Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 8 (1955)
Heft: 3

Artikel: La symbiose bactérienne intracellulaire chez la blatte, B. Germanica
Autor: Haller, Gérard de
Kapitel: 3: Isolement du symbiote
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739854

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 14.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

CHAPITRE 3

Isolement du symbiote.

On ne saurait étudier une symbiose sans en avoir séparé les deux partenaires. C'est en effet la seule façon d'observer sûrement leur rôle réciproque.

En ce qui concerne le symbiote, la première pensée qui vient à l'esprit du chercheur est d'en faire une culture semblable à celles que l'on fait de presque toutes les bactéries. Nous avons vu que cette expérience a été tentée déjà très souvent (voir pp. 241-242). Devant les nombreux échecs et les succès douteux que les auteurs signalent, je n'ai retenu pour mes propres essais de cultures pures de bactéries symbiotiques que la méthode de KELLER (1950), qui faisait des extraits de corps adipeux et des milieux à l'acide urique. En effet, je préférais ne pas m'attarder aux cultures et tenter l'isolement des symbiotes par d'autres expériences.

La première partie de ce troisième chapitre est consacrée à ces essais de c u l t u r e s sur milieux gélosés, à l'acide urique ou à l'extrait d'organes symbiotiques; la deuxième à des g r e f f e s d'organes symbiotiques (corps adipeux ou ovaires) sur d'autres insectes. Les résultats de ces deux séries d'expériences nous incitèrent à faire des e x p l a n t a t i o n s de fragments de ces organes sur milieux artificiels, essais qui font l'objet de la troisième partie.

A. ESSAIS DE CULTURE DES BACTÉRIES SYMBIOTIQUES.

Les chercheurs qui ont essayé de cultiver les bactéries symbiotiques des Blattes ont pris comme source de leurs cultures les bactéries du corps adipeux d'insectes adultes ou celles d'embryons prélevés dans des oothèques. Ils les inoculaient dans les milieux nutritifs sous forme de suspensions ou appliquaient sur

les milieux gélosés la surface de section d'un fragment de corps adipeux. Les méthodes par lesquelles ces cultures ont été tentées utilisent tous les milieux classiques de la bactériologie. Ces milieux ont été employés si souvent sans succès que je n'ai pas jugé bon de les reprendre. Seule l'expérience de KELLER, un élève de KOCH à Munich (1950), a retenu mon attention et j'ai tenté de la refaire. Il s'agit, comme je l'ai déjà dit, de milieux gélosés à l'extrait de corps adipeux de Blatte ou à l'acide urique.

J'ai pris comme source d'inoculation, d'abord des lobes de corps adipeux, plus tard des pointes d'ovaire et des embryons.

Méthode.

Une blatte d'aspect normal, prise dans un élevage ordinaire et sain, est tuée à l'éther. Puis on sectionne les pattes et les ailes à ras du corps, souvent aussi la tête, et on désinfecte le corps de l'animal en le plongeant pendant une à deux minutes dans de l'alcool à 70° contenant quelques gouttes de sublimé. L'animal est ensuite rincé quelques minutes dans une solution rose vif de permanganate de potassium, avant d'être fixé avec des épingles dans une petite cuve à dissection contenant de l'eau physiologique (NaCl 0,8%), le tout stérile. Il est pratiquement impossible de désinfecter complètement les replis de peau séparant les segments de l'insecte. Toutefois, en étirant avec des pincettes le corps de l'animal dans le liquide désinfectant, on accroît quelque peu les chances d'asepsie, en découvrant ces replis. D'autre part, un traitement plus long risquerait de toucher aussi les organes internes et nuirait à l'expérience. On place l'animal le ventre en haut si l'on veut extraire le corps adipeux, le dos en haut si ce sont les gonades que l'on veut prendre.

La suite de l'opération se fait sous la loupe binoculaire. On ouvre l'abdomen en sectionnant le tégument de chaque côté juste au-dessus des stigmates et en enlevant d'une pièce tous les sternites ou tous les tergites, selon la position de l'insecte. Le tube digestif apparaît, entouré des nombreux lobes du corps adipeux dans lequel sont enfouis les ovaires. En ayant soin de ne blesser ni le tube digestif ni les tubes de Malpighi, ni les

grosses trachées, on prélève alors les lobes du corps adipeux ou les ovaires.

KELLER dit avoir obtenu des colonies de bactéries symbiotiques de Blattes, sur un milieu à la gélose additionné de corps adipeux broyés et filtrés, après rectification du pH à 7,5 environ. Après 7 jours des colonies se forment, qui ne se laissent repiquer que sur le même milieu. Or une substance qu'on trouve en grande quantité dans le corps adipeux est l'acide urique. KELLER fit alors un milieu artificiel à l'acide urique: dans

1000 cm^3 d'eau en ébullition, il verse
2 g d'acide urique, et
3 g de NaCl,

ce qui donne un liquide trouble, blanc. Le trouble disparaît peu à peu par dissolution de l'acide urique lorsqu'on ajoute de la soude décinormale goutte à goutte. Quand la solution est claire, le pH se trouve aux environs de 7,6. On ajoute alors 2% d'agar.

Selon KELLER, aucune contamination extérieure ne prendrait corps sur ce milieu, même à partir d'empreintes de doigts. En revanche, des inoculations à partir de fragments de corps adipeux réussissent bien, et produisent de fines colonies membraneuses, transparentes, humides, à bords nets.

Première série.

Je préparai donc un milieu selon cette méthode. 4 jours après la préparation du milieu, je vis quelques contaminations se produire. Il est donc faux de dire que les infections étrangères ne prennent pas sur ce milieu.

Je fis une première série de 10 inoculations. Après prélèvement aseptique d'un lobe du corps adipeux d'une larve d'environ 8 semaines, j'en appliquai un fragment à plusieurs reprises sur la surface du milieu, dans une boîte de Pétri. Le même fragment servit ensuite à faire un frottis de contrôle, permettant de s'assurer que l'inoculation avait été effective.

Résultat.

Sept jours après cette inoculation, rien n'était visible sur l'agar, si ce n'est un petit halo transparent autour d'un des

points d'inoculation. Il devait s'agir de la trace laissée par une goutte de liquide physiologique, entraînée par la pincette ou le fragment d'organe lors de l'inoculation. Car même après 15 jours, il ne s'était rien produit de nouveau; un frottis prélevé sur cette tache ne montre que quelques bactéries, mal colorables et d'aspect granuleux, mais du type des symbiotes: environ 5 $\mu \times 1$ μ, plus ou moins courbes, à bouts arrondis. Elles proviennent sans aucun doute de l'inoculation et ne se sont pas multipliées.

Deuxième série.

Les résultats de KELLER furent meilleurs lorsqu'il ajoutait au milieu à l'acide urique des glucides, moins bons s'il y mettait du bouillon. Pour ma deuxième série d'essais (30 inoculations), j'employai un milieu gélosé à l'acide urique, additionné de 1% de dextrose ou de 1% de peptone, ou de 0,5% de chacun des deux, dans des boîtes de Pétri.

Résultat.

