherichia coli*, on retrouve le phénomène et sur les souches du n° 10 au n° 18, il n'existe qu'un seul type d'inhibition vis-à-vis de l'antibiotique. Par contre les *Escherichia coli* 36, *Bordet* et B ont des réactions très divergentes. Toutes les expériences qui ont suivi cette première sélection ont alors porté sur un nombre de souches plus réduit. La figure 19 donne les résultats de l'antibiotique de l'abeille sur 12 souches

comparée à celle mesurée sur *Bacillus subtilis* souche Caron que je prends comme unité de référence en lui donnant la valeur $U = 10$. On s'aperçoit qu'une souche est particulièrement sensible à l'extrait d'abeille, c'est le *Proteus vulgaris* pour lequel l'action antibiotique est 4 fois plus forte que pour *Bacillus subtilis*. Parmi les bactéries plus sensibles que *Bacillus subtilis*, il faut citer deux *Salmonella* (*Salmonella pullorum* 1 et *Gallinarum* 47) et les bactéries pathogènes du couvain de l'abeille : *Bacillus alvei* et *Bacillus larvae*, qui sont inhibées avec deux fois moins d'extrait. Dans le lot des bactéries réagissant comme *Bacillus subtilis* se placent : *Salmonella* type Dublin n° 7-54, *Escherichia coli* 5401, 5434, Bordet et *Pseudomonas pyocyanea* 4. Au contraire, deux bactéries sont environ deux fois plus résistantes à l'antibiotique, ce sont : *Escherichia coli* 5512 et *Escherichia coli* B (Demerec et Fano).

D'après l'ensemble des résultats, je constate que l'antibiotique présent chez l'abeille est en général peu actif sur les *Escherichia coli*, alors que son activité est moyenne sur les *Salmonella* et très importante chez les *Proteus*.

L'action des extraits d'abeilles privées de l'appareil vulnérant est, comme je l'ai déjà montré au chapitre II, un peu différente et parfois l'activité est plus grande que chez les abeilles totales notamment sur *Salmonella gallinarum* n° 237, *Proteus* X 19 et *P. Pyocyanea* 5.

Nous avons vu également que l'extrait garde son action envers *Bacillus subtilis* après une longue conservation en milieu aqueux au réfrigérateur et à l'abri de la lumière. J'ai contrôlé également vis-à-vis de toutes les autres souches bactériennes du tableau I que ces extraits ne se modifient pas avec le vieillissement. En milieu éthéré, la fraction antibiotique se conserve dans de meilleures conditions encore, car on évite alors toute pollution et dégradation de l'extrait par les champignons.

De même, les progrès dans l'isolement des fractions actives donne des résultats différents. La courbe garde en gros la même forme, mais elle se trouve très renforcée ; il est possible en effet d'obtenir, par exemple avec une fraction éthérée, une valeur de 106 unités *subtilis* par gramme d'extrait sec et de calculer que 10 grammes d'abeilles renferment 212 de ces unités. Donc, dans les extraits bruts se trouvent probablement mélangées avec l'antibiotique des substances qui contrarient son action. Je ne reviendrai pas sur les différences existant entre l'antibiotique de l'ouvrière et celui de la reine exposées à la figure 5.

B. — Comparaison de l'action de l'antibiotique présent chez *Apis mellifica* L. avec des substances voisines.

Il est assez malaisé de comparer l'action de l'antibiotique présent chez l'abeille avec d'autres substances extraites soit d'autres insectes, soit du tégument des mammifères. En effet, la plupart des auteurs

n'ont pas travaillé sur les mêmes souches bactériennes. Dans le cas de KOIDSUMI, seule l'action antifongique a été étudiée à l'exclusion de l'action antibactérienne. Par contre l'action antibiotique des acides gras de la peau humaine se rapproche de l'action de l'antibiotique de l'abeille (BURTENSCHAW, 1942). Les travaux de M. PAVAN fournissent d'autres points de comparaison plus intéressants encore : *L'action antibiotique de l'Iridomyrmécine est positive sur Escherichia coli et Proteus vulgaris* (comme pour l'antibiotique abeille). Chez *Formica rufa*, les extraits d'abdomens sont très actifs sur les deux souches déjà citées, tandis que les extraits de thorax et ceux de têtes seraient inactifs. Chez *Xylocopa violacea* et *Calotermes flavicollis* pas d'activité. Au contraire, toujours sur ces deux souches les extraits d'ouvrières de *Vespa crabro* seraient plus ou moins actifs alors que les larves ne le seraient pas du tout. En ce qui concerne les travaux sur *Apis mellifica* L. PAVAN a essayé des extraits de tête, thorax, abdomen et du venin sur quelques souches bactériennes, les résultats sont consignés sur le tableau VIII. Je constate que PAVAN met en évidence une inhibition uniquement avec l'extrait d'abdomen et le venin contrairement à mes résultats, mais nous n'avons pas travaillé avec les mêmes souches et l'on ne peut rien conclure de précis.

TABLEAU VIII

Action des extraits alcooliques d'Apis mellifica d'après PAVAN.

Souches éprouvées	Extrait de têtes d'ouvrières	Extrait de thorax d'ouvrières	Extrait d'abdomens	Extrait de glandes à venin
<i>Staphylococcus aureus</i> .	—	—	—	
<i>Vibrio comma</i>	—	—	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	—	—	+	+
<i>Mycobacterium phlei</i> ..				+

Note : L'extrait de têtes d'ouvrière correspond à 1,64 g dans 10 cm³ alcool à 96°

L'extrait de thorax d'ouvrière correspond à 5,07 g dans 10 cm³ alcool à 96°

L'extrait d'abdomens d'ouvrière correspond à 7,64 g dans 10 cm³ alcool à 96°

Le venin correspond à 5/100 du venin d'une ouvrière.

C. — Action de l'antibiotique de l'abeille sur *Bacillus larvae* et *Bacillus alvei*.

Il existe une grande différence entre le *Bacillus alvei* Ch. et Ch., et le *Bacillus larvae* W., bien que ces deux bacilles soient strictement adaptés à l'hôte. Ces deux bacilles ne sont jamais pathogènes pour l'imago ; ils infectent seulement les larves. *Bacillus alvei* se cultive sur des milieux nutritifs courants de laboratoire sans exigence spéciale et présente beaucoup d'analogie avec *Bacillus subtilis*. Le *Bacillus larvae* au contraire est très exigeant pour sa culture et demande des milieux synthétiques

très spéciaux. D'autre part, il est très différent de *Bacillus alvei* par sa morphologie et sa physiologie.

J'ai trouvé en ce qui concerne l'agent de la loque européenne qu'un extrait alcoolique d'abeilles adultes était 4 fois plus actif sur *Bacillus alvei* que sur *Bacillus subtilis* (figure 15), mais cette figure nous montre aussi que l'action antibiotique de cet extrait est voisine pour les souches *Bacillus subtilis* et *Bacillus larvae*. J'ai également pratiqué l'extraction d'abeilles adultes provenant d'une colonie atteinte de loque américaine. L'épreuve de cet extrait ramené à l'unité subtilis = 10 montre que dans ce cas l'activité de l'antibiotique sur *Bacillus larvae* est double de celle obtenue avec l'extrait d'abeille provenant d'une colonie saine. Nous savions déjà que les extraits d'abeilles provenant de ruches loqueuses étaient plus actifs que les extraits d'abeilles saines sur *Bacillus subtilis*. Il est intéressant de noter ces résultats : en effet, on a l'impression que les colonies atteintes par *Bacillus larvae* secrètent plus d'antibiotique. On peut se demander si les souches d'abeilles dites résistantes à la loque américaine, (TOUMANOFF, 1929 et TARR, 1934), ne doivent pas cette immunité naturelle aux antibiotiques présents dans la ruche. En effet, TOUMANOFF n'a pu infecter qu'avec de grandes difficultés des colonies d'abeilles par *Bacillus larvae*. En 1936, PARK, PELLET et PADDOCK aux Etats-Unis ont trouvé qu'il existait des souches d'abeilles résistantes à la loque américaine et que cette résistance était héréditaire. Une sélection de ces souches a donné par la suite des résultats intéressants qui ont été étudiés par WOODROW (1941) et HOLST (1943). D'après ces chercheurs, la résistance des colonies trouverait son explication dans leur vigueur et leur activité de nettoyage, et ils excluent toute autre cause physiologique. Je pense qu'il serait intéressant de reprendre ces travaux, car rien ne prouve que le facteur activité de nettoyage soit le seul en cause, il est possible également que l'on ait affaire à une accentuation des défenses biochimiques. D'ailleurs TOUMANOFF signale en 1951 que les « déductions des auteurs américains sont trop catégoriques et que des études sont nécessaires afin de rechercher la possibilité pour les larves d'acquérir l'immunité contre la loque américaine ». Il envisage même la possibilité d'une vaccination de certaines larves appelées à donner les reines, mais je crois qu'il est difficile d'admettre la transmission d'une vaccination de la larve à l'imago et ensuite à sa descendance.

En conclusion, je signale : l'activité plus grande de l'antibiotique d'abeilles sur *Bacillus alvei* que *Bacillus larvae* et l'augmentation d'activité de l'extrait d'abeilles atteintes de loque américaine. Je pense qu'il serait intéressant de se procurer des abeilles provenant de souches résistantes à la loque américaine pour éprouver leurs extraits sur *Bacillus larvae*. Il faudrait également étudier l'action de l'antibiotique de l'abeille, en fonction de la saison et de la nutrition, sur *Bacillus larvae* et *Bacillus alvei*.

CHAPITRE VI

ACTIONS DIVERSES DES SUBSTANCES EXTRAITES DES INSECTES ET DES ABEILLES

A. — Action antifongique.

Nous pouvons trouver dans la littérature de nombreux cas où certaines réactions d'immunité naturelle des insectes envers les champignons pathogènes sont restées inexpliquées et jusqu'aux travaux de KOIDSUMI et PAVAN, il n'existait aucune preuve que cette immunité fût de nature biochimique. Evidemment, ces résultats récents ne prouvent pas que ce mécanisme de protection soit le seul en jeu dans tous les cas, mais il est certain qu'ils complètent nos connaissances sur l'immunité naturelle. Les recherches de KOIDSUMI ont permis de déceler des antifongiques chez *Bombyx mori* L. et *Chilo simplex* Butl. actifs *in vitro* sur *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus mucor*, et *Beauveria bassiana*. C'est à ma connaissance, les seuls travaux actuels ayant démontré la présence de substance antifongique dans la cuticule des insectes.

RAIGNIER (1947) dans une étude sur *Formica rufa polycтена* Foerst signale des faits se rapportant aux propriétés antifongiques ou plus exactement fongostatiques des substances présentes dans le nid. Dans les fourmières bien vivantes, il n'y a nulle part trace de moisissure et le développement des mycéliums est inhibé alors que les spores y sont très abondantes et que le milieu (humidité, température, obscurité), favoriserait leur développement. L'auteur a supposé que seul le pH entre en jeu; il a trouvé que les matériaux du nid habité ont un pH voisin de 5, tandis que les matériaux similaires dans la nature ou dans les nids abandonnés ont un pH de 8 à 8,5. Sur ces derniers matériaux, les moisissures forment aisément leur mycélium. Personnellement, je ne crois pas que le pH suffise à gêner les champignons dans leur cycle évolutif car ces végétaux s'accommodent bien en général d'un milieu très acide et en tous les cas, ce facteur d'inhibition n'est certainement pas le seul. Nous retrouvons dans ce cas encore une action antifongique qui provient, de toute manière, des insectes vivants.

J'ai éprouvé l'extrait alcoolique d'*Apis mellifica* sur *Pericystis apis*, champignon inféodé à la colonie d'abeilles; je dois dire que je n'ai pas obtenu de résultats réguliers. Une fois seulement j'ai vu une inhibition que je n'ai jamais retrouvée depuis malgré de nombreuses

tentatives. Lors de cette expérience, j'ai même obtenu un développement de *Pericystis apis* proportionnel à la dilution de l'extrait dans le milieu de culture. Je dois signaler également que les extraits d'abeilles conservés en milieu aqueux et au réfrigérateur laissent pousser parfois des *Penicillium* à la surface du liquide malgré la température ambiante assez basse. *Il est donc à peu près certain que l'extrait alcoolique d'abeille ne contient pas de substances antifongiques.* D'ailleurs *Apis mellifica* est très peu attaquée par les champignons pathogènes, mais au contraire très souvent par des infections bactériennes graves. C'est peut-être pour cette raison que cet insecte ne possède pas de moyens de lutte naturels antifongiques, tandis que le *Bombyx mori* se trouve dans une position inverse, étant très exposé à des épizooties dues à des champignons pathogènes.

B. — Action antigerminative sur les pollens stockés.

Jusqu'à présent, on ne savait pas pourquoi le pollen stocké dans les rayons par les abeilles ne germait pas dans la ruche où la température et l'hygrométrie sont favorables à ce processus. MAURIZIO (1958) vient d'élucider ce problème dans des travaux très récents et très importants. On sait que le pollen perd très rapidement dans la ruche ses facultés germinatives et après 5 jours de stockage dans les cellules, il ne peut plus germer. Ce pollen, mélangé au nectar et aux sécrétions des abeilles, est entreposé dans les alvéoles et subit évidemment alors de nombreuses transformations. Je montrerai d'ailleurs dans la deuxième partie de cette thèse que la valeur antibiotique des extraits de pollen est fonction de sa maturation dans la ruche. Les principaux résultats obtenus par MAURIZIO sont les suivants :

Sont très inhibiteurs de la germination du pollen : les glandes pharyngiennes des ouvrières, la nourriture larvaire (même avec le pH ajusté) et les extraits alcooliques d'abeilles (antibiotique) que je lui avais fait parvenir.

Sont inhibiteurs, mais à un moindre degré : le miel normal ou bouilli et les solutions de sucre à plus de 40 p. 100.

Ne sont pas inhibiteurs de la germination du pollen : toutes les autres glandes de l'abeille (salivaires des mandibules, de la tête et du thorax), le jabot, l'intestin moyen et le rectum.

En outre, l'auteur signale que la germination du pollen est entravée en milieu acide (pH 3,9-4,5) et favorisée au contraire par pH neutre (7 à 7,5).

La conclusion de ce travail établit que la concentration du nectar et du miel mélangé au pollen stocké et l'augmentation de l'acidité favorisent déjà l'inhibition de sa germination. Mais c'est principalement une

substance thermostable qui inhibe la germination des pollens. *Cette substance inhibitrice spécifique est contenue dans les glandes pharyngiennes, l'extrait alcoolique d'abeille, dans la nourriture larvaire et dans le miel.* D'après A. MAURIZIO on pourrait attribuer l'efficacité bactéricide et l'efficacité inhibitrice de la germination du pollen à la même substance qui aurait son origine dans le corps des abeilles et serait présente également dans les produits de la ruche. Cette substance agit indépendamment du pH, de la concentration en sucre et elle est thermostable. Nous avons vu d'autre part, que les glandes pharyngiennes de l'ouvrière possédaient des propriétés antibiotiques comme l'extrait alcoolique. Tout me donne à penser qu'il s'agit de la même substance dans mes travaux et dans ceux de MAURIZIO.

C. — Action antigerminative sur les graines et les tubercules.

Nous savons depuis longtemps que certaines fourmis stockent des graines à l'intérieur de leur nid (LEMAY, 1947). Or de nombreux auteurs sont d'accord sur le fait que ces graines ne germent pas à l'intérieur de la fourmilière qui constitue cependant un milieu favorable à la germination par sa température, son humidité et son obscurité. Si ces mêmes graines sont prélevées et mises à germer dans un autre milieu l'inhibition de la germination disparaît. De nombreuses suppositions ont été faites à ce sujet, par exemple l'action des émanations d'acide formique. Il semble plus probable que les fourmis enduisent les graines de substances antigerminatives, qui seraient également antifongiques (RAIGNIER) et même antibiotiques (PAVAN). Ces idées concordent avec les travaux de LEMAY (1947) qui a montré que certaines substances antibiotiques étaient également capables d'empêcher la germination des graines et des tubercules sans que leur pouvoir germinatif soit détruit. Il est possible en effet de faire germer ces mêmes graines et ces mêmes tubercules en les transplantant dans un milieu ne contenant pas d'antibiotique. D'autre part, on sait actuellement que les antibiotiques sont fréquents chez les fourmis (PAVAN). LEMAY constatant le parallélisme d'action de ces substances sur les graines et les microbes, arrive à la conclusion que l'on peut se servir de la germination différée des graines pour rechercher les antibiotiques (cette épreuve constituant simplement une indication pour orienter d'autres recherches). Dans cet ordre d'idées, ce même auteur a montré que *l'épreuve de germination des graines est positive pour le venin d'abeille*. D'autre part, l'action bactériostatique et bactéricide du miel est bien connue et l'on sait que ce produit a servi pendant très longtemps à conserver intactes des semences destinées à de longs voyages. Nous verrons d'ailleurs dans la deuxième partie ce qu'il faut penser des facultés antibiotiques et antigerminatives des produits de la ruche.

D. — Action insecticide.

PAVAN (1952) a été le premier à extraire un insecticide d'origine animale et à l'obtenir pur et cristallisé. En effet, cet auteur s'est aperçu que l'iridomyrmécine extraite de *Iridomyrmex humilis* était non seulement antibiotique vis-à-vis des bactéries, mais encore *insecticide*. Cette lactone $C_{10}H_{16}O_2$ (voir plus haut) montre une très grande activité insecticide, même sur des espèces résistant au D. D. T. La substance est sécrétée par les glandes anales de la fourmi et aurait selon PAVAN un rôle défensif et offensif ; après essais sur une quinzaine d'espèces très diverses, on constate notamment une activité intéressante sur *Musca domestica* L. résistante au D. D. T., sur les anophèles, les fourmis dont certaines sont résistantes au D. D. T. et également sur *Pyrhocoris apterus* L. L'activité est moins grande sur les coléoptères et nulle sur *Blatella germanica* L. Une souche de mouches domestiques résistant au contact du D. D. T. pp' pendant 24 heures, à la concentration de 10 000 gamma par cm^2 est détruite par une dose de 6,5 gamma d'iridomyrmécine par cm^2 en quelques heures dans la proportion de 93 p. 100 des individus. PAVAN (1953) a également extrait une substance à partir de larves de *Melasoma populi* L. qui est à la fois antibactérienne et insecticide. Ce corps sécrété par des glandes présentes sur les segments abdominaux de la larve a été obtenu à l'état cristallisé.

A ma connaissance, ce sont les seuls cas où des insecticides aient été extraits d'organismes animaux et de plus se confondent exactement avec des antibiotiques. Chez *Apis mellifica*, je n'ai pas retrouvé une semblable action insecticide.

E. — Action sur les mammifères.

Nous ne savons ici que très peu de choses. L'iridomyrmécine d'après PAVAN n'est que faiblement toxique pour la souris blanche par injection intrapéritonéale.

Nous avons vu dans le chapitre I que l'extrait alcoolique d'abeilles n'était pas non plus toxique pour la souris blanche s'il est administré par voie buccale.

CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

A. — La découverte d'un antibiotique chez *Apis mellifica* L. renforce la théorie de la protection naturelle.

Les premiers travaux qui ont mis en lumière les théories de l'immunité naturelle datent de 1884 et c'est un zoologiste, METCHNIKOFF, qui a découvert le rôle des phagocytes dans l'organisme. Mais bientôt la théorie de la phagocytose est complétée par la théorie humorale, mécanisme de défense mettant en action l'*anticorps* et le *complément* dans le

sang des animaux malades. Parmi les principaux chercheurs qui nous ont apporté du nouveau chez les insectes sur ce sujet il faut citer GLASER (1918) et principalement PAILLOT (1919 et la suite). Mais de leur côté, les biochimistes commençaient à pressentir une action « chimique » dans de nombreuses réactions d'immunité. L'action bactéricide *in vitro* du sang de certains insectes (GLASER et PAILLOT) montre qu'il s'agit là de mécanismes différents de la phagocytose et des défenses humorales. Cependant, à part le lysozyme étudié par FLEMING (1922), toutes les recherches dans ce sens n'aboutissent pas avant 1939. A ce moment, l'ensemble des recherches sur les antibiotiques prend un départ foudroyant après la découverte de la pénicilline. Cependant, l'orientation donnée fait que les antibiotiques sont alors recherchés très activement dans les champignons, les bactéries, les végétaux supérieurs. C'est alors une période riche en découvertes et une confirmation éclatante de la possibilité d'une protection biochimique chez les êtres vivants. Mais il faut reconnaître que la recherche d'antibiotique *d'origine animale* reste un peu en retard, malgré la présence connue du lysozyme, et ce n'est qu'aux environs des années 1940 que la recherche de ces substances chez les animaux prend son essor. Tout d'abord chez les mammifères NUTINI (1942) trouve une substance antibiotique active *in vitro* et *in vivo*, vis-à-vis des streptocoques hémolytiques, dans les extraits de rate de bœuf et de rate humaine. Ces travaux ont été complétés depuis par BLOOM (1947). DUBOS et HIRCH en 1952 trouvent dans l'organisme la *spermine*, substance qui tue les bacilles de Koch humains ou animaux. Tous ces travaux encore en cours sont d'une grande importance et confirment que *la protection chimique présente dans les organismes vivants est peut-être aussi importante que l'immunité due aux phagocytes ou aux réactions humorales*.

Cependant, les travaux n'ont pas porté uniquement sur l'homme et les mammifères. Dès 1947, LEMAY signale l'intérêt des antibiotiques présents chez les insectes, mais il faut attendre PAVAN (1948) pour trouver un travail d'ensemble sur la question. Celui-ci étudie des extraits d'invertébrés et constate que, nombreux sont ceux qui possèdent dans leur organisme des substances antibiotiques. Cet auteur est le premier à obtenir à l'état pur et cristallisé un antibiotique d'origine animale l'*irido-myrmeicine*. Après PAVAN c'est un entomologiste japonais KOIDSUMI (1957) qui trouve une substance antifongique chez des larves de lépidoptères.

J'ai montré sur l'abeille, une fois de plus, l'importance de la défense chimique. Mais l'antibiotique de l'abeille n'est pas antifongique. Ce dernier point s'explique naturellement, si l'on considère que les maladies dues aux champignons pathogènes chez l'abeille ne sont pas graves en général. L'abeille n'aurait donc pas besoin d'antifongiques puissants, tandis que les substances antibiotiques au contraire lui seraient nécessaires pour se défendre contre les bactéries.

B. — Signification des substances antibiotiques tégumentaires chez les animaux.

Nous savons depuis longtemps que le tégument animal est un moyen de défense primordial. En effet, c'est une barrière naturelle entre l'organisme et les facteurs d'agression physiques ou chimiques. Il protège des traumatismes, de la déperdition en eau, des différences de température et il sert de régulateur également aux échanges d'oxygène, aux échanges électrolytiques et aux rayonnements divers. La souplesse, l'élasticité ou l'articulation et la solidité du tégument permettent les mouvements nécessaires aux animaux de toutes espèces. Dans certains cas limites, le tégument facilite même le déplacement (nage chez les palmipèdes, vol des chiroptères et chez de nombreux insectes). Enfin, il est le support d'organes sensoriels vitaux pour l'animal.

En ce qui concerne les insectes, les travaux de MUKERJI et de CHATTERJEE (1953) ont montré que, dans la nature, l'épicuticule subissait une abrasion inévitable, mais sans que ce phénomène paraisse avoir une grosse importance biologique. A l'inverse SLIFER (1950) a montré que les insecticides pénètrent plus facilement par les tarses et métatarses des orthoptères si ces organes sont traités aux abrasifs. De nombreux auteurs ont vu également la mort survenir très rapidement par déshydratation chez les insectes dans le cas où l'on supprime la barrière cuticulaire.

Les derniers travaux sur les antibiotiques et les antifongiques tégumentaires permettent d'affirmer que s'il existe chez les animaux une protection en surface envers les agents physiques et chimiques, *il existe également une barrière naturelle qui s'oppose à la pénétration d'agents pathogènes dans l'organisme*. C'est le cas de la peau humaine qui possède un pouvoir bactéricide, (MARCHIONINI), de la cuticule des insectes qui possède un pouvoir fongicide (KOIDSUMI) ou antibiotique (PAVAN). Des acquisitions récentes sur la valeur antibiotique et antifongique du tégument prennent toute leur valeur en entomologie si l'on considère que les infections se font presque toutes par le tégument (PAILLOT-KOIDSUMI-CLAUSEN et SMITH-LEFEBURES-SUSSMAN, etc.). Nous savons également que les infections artificielles sont plus faciles lors de l'histolyse des tissus et plus faciles par injection que par ingestion. D'après PAILLOT, les insectes adultes seraient moins atteints que les chenilles : faut-il interpréter cela en invoquant une maturation du tégument nécessaire avant la production d'antibiotique comme je l'ai trouvé chez l'abeille et PAVAN chez les fourmis? J'ai déjà signalé qu'une abeille blessée même légèrement meurt rapidement ; est-ce dû uniquement à la pénétration dans l'organisme, par cette brèche, de bactéries pathogènes? On l'ignore encore. D'autre part, lors d'essais d'infection expérimentale, on a constaté que l'intervention d'insectes prédateurs favorise le déclenchement des

épidémies (PAILLOT), ce qui tend à prouver que les ruptures du tégument favorisent la pénétration des microorganismes pathogènes chez les insectes. Cette relation entre la rupture du tégument et l'infection microbienne chez l'insecte vient d'être confirmée récemment par VAGO. Cet auteur a mis en évidence un grand nombre de rapports existant dans le complexe « *blessure-infection microbienne* », chez de nombreux insectes et principalement chez *Bombyx mori* L. Dans la conclusion du chapitre intéressé, l'auteur précise notamment que « la discontinuité de l'épiderme semble faciliter une pénétration microbienne, que les blessures rendent possible l'évolution de la pathogénèse de certains germes incapables de réaliser une infection sur un épiderme intact, que les blessures augmentent la possibilité d'infection par des germes peu pathogènes et même peuvent permettre à des germes considérés comme non pathogènes de réaliser un processus pathologique ». Nous verrons, dans la troisième partie du travail, que je présente ici, le rapport qui peut exister chez certains insectes entre la présence de substances antibiotiques d'une part et leur sensibilité aux mutilations d'autre part.

C. — Action de l'antibiotique de l'abeille sur *Bacillus larvae* et *Bacillus alvei*.

D'après mes expériences *in vitro*, l'antibiotique extrait de l'abeille serait actif dans une certaine mesure sur les deux bactéries pathogènes de la ruche. Il est d'ailleurs facile de constater que les abeilles adultes sécrétant l'antibiotique ne paraissent pas souffrir de la loque, tandis que les larves et nymphes dépourvues de substances antibiotiques peuvent en mourir. Mais l'antibiotique présent dans la cuticule de l'abeille adulte n'est pas très actif sur ces deux bactéries et il semble que d'autres antibiotiques présents dans la ruche jouent un rôle plus important. Cependant, je rappelle à nouveau que les abeilles d'une colonie atteinte de loque américaine contiennent beaucoup plus de substances antibiotiques, vis-à-vis de *Bacillus larvae*, que les abeilles provenant d'une ruche saine. J'ai signalé également que ce sont les abeilles « nourrices » qui sont les plus riches en substances antibiotiques et il existe peut-être un rapport direct entre les soins des adultes donnés au couvain et la santé de ce dernier.

D. — Action de l'antibiotique de l'abeille sur les produits de la ruche.

Nous ne connaissons que peu de chose sur l'action possible de l'abeille dans la conservation des produits stockés dans la ruche, nectar et pollen. Nous savons cependant (MAURIZIO, 1958) que la substance antibiotique de l'abeille inhibe très puissamment la germination du pollen, ce

qui favoriserait donc sa conservation et son stockage dans la ruche. En ce qui concerne le miel ou le nectar, rien ne permet de supposer, à l'heure actuelle, l'addition d'une substance analogue pour favoriser sa conservation. Je puis rapprocher encore de ces résultats l'action antigerminative observée sur les graines dans certaines fourmilières et les résultats de LEMAY sur le pouvoir antigerminatif de certains antibiotiques sur les graines et tubercules. De même, la conservation des matières stercorales par certains insectes pourrait s'expliquer par l'action de substances analogues.

E. — La production de l'antibiotique chez *Apis mellifica* L. a une signification sociale.

Nous savons que la colonie d'abeilles peut être considérée comme un organisme dont les principales fonctions sont régies par l'ensemble du groupe et non par l'individu isolé. EMERSON (1952) et CHAUVIN (1954) ont prononcé à ce propos le mot de *super-organisme*. Les régulations sociales indispensables à la vie d'une société telle que la ruche sont le résultat d'équilibres très complexes entre tous les individus. Nous avons d'ailleurs montré en 1952 avec ROTH que la *régulation thermique* par exemple n'apparaît que si nous expérimentons sur une dizaine d'abeilles au minimum. J'ai choisi cet exemple que je connais particulièrement, mais il en est de même pour d'autres activités de l'abeille : la *récolte*, la *construction*, l'*élevage* (GONTARSKI, 1959 et ROUBAUD, 1950) ne commencent qu'avec un nombre d'abeilles plus ou moins grand, mais ne sont jamais réalisées par une abeille isolée.

Du point de vue de la production de l'antibiotique nous retrouvons les mêmes faits. D'après les résultats des travaux exposés dans la première partie de cette thèse il est évident que *la sécrétion de substances antibiotiques par l'abeille intéresse l'ensemble de la colonie et non pas l'individu. Dans une colonie d'abeilles complète, il est toujours possible d'extraire à partir des abeilles adultes une substance antibiotique.* En revanche, nous avons vu que certains individus recèlent peu ou pas de ces substances (insectes naissants ou âgés de plus de 12 jours, mâles, larves, nymphes, etc.). *Il se crée un équilibre dans la ruche et la résultante correspond à une valeur à peu près constante pour une saison considérée.* Par exemple, la production d'antibiotique chez l'ouvrière adulte varie en fonction de l'âge, c'est-à-dire en fonction de son développement physiologique. Or, dans une ruche normale et bien organisée, il naît et il meurt tous les jours des abeilles dans une certaine proportion de telle manière qu'il y ait toujours à peu près le même nombre dans chaque classe d'âge. Il y a sans doute aussi pour l'antibiotique un équilibre dans la colonie et la sécrétion de cette substance ne doit pas être considérée seulement sur

l'individu isolé. Nous avons vu d'autre part les rapports étroits entre la production de la substance attractive pour les ouvrières chez la reine et la production d'antibiotique chez la reine et chez l'ouvrière. J'ai montré également que lors d'une infection par *Bacillus larvae*, la quantité d'antibiotique présente chez les adultes augmentait, ce qui ferait songer à une réaction d'équilibre de la colonie envers le bacille pathogène.

Tous ces exemples nous amènent à conclure que *la production d'antibiotique par l'abeille est pour une part un phénomène social; d'autre part cette sécrétion se maintient constamment en équilibre dans la ruche à une certaine concentration nécessaire pour la défense de la colonie*, phénomène comparable à ce qui se passe dans l'organisme d'un mammifère, ce qui renforce l'analogie entre la société d'abeilles et un super-organisme.

Je voudrais compléter cette conclusion par quelques remarques *sur la survie chez les abeilles isolées*. L'influence de l'effet de groupe est particulièrement nette chez les abeilles sur la durée de vie (CHAUVIN et GRASSÉ 1944, — CHAUVIN 1952). L'abeille isolée meurt très rapidement en 8 jours au plus. Pour obtenir une survie plus longue, il faut dépasser le chiffre de 30 abeilles. Les isolées peuvent subsister plus longtemps si elles échangent de la nourriture avec un groupe d'abeilles et leur survie est également prolongée si, étant isolées, elles reçoivent une nourriture enrichie en vitamines (acide panthoténique, thiamine, lactoflavine). *L'effet de groupe dépendrait donc d'une sorte de circulation sociale de substances diverses* (CHAUVIN 1958). D'autre part, MAURIZIO (1954) montre que les abeilles captives nourries avec du pollen récolté par les abeilles vivent plus longtemps, mais que le pollen récolté à la main est moins efficace que celui qui est mis en réserve dans les alvéoles. D'après cet auteur, les protéines du pollen seraient actives sur le développement des glandes et la survie, les vitamines n'ayant qu'une importance réduite. Cette circulation des substances diverses dans la ruche et l'action du pollen emmagasiné par les abeilles sur la survie me font émettre l'hypothèse *d'une circulation sociale de l'antibiotique trouvé chez l'abeille*. Qui sait s'il n'influence pas la survie individuelle, son action étant peut-être aussi importante que celle des protéines et des vitamines?

DEUXIÈME PARTIE

A la suite de l'étude des substances antibiotiques chez l'abeille, nous avons exécuté des travaux du même genre sur les produits de la ruche. Nous allons étudier d'abord la valeur antibiotique des matériaux utilisés dans la construction du nid ou pour assurer l'étanchéité : la propolis et la cire. Le troisième et le quatrième chapitres seront consacrés aux matières récoltées ou emmagasinées dans la ruche : le pollen et le miel. Le chapitre VI traitera de la gelée royale, sécrétion des glandes de l'ouvrière. Enfin, j'étudierai les rapports entre ces différents antibiotiques et ce qu'il faut penser de leur importance dans la vie de la colonie.

CHAPITRE PREMIER

L'ANTIBIOTIQUE DE LA PROPOLIS

A. — Généralités.

La propolis est une résine employée par l'abeille pour calfeutrer les fissures de la ruche et assurer son étanchéité à l'eau. Une deuxième utilisation est également très importante : lorsque les ouvrières tuent un ennemi à l'intérieur de la ruche et que le cadavre est trop gros pour être expulsé, il est alors enduit de propolis, ce qui évite toute putréfaction et toute moisissure ultérieure. Il faut noter encore la présence de la propolis dans les rayons de cire bâtis par les abeilles (elle est responsable en partie de la coloration de la cire). La propolis aurait en outre, d'après des travaux récents, une action sur la construction des cellules royales (VUILLAUME, 1958). Je n'entrerai pas dans le détail de la bibliographie concernant la propolis, celle-ci est très volumineuse et bien souvent de caractère peu scientifique. Je retiendrai seulement quelques travaux se rapportant à la valeur antibiotique ou à l'utilisation médicale de cette résine. Il est assez étonnant que WHITE (1906) qui a fait l'inventaire de la flore bactérienne de la ruche n'ait pas étudié la propolis. En effet, déjà à cette époque la propolis était considérée comme une matière cicatrisante et antiseptique, aussi bien pour les tissus animaux que pour les tissus végétaux. En ce qui concerne l'utilisation médicale, CAILLAS (1945) cite les observations de PARVEL qui avait traité des blessés pen-

dant la guerre Anglo-Boer avec de la « popolisin vasogen » (propolis plus vaseline), et avait constaté une action cicatrisante et régénératrice sur les tissus. ROOT cite des observations de 58 cas chirurgicaux où l'on a utilisé la « popolisinvasogen » avec d'excellents résultats en ce qui concerne l'asepsie des plaies. KILVALKINA (1948) et HAMBLETON (1950) ont mis en évidence les propriétés bactéricides de la propolis. VERGÉ (1951) qui cite des travaux de ces deux auteurs a vérifié également le pouvoir antibactérien de la propolis, et trouve des résultats positifs sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei*, *Bacillus prodigiosus* et une grande sensibilité des *staphylocoques blancs et dorés* et des *bacilles pyocyaniques*. Au contraire, il n'obtient pas d'action sur toute une série de *Salmonella*, une série d'*Escherichia* et trois *Proteus*. Je dois dire que je n'ai pas trouvé les mêmes résultats; nous verrons plus loin et en détail la critique de ces travaux.

Mais les recherches les plus intéressantes sur les antibiotiques dans la propolis sont celles de deux tchèques, FEUEREISL et KRAUS (1958). Ces auteurs ont montré l'activité de divers extraits de cette substance sur plusieurs souches de bacilles de la tuberculose. Ils ont trouvé que les extraits à chaud au soxhlet par les solvants tels que : éther de pétrole, l'éther, le benzène, l'éthanol, l'eau étaient tous bactériostatiquement inactifs. *L'extrait de propolis à froid par l'éthanol n'est pas inhibiteur vis-à-vis du bacille tuberculeux*, mais est inhibiteur de plusieurs souches étudiées. *L'extrait aqueux à froid* (plusieurs jours de macération) possède une action positive sur *Mycobacterium tbc*. Il est possible d'extraire la substance antibiotique plus rapidement au moyen de chloroforme ajouté à l'eau d'extraction. Enfin, si la propolis est soumise à la lyophilisation, le produit lyophilisé conserve une action antibiotique. La propolis contient donc un antibiotique vis-à-vis de *Mycobacterium tbc*. Cette substance est hydrosoluble et thermolabile; son efficacité n'est pas modifiée par la lyophilisation.

Avant de passer à mes recherches personnelles, il faudrait encore citer le travail de MAYER dont la thèse non publiée porte sur divers fractionnements de la propolis, qui n'ont toutefois pas été poussés assez loin pour permettre de déterminer la nature chimique de l'antibiotique.

B. — Travaux personnels.

1^o Matériel et méthodes.

La propolis recueillie dans les ruchers de la Station de Recherches de Bures (soit dans la région parisienne, soit dans le Sud-Est) m'a toujours donné des résultats réguliers. Cette propolis a été extraite de deux façons, par l'eau et par l'alcool éthylique. *L'extraction par l'alcool à chaud de la propolis* s'effectue de la manière suivante : la propolis concassée et enveloppée dans un linge est mise à bouillir à reflux pendant 1 heure dans

un ballon surmonté d'un réfrigérant, l'extrait est ensuite filtré, évaporé au bain-marie et repris par l'eau chaude. *L'extraction par l'eau chaude* se pratique exactement de la même façon. Je fais bouillir à reflux pendant 1 heure le mélange eau et propolis, ensuite je filtre et concentre au bain-marie. En général je traite 50 grammes de propolis par 1 litre de solvant. J'ai obtenu également des extraits aqueux aussi actifs en faisant bouillir la propolis seulement pendant un quart d'heure à reflux. Cependant, dans la majorité des essais, *les extraits alcooliques se sont montrés légèrement plus actifs que les extraits aqueux*. Les extraits repris en phase

FIG. 20. — Comparaison de la valeur antibiotique de l'extrait d'abeille et des extraits des produits de la ruche (en abscisse les numéros des souches éprouvées). — — — extrait d'abeille. — extrait de propolis. — - - - - extrait de cire. — - - - - extrait de miel.

aqueuse sont stables plusieurs mois au réfrigérateur et à l'abri de la lumière ; thermostables, ils résistent à l'autoclavage à 120° pendant une demi-heure. Il ne se développe pas de *Penicillium* dans les extraits aqueux comme j'en avais trouvé parfois dans les extraits d'abeilles. L'extrait possède une odeur aromatique très agréable. Le *pH* est voisin de la neutralité.

2° Activité antibactérienne.

L'action des extraits sur *Bacillus subtilis* souche Caron est très nette et va jusqu'à 196 unités *subtilis* dans certaines expériences. Dans ce cas, 10 grammes de propolis correspondaient à 38 unités *subtilis*.

Ces résultats nous montrent une activité très grande de l'extrait de propolis par rapport à l'antibiotique de l'abeille. Les extraits alcooliques sont en général légèrement plus actifs que les extraits aqueux. J'ai essayé également l'antibiotique de la propolis sur 12 autres souches bactériennes de façon à comparer son action avec celle de l'antibiotique de l'abeille. Or la comparaison nous a montré qu'il ne s'agissait pas de la même substance. En effet, pour pouvoir confronter les résultats ramenons arbitrairement à la valeur 10 l'action des deux substances sur *Bacillus subtilis* souche Caron et portons sur un graphique les valeurs correspondantes pour les autres souches bactériennes. Ces chiffres sont portés sur la figure 20. Nous remarquerons les faits suivants :

Pour l'antibiotique de la propolis,

— *Activité très intéressante sur :*

Bacillus subtilis souche Caron, *Proteus vulgaris* et *Bacillus alvei*.

— *Activité moitié moindre sur :*

Salmonella pullorum, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella* type Dublin, *Escherichia coli* B, *Bacillus larvae*.

— *Activité nulle* sur quatre souches d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas pyocyanea*.

Pour l'antibiotique de l'abeille :

L'activité est presque toujours égale ou supérieure à celle qui a été trouvée sur *Bacillus subtilis* pour l'antibiotique de la propolis.

— *L'antibiotique abeille est d'une activité voisine de 10 sur les Escherichia, Salmonella type Dublin, Bacillus larvae, Pseudomonas pyocyanea.*

— *Son activité est double sur :*

Salmonella pullorum et *Salmonella gallinarum*.

— *Son activité est quadruple sur :*

Proteus vulgaris et *Bacillus alvei*.

La comparaison de tous ces résultats m'amène à conclure que l'antibiotique de l'abeille est très différent des substances antibiotiques présentes dans la propolis. D'autre part, j'ai montré dans la première partie que l'antibiotique de l'abeille s'extraît mal par l'eau bouillante, or, celui de la propolis y passe facilement. Je montrerai plus loin au chapitre VII l'action antibiotique des divers produits de la ruche vis-à-vis des bactéries pathogènes pour la colonie d'abeilles. Mais il est déjà possible dès maintenant de préciser que l'antibiotique extrait de la propolis est deux fois plus actif sur *Bacillus alvei* que sur *Bacillus larvae*.

3° Comparaison avec d'autres travaux.

VERGÉ a remarqué une sensibilité particulière des bacilles pyocyaniques à la propolis ; or, je n'ai trouvé aucune action bactériostatique des extraits de propolis sur *Pseudomonas pyocyanea*, mais j'ai constaté comme lui une action positive sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei*, nulle

ou faible sur les *Salmonella*, les *Escherichia coli* (3 souches), le *Proteus* X 19. Quant aux autres souches, elles n'ont pas été éprouvées dans les deux cas et il n'est pas possible de comparer les résultats. Il résulte de cette analyse que VERGÉ avait trouvé les mêmes actions antibiotiques dans les extraits de propolis que moi-même à l'exception toutefois du comportement de la substance vis-à-vis de *Pseudomonas pyocyanea*. A mon avis, ces différences tiennent d'une part à la méthode d'extraction qui était différente. Les essais de VERGÉ ont porté sur de la propolis brute fondue, un extrait aqueux comparable au nôtre, des extraits dans l'éther de pétrole, l'éther, l'alcool et également sur une essence obtenue par entraînement de l'extrait éthéro-pétrolique à la vapeur d'eau. Les essais ont été exécutés sur plaques de gélose et non pas par la méthode de la dilution comme je l'ai pratiquée. D'autre part, le milieu n'était pas non plus de composition identique au mien. Tous les extraits ont donné à VERGÉ un résultat positif (sauf l'essence entraînée à la vapeur d'eau).

KILVALKINA (d'après CHVIDCHENKO) a trouvé qu'une culture microbienne au contact d'une plaque de propolis est détruite en peu de temps, de 10 minutes à 20 heures suivant les souches étudiées. Dans une autre série d'expériences la propolis brute est ajoutée au milieu de culture dans des proportions variant de 1,5 p. 100 à 10 p. 100. Un certain nombre de bactéries sont détruites, les bactéries sporogènes nécessitant la dose la plus importante de propolis (10 p. 100). L'extrait aqueux obtenu en faisant chauffer la propolis dans son poids d'eau au bain-marie, est également actif. Dans ce dernier cas le bacille du rouget du porc est détruit en 30 minutes, mais d'autres bacilles résistent deux semaines. D'après cet auteur, la propolis possède donc des propriétés bactéricides certaines, mais très variables suivant les bactéries étudiées. KILVALKINA a mesuré la valeur bactéricide et bactériostatique de la propolis sur des souches bactériennes très différentes des miennes et je ne peux pas comparer mes résultats avec les siens, sauf pour le bacille pyocyanique (souches non précisées). Cet auteur trouve que ce bacille est détruit au bout de 3 heures de contact avec la propolis fondue, tandis que je n'ai pas pu mettre en évidence l'action antibactérienne de l'extrait aqueux ou alcoolique de propolis sur 3 souches de *Pseudomonas pyocyanea* (souches 3-4- et 5, de l'Institut Pasteur). Il est à remarquer d'autre part que VERGÉ a retrouvé les résultats de l'auteur russe.

Les travaux de FEUEREISL et KRAUS sont difficiles à comparer avec ceux de VERGÉ et les miens ; en effet, ces auteurs se sont principalement attachés aux épreuves sur les bacilles tuberculeux : *Mycobacterium tbc.* souche H 37 Rv, Ravenel, B. C. G. et M. 57 a. Comme point commun, la substance est extractible et soluble dans l'eau. Cependant, je ne suis pas d'accord au sujet de la thermolabilité de l'antibiotique, celui-ci étant d'après moi thermostable.

Peut-être VERGÉ et HAMBLETON ont-ils raison lorsqu'ils supposent que des propolis d'origines différentes n'ont pas la même composition chimique et la même valeur antibiotique. Malgré la régularité de mes propres résultats, on ne peut exclure l'existence de plusieurs antibiotiques de propriétés différentes. Nous allons d'ailleurs voir ci-dessous que l'origine de la propolis est une question assez complexe.

4° Origine de la propolis et origine possible de son antibiotique.

Nous venons de voir que des échantillons de propolis de provenances diverses ne sont pas toujours d'une valeur antibiotique constante. Ces faits s'expliquent simplement par l'origine des propolis, qui peut être double d'après les auteurs : *une origine externe*, la récolte sur les bourgeons d'arbres et *une origine interne*, régurgitation des substances résineuses provenant des pollens. En dehors de ces deux origines, il ne faut pas oublier que la propolis est mélangée à de la cire dans des proportions variables atteignant jusqu'à 20 p. 100, ce qui n'est pas négligeable. Nous verrons d'ailleurs au chapitre II quels rapports peuvent exister entre ces deux matières du point de vue de leur action antibactérienne.

Les abeilles récoltent de la propolis, ou tout au moins une certaine résine, sur les bourgeons des arbres, et transportent cette matière en boulettes dans les corbeilles des pattes postérieures exactement comme pour le pollen. Cette récolte de la propolis a été étudiée par MEYER (1954) ; elle a lieu aux moments les plus chauds de la journée. Elle est connue depuis les temps les plus anciens.

KUSTENMACHER, soutenu par PHILIPP et WECK (cités par CAILLAS) admet une origine interne. D'après ces auteurs la propolis serait un résidu provenant de la première phase de la digestion du pollen et régurgité par l'abeille. Les travaux de PHILIPP (1923) ont prouvé que, dans des gouttelettes de cette substance recueillie dans la ruche, on retrouvait toujours des exines de grains de pollen et des poils qu'on ne retrouve jamais dans la propolis récoltée à l'extérieur. Cette propolis servirait à vernir les cellules avant la ponte de la reine. Cependant, MAC GREGOR (1952) a montré qu'une colonie d'abeilles installée dans une serre et pourvue de pollen était incapable d'effectuer des dépôts de propolis.

D'autre part, il est admis communément que la propolis provient des bourgeons de peuplier ; or il semble bien que les abeilles récoltent la propolis sur de nombreux bourgeons d'autres arbres qu'elles trouvent à certaines périodes de l'année. Cependant, il est non moins certain que le peuplier est la source la plus importante de propolis. D'autre part, les bourgeons de peuplier sont les seuls qui fournissent à l'extraction un résidu doué de l'odeur caractéristique de la propolis. JAUBERT (1927) a montré la parenté entre la propolis et les bourgeons de peuplier. Il a trouvé notamment un colorant la *chrysine* ou 1-3 dioxylavone dans ces deux sub-

stances. La chryisine se retrouve également dans la cire des rayons, et dans le miel (JAUBERT, 1939). En effet, c'est la chryisine qui confère à la cire et au miel sa coloration jaune. Cette matière se trouve principalement chez le peuplier dans les feuilles, les bourgeons et les parties vertes de l'arbre. La 1-3 dioxylavone diffuse très facilement dans les matières grasses et dans la ruche, elle passe facilement dans la cire. Cette matière représente 0,25 p. 100 du poids des bourgeons, son extraction est très facile. De même, de la propolis, on peut extraire la chryisine par les mêmes méthodes et obtenir les cristaux purs de formule

Une preuve de la relation étroite entre la propolis et les bourgeons de peuplier nous est fournie par les travaux de VUILLAUME (1958). Ce dernier auteur a montré que les extraits de propolis et les extraits de bourgeons de *Populus nigra* inhibaient la construction des cellules royales dans la colonie d'abeilles.

En résumé, l'on peut dire que de nombreuses substances identiques, odorantes, colorantes, etc... se retrouvent dans la propolis et dans les bourgeons de peuplier.

C. — Présence de substances antibiotiques sur les plantes où les abeilles récoltent la propolis.

J'ai pensé qu'il était utile de comparer l'activité antibiotique de la propolis des ruches à celle des substances produites par les arbres où les abeilles venaient recueillir des résines. J'ai étudié successivement, *Populus nigra*, *Abies pectinata*, *Aesculus hippocastanum*, *Quercus robur*, *Pinus sylvestris*, *Castanea vulgaris*. De plus, j'ai essayé chez certains, différentes parties de la plante : bourgeons, boutons floraux, feuilles, rameaux, bois des troncs. Je savais que la feuille du peuplier contient des antibiotiques ; d'autre part, les abeilles prélèvent le plus généralement leur propolis sur les peupliers. J'ai donc étudié d'abord les extraits de cet arbre.

1° Recherche d'antibiotique chez *Populus nigra*.

J'ai pratiqué des extractions soit par l'eau bouillante à reflux pendant 1 heure, soit par l'alcool éthylique bouillant de la même manière. Les liqueurs obtenues sont filtrées, évaporées et reprises par l'eau avant d'être ajoutées aux milieux de culture suivant notre technique habituelle basée sur la méthode de la dilution. Les extraits aqueux ou

alcooliques de bourgeons ont montré une activité antibiotique similaire et ces substances se révèlent très voisines de l'antibiotique de la propolis sur *Bacillus subtilis*. En effet, il est possible de décèler 123,9 Unités subtilis pour 1 gramme d'*extrait sec*, et 10 grammes de bourgeons recèlent 55,4 Unités subtilis. Au contraire, des substances extraites des *jeunes rameaux* de peuplier sont beaucoup moins actives vis-à-vis du même

FIG. 21. — Comparaison de la valeur antibiotique des extraits de propolis et de peuplier (épreuve *B. Subtilis*).

- a : propolis.
- b : bourgeons *Populus*.
- c : rameaux *Populus*.
- d : copeaux frais *Populus*.

bacille : j'y trouve presque 3 fois moins d'unités subtilis ; une extraction portant sur des copeaux de bois de tronc de peuplier fraîchement abattu ne permet pas d'obtenir une substance antibiotique. Ces résultats sont consignés sur la figure 21 et comparés à l'extrait de propolis. L'extrait en milieu aqueux de bourgeons de peuplier ressemble à celui de propolis et possède notamment un *pH* voisin, la même odeur, et se conserve plusieurs mois au réfrigérateur. L'antibiotique de *Populus nigra* est hydro-

soluble, alcoolosoluble et thermostable, comme celui de la propolis. Mais la ressemblance entre les deux corps tient principalement à leur action antibiotique sur d'autres souches bactériennes. Les résultats obtenus sont portés sur la figure 22. On y remarque pour les deux extraits (ramenés arbitrairement à la valeur $U = 10$ pour *Bacillus subtilis*) une grande similitude d'activité antibiotique sur 7 bactéries. Tout d'abord une activité égale ou supérieure à celle obtenue sur *Bacillus subtilis* pour *Proteus vulgaris* et *Bacillus alvei*. Une action plus faible pour *Salmonella gallinarum* et *Escherichia coli* B. Une action très minime ou même nulle envers *Escherichia coli* n° 5512 et les *Pseudomonas pyocyanea*. Il faut remarquer que l'extrait alcoolique de bourgeons de peuplier est dans son ensemble plus actif sur les diverses souches étudiées que l'extrait alcoolique de propolis. L'action des bourgeons de peuplier est particulièrement nette sur *Bacillus alvei* agent pathogène de la loque européenne. L'action

FIG. 22. — Comparaison de l'activité antibiotique des extraits de propolis et de bourgeons de *Populus nigra* (en abscisse les numéros des souches éprouvées).

— *Populus nigra*.
 --- Propolis.

de ces derniers est faible sur *E. coli* et *Pseudomonas pyocyanea*, souches sur lesquelles l'extrait de propolis n'a pas d'action. Je puis conclure que les substances extraites des bourgeons de peuplier sont certainement présentes à l'état brut ou légèrement modifiées dans la propolis recueillie par les abeilles. D'autre part, nous avons vu que les autres organes sont moins riches en antibiotique ou même n'en contiennent pas du tout. Ce dernier fait est à rapprocher des travaux de JAUBERT qui a montré que les organes verts du peuplier étaient plus riches en chrysine que les autres parties de la plante.

2° Recherche d'antibiotiques sur quelques arbres visités par *Apis mellifica*.

La recherche de substances analogues sur divers arbres m'a donné des résultats variables. Je n'ai jamais trouvé des corps aussi actifs que la propolis ou les bourgeons de peuplier. Les extractions ont été pratiquées de la même manière que sur les organes du peuplier et aussi par macé-

ration dans l'alcool à froid dans certains cas. L'extraction alcoolique à chaud donne un peu plus de substances actives que l'extraction aqueuse à chaud. Mais la macération alcoolique à froid diminue de moitié l'activité antibiotique des extraits. Quelques exemples de ces résultats sont portés sur la figure 23 et le tableau IX : il apparaît plusieurs faits principaux.

— Tous ces extraits sont moins actifs que les substances présentes dans les bourgeons de *Populus nigra*.

— Les bourgeons de *Pinus* (extrait alcoolique) sont très actifs sur *Bacillus subtilis* souche Caron et l'unité antibiotique ($U = 62,5$) est voisine de celle de la résine récoltée par les *Trigona* (*Meliponula bocandei*) à Bures-sur-Yvette ($U = 73,5$) (voir troisième partie).

TABLEAU IX

Comparaison entre l'extrait de propolis et les extraits de bourgeons.

Réf. du tableau I	Souches éprouvées	Propolis	Bourgeons de <i>Populus nigra</i>	Bourgeons d'Abies	Bourgeons de <i>Aesculus hipp.</i>	Bourgeons de <i>Quercus robur</i>
28	B. Subtilis souche Caron	+	+	+	+	+
26	<i>Pseudomonas pyocyanea</i> 4	—	—+	—	—	+
23	Proteus X 19	+	—+	—	—	—
20	Coli bordet	—	—	—	—	—
16	E. Coli o 26 = B6. Ec 5434	—	—	—	—	+—
13	E. Coli o 55 = B5. Ec 5401	—	—	—	—	Non essayé
10	E. Coli o 111 = B4. Ec 5512	—	—+	—	—	—
9	S. type Dublin N° 7-54	+—	+	+	+	+
4	S. Gallinarum N° 38	+—	+—	—	+	+
3	S. Pullorum N° 309	+—	+	+	+	+

— Les bourgeons de chêne sont moins actifs sur *Bacillus subtilis* ($U = 15,4$) que les copeaux de bois de chêne fraîchement coupés ($U = 41,3$). Je pense qu'il s'agit là d'un phénomène dû à la présence des tanins dans le bois ; d'ailleurs le pH de l'extrait est très acide et il est difficile, à forte concentration, de faire durcir par refroidissement le milieu gélosé. Il n'y aurait donc pas dans ce cas d'action antibiotique, mais plus exactement un effet antiseptique dû au tanin.

Les bourgeons de marronnier d'Inde ont une activité moins grande que ceux de peuplier, mais cette activité est parallèle sur 10 souches testées.

Les bourgeons de sapin ont également une activité parallèle à ceux

de peuplier sur 9 des 10 souches éprouvées, mais leur extrait n'est pas antibiotique vis-à-vis de *Salmonella gallinarum* n° 38.

L'extrait de bourgeons de chêne, contrairement à toutes les autres substances végétales que j'ai essayées est très actif sur *Pseudomonas pyocyanea* 4.

Toutes ces substances d'origine végétale ainsi que la propolis sont sans action ou n'ont qu'une faible action sur les Entérobactériacées du genre *Escherichia*.

FIG. 23. — Valeur antibiotique de quelques substances végétales (épreuve *B. subtilis*).

- a : bourgeons *Abies pectinata*.
 - b : bourgeons *Aesculus hippocastanum*.
 - c : bourgeons *Quercus robur*.
 - d : copeaux frais de *Quercus robur*.
 - e : rameaux de *Pinus*.
 - f : macération alcool à froid.
 - g : extraction alcool à chaud.
- } boutons floraux de *Castanea vulgaris*.

En résumé, je puis dire qu'il existe un rapport certain entre les résines des bourgeons d'arbres d'une part et la propolis d'autre part. Cependant, il apparaît très nettement que les bourgeons de peuplier contiennent les substances antibiotiques les plus voisines de celles de la propolis.

D'après mes essais, les bourgeons, puis les boutons floraux et enfin les rameaux seraient les organes les plus intéressants pour la production de substances antibiotiques chez ces plantes, mais ce n'est pas une règle générale.

Toutefois, comment expliquer que la propolis possède toujours la même odeur, que les bourgeons de peuplier sont les seuls à partager?

CHAPITRE II

L'ANTIBIOTIQUE DE LA CIRE D'APIS MELLIFICA

A. — Généralités.

La production de la cire, sécrétée par les glandes cirières de l'ouvrière, dépend de quatre facteurs :

Tout d'abord la *température* doit être de 33° à 36°C ; la cire est alors émise à l'état liquide entre les plaques cirières abdominales.

Le deuxième facteur nécessaire est *l'alimentation en sucres*. Certains auteurs ont calculé que les abeilles consomment de 6 à 20 kilogrammes de miel pour excréter 1 kilogramme de cire.

L'excrétion de la cire est liée également à *l'effet de groupe*. Il est nécessaire pour qu'il y ait production de cire que les abeilles atteignent un certain nombre, de manière à réaliser la régulation thermique nécessaire.

Enfin, *l'âge* joue un grand rôle. Depuis les travaux de RÖSCH, on sait que les abeilles cirières sont âgées de 12 jours à 18 jours. Ce n'est donc qu'un petit nombre d'abeilles qui est capable d'une telle excrétion et non pas l'ensemble de la colonie. Cependant, les travaux plus récents (LINDAUER, RIBBANDS) ont démontré qu'il existait une plus grande souplesse dans la division du travail chez l'abeille et que dans certains cas, et suivant les besoins, l'ouvrière peut sécréter de la cire à des périodes différentes de sa vie. En un mot, si les travaux de RÖSCH sont toujours valables, les règles de la division du travail dans la ruche sont moins rigides qu'il ne l'avait supposé.

La production de la cire n'est pas une nécessité biologique. Certains chercheurs, principalement PERRET-MAISONNEUVE, ont prouvé que l'absence de sécrétion cirière ne gêne pas la colonie. D'ailleurs, dans les vieilles ruches où les colonies sont établies depuis longtemps, la production de cire chaque année est infime et les abeilles ne s'en portent pas plus mal. D'autre part, c'est un fait bien établi que ces insectes récoltent ou utilisent la cire qu'on leur offre à l'extérieur, les vieilles cires à l'intérieur de la ruche, la cire gaufrée (même fabriquée avec des matériaux très différents de la cire), *plutôt que d'en sécréter eux-mêmes*.

La cire telle qu'elle sort des glandes cirières est liquide ; or nous savons que la cire d'abeilles fond à 63° centigrade. Il faut donc admettre que lors de l'excrétion, à 33°-36° nous n'avons pas affaire réellement à la même matière ou qu'elle est dispersée dans une autre phase. De plus, la cire est

additionnée de propolis dans certaines proportions ainsi que *de grains de pollens*. Il est possible, comme nous l'avons vu, d'y retrouver une matière colorante, la chrysine qui d'après JAUBERT (1940), viendrait des bourgeons de peuplier. Si la cire de même que la gelée royale, est une substance sécrétée par l'abeille, à l'inverse, le nectar, le pollen et la propolis sont récoltés sur les plantes et les substances antibiotiques qu'ils renferment peuvent venir soit des végétaux, soit des sécrétions de l'abeille, soit des deux origines. La cire, sécrétion glandulaire malaxée avec de la salive de l'abeille, devrait, si ce n'était l'adjonction d'une quantité de propolis non négligeable, se comporter différemment des autres produits de la ruche en ce qui concerne sa valeur antibiotique. D'après CAILLAS (1944) la cire des rayons naturels des abeilles serait composée :

- de cire pure 90 à 95 p. 100 ;
- de propolis ;
- de grains de pollen très abondants.

On voit d'après cet auteur que des substances complémentaires entrent dans une proportion de 5 à 10 p. 100 dans la construction des rayons de cire et se composent principalement de propolis. Ce pourcentage peut évidemment modifier la valeur antibiotique de la cire pure.

La cire pure d'*Apis mellifica* est un mélange contenant des acides gras supérieurs, des alcools à longues chaînes, des esters d'acides gras supérieurs et d'alcools à longues chaînes et des hydrocarbures saturés et non saturés. L'insaponifiable (alcools + hydrocarbures) représente environ 50 à 60 p. 100 de la cire. Les esters de la cire sont presque uniquement du palmitate de myricyle, $C_{15}H_{31}COOC_{30}H_{61}$. Nous retrouvons donc ici des acides gras, *mais contrairement aux acides gras de la cuticule des insectes, les chaînes carbonées sont beaucoup plus longues*. D'ailleurs la cire est insoluble dans l'eau, mais se dissout facilement dans les solvants des corps gras, éther, benzène, sulfure de carbone, chloroforme, acétone.

Il est difficile de trouver des renseignements originaux en ce qui concerne les usages médicaux. La cire a servi principalement comme support pour des onguents, emplâtres, pommades etc. Cependant CLÉMENT et ICHES (1912) signalent que la cire était employée autrefois par les médecins pour guérir la dysenterie. Il existe peut-être un rapport entre cette utilisation de la cire et l'action de ses extraits sur quelques Entérobactériacées (voir plus loin).

WHITE (1906) a étudié la flore bactérienne des rayons de cire en plaçant de petits morceaux de rayons directement dans un milieu de culture synthétique solide ou liquide. Les rayons étaient presque stériles et il n'a isolé que très peu d'espèces : *Bacterium cyaneus*, *Saccharomyces roseus* et un *micrococcus* qu'il a dénommé « C ». Cependant, j'ai déjà signalé que WHITE n'a pas distingué l'action de la cire et celle de la propolis. Pourtant la surface d'un rayon de cire est toujours recouverte de

propolis et les substances présentes dans la cire ne doivent guère diffuser à travers cette résine.

LEMAÏ (1947) émet l'opinion que la présence d'un antibiotique renforcerait l'immunité naturelle de *Galleria mellonella* envers le bacille de Koch. Or cet antibiotique ne pourrait-il être présent dans la cire ou tout au moins provenir de la dégradation de celle-ci dans le tube digestif de la larve? Je pense qu'il y a ici encore matière à des recherches malgré les innombrables travaux sur ce sujet depuis METALNIKOV (1909). PERTZOFF (1928) trouve que c'est la fraction soluble dans l'acétone des extraits de larves de *Galleria mellonella* qui est active contre *Mycobacterium*. OLIVIER (1947) a mis en évidence *un facteur antibactérien contre le bacille tuberculeux, extractible de Galleria au moyen de l'acétone* et qui produit la lyse du corps bactérien. REHM (1948) trouve dans le tube digestif de quelques larves de lépidoptères et notamment chez *Galleria mellonella* la présence de substance antibactérienne qu'il dénomme « insecticin ». Enfin FLORKIN, LOZET et SARLET (1949) *isolent une bactérie dans l'intestin de la larve de Galleria mellonella capable d'utiliser la fraction acide gras et ester de la cire*. Ces derniers travaux pourraient faire supposer que lors de la dégradation de la cire dans le tube digestif des larves, il se produit une libération de l'antibiotique qui s'y trouve mélangé.

B. — Travaux personnels.

1^o Matériel et méthodes.

L'épreuve de la valeur antibiotique de la cire a été effectuée comme pour les autres substances de la ruche. J'ai pratiqué des extractions à partir de *la cire naturelle construite par les abeilles* et j'ai ensuite éprouvé ces extraits sur la série de souches bactériennes habituelles. Les prélèvements de rayons étaient pratiqués peu de temps avant l'extraction. *J'éliminais totalement la présence de couvain, de miel et de pollen de mes échantillons*. De même, les rayons étaient *découpés en dehors des zones* fortement propolisées.

J'ai prélevé aussi des rayons venant d'être construits en cire très blanche (cire vierge) pour les comparer avec des vieux rayons très foncés habités depuis très longtemps.

L'extraction par l'eau froide, l'alcool éthylique à froid ou à chaud ne donne aucun résultat.

L'extraction par l'eau bouillante, 1 heure dans un soxhlet a été pratiquée. L'extract était ensuite refroidi, filtré et ajouté au milieu de culture.

La meilleure extraction était obtenue par l'acétone bouillant pendant 1 heure au soxhlet. La liqueur obtenue était ensuite refroidie, filtrée, évaporée au bain-marie et reprise par l'eau avant son addition au milieu

de culture. Le pH de l'extrait est très acide et on doit l'ajuster avant son utilisation. Toutes les substances extraites ont été éprouvées sur les souches bactériennes par la méthode de la dilution.

2° Résultats.

Contrairement aux antibiotiques de l'abeille et de la propolis, la substance antibiotique ne s'extrait pas par l'alcool et mal par l'eau

FIG. 24. — Comparaison de la valeur antibiotique des extraits de rayons de cire bâtis et de l'extrait de propolis (épreuve *B. subtilis*).

a : extrait acétonique de cire.
b : extrait aqueux de cire.
c : extrait aqueux de propolis.

bouillante. *L'extrait le plus actif est celui obtenu par l'acétone à chaud.* L'antibiotique de l'abeille est difficilement extrait par l'acétone et par contre passe très bien dans l'alcool à chaud ou à froid. Nous avons vu également que l'antibiotique de la propolis s'extrait très bien par l'eau bouillante et l'alcool au contraire de la cire. Cependant, il faut remarquer

que la substance antibiotique de la cire est thermostable et résiste à 120° pendant 30 minutes, comme les autres antibiotiques de la ruche.

Voyons tout d'abord l'action des extraits de cire sur *Bacillus subtilis* souche Caron. La figure 24 montre la différence entre les extraits acétoniques et les extraits aqueux de rayons de cire foncés comparés à la propolis. Je constate que l'extrait acétonique de cire a une valeur antibiotique très voisine de l'extrait aqueux de propolis. Mais l'extrait aqueux (à chaud) de cire est nettement moins actif, voisin du tiers de l'activité de la liqueur obtenue par l'acétone.

J'avais pensé que la cire fraîchement élaborée par les abeilles, ne contenant pas d'exuvies de larves et de corps divers accumulés au cours du temps ne posséderait pas les mêmes propriétés. C'est pourquoi j'ai comparé les extraits de cire blanche neuve et les extraits de cire très foncée, vieille et ayant servi de nombreuses années. Ces substances ont été testées sur *Bacillus subtilis* et sur *Proteus vulgaris*. Les résultats sont assez surprenants :

Extrait de cire claire :

— Action sur <i>Bacillus subtilis</i>	U = 35,71
— Action sur <i>Proteus vulgaris</i>	U = 124,85

Extrait de cire foncée :

— Action sur <i>Bacillus subtilis</i>	U = 75,42
— Action sur <i>Proteus vulgaris</i>	U = 93,85

Il est assez singulier de trouver que l'activité sur *Proteus vulgaris* est très grande dans le cas d'un extrait de cire claire, et qu'il y ait perte d'activité lors du vieillissement. Chez *Bacillus subtilis* au contraire l'activité double lors du vieillissement des cires et de l'incorporation à celles-ci de matières diverses. Je ferai remarquer que ces résultats ne sont pas toujours réguliers et l'on peut trouver dans quelques expériences une valeur nulle de l'extrait de cire claire aussi bien pour l'une que pour l'autre de ces bactéries. La cire foncée et vieillie par contre, a toujours une activité sur les souches éprouvées.

J'ai essayé l'antibiotique de la cire extrait par l'acétone sur 11 autres bactéries. La valeur en unités antibiotiques, comme pour les précédentes comparaisons est calculée proportionnellement à la valeur des unités *subtilis* fixées arbitrairement à U = 10. Si l'on considère la figure 20 on remarque que l'antibiotique de la cire est particulièrement actif sur *Bacillus alvei*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella gallinarum* n° 38 et *Bacillus subtilis*. Son activité tombe de moitié vis-à-vis de *Salmonella pullorum* n° 309, *Salmonella* type Dublin n° 7-54, *Escherichia coli* Bordet, *Escherichia coli* B et *Bacillus larvae*.

Cet antibiotique n'a pas d'action sur *Escherichia coli* (souches 5512-5401-5434) et *Pseudomonas pyocyanea* 4.

3° Comparaison de l'antibiotique de la cire avec celui de la propolis.

J'ai porté sur le tableau X les résultats obtenus avec les extraits aqueux de cire et de propolis et les résultats des extraits acétoniques de cire.

Tout d'abord, les deux extraits de cire éprouvés sur diverses souches sont comparables entre eux au point de vue antibiotique. Cependant, il ne faut pas oublier que l'activité de l'extrait aqueux est moindre sur toutes les bactéries, ce qui n'apparaît pas sur le tableau. Seule, la souche de *Salmonella pullorum* n° 309 montre une réaction inverse : elle est plus sensible à l'extrait aqueux qu'à l'extrait acétonique. La comparaison entre l'extrait de cire et l'extrait de propolis fait apparaître de nombreux points communs.

— Activité importante sur *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus alvei*. Pour la cire vierge, l'activité est encore plus intense sur *Proteus vulgaris*.

— Activité moyenne sur *Salmonella* type Dublin n° 7-54, *Salmonella pullorum* n° 309 et *Bacillus larvae*.

TABLEAU X

Comparaison des extraits de cire et de propolis.

Réf. du tableau I	Souches éprouvées	Propolis extrait par H ₂ O	Cire extrait par acétone	Cire extrait par H ₂ O
28	B. Subtilis souche Caron	+	+	+
26	Pseudomonas pyocyanea 4	—	—	—
23	Proteus vulgaris	+	+	+
20	Coli Bordet	—	+ —	+ —
16	E. Coli o 26 = B6. Ec 5434	—	—	—
13	E. Coli o 55 = B5. Ec 5401	—	—	—
10	E. Coli o 111 = B4. Ec 5512	—	—	—
9	S. type Dublin n° 7-54	+ —	+ —	+ —
4	S. Gallinarum n° 38	+ —	+	+
3	S. Pullorum n° 309	+ —	+ —	+
29	B. Alvei	+	+	non essayée
30	B. larvae	+ —	+ —	non essayée

— Activité nulle sur *Pseudomonas pyocyanea* 4 et *Escherichia coli* (souches 5401-5434-5512).

Les différences apparaissent pour les bactéries suivantes :

— *Escherichia coli* Bordet n'est pas inhibé par les extraits de propolis, mais inhibé par les deux extraits de cire.

— *Salmonella gallinarum* n° 38 est inhibée par les trois extraits, mais les deux extraits de cire sont nettement plus actifs que l'extrait de propolis.

Je peux considérer que les substances antibiotiques de la cire et celles de la propolis ont des réactions très voisines sur les souches essayées (figure 20). Cependant, il ne faut pas oublier que si l'antibiotique de la propolis est extractible par l'alcool, celui de la cire ne l'est pas. Une différence existe également lors de l'addition des extraits dans le milieu de culture, celui de propolis s'y mélange très facilement, tandis que l'extrait de cire a tendance à liquéfier le milieu gélosé ; même après neutralisation, un mélange homogène est difficile à obtenir. Je souligne d'autre part que si les extraits de propolis sont voisins de la neutralité, les extraits de cire sont toujours très acides.

Je reviendrai dans le chapitre VII sur le parallélisme rigoureux de l'action antibiotique de ces deux extraits sur les souches pathogènes de la colonie d'abeilles.

CONCLUSION DES CHAPITRES I et II

Nous venons d'étudier deux substances qui servent à la charpente et au revêtement de la colonie. L'une d'elles est d'origine purement interne : la cire et l'autre d'origine externe (principalement), la propolis. J'ai montré qu'il y avait de nombreuses analogies entre les extraits antibiotiques provenant de ces deux substances, mais malgré tout, il n'existe pas d'identité complète entre elles. Quel rapport trouvons-nous maintenant entre ces deux corps et l'antibiotique extrait de l'insecte lui-même ? La figure 20 le rend apparent. Toutes les unités actives sont calculées proportionnellement à l'Unité *subtilis*, (celle-ci fixée arbitrairement à $U = 10$). L'examen de ces courbes nous montre que celles-ci présentent dans l'ensemble les mêmes maxima et les mêmes minima d'activité. Les faits saillants qui sont communs par rapport à l'action sur *Bacillus subtilis* sont les suivants :

— Grande sensibilité des souches de *Proteus vulgaris* et de *Bacillus alvei*.

— Sensibilité faible ou nulle des souches de *Escherichia coli* (5 souches) et de *Pseudomonas pyocyanea* 4.

D'autre part, l'action de la substance extraite de l'abeille ressemble plus à l'action de l'antibiotique de la cire qu'à celle de l'antibiotique de la propolis.

Ces trois antibiotiques ont un autre point commun, ils sont thermos-

tables. Leur solubilité dans les solvants est au contraire très différente et dans ce cas, on remarque que l'extrait d'abeille et l'extrait de propolis sont les plus proches.

J'ai déjà montré dans la première partie de ce travail que l'extrait d'abeille n'était pas antifongique. *La cire n'est pas antifongique non plus*. En effet TAUSSON (1928) a montré qu'*Aspergillus flavus* est capable d'utiliser la cire d'abeille comme source de carbone. Dans les ruches, c'est une remarque fréquente et banale de voir que les rayons de cire moisissent dès que les abeilles ne s'y trouvent plus. Enfin j'ai montré par des expériences simples qu'un extrait de cire (même très concentré) ajouté à un milieu n'empêchait pas le développement des moisissures les plus communes. Je développerai dans la conclusion de la deuxième partie, la notion de la valeur antifongique des produits de la ruche, mais il est opportun de signaler ici que *l'extrait antibiotique de propolis est également un antifongique* très intéressant à l'inverse des extraits de cire.

En ce qui concerne l'action sur les bactéries pathogènes de la colonie d'abeilles, j'y reviendrai spécialement au chapitre VII après l'étude des autres substances extraites des produits de la ruche.