

<b>Zeitschrift:</b>	Archives des sciences [1948-1980]
<b>Herausgeber:</b>	Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
<b>Band:</b>	8 (1955)
<b>Heft:</b>	3
<b>Artikel:</b>	La symbiose bactérienne intracellulaire chez la blatte, B. Germanica
<b>Autor:</b>	Haller, Gérard de
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.5169/seals-739854">https://doi.org/10.5169/seals-739854</a>

### **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:** 06.02.2026

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

# LA SYMBIOSE BACTÉRIENNE INTRACELLULAIRE CHEZ LA BLATTE, *B. GERMANICA*

(Avec 24 fig. et 6 tableaux)

PAR

**Gérard de HALLER**

## INTRODUCTION

Une littérature extrêmement abondante a été consacrée ces dernières années à la symbiose. Je me bornerai à rappeler en quelques lignes les aspects généraux de cet intéressant chapitre de la biologie.

### SYMBIOSE.

La symbiose est la vie en commun permanente de deux organismes spécifiquement distincts, dont les besoins et les fonctions se complètent et se satisfont mutuellement. Il peut y avoir symbiose de deux végétaux, comme le champignon et l'algue qui forment le lichen, les légumineuses et les bactéries qui contiennent les nodosités de leurs racines, de nombreuses plantes herbacées ou ligneuses et leurs mycorhizes. On trouve aussi des symbioses entre deux espèces animales. Ainsi les Termites et les flagellés de leur intestin, les ruminants et les protozoaires de leur panse vivent en symbiose. L'association peut réunir un animal et un représentant du règne végétal. Telles sont toutes les symbioses à algues, champignons ou bactéries, dans tous les embranchements du règne animal. Chacun connaît les Zoochlorelles qui vivent dans le protoplasme de certains protozoaires, celles qui donnent sa couleur à l'Hydre

verte. Les Termites et certaines Fourmis portent en eux des champignons, qu'ils cultivent d'ailleurs dans leurs termitières ou leurs fourmilières, ce qui constitue un aspect intéressant de la symbiose. Des bactéries se trouvent en symbiose chez des vers, des mollusques, des vertébrés. Enfin de nombreuses espèces d'insectes vivent en symbiose avec des bactéries, souvent aussi avec des levures.

C'est DE BARI qui en 1879 introduisit la notion de symbiose. Ce mot définissait alors toute vie en commun et englobait le parasitisme, la symbiose vraie et le commensalisme. En fait, on ne saurait séparer nettement la symbiose du parasitisme et du commensalisme. Il est des cas de parasitisme où l'hôte est si bien immunisé contre les effets nocifs de son parasite qu'il en supporte la présence sans dommage. De son côté, le commensalisme n'est pas toujours indifférent: le pagure et l'actinie profitent l'un et l'autre de leur association, qui se rapproche ainsi d'une symbiose. Inversement la symbiose est-elle toujours avantageuse pour les deux partis ? N'est-elle pas en quelque sorte un parasitisme réciproque, voire un parasitisme simple, avec immunisation d'un des partenaires ? Il y a aussi des symbioses plus ou moins inutiles ou facultatives. Que sont-elles d'autre qu'un simple commensalisme ?

En 1933, RIES proposa trois conditions, qui réunies, définiraient une symbiose vraie :

1. Régularité du phénomène. Chaque individu de l'espèce hôte est porteur de symbiotes, les symbiotes n'existent jamais en dehors de l'hôte. Autrement dit, on ne rencontre jamais l'un des partenaires sans l'autre;
2. Localisation des symbiotes dans une région précise de l'hôte, modifiée à cet effet, et constituant un organe spécifique;
3. L'hôte présente une adaptation spéciale pour la transmission des symbiotes à ses descendants.

Ce triple critère éviterait toute confusion avec le parasitisme. Toutefois, on n'y fait pas mention de l'utilité de l'association, qui permettrait de distinguer la symbiose du commensalisme. Pour établir sûrement le fait d'une symbiose, il faut, à mon

avis, sinon connaître le rôle de chaque partenaire, du moins être sûr qu'une utilité réciproque existe.

Je m'en tiendrai là quant aux considérations générales. Les traités de CAULLERY, STEINHAUS, BUCHNER, et les nombreux articles de KOCH, TÓTH, FRAENKELS, GLASER et de bien d'autres encore font état de tous les problèmes de la symbiose et de toutes les connaissances acquises jusqu'ici à son sujet. Le but du présent travail n'est que de fouiller un cas précis, et d'ailleurs spécial, parmi une catégorie déterminée de symbioses.