De nouveau le résultat fut totalement négatif. Après 3 semaines, à part quelques infections accidentelles (surtout des moisissures), je n'avais obtenu le développement d'aucune colonie bactérienne.

Troisième série.

Les symbiotes des bactériocytes du corps adipeux sont inertes, ils sont destinés à rester dans leurs bactériocytes jusqu'à la mort de l'insecte. Au contraire, ceux des ovaires, qu'ils se trouvent dans des bactériocytes ou à la surface des œufs, étant sur le point de changer de milieu, doivent être plus aptes à accepter des conditions nouvelles.

Ma troisième série a consisté en 63 inoculations de bactéries provenant de la pointe d'un certain nombre d'ovaires. Dans les boîtes de Pétri, je procédais par « touches », comme pour les fragments de corps adipeux, en terminant par une traînée de 4 à 5 cm. Dans les éprouvettes (agar incliné), j'inoculais au moyen du fil de platine une suspension provenant d'un broyage d'ovaire. Les milieux furent les mêmes que précédem-

ment: acide urique gélosé avec ou sans adjonction de dextrose, de peptone ou des deux.

Résultat.

Aucune des 63 inoculations n'a donné naissance à une prolifération des symbiotes. 48 n'ont été suivies d'aucun phénomène, tandis que, dans les 15 autres, des colonies se formèrent qui, toutefois, repiquées sur des milieux ordinaires, se révélèrent être des contaminations étrangères. Cette forte proportion d'infections (24%) s'explique par la manière dont les insectes furent désinfectés lors de leur dissection. J'ai toujours employé des désinfectants violents, mais ne pouvais les laisser agir plus de quelques minutes. Comment alors tuer les germes qui pouvaient se trouver dans les grosses trachées sans risquer de porter atteinte aux symbiotes eux-mêmes ? De ce fait, l'asepsie ne saurait avoir été parfaite.

Quatrième série.

Les symbiotes des embryons sont-ils plus susceptibles de s'adapter à un milieu artificiel ? J'ai fait quelques essais de culture à partir de broyats d'embryons. Une oothèque était désinfectée à l'alcool à 70° additionné de sublimé, pendant 20 minutes, puis rincée dans une solution rouge sombre de $KMnO_4$, avant d'être fixée sur un bloc de paraffine. Je l'ouvrais alors au moyen de deux pincettes et en broyais le contenu avec un fil de platine. Ce même fil de platine servait ensuite à porter une goutte du broyage sur le milieu de culture. J'inoculai ainsi 12 tubes à essais, dont 3 contenant de l'eau peptonée sucrée (peptone 1%, glucose 1%), 3 de l'agar peptoné sucré, 3 de l'agar peptoné sucré additionné d'acide urique (0,2%), et 3 du milieu gélosé à l'acide urique seul. Afin de vérifier la stérilité extérieure de l'oothèque, je la mettais ensuite dans un tube d'eau peptonée sucrée, ce qui constituait en même temps une inoculation de plus.

Résultat.

Aucun de ces essais n'aboutit. Tous les milieux restèrent rigoureusement stériles, y compris celui où se trouvait l'oothèque. Des prélèvements faits sur les milieux solides ne montrent que quelques rares symbiotes, petits et décomposés.

Ces milieux artificiels ne conviennent donc manifestement pas à la culture des symbiotes.

Cinquième série.

Dès lors, il fallait s'approcher davantage du milieu naturel. KELLER avait réussi ses premiers essais sur des extraits de corps adipeux.

Je fis des milieux naturels gélosés de la manière suivante: La dissection d'environ 50 blattes (surtout des femelles, de nombreux mâles et quelques larves) me procura une certaine masse de corps adipeux et des ovaires à divers stades de maturité et de développement des ovocytes. Ces organes symbiotiques étaient broyés au mortier ou entre des lames de verre, puis le produit du broyage dilué dans quelques centimètres cubes de liquide physiologique. Je mélangeais 2 cm^3 de ce liquide avec 8 cm^3 d'agar à 2%. Il en résultait une petite quantité d'un milieu trouble, contenant des fragments d'organes visibles à l'œil nu. Le milieu était stérilisé par tyndallisation.

Je pus remplir ainsi 6 tubes à essais et 4 verres de montres tenus dans des boîtes de Pétri. Des 6 tubes, 2 contenaient un broyat de corps adipeux seul, 2 un mélange de corps adipeux et d'ovaires, 2 ce même mélange additionné de 0,2% d'acide urique. Les verres de montres contenaient le mélange corps adipeux-ovaires.

Les inoculations furent faites à partir de pointes d'ovaires dans les tubes, à partir d'embryons dans les verres de montres.

Résultat.

Ces essais furent encore vains. Je n'obtins que des colonies de bacilles très petits ou de cocco-bacilles manifestement étrangers au symbiote, et cela seulement après 15 jours.

Conclusion des essais de culture.

Je n'affirmerai pas que la culture des bactéries symbiotiques de la Blatte est impossible. Certains auteurs disent y être parvenus. Toutefois, s'il existait un milieu et une technique qui permettent cette culture, et si alors les symbiotes se multi-

pliaient réellement et formaient des colonies, on serait en droit de s'attendre à voir ces phénomènes se produire chaque fois que cette technique et ce milieu sont utilisés. Les nombreux échecs subis par quantité de chercheurs prouvent que le procédé adéquat n'a pas encore été trouvé. Il faut chercher encore, composer des milieux avec des protéines ou des acides aminés choisis, des vitamines; tenter des cultures en atmosphère de CO_2; s'occuper du facteur redox, etc. C'est un travail de longue haleine, car les conditions de vie du symbiote sont extrêmement strictes.

TABLEAU 1.

Essais de culture.

Milieux	Inoculum															
	C. adip.				Ovaire				Embr.				Ooth. (contrôles)			
	Inoc.	+	—	Inf.	Inoc.	+	—	Inf.	Inoc.	+	—	Inf.	Inoc.	+	—	Inf.
Agar, ac. urique	10	0	10	0	14	0	12	2	3	0	3	0				
Agar, ac. urique, glucose	10	0	10	0	17	0	14	3								
Agar, ac. urique, peptone	10	0	10	0	16	0	11	5								
Agar, ac. urique, glucose, peptone	10	0	10	0	16	0	11	5	3	0	3	0				
Agar, broyats					6	0	0	6	4	0	2	2				
Agar, peptone, glucose									3	0	3	0				
Eau, peptone, glucose									3	0	3	0	2	0	2	0
Total	40	0	40	0	69	0	48	21 [1]	16	0	14	2	2	0	2	0

[1] En prélevant un ovaire, on déchire inévitablement de grosses trachées porteuses de germes, ce qui n'est pas le cas pour les lobules du corps adipeux. C'est ainsi que j'interprète la forte proportion d'infections apparues dans les inoculums d'ovaires.

TABLEAU 2.

Soit au total:	Inoculations	127
	Positifs	0
	Négatifs	104
	Infections	23

B. GREFFES D'ORGANES SYMBIOTIQUES DE BLATTES SUR D'AUTRES INSECTES.

Les symbiotes des Blattes ne parvenant pas à se développer sur un milieu artificiel, la question se pose de savoir s'ils peuvent s'accommoder d'un milieu naturel, comme le milieu intérieur d'un autre insecte. J'ai donc tenté d'inoculer les bactéries de *B. germanica* à des insectes de diverses familles d'Orthoptères.

Méthode.

J'ai utilisé au début deux techniques différentes. L'une consistait à faire une suspension de symbiotes en broyant un organe symbiotique, corps adipeux ou ovaire, dans une goutte de liquide physiologique, et à injecter cette suspension dans la cavité générale de l'insecte choisi [1]. L'autre technique laissait l'organe symbiotique intact, et ce « greffon » était introduit entier dans la cavité abdominale de l'insecte récepteur, du « porte-greffe ».

La première de ces deux méthodes n'a jamais donné aucun résultat positif. Très souvent l'insecte récepteur succombait quelques jours après l'injection à une infection généralisée, malgré de soigneuses précautions d'asepsie. De plus, il était impossible de retrouver les symbiotes inoculés. J'ai donc abandonné cette technique pour ne pratiquer que la seconde. Voici alors comment je procédais:

Une blatte était désinfectée et disséquée de la même manière que pour les inoculations des cultures (voir p. 262). Les organes prélevés, lobes du corps adipeux ou ovaires, étaient

[1] Méthode employée par GUBLER (1947), sauf erreur sur *Bacillus rossii*.

placés dans une petite boîte de verre remplie de liquide physiologique stérile. Souvent j'ajoutais à l'eau physiologique quelques gouttes de rouge neutre afin de colorer le greffon. Il était alors plus facile de le retrouver au moment de la dissection du porte-greffe. Un fragment d'organe ainsi prélevé servait à faire un frottis qui indiquait immédiatement si l'organe était normal du point de vue de la symbiose. J'en fixais un autre fragment comme témoin du greffon.

Puis je préparais le porte-greffe. L'insecte était endormi à l'éther. Lorsqu'il était complètement immobile, je le fixais en position normale sur un liège, au moyen d'élastiques immobilisant ses pattes et son thorax, et j'écartais ses élytres et ses ailes au moyen d'épingles que je plantais dans le liège. Il fallait alors désinfecter la région où la greffe devait être pratiquée avec un tampon d'ouate imbibé d'alcool à 70°. Je faisais pénétrer le tampon dans les replis du tégument, mais il fallait prendre garde que l'alcool ne coule pas jusqu'aux stigmates. Puis je rinçais au permanganate de potassium.

Je pratiquais alors une incision dans le tégument abdominal dorsal du futur porte-greffe. J'ai fait des incisions transversales, pensant que les contractions de l'insecte risqueraient moins de faire bâiller la plaie, mais j'ai observé plus d'infections, et de moins bonnes cicatrisations chez les animaux opérés de cette manière que chez ceux dont l'incision avait été faite longitudinalement. Dans ce dernier cas, elle s'étendait sur deux, trois ou quatre segments, selon la grandeur de l'insecte.

Pour implanter le greffon, je le prenais au moyen d'une pipette de 1 mm de diamètre dans la boîte de verre et je l'injectais avec une goutte de liquide, en prenant soin d'introduire la pipette d'au moins 3 ou 4 mm à l'intérieur de l'abdomen, faute de quoi le greffon était expulsé immédiatement lorsque l'insecte, par réflexe, contractait son abdomen. C'était du moins le cas pour la plupart des insectes opérés. Les Acridiens, en revanche, dont l'abdomen est rempli de sacs aérifères, renflements des trachées, se laissaient greffer de grosses quantités de corps adipeux ou des ovaires volumineux, car en faisant l'incision je crevais toujours quelques-uns de ces sacs, ce qui créait la place nécessaire au greffon.

La greffe effectuée, je laissais la plaie telle quelle, ou je la couvrais d'une goutte de paraffine chaude qui en se figeant la fermait instantanément. Toutefois, pour la suite de la cicatrisation, puis plus tard pour les mues, cette paraffine représentait un gros handicap. C'est pourquoi j'y renonçais autant que possible. Il m'est arrivé de cautériser des plaies, lorsqu'elles saignaient abondamment. Je n'ai jamais utilisé de collodion pour fermer une plaie, son solvant (éther-alcool) étant nuisible à l'insecte.

L'animal opéré était placé ensuite sur un papier filtre dans une boîte de Pétri pendant environ 24 heures, puis, avec de la nourriture, dans un flacon d'Erlenmeyer couvert d'une gaze, où il restait jusqu'au moment de son autopsie.

Notons que les greffons étaient prélevés sur des Blattes femelles jeunes, c'est-à-dire encore dans les derniers stades larvaires ou juste après la mue imaginale. Les œufs dans les ovaires n'étaient ainsi pas trop gros, et l'organe, ovaire ou corps adipeux, se trouvait dans une période de pleine vitalité. Les porte-greffes aussi étaient choisis parmi des animaux jeunes, tous des larves à divers stades.

Première série.

Je ne ferai que citer les essais qui, infructueux, sont sans intérêt. Ce sont des inoculations de bactéries symbiotiques, selon la première méthode, et des greffes de petits fragments de corps adipeux de Blattes, selon la deuxième méthode, à des Lucanes *(Lucanus cervus)*. Devant les résultats négatifs, c'est-à-dire la disparition aussi bien des bactéries inoculées que des greffons, j'ai renoncé à ces Coléoptères pour ne plus travailler que sur des Orthoptères.

Deuxième série.

Cherchant toujours de gros insectes, auxquels une incision de quelques millimètres devait faire moins de mal qu'à des petits, j'ai tenté l'opération, désormais uniquement selon la deuxième méthode, sur des Courtilières (*Gryllotalpa* sp.).

Malheureusement ces bêtes sont extrêmement sensibles à l'infection et ne survivaient jamais au-delà de 3 à 5 jours, sauf une seule que je disséquai après 21 jours. Le greffon avait disparu.

J'entrepris alors des greffes sur des Gryllides, des Acridiens, des Locustides. Là encore, les insectes porteurs de greffes ne vivaient très souvent pas au-delà du 5e jour après l'opération. Certains mouraient après 7 à 8 jours. De ceux qui survivaient, j'en disséquai à intervalles réguliers, jusqu'à 15 jours après l'implantation.

Souvent la mort était due à une infection généralisée, par de petits bacilles courts et minces, sans rapport avec les symbiotes. Souvent aussi, c'est un mycélium qui avait envahi les organes de l'insecte. Je trouvais alors des spores, des figures de bourgeonnement et des filaments à divers stades, pénétrant dans le corps adipeux, les tubes de Malpighi, les gonades et évidemment aussi le greffon. Tous ces tissus étaient altérés, mais surtout les tubes de Malpighi, par la présence de ces bacilles ou de ces champignons. Ces infections pourraient avoir pour

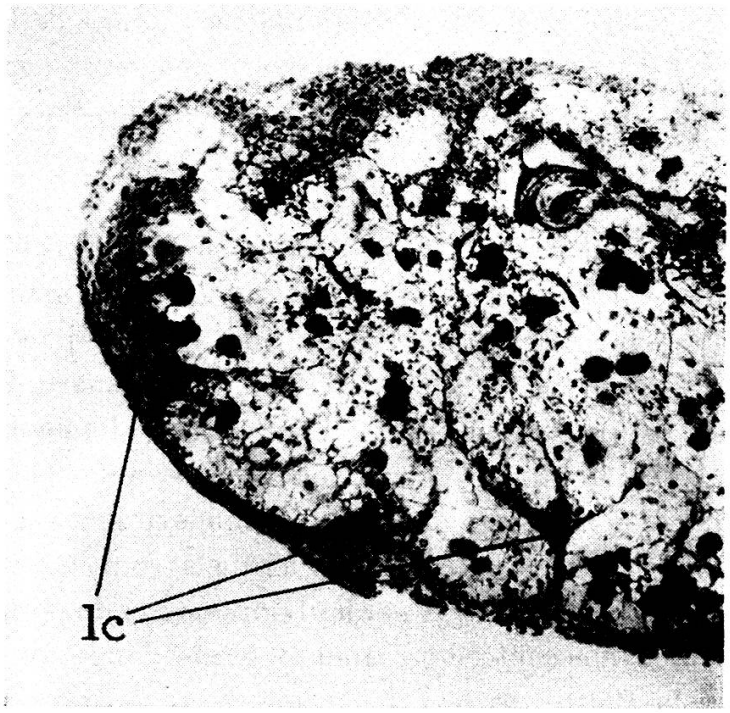

Fig. 8.

Greffon (corps adipeux) sur Gryllus, après 24 heures.
lc: leucocytes.

origine des bactéries ou des spores libérées par la lésion inévitable de troncs trachéens, lors du prélèvement du greffon.

Troisième série.

Chez le Grillon *(Gryllus campestris)* on voit, déjà 24 heures après l'implantation, une violente réaction se faire de la part de l'hôte contre le greffon. Celui-ci est attaqué par des lymphocytes qui forment autour de lui une épaisse croûte, puis le pénètrent (fig. 8). Le tissu adipeux greffé garde sa structure générale tant qu'il n'est pas détruit par l'action directe des lymphocytes. Toutefois, après un jour déjà, les noyaux des cellules changent d'aspect, révélant une altération histologique de l'implantat. Mais ce sont les bactériocytes qui subissent la plus grave atteinte. Dès le premier jour après l'opération, on en trouve qui dégénèrent. Leurs bactéries ne se laissent plus colorer normalement et perdent leur aspect turgescent. Après 6 jours, on ne trouve plus, à la place des bactériocytes, que des taches jaunâtres formées de bactéries mortes, incolores, agglutinées (fig. 9). Certains îlots de tissu subsistent encore intacts au milieu du greffon dégénéré et contiennent des bactériocytes à symbiotes normaux. Mais au bout de 12 jours, même ces îlots ont disparu. La greffe d'ovaires donne des résultats encore plus décevants: quatre jours après l'implantation, aucun symbiote n'est plus visible à la surface des ovocytes, lesquels sont au contraire couverts et souvent pénétrés par les lymphocytes du porte-greffe.

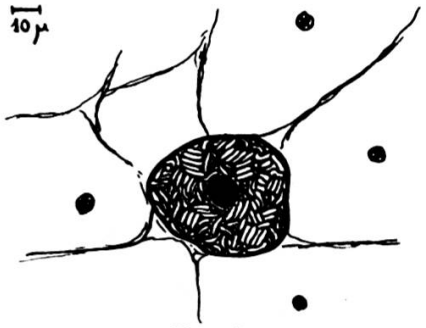

Fig. 9.
Bactériocyte d'un greffon sur Gryllus, après 6 jours.
Les symbiotes sont agglutinés.

Le Grillon n'accepte donc aucune greffe d'organes symbiotiques de la Blatte. Il réagit par une forte attaque lymphocytaire et élimine plus ou moins rapidement le greffon. L'altération subie par le tissu greffé ne permet pas aux symbiotes de la Blatte de survivre.

Quatrième série.

La réaction lymphocytaire des Criquets (*Acridium* sp.) à une greffe d'organe symbiotique de Blatte est moins violente que chez les Grillons. Cependant le milieu intérieur du Criquet provoque une forte dégénérescence du tissu implanté. Après deux jours on ne voit que peu de lymphocytes attaquer le greffon, mais la structure histologique en est déjà altérée; les noyaux cellulaires notamment sont ratatinés, opaques.

Fig. 10.
Symbiotes difformes dans un bactériocyte d'un greffon de 6 jours sur un Acridien.

En revanche, les bactéries symbiotiques résistent plus longtemps. On les trouve encore bien visibles dans leurs bactériocytes, dont le noyau semble être en parfait état, encore après 6 jours. Mais elles ont alors une forme épaisse, boursouflée (fig. 10). Après le même délai, les ovocytes des ovaires greffés dégénèrent, mais leurs symbiotes paraissent survivre. On en voit, en effet, encore à l'intérieur d'œufs très vacuolisés et dont les cellules folliculaires sont mortes. Ils sont groupés en paquets irréguliers (fig. 11). Ce n'est qu'après une moyenne d'environ 8 jours que leur structure s'altère. Ils deviennent granuleux, se colorent mal. Enfin, après 12 jours on ne les retrouve pas, et après 16 jours le greffon, s'il n'était pas trop gros, est entièrement résorbé.

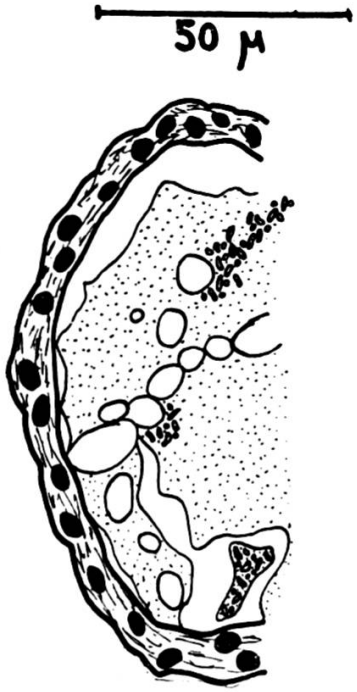

Fig. 11.
Ovocyte très fortement vacuolisé, dans un greffon de 6 jours sur un Acridien. Les symbiotes survivent.

Cinquième série.

Les Sauterelles (*Locusta* sp.) ont un ovaire très semblable, morphologiquement parlant, à celui des Blattes. Ses ovocytes sont en effet entourés d'une couche folliculaire simple, c'est-à-dire plane et formée d'une seule assise de cellules. (Chez les Acridiens, cette couche est pluristratifiée et, de plus, elle forme des villosités qui pénètrent dans le vitellus de l'ovocyte.) On aurait pu penser que mises en présence d'un ovaire de Locuste, les bactéries d'un lobe de corps adipeux de Blatte suivraient le même tactisme qui, dans leur hôte habituel, les fait pénétrer dans les œufs, et qu'on trouverait des ovocytes de Locuste remplis ou entourés de symbiotes de Blatte. Mais cela ne s'est jamais produit, même lorsque le greffon adhérait à un ovaire de l'hôte. Au contraire, les symbiotes restent toujours passivement dans leurs bactériocytes, où ils meurent en quelques jours.

On trouve d'ailleurs chez les Locustes une réaction violente de la part des lymphocytes. Le porte-greffe se défend même encore contre le greffon par l'action de ses tubes de Malpighi, qui s'approchent du greffon et, à son contact, s'enlacent au point de former dans la région attaquée un véritable feutrage (fig. 12). Le greffon subit le même sort que dans les autres porte-greffe. Dans des délais variables, on voit les symbiotes s'agglutiner, perdre leur colorabilité. Les bactériocytes sont réduits souvent très tôt à l'état de taches brunes informes. Les ovaires implantés peuvent garder des ovocytes intacts assez longtemps (8 jours), s'ils ne sont pas envahis par les leucocytes. La couche de sym-

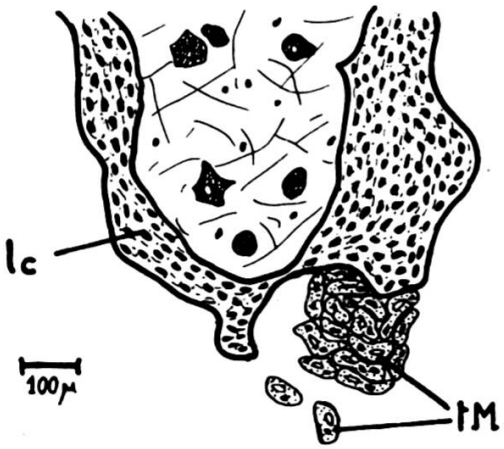

Fig. 12.

Réaction simultanée des leucocytes (lc) et des tubes de Malpighi (tM) contre un greffon (sur une Locuste).

biotes se présente alors de façon tout à fait normale à la surface des ovocytes. Dans quelques cas, le greffon (un fragment de corps adipeux) s'est collé à l'un des ovaires de l'hôte. Sans qu'aucun symbiote soit discernable dans cet ovaire, on voit néanmoins les lymphocytes l'envahir abondamment.

Ainsi, chez les Locustes, pas davantage que chez les insectes d'autres familles que j'ai soumis à ces expériences, les symbiotes de la Blatte ne peuvent se développer, ni même survivre.

Conclusion.

J'ai voulu voir si les symbiotes — bactéries si strictement adaptées à leur milieu naturel symbiotique qu'elles sont incapables de se développer sur un milieu artificiel — pourraient sinon se multiplier, du moins survivre dans un milieu constitué par le corps vivant d'un autre insecte. Nous avons vu que les bactéries injectées seules, en suspension, à des insectes, disparaissent. Un organe symbiotique entier implanté dans un insecte est également détruit et éliminé par son hôte. La destruction de l'implantat se fait progressivement à partir de l'extérieur, laissant d'abord la partie centrale intacte. Mais je n'ai jamais retrouvé un greffon vivant après plus de 12 jours. Cette réaction a lieu soit au moyen des lymphocytes, soit au moyen des tubes de Malpighi qui se mêlent au greffon et souvent s'hypertrophient jusqu'à atteindre le double de leur diamètre ordinaire, soit encore au moyen de lysines de l'hémolymphe, car on voit parfois du tissu implanté dégénérer sans aucune action visible de la part du porte-greffe [1].

Il faudrait donc trouver un insecte qui accepte un greffon de Blatte. J'ai bien tenté des homo-greffes de corps adipeux sur quelques Blattes « stérilisées », c'est-à-dire débarrassées de leurs symbiotes. Ces bêtes n'ont vécu que trois jours après l'opération. Toutefois le greffon, après ces trois jours, était en parfait

[1] Peut-être l'agglutination des bactéries dans les bactériocytes est-elle due aussi à une action du porte-greffe (agglutinine ?), mais il faut remarquer que les symbiotes des ovocytes ne s'agglutinent jamais.

état. Aucune phagocytose ni aucune réaction n'était intervenue contre les organes implantés, dont les symbiotes étaient encore tout à fait normaux. Mais ceux-ci étant restés dans leurs conditions symbiotiques normales, l'expérience n'a pas d'intérêt du point de vue de leur isolement. Elle prouve du moins que c'est l'hôte qui détermine la dégénérescence des greffons.

Or je voulais trouver un moyen de faire vivre des symbiotes en l'absence de leur hôte habituel, d'obtenir leur croissance en dehors des strictes conditions symbiotiques. Dans le paragraphe suivant on trouvera le compte rendu des essais que j'ai faits pour maintenir des lobes de corps adipeux et des ovaires en survie plus ou moins prolongée « in vitro », afin d'étudier le comportement des bactéries dans des conditions aussi proches que possible de la symbiose, mais sans intervention de la part de l'hôte ou d'un porte-greffe.

C. Explantations d'organes symbiotiques sur milieux artificiels.

Le but de tous mes essais était d'opérer la séparation des deux partenaires de la symbiose étudiée. Les tentatives de culture du symbiote sur milieu artificiel et les greffes de tissus symbiotiques sur d'autres insectes tendaient à obtenir des bactéries en dehors de leur hôte ordinaire, la Blatte. Une dernière expérience dans ce sens a été l'« explantation » d'organes symbiotiques, qui consistait à mettre des fragments de ces organes en « survie » « in vitro ». J'espérais voir le tissu dégénérer après quelque temps, et peut-être les symbiotes s'y multiplier, y pulluler, prouvant alors leur indépendance vis-à-vis de l'hôte.

Première série.

Pour commencer, je pris des baguettes de verre d'une longueur de 10 cm et de 4 mm d'épaisseur, et qui comportaient au tiers supérieur de leur longueur un renflement. J'enroulais autour de la baguette, au-dessous de son renflement, une bande de coton de 3 cm de largeur, de façon à constituer un bouchon pouvant s'adapter à une éprouvette. Je suspendais une goutte

d'un liquide physiologique au bout inférieur de la baguette et, au moyen d'une pipette, plaçais un fragment de tissu dans cette goutte. La baguette était alors placée dans le col d'une éprouvette, où elle était maintenue par son bouchon de coton. L'éprouvette était remplie, jusqu'à 1 cm au-dessous de l'extrémité inférieure de la baguette, d'une solution de NaCl isotonique au liquide physiologique, pour prévenir un desséchement du système (fig. 13).

L'opération était faite d'une manière absolument stérile. Le matériel et les liquides avaient été stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 120°), les fragments de tissu prélevés aseptiquement, selon la méthode utilisée pour les inoculations et les greffes (voir p. 262).

Le liquide physiologique employé pour cette expérience était fait, selon une indication de Locke-Lewis, de la manière suivante: NaCl 0,7 g, KCl 0,042 g, $CaCl_2$ 0,025 g, $NaHCO_3$ 0,02 g, dextrose 0,25 g, eau dist. 90 cc.

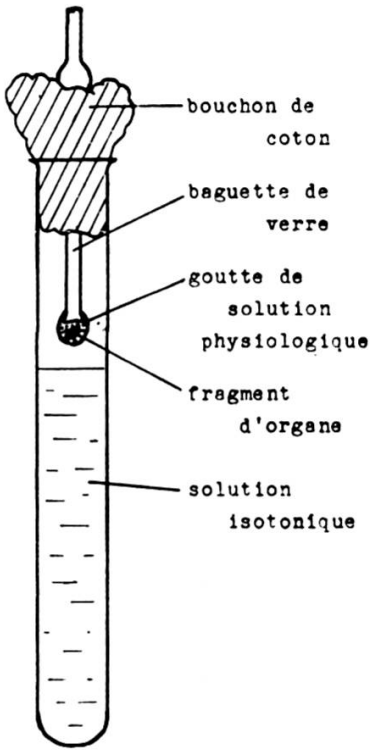

Fig. 13.
Système d'explantation de tissus en goutte pendante dans un tube à essais.

Je ne choisissais pas les lobes du corps adipeux que j'explantais, mais en ce qui concerne les ovaires, j'en prenais plutôt la pointe, car dans les œufs encore petits la proportion de symbiotes est plus grande que dans de gros ovocytes.

Résultat.

Le résultat fut atteint après 5 jours dans un petit fragment de tissu ovarien. En effet, si le tissu adipeux résiste longtemps à la dégénérescence dans une goutte de liquide physiologique aseptique, et qu'après 6 jours une altération notable ne s'y manifeste guère, les ovocytes au contraire, dégénèrent. Leur proto-

plasme perd son homogénéité, de nombreuses vacuoles s'y creusent. Déjà 5 jours après l'explantation, les ovocytes sont presque complètement détruits et leur couche folliculaire ne présente plus sa structure histologique nette.

En revanche, dans les tubes ovariques dégénérés du fragment en question, les bactéries symbiotiques se sont multipliées, la couche qu'elles forment autour des ovocytes est énorme, et elles pénètrent même dans ce qui était la couche des cellules folliculaires (fig. 14).

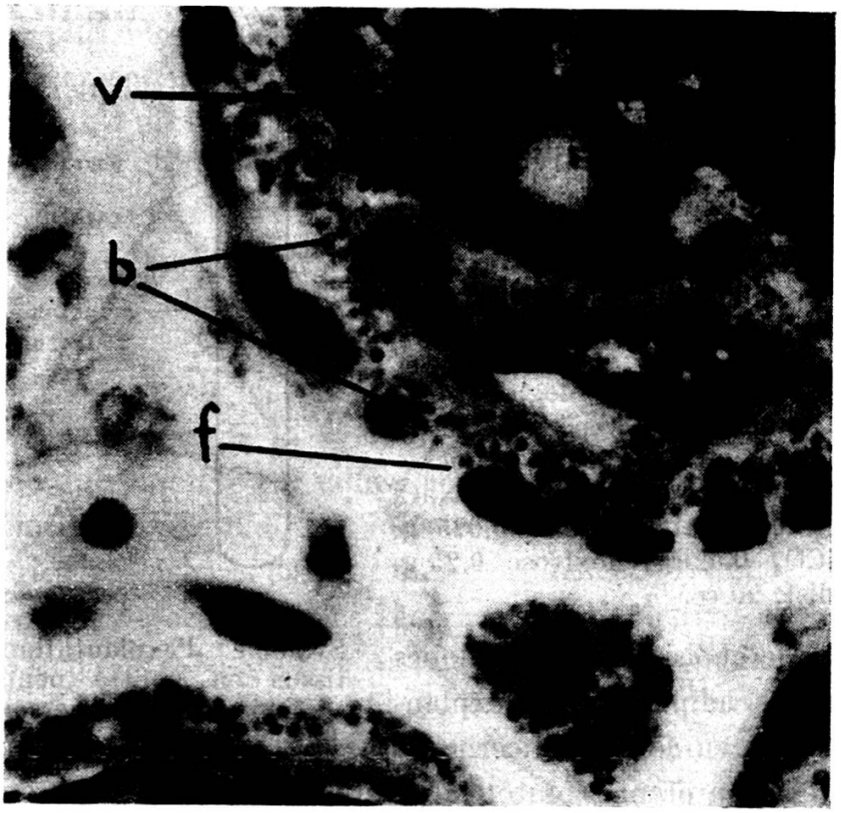

Fig. 14.

Fragment d'ovaire, 5 jours après son explantation dans le liquide physiologique.
v: vitellus; b: bactéries symbiotiques; f: couche folliculaire.

Dans une série d'explantations semblables faites d'autre part en vue d'étudier l'effet de la chaleur sur les symbiotes, j'ai observé sur un fragment explanté une pullulation des

bactéries aux dépens du tissu adipeux dégénéré, cela après 15 jours.

Il y a donc là un premier pas de fait dans le sens d'une dissociation des symbiotes et de leur hôte. Les bactéries ne se trouvent en effet plus sous le contrôle de l'insecte et prolifèrent aux dépens de ses tissus.

Mais ces bactéries ne pouvaient évidemment pas se multiplier longtemps dans ces conditions. Il aurait fallu un renouvellement de leur substratum, un apport de matières nutritives.

Deuxième série.

Le pas suivant que je tentai de faire fut de remplacer le liquide physiologique dans lequel je plaçais l'explantat par des milieux nutritifs à la gélose. Cela revenait simplement à placer les fragments d'organes symbiotiques dans de petites cavités creusées à la surface d'une plaque d'agar. Afin d'éviter un desséchement des explantats, je diluais le milieu gélosé à parties égales dans de l'eau distillée. La gelée était alors fortement imbibée d'eau, et le tissu restait humide très longtemps.

Je pensais ainsi obtenir, sinon un passage immédiat des bactéries sur la gélose, du moins peut-être leur adaptation progressive au nouveau milieu, au fur et à mesure que le milieu symbiotique dégénèrerait.

Cette expérience comporta l'explantation de 48 organes, sur quatre milieux légèrement différents. Le milieu de base était fait d'agar à 1% dans l'eau, et de 0,1% d'acide urique. L'adjonction de substances nutritives était de 0,5% soit de peptone, soit de glucose, soit de chacun de ces deux produits. Chaque milieu servit à l'explantation de 12 organes: 6 ovaires entiers et 6 fragments de corps adipeux [1]. Au bout de quelques jours, 5 des explantats furent broyés au moyen d'un fil de platine afin de libérer les symbiotes et de favoriser leur passage sur les

[1] Avec un des ovaires explantés sur acide urique-peptone-glucose fut entraîné un fragment de corps adipeux, qui seul fut retrouvé sur les coupes. Je considèrerai donc cette pièce comme explantation de corps adipeux.

milieux nutritifs. Je faisais périodiquement des sondages sur l'état des symbiotes au moyen de prélèvements.

Après un laps de temps plus ou moins long, allant de 7 à 39 jours, ces organes étaient fixés pendant 24 heures dans le liquide de Bouin, puis coupés et colorés.

En général, avant de fixer l'explantat, j'en faisais un dernier prélèvement qui m'indiquait immédiatement sur un frottis si les symbiotes existaient encore dans l'organe, dans quel état ils étaient, et si le fragment avait été la proie de microorganismes étrangers.

Les coupes, d'autre part, me montraient l'état du tissu symbiotique et la disposition des symbiotes à l'intérieur de l'organe.

Cela me permit d'établir à priori huit catégories selon l'état du tissu et des symbiotes:

Je réservai aux explantats dont le tissu était mort, ou plus ou moins dégénéré, les catégories *a*, *b*, *c* et *d* (altération nette de la structure cellulaire, notamment des noyaux). Les catégories *e* et *f* comprenaient les organes restés en bon état, peut-être encore vivants, ou dont on ne pouvait prouver la dégénérescence. Enfin je mettais dans la catégorie *g* les tissus tout à fait dégénérés, sans aucune structure reconnaissable, et dans la catégorie *h* les pièces soit inutilisables à cause d'infections par des champignons, soit détruites ou perdues au cours des manipulations.

L'état des symbiotes déterminait le classement des pièces dans les quatre premières catégories d'une part, dans les catégories *e* ou *f*, d'autre part, et cela de la manière suivante:

a, les symbiotes ont disparu; *b*, les symbiotes sont présents, mais morts; *c*, pièces dont on ne peut pas prouver que les symbiotes soient vivants; *d*, les symbiotes survivent; *e*, les symbiotes sont morts; *f*, les symbiotes sont vivants.

En résumé:

a:	tissu	mort	—	symbiotes	disparus;
b:	»	»	—	»	morts;
c:	»	»	—	»	peut-être vivants;
d:	»	»	—	»	vivants;

e: tissu peut-être vivant — symbiotes morts;
f: » » » — » vivants;
g: pièces totalement dégénérées;
h: » inutilisables.

Une catégorie comprenant des cas de développement des symbiotes sur le milieu de culture s'avéra inutile, cela ne s'étant jamais produit.

Du point de vue de la symbiose, on voit que seule la catégorie *d* est déterminante. En effet, si les symbiotes sont morts *(a, b, c)*, le résultat n'est pas atteint. Si le tissu est encore vivant *(e, f)*, la symbiose subsiste.

Les pièces de la catégorie *d* présentent un tissu visiblement dégénéré; leurs symbiotes sont nettement vivants, de forme typique, de structure homogène — sauf les zones claires normales —, d'aspect turgescent; ils se colorent de la même manière que sur des pièces fraîches. Le bon état des symbiotes est confirmé par les frottis qui montrent leur structure typique, leur bonne colorabilité, souvent des figures de division. Ce fait n'exclut pas la présence, dans les pièces de cette catégorie, de symbiotes morts, brisés, d'aspect granuleux, faiblement colorés, parfois de symbiotes difformes.

Dans une proportion de près de 50%, les explantats se révélèrent infectés par d'autres bactéries (cocci ou bacilles de petite dimension). Lorsque cette infection n'empêchait pas un examen utile de la pièce, je la mettais dans des catégories *a'* à *f'*. Sinon, elles étaient classées sous *g'*. Je reconnaissais l'état d'infection des pièces inutilisables ou disparues *(h')* d'après les frottis.

Résultats.

13 pièces, soit 3 corps adipeux et 10 ovaires, entrent dans les catégories *g* et *h* et sont inutilisables. Les 35 autres se répartissent comme suit:

a	(tissu mort,	symbiotes	disparus):		2
b	»	»	»	morts):	10
c	»	»	»	peut-être vivants):	9
d	»	»	»	vivants):	8

e (tissu peut-être vivant, symbiotes morts): 0
f » peut-être vivant, symbiotes vivants): 6

Les 12 pièces des catégories *a* et *b* ne présentent pas d'intérêt, leurs symbiotes ayant dégénéré. Les deux explantats de *a*, tous deux des ovaires, furent fixés 15 jours après l'explantation. De la catégorie *b* (5 ovaires, 5 corps adipeux), 2 furent fixés le 14e et le 15e jour, les 8 autres au-delà du 25e jour, dont les 3 derniers le 34e jour. C'est donc dès le début que l'on trouve des fragments dégénérés et dont les symbiotes sont morts. La nature des milieux ne semble pas avoir influencé les pièces de ces deux catégories.

Aucune pièce n'entre dans la catégorie *e*. Donc tant que l'organe se maintient en bon état, les symbiotes vivent. Je n'ai jamais assisté à une dégénérescence des symbiotes dans un tissu symbiotique sain.

Parmi les explantats de la catégorie *f*, nous en trouvons qui ont gardé leur structure typique (noyaux cellulaires normaux): 1 ovaire jusqu'au 14e jour, 1 corps adipeux jusqu'au 21e jour, et 2 jusqu'au 28e jour. Il est toutefois difficile d'admettre que ces fragments aient été réellement vivants après si longtemps, alors que d'autres (mis dans les catégories *a* à *d*) ont dégénéré dès le 7e jour, sans même être atteints d'infection bactérienne. Deux pièces ont été mises dans la catégorie *f* sur la seule base de leur frottis qui présente des symbiotes vivants, le tissu n'ayant pas pu être examiné sur des coupes. De toute manière cette catégorie, composée de 6 pièces, ne nous montre pas de manière certaine la vie des symbiotes dans un tissu mort, et ne nous est de ce fait d'aucune utilité.

La catégorie *c* comprend 9 pièces, soit 6 corps adipeux et 3 ovaires. Un corps adipeux et 2 ovaires présentent une infection par des micro-organismes étrangers. Dans ces 9 cas, les symbiotes sont présents, souvent en très grand nombre, dans un tissu nettement altéré. Toutefois, rien ne permet de prouver l'état de vie de ces symbiotes. On ne peut donc pas placer ces explantations dans la catégorie *d*.

Enfin 8 pièces ont pu être attribuées d'une manière sûre à la catégorie *d*. Il s'agit de 7 corps adipeux et d'un ovaire. Seul

un fragment de corps adipeux, fixé après 15 jours, est infecté par d'autres microbes. Tous sont dégénérés, mais présentent des symbiotes vivants et normaux. Le frottis de contrôle manque dans un cas; cependant la coupe de ce fragment est suffisamment probante. Dans un autre cas, certaines bactéries

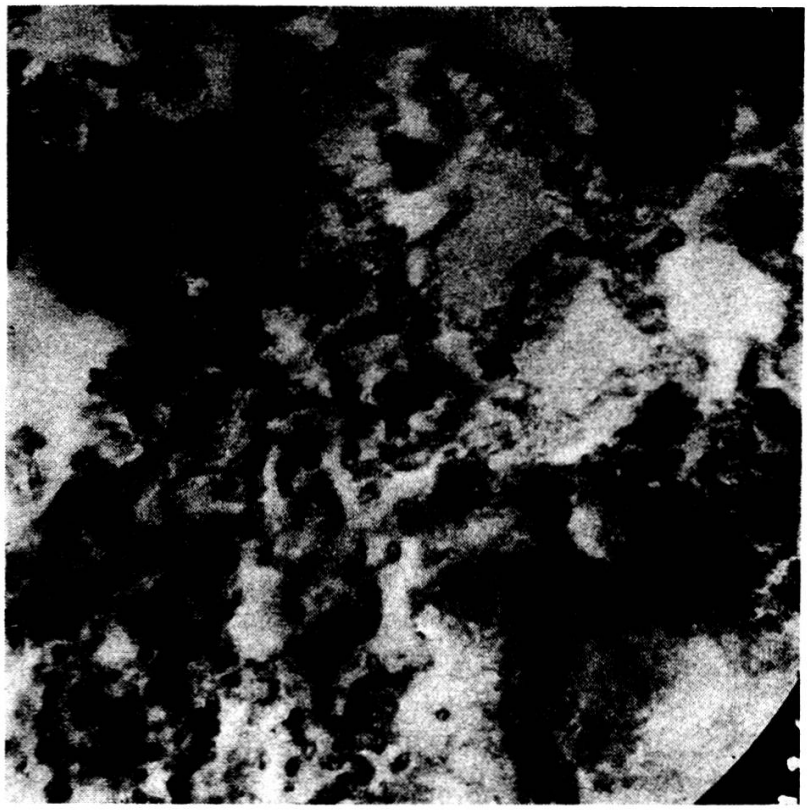

Fig. 15.

Fragment de corps adipeux, 14 jours après son explantation sur un milieu à la gélose; complètement dégénéré, il est envahi par ses symbiotes.

symbiotiques ont une forme très légèrement modifiée, boursouflée. Mais les autres sont normales et l'on voit des figures de division typiques.

La durée de l'expérience pour ces 8 explantations est la suivante:

ovaire:	1 cas de 39 jours
corps adipeux:	1 » » 14 »
	1 » » 15 »
	3 » » 21 »

corps adipeux: 1 cas de 34 jours
1 » » 39 »

D'autre part, 4 des fragments de corps adipeux de la catégorie *d* (14, 15 et 2 fois 21 jours) prouvent que les symbiotes ne se contentent pas de survivre dans l'organe dégénéré, mais s'y multiplient activement. C'est en quelque sorte à une pullulation que l'on assiste. Les bactériocytes ayant perdu leur membrane, les bactéries se répandent dans les cellules voisines et dans tout le tissu (fig. 15).

On trouve un cas semblable parmi les fragments de corps adipeux de la catégorie *c*.

Enfin le fragment de corps adipeux de *d* resté 39 jours en explantation présente sur son frottis des figures de multiplication typiques.

Sur l'ovaire, l'observation de tels phénomènes est plus difficile, car il faut estimer l'épaisseur de la couche de symbiotes à la surface des ovocytes. Toutefois, comme dans le cas cité au début de ce chapitre (explantations en gouttes pendantes, fig. 14), cette couche est ici manifestement plus épaisse que d'ordinaire, et surtout, les cellules folliculaires sont envahies par les symbiotes.

L'influence du milieu est faible. Sur le tableau 4, les catégories *d* et *f* semblent indiquer un effet favorable du glucose sur les symbiotes. Tous les cas de multiplication ou de pullulation des symbiotes ont eu lieu sur des milieux glucosés.

Des 23 explantats infectés par des microbes étrangers, 12 font partie des catégories *g'* et *h'*. Il en reste 11 sur les 35 pièces utilisables. Ces infections sont dues, soit à la présence de germes dans les explantats eux-mêmes, soit à des germes extérieurs tombés sur les milieux de culture lorsque j'ouvrais les boîtes de Pétri pour faire les prélèvements périodiques.

La plupart de ces colonies bactériennes qui avaient infecté des fragments explantés ou qui s'étaient développées à leur contact immédiat furent repiquées sur des milieux ordinaires (eau peptonée notamment). Toutes étaient étrangères au symbiote et se développèrent abondamment dans ces milieux. Ces souches étaient donc sans intérêt. En admettant même, en

effet, que l'une d'elles ait eu pour origine le symbiote, il n'aurait pu s'agir que d'une exception, d'un mutant. Or, si la culture du symbiote réussit une fois, il faudra alors que l'on puisse réinoculer à des Blattes les organismes cultivés, et, pour ainsi dire, les rendre à leur symbiose. Il est peu probable qu'un mutant adapté à un milieu artificiel si radicalement différent du milieu symbiotique réponde à cette condition. D'ailleurs je cherchais à obtenir le développement du symbiote dans sa forme normale, et si j'avais atteint ce but dans un cas, j'aurais dû l'atteindre dans tous les cas similaires.

Conclusion.

Cette expérience confirme donc les résultats des explantations en gouttes pendantes et établit que les symbiotes peuvent survivre au tissu symbiotique, se multiplier à ses dépens, vivre en dehors des conditions normales de la symbiose. Dans cette mesure, nous pouvons parler d'une dissociation de cette symbiose.

Dès lors on doit pouvoir obtenir une prolifération des symbiotes en l'absence de l'hôte, sur un milieu non vivant. Si je n'ai pas obtenu leur passage sur mes milieux artificiels, c'est que ces milieux n'étaient pas les bons. Il semble que, le milieu propice trouvé, rien ne s'opposerait plus à ce que les bactéries symbiotiques s'y développent.

Le système des explantations paraît donc être la meilleure méthode pour l'isolement du symbiote. Elle échappe aux inconvénients d'une greffe sur un autre insecte et permet une adaptation progressive des symbiotes à des conditions extra-symbiotiques, mieux que ce n'est le cas lors d'inoculations simples, par application d'organes ou au moyen de suspensions.

TABLEAU 3.

Récapitulation des explantations sur milieux gélosés.

Catégorie	Durée de l'explantation												Totaux		
	7 jours		14 jours		21 jours		28 jours		35 jours		39 jours				
	ca	ov	ca	ov	ca	ov	ca	ov	ca	ov	ca	ov	ca	ov	Total
a						2								2 (2)	2 (2)
b				1	1		2	2	1	3			4 (4)	6 (0)	10 (4)
c	1		3	1		1	1	1	1				6 (1)	3 (2)	9 (3)
d			1		4				1		1	1	7 (1)	1 (0)	8 (1)
e															
f				1	1		3				1		5 (1)	1 (0)	6 (1)
g				1					1				1 (1)	1 (1)	2 (2)
h	1		1	3		3		3					2 (2)	9 (8)	11(10)
Totaux	2		5	7	6	6	6	6	4	3	2	1	25(10)	23(13)	48(23)

Catégories: voir pages 280-281.

ca: corps adipeux. ov: ovaires.

Entre parenthèses, le nombre de fragments infectés par des micro-organismes étrangers à la symbiose.

TABLEAU 4.

Influence du milieu.

Milieu	Catégories								Total
	a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*	*g*	*h*	
Agar, acide urique . . .	2	4	1	1			1	3	12
Agar, acide urique, peptone		1	6				1	4	12
Agar, acide urique, glucose		2		4		3		3	12
Agar, acide urique, peptone, glucose		3	2	3		3		1	12

Catégories: voir pages 280-281.

La majorité des cas de survie des symbiotes se sont produits sur des milieu sucrés (catégories *d* et *f*).