#### ENDOSYMBIOSE.

On parle d'endosymbiose lorsque l'un des partenaires vit complètement à l'intérieur de l'autre. L'espèce habitée est en général beaucoup plus évoluée que l'espèce habitante. La flore intestinale de tous les animaux en est un exemple. On appelle hôtes les individus habités, et symbiotes ou symbiontes<sup>1</sup> les habitants, souvent en très grand nombre à l'intérieur d'un seul hôte. Remarquons que l'hôte ne se laisse jamais envahir par ses symbiotes. Il en contrôle constamment le nombre qui ne dépasse jamais une certaine limite.

#### SYMBIOSE INTRACELLULAIRE.

Lors de symbioses intracellulaires, les symbiotes se trouvent à l'intérieur même des cellules de l'hôte. Citons entre autres la symbiose photogène dans les organes lumineux des Pyrosomes et des Céphalopodes.

Dans leur grande majorité les symbioses intracellulaires des Insectes remplissent les trois conditions de Ries et pourraient donc être considérées comme des symbioses vraies.

<sup>1</sup> Faut-il dire symbiote ou symbionte ? Les anglais et les allemands emploient le terme « Symbiont ». La plupart des auteurs français parlent de symbiotes, quelques-uns de symbiontes. L'origine du mot symbionte est le participe présent grec « συμβιων, συμβιοντος ». Mais il est possible de former le substantif « συμβιωτης », dont on peut tirer le mot symbiote. Les deux formes ont donc leur raison d'être. Par analogie avec les auteurs français, nous emploierons le terme de symbiote.

Dans de nombreux cas les symbiotes sont localisés dans l'intestin. Un exemple connu de longue date nous est fourni par un prédateur des céréales, *Sitodrepa panicea*<sup>1</sup>, de la famille des Anobiidae. Ce Coléoptère porte des levures symbiotiques dans des coecums spéciaux de la partie antérieure de son intestin moyen. Dans l'épithélium unistratifié de ces coecums, on voit de place en place une cellule fortement hypertrophiée et bourrée de levures. La transmission des symbiotes aux descendants de l'insecte est assurée de la manière suivante : l'appareil de ponte est pourvu de deux paires d'ampoules, de « réservoirs » à levures, qui au moment de la ponte, déversent des symbiotes sur les œufs. La larve s'« infecte » au moment de l'éclosion en dévorant la coque de son œuf.

Très souvent les symbiotes sont logés dans un organe isolé, appelé mycetome. Il est en général sphérique ou plus ou moins allongé. Ses cellules, ou mycetocytes, — bactériocytes s'il s'agit de symbiose bactérienne — sont particulièrement grosses. Les symbiotes occupent entièrement leur protoplasme, ne laissant de place qu'au noyau. Les mycetomes sont toujours pourvus d'un réseau très dense de trachées assurant la respiration des symbiotes.

Tel est le cas chez un insecte de la famille des Silvanides, *Orizaephilus surinamensis*. Répandu actuellement sur tout le globe, cet habitant indésirable des magasins de vivres et de tabac vivait à l'origine dans les pays tropicaux, sous l'écorce des arbres. Il possède quatre mycetomes ovales, dont deux sont situés dorsalement, au-dessus de l'intestin, accolés l'un à l'autre. La deuxième paire est ventrale, à gauche et à droite de la chaîne nerveuse. Chez *Orizaephilus*, comme chez bien d'autres insectes, les larves ne sont pas contaminées après l'éclosion, mais les symbiotes pénètrent dans les œufs à l'intérieur même de l'ovaire, déjà bien avant la ponte. Ils participent ensuite au développement au même titre que les propres cellules de l'embryon. Dans d'autres cas, les symbiotes sont transmis par le mâle. Les bactéries envahissent le testicule et se mêlent au sperme. Elles pénètrent dans l'œuf par le micropyle, après la fécondation. (Certaines Bostrichides.)

<sup>1</sup> Parfois appelé *Sitopreda panicea*, notamment par HENNEGUY.

Enfin il existe des mycétomes diffus, si l'on peut dire, dont les mycétocytes sont dispersés dans un organe ordinaire de l'insecte. C'est ainsi que chez les Blattes, nous trouvons des bactéries symbiotiques dans certaines cellules éparses du corps adipeux.

Deux ou plusieurs espèces de symbiotes intracellulaires peuvent se trouver en même temps chez un insecte. Les œufs sont alors infectés par tous les symbiotes à la fois, mais ceux-ci se séparent par la suite et occuperont dans l'hôte des cellules différentes.

La symbiose existe surtout chez les insectes à nutrition cellulosique et chez les suceurs de sève ou de sang. Elle ne se trouve qu'exceptionnellement chez des omnivores, tels que les Blattes et les Fourmis. Ce sont les Rhynchotes et les Coléoptères qui en présentent le plus grand nombre. Les Diptères en ont moins, et les Lépidoptères, les Thysanoptères, de même que les Aptérigotes en sont dépourvus. On ne connaît aucun cas certain de symbiose lumineuse ou excrétrice chez les Insectes.

Tous les degrés se présentent, montrant selon STAMMER, le chemin que la symbiose a dû suivre au cours du temps en se perfectionnant. Des cultures de champignons des Termites et de bien d'autres espèces, on passe à la flore intestinale libre dans le lumen de l'intestin, présente chez tous les insectes. Puis on assiste à la formation de coecums spéciaux contenant cette flore (de nombreux Hétéroptères suceurs de sève); plus loin les symbiotes ont pénétré dans les cellules de la paroi des coecums (Anobiides, Buprestides, larves de Cerambycides). Les Aphanides en présentent aussi bien dans le lumen que dans les cellules épithéliales des coecums. Enfin les coecums se détachent de l'intestin, pénètrent dans la cavité générale et forment ainsi les mycétomes. Les symbiotes n'ont alors plus aucun contact avec l'intestin. Ce déplacement s'observe parfois pendant la vie embryonnaire, précise STAMMER, et chez les Lygaeides un canal étroit rattache encore le mycétome à l'intestin. Ce canal n'est plus qu'un mince cordon chez les Acanthosomides.

On observe des symbioses en régression, en quelque sorte décadentes. Ainsi les bactériocytes épithéliaux de l'intestin des Fourmis sont parfois vides de symbiotes.

Le rôle d'une endosymbiose intestinale est relativement facile à déterminer. Il s'agit dans la plupart des cas d'un rôle digestif, par exemple chez les insectes xylophages de la dégradation de la cellulose<sup>1</sup>. Il est intéressant de noter que, chez les Termites, les grands Flagellés symbiotiques intestinaux contiennent eux-mêmes des bactéries symbiotiques dans leur protoplasme. On pourrait parler d'*hyper-symbiose*.

La fonction des mycétomes est beaucoup plus malaisée à définir, et, à plus forte raison, celle des mycétomes diffus. Nous en reparlerons en étudiant le rôle de la symbiose des Blattes.

#### ORIGINE ET PHYLOGÉNIE DE LA SYMBIOSE.

Si nous connaissions l'origine de la symbiose, nous en comprendrions peut-être mieux le sens. Mais nous sommes réduits à formuler des hypothèses.

Comment ne pas penser qu'il s'agissait au début d'une présence de micro-organismes parasites dans le corps des insectes ? Une immunisation se serait produite une fois, qui aurait changé ce parasitisme en commensalisme. Ce n'est que plus tard que l'insecte se serait mis à profiter d'une fonction quelconque des microbes, comme par exemple la production de vitamines. Cette action des micro-organismes aurait alors permis à l'insecte soit de changer ses habitudes, par exemple de ne plus se nourrir que de substances pauvres en vitamines, soit de supporter des modifications des conditions extérieures. Ces changements extérieurs, devenus permanents, auraient rendu indispensable la présence des parasites. Les individus dépourvus de microbes auraient alors disparu.

Le mode de transmission des symbiotes de génération en génération pose un problème plus ardu. L'existence chez l'hôte d'appareils parfaitement adaptés à cette fonction ne peut que nous prouver la très grande ancienneté de ces symbioses. On trouve d'ailleurs des symbioses dans des groupes très évolués aussi bien que dans des groupes primitifs.

La présence des mycétomes eux-mêmes est une énigme. Ces organes spécifiques ne sont pas « induits » chez l'embryon par

<sup>1</sup> De récentes recherches ont toutefois prouvé que l'insecte peut produire lui-même la cellulase nécessaire à la digestion du bois.

les symbiotes. Ils ne sont pas comparables aux galles des végétaux, produites par un parasite. En effet, nous verrons qu'ils se développent même en absence de micro-organismes, que même des espèces sans symbiose en possèdent (certaines Fourmis, une espèce de Charançon). Doit-on penser alors que le mycétome n'est qu'un organe banal que le symbiose choisit parce qu'il lui convient le mieux ? Non. Les mycétomes vides doivent avoir perdu leurs symbiotes. Il faut les considérer comme des reliquats; ou alors, s'ils n'ont jamais contenu de symbiotes, il s'agirait, selon l'expression de Cuénot, d'un cas de préadaptation. On peut seulement déduire de ces exceptions que les symbioses peuvent avoir disparu plus ou moins complètement, donc qu'elles peuvent perdre leur utilité.

Le cas des Blattes est intéressant. On sait que les Blattes et les Termites (ou Isoptères) sont deux rameaux issus d'une même souche. GRASSÉ en fait deux ordres — Dictyoptères et Isoptères — du super-ordre des Blattoptéroïdes. La séparation des deux phylums se serait faite au début du Carbonifère<sup>1</sup>.

Il existe actuellement parmi les Isoptères une espèce « relique », *Mastotermes darwiniensis*, qui vit en Australie. Or ce Termite primitif présente une symbiose bactérienne en tous points identique à celle des Blattes. Localisé dans les cellules du corps adipeux viscéral, le symbiose se transmet par l'ovaire. De nombreux autres caractères confirment cette similitude. On ne peut douter qu'il s'agisse bien là de la même symbiose, et on doit en conclure qu'elle existait déjà chez l'ancêtre commun aux deux ordres. (Le fait que Koch ait trouvé des bactéries Gram-négatives chez *Mastotermes* ne signifie rien; cela provient probablement de la longue conservation à l'alcool

<sup>1</sup> A la suite de ses recherches sur la répartition des trachées dans les fourreaux alaires de la nymphe des Termites, TILLYARD a fait remarquer en 1931 que les nervures considérées jusqu'ici comme anales dans les ailes aussi bien des Termites que des Blattes ne sont en réalité chez les Termites que des rameaux de la Cubitale et qu'on ne peut pas considérer le lobe anal de l'aile des deux groupes comme homologue. GRASSÉ admet cependant que cette différence, due peut-être à des modifications de croissance régionales des nervures, « ne s'oppose pas à l'idée d'une filiation des Termites à partir des Blattes ou, ce qui selon nous a plus de chances de correspondre à la réalité, à partir d'un ancêtre commun aux deux phylums ».

subie par les insectes que l'auteur avait à sa disposition. GLASER signale, en effet, que les symbiotes de Blattes deviennent Gram-négatifs après la mort de l'insecte.)

#### LA SYMBIOSE BACTÉRIENNE INTRA-CELLULAIRE DES BLATTES.

Les Blattes possèdent des parasites, une flore intestinale; je ne m'en occuperai pas ici. C'est l'énigme posée par la symbiose bactérienne de leur *corps adipeux* que je veux étudier. Les corpuscules considérés comme symbiotes sont-ils vraiment des bactéries ? Pendant longtemps on leur a appliqué le terme de « bactéroïdes », qu'en 1885 BRUNCHORST avait créé pour l'*Azotobacter* des nodules de la racine des Légumineuses; et pendant longtemps on a hésité sur leur nature. Si ce sont des bactéries, s'agit-il réellement d'une symbiose ? Quel est le sens de cette association ? Les deux partenaires peuvent-ils être séparés ? Quelles en seraient les conséquences ?

Le premier chapitre, théorique, de ce travail me permettra de cerner ces divers problèmes de plus près, grâce aux nombreux ouvrages parus.

Le chapitre 2 est consacré à la description des organes de la Blatte qui contiennent les symbiotes, et à celle des symbiotes eux-mêmes.

Dans le troisième chapitre, je fais part de mes essais d'isolation du symbiose, par trois méthodes: la culture du symbiose, la greffe et l'explantation d'organes symbiotiques.

Les expériences d'isolation de l'hôte font l'objet du chapitre 4.

Enfin j'indique dans une annexe les quelques données que j'ai pu recueillir quant aux répercussions sur l'hôte de l'absence des symbiotes.

## CHAPITRE PREMIER

**La symbiose intracellulaire de la Blatte.**  
**Historique.****A. LES CORPUSCULES DE BLOCHMANN.**

En 1887, BLOCHMANN signala la présence de corpuscules en forme de bactéries dans les tissus et les œufs de divers insectes. Il les étudia spécialement chez les Blattes. Leur forme, leur mode de multiplication et leur comportement vis-à-vis de différents réactifs l'amenèrent à les considérer comme des Bacilles. Il les trouvait régulièrement, sous forme de bâtonnets de 6 à 8  $\mu$  de longueur, d'une part dans les œufs, d'autre part dans les cellules centrales du corps adipeux. Ces dernières en étaient bourrées au point que seuls leur noyau et leur membrane étaient encore visibles. Toutefois c'est en vain que BLOCHMANN chercha à cultiver ces organismes. KORSCHELT et CUÉNOT signalèrent également ces corpuscules énigmatiques.

Leur localisation dans le corps adipeux fut précisée par FRÄNKEL (1918). Les cellules contenant les bactéries, les bactériocytes, ne présentent jamais ni les gouttelettes de graisse, ni les concrétions d'urates, que renferment les autres cellules du corps adipeux. Elles sont rangées, chez *Periplaneta orientalis*, sur une ligne, longitudinale par rapport aux lobes adipeux. *Blatella germanica* présenterait trois ou quatre de ces lignes, qui peuvent atteindre le nombre de vingt chez d'autres espèces. Chez *Blatta aethiopica*, les bactériocytes sont au contraire dispersés sans ordre dans le corps adipeux. Enfin, on peut aussi trouver les micro-organismes massés tous ensemble dans un lobule de cet organe. Ces bactériocytes ne se trouvent jamais à la surface du corps gras. Ils sont toujours recouverts d'une couche au moins de cellules adipeuses, sauf au contact des gonades, qu'ils côtoient directement. On en trouve même parmi les cellules conjonctives qui tapissent ces

organes (MERCIER, 1907; GIER, 1936). C'est ce qui permet la transmission des symbiotes aux descendants. En effet, si chez les mâles l'on ne trouve jamais de bactéries dans les testicules, dans l'ovaire des femelles, en revanche, les ovocytes en sont couverts.

MERCIER découvrit des symbiotes dans les cellules de la gaine ovarienne, puis dans des cellules folliculaires. BLOCH-MANN avait déjà signalé le passage des bacilles du corps adipeux dans les œufs. WHEELER, en 1889, montra que les ovocytes jeunes présentent à leur surface une couche mince de ces micro-organismes, alors que chez les ovocytes plus âgés, les symbiotes sont beaucoup plus nombreux et forment des amas épais repoussant la couche des cellules folliculaires. Dans les ovules mûrs, ils se trouvent par paquets dans des enclaves du cytoplasme. WHEELER les vit également sur des coupes et des frottis d'embryons. Selon FRÄNKEL, la contamination des œufs a lieu lorsque ceux-ci ont 0,13 mm de long, pour *P. orientalis*. Les bactéries passeraient entre les cellules folliculaires, puis se rangeraient en une couche superficielle tout autour de l'œuf, et en épaisses calottes à chacun de ses pôles.

C'est le cas chez toutes les Blattides, sauf chez *B. germanica* où il n'y a, outre la couche superficielle, qu'une petite calotte à l'un des pôles. Après que la membrane de l'ovocyte s'est dissoute en un endroit, les symbiotes pénètrent dans le protoplasme. Chez *Heterogomia aegyptica*, ils pénètrent par les pôles, grâce à de profonds replis creusés dans le protoplasme. KOCH décrit le comportement des symbiotes pendant le développement embryonnaire de la façon suivante: A la fin de la croissance de l'œuf, on trouve les bactéries groupées en îlots dans le protoplasme superficiel, tout autour de l'œuf. Au début du développement, elles se déplacent toutes vers la face ventrale où elles se groupent autour de certains noyaux, émigrés à la surface. Lorsque la ligne primitive est achevée, les symbiotes sont répartis juste au-dessous d'elle, dans le vitellus. Plus tard, on les retrouve au centre de l'œuf, en un amas irrégulier. Après l'apparition des segments, de l'intestin antérieur et postérieur et des appendices, les bactéries quittent le vitellus, gagnent la cavité abdominale, où elles pénètrent dans

certaines cellules du tissu adipeux. Ces cellules se distinguent d'avance par leur noyau énorme et par la limpidité de leur protoplasme. Les bactériocytes s'enfoncent alors dans la profondeur du corps adipeux, s'y accroissent et se multiplient par amitose. HEYMONS pense qu'il pourrait s'agir d'un mouvement actif de la part des bactéries.

Le nombre de ces micro-organismes double en dix jours chez l'embryon et la larve jeune. Dès le stade de la maturité de l'insecte, et jusqu'à sa mort, il diminuera, sauf dans les ovaires.

Quant à la forme de ces symbiotes, elle peut varier. Ils sont beaucoup plus longs chez les adultes, et notamment chez les mâles, que chez les larves. D'après FRÄNKEL, leur longueur varie entre 1,6 et 9  $\mu$ . On trouve des formes ovoïdes, ou des bâtonnets plus ou moins longs, légèrement courbes, selon l'âge et selon l'état de nutrition de l'insecte. Ils prennent dans l'œuf la même forme courte, ovoïde, qu'ils ont lors de l'inanition de l'hôte. STEINHAUS, citant différents auteurs, indique qu'ils existent parfois aussi sous forme de courtes chaînettes. Leur endoplasme contient des vacuoles. L'inanition de la Blatte, ajoute-t-il, fait diminuer leur nombre et leur fait prendre une forme renflée aux extrémités. MERCIER prétendait qu'ils forment des spores, ce qui a été confirmé par GROPENGISSER, mais contesté par JAVELLY. TÓTH, en 1946, a signalé la présence de plusieurs formes différentes de symbiotes dans le corps adipeux d'un même individu. Les contradictions entre divers auteurs s'expliquent donc par cette variété de formes. GROPENGISSER (1925) suppose même que ce n'est pas toujours la même espèce qui vit en symbiose avec un hôte déterminé. Les bacilles peuvent d'ailleurs, comme il l'a constaté, être remplacés dans les bactériocytes par des levures.

#### B. NATURE DES CORPUSCULES DE BLOCHMANN.

La nature bactérienne de ces organismes a été longtemps contestée. CUÉNOT, PRENANT, BOUIN, MAILLARD, entre autres, les considéraient comme des produits du métabolisme. HENNEGUY les comparait à certains cristaux qui se trou-

vent parfois dans les tubes de Malpighi. SCHNEIDER les prenait pour des mitochondries. Mais BLOCHMANN, FORBES, MERCIER et bien d'autres se prononcent pour la nature microbienne des symbiotes, se basant pour cela sur leur examen microscopique, sur diverses expériences (culture des symbiotes, action d'antibiotiques, etc.) et sur des théories que nous examinerons plus loin.

MILOVIDOV (1928) et KOCH (1930) montrèrent que les corps de BLOCHMANN ne sont pas des mitochondries. Ces auteurs purent en effet colorer séparément symbiotes et mitochondries dans les bactériocytes. Ce ne sont pas non plus de simples produits du métabolisme, car on distingue en eux un ectoplasme, très colorable, un endoplasme, contenant des vacuoles et des granulations, et l'on voit même des divisions se produire (BUCHNER). WOLF, en 1924, décrit des micro-organismes symbiotiques à granulations, et d'autres qui en sont dépourvus (sans compter de petites bactéries en forme de grains, dans toutes les cellules du corps adipeux, mais qui sont sans rapport avec la symbiose). En 1927, NEUKOMM les colore à la safranine, au violet de gentiane, au liquide de Ziehl, au bleu de méthylène phéniqué, etc. Il traite des Blattes aux rayons UV. Au cours de toutes ces opérations, les symbiotes se comportent comme des bactéries. Enfin, GLASER les décrit, en 1930, de la manière suivante: « L'examen microscopique montre des organismes pléomorphes, semblables à des bactéries, que leurs caractères feraient placer dans le genre *Corynebacterium* (diphéroïdes): sans capsules, immobiles, ils sont Gram-positifs, non acido-résistants. Leurs dimensions vont de 2 à 5  $\mu$  de long sur 0,5 à 1  $\mu$  de large. On trouve des formes coccoïdes de 0,5 à 1  $\mu$  de diamètre, et également des formes de bourgeonnement. Dans les œufs et les embryons, les formes courtes ou coccoïdes se trouvent plus fréquemment que les autres. » (Traduction libre.) HOLLANDE et FAVRE (1931) donnent également une description de ces organismes.

Leur apparence sous le microscope et leur façon de se colorer, de même que leurs réactions à des agents extérieurs semblent donc bien indiquer qu'il s'agit de bactéries. Une preuve en est d'ailleurs fournie, me semble-t-il, d'une manière irréfut-

table, par une expérience intéressante que BRUES et DUNN firent en 1945: ils injectèrent de la pénicilline à des Blattes de grande taille, *Blaberus craniifer*, et constatèrent une forte diminution, voire la disparition complète des symbiotes. Quels autres organismes que des Bactéries auraient présenté une réaction aussi nette ? Citons en passant une autre expérience prouvant indirectement que les corpuscules de Blochmann sont des organismes distincts de leur hôte. NEUKOMM, en 1932, inocula à des lapins, d'une part du tissu adipeux débarrassé de ses symbiotes, d'autre part une suspension pure de « bactéroïdes » symbiotiques. Les sérum présentent alors des anticorps différents, ce qui prouve que les antigènes proviennent d'organismes différents.

Plusieurs auteurs affirment avoir cultivé sur milieu artificiel les bactéries symbiotiques de la Blatte. Mais nombreux furent ceux qui s'y sont vainement efforcés. MERCIER, le premier, annonça en 1906 la réussite d'une culture de ces bacilles — qu'il appela *Bacillus cuenoti* — sur bouillon, gélatine, gélose, pomme de terre glycérinée, lait. Une très vive réaction se produisit toutefois de la part de nombreux chercheurs qui crurent à une erreur d'interprétation. (JAVELLY, 1914; GLASER, 1920; HERTIG, 1921, etc.) NEUKOMM expliquait leur échec — il n'avait lui-même pas obtenu de culture — en disant que le milieu symbiotique est tellement complexe et spécial qu'un milieu artificiel ne peut en aucun cas convenir à des bactéries adaptées à la symbiose. Pourtant, en 1925, GROPENGISSER affirme à son tour avoir réussi cette culture sur agar nutritif, dans des conditions très semblables à celles de MERCIER. Plus récemment encore, GLASER (1930), qui en 1920 niait la possibilité de cultiver ces symbiotes, attribua tous les échecs précédents à un manque de persévérance de la part des chercheurs. Il avait en effet obtenu des cultures après repiquage des premiers milieux inoculés, sur un deuxième milieu. Il utilisait un mélange d'agar (10 p.), de sang défibriné de cheval (3 p.) et d'une solution de dextrose à 10% (2 p.). Il en conclut qu'il fallait aux bactéries un certain temps pour s'adapter aux milieux artificiels. Il baptisa le bacille *Corynebacterium periplanetae*. Mais là encore il y eut contestation. En 1937, GIER, ayant

échoué lui-même dans toutes ses tentatives, pensait que tous les résultats soi-disant positifs n'étaient dus qu'à des infections accidentelles. GUBLER (Zurich, 1947) a essayé à nouveau toutes les méthodes classiques pour cultiver ces symbiotes « *in vitro* » et « *in vivo* » sans y parvenir. Enfin, dernièrement, KELLER (1950) dit avoir réussi la culture des symbiotes de la Blatte sur un milieu d'agar-agar contenant de l'acide urique. Malgré une différence morphologique, la réaction sérologique semblait confirmer l'identité des organismes cultivés et des symbiotes. KELLER les nomma *Rhizobium uricophilum*.

S'il est donc difficile, à la seule lecture de ces rapports contradictoires, de se faire une opinion catégorique quant à la possibilité de cultiver les corps de Blochmann, on est au contraire en droit d'admettre avec certitude qu'il s'agit bien de bactéries. Tous les auteurs sont actuellement d'accord sur ce point.

### C. SYMBIOSE, COMMENSALISME OU PARASITISME ?

Cette présence de bactéries dans le corps adipeux des Blattes n'est pas pathologique. Les Blattes n'en souffrent nullement. Les cellules atteintes se modifient, certes, elles ne se divisent plus que par amitose, mais l'organe même n'est pas altéré. Le parasite est-il donc inoffensif ou l'hôte est-il immunisé ? S'agit-il d'un simple commensalisme ? Prenons en considération les critères de Ries (voir page 230). La première condition est incontestablement remplie : la présence des symbiotes est régulière. On ne trouve jamais de Blatte sans ces bactéries ni de bactéries de cette espèce ailleurs que dans une Blatte. D'autre part, je crois qu'on est en droit de considérer les bactériocytes des Blattes comme un organe spécifique. En effet, chez l'embryon, ces cellules se distinguent des autres par la grande dimension de leur noyau et la limpidité de leur protoplasme déjà bien avant leur infection par les symbiotes. Voilà donc le deuxième argument en faveur d'une symbiose. Qu'en est-il de la troisième condition ? Les Blattes n'ont pas d'organe spécial pour transmettre les symbiotes à leurs descendants ; nous ne savons pas si le mouvement des bactéries pendant l'infection des ovaires est autonome ou s'il est dû à une

action quelconque de l'insecte. Si l'hôte en est responsable, ne serait-ce que pour une part, la troisième condition est remplie. Mais ce point demeure incertain. Il s'agirait encore de savoir si les deux partenaires sont indispensables l'un à l'autre.

Que la vie des bactéries dépende totalement de cette symbiose ne fait en tout cas pas de doute. La peine qu'on a à les cultiver artificiellement le prouve suffisamment; de plus elles n'ont jamais été trouvées ailleurs dans la nature. Sans la réinfection constante des générations successives de l'insecte, cette espèce de bactéries aurait disparu. Toutefois l'insecte agit encore sur les bactéries d'une autre manière moins favorable. Il possède en effet un facteur antibactérien encore inconnu, qui empêche le nombre de symbiotes de dépasser une certaine limite; on a constaté que ce nombre est toujours proportionnel au poids de l'hôte au cours de son développement (BUCHNER, TÓTH). Mais cette action régulatrice n'est là que pour protéger l'insecte contre un envahissement général.

Il est en revanche très difficile de dire si l'insecte, à son tour, retire quelque avantage de la présence des symbiotes dans les cellules de son corps adipeux. Le meilleur moyen de le savoir serait de priver des insectes de leurs bactéries symbiotiques; à ma connaissance cela n'a encore été obtenu chez les Blattes que sur quelques individus. Cependant il est intéressant d'apprendre que chez d'autres insectes, tels que les Scarabées, par exemple (Koch), l'élimination des bactéries symbiotiques n'a aucun effet sur l'hôte, qui vit et se reproduit pendant au moins vingt-cinq générations. Des essais ont été faits pour «stériliser» des Blattes, pour les débarrasser de leurs symbiotes. BRUES et DUNN, notamment, procédaient à des injections de pénicilline. Nous avons déjà cité cette expérience. Lorsqu'ils arrivaient à faire disparaître complètement les bactéries, les Blattes mouraient peu après. Les deux auteurs en concluent que la présence des symbiotes est indispensable à l'hôte. Toutefois cette expérience n'est pas déterminante. Peut-être les insectes ne supportent-ils pas l'antibiotique lui-même et rien ne permet d'attribuer avec certitude les troubles constatés (liquéfaction de la graisse) à l'absence des bactéries. D'ailleurs ces essais n'ont été faits que sur un très petit nombre d'individus.

La chaleur a été utilisée avec plus de succès par GLASER (1946). Nous en parlerons en détail plus loin.

Sans savoir encore si l'hôte peut se passer de ses symbiotes, nous allons voir quel rôle physiologique divers auteurs ont pensé pouvoir attribuer à ces derniers.

#### D. RÔLE PHYSIOLOGIQUE DES BACTÉRIES SYMBIOTIQUES.

Les hypothèses qui ont été faites quant à la fonction des symbiotes intracellulaires sont variées. A ma connaissance, le nombre d'expériences probantes effectuées à ce sujet sur les Blattes est fort restreint. De toute façon, nous serons obligés, pour examiner ce problème, de nous adresser à d'autres groupes d'insectes, sans oublier pour autant qu'il s'agit peut-être d'une tout autre symbiose.

1. A cause de leur place, à l'intérieur et autour des gonades, et grâce à certaines observations, on a cru pouvoir attribuer aux bactéries symbiotiques un rôle dans les *fonctions reproductrices*. On constate, en effet, que dans la génération sexuée du puceron *Pemphigus*, le mâle n'a pas de symbiotes, et que la femelle n'en a que juste assez pour infecter son unique œuf. ASCHNER et RIES (1932-34) ont fait des expériences sur des poux qu'ils privaient de leurs symbiotes, soit en extirpant le mycétome, soit en faisant subir à l'œuf une centrifugation. Ces animaux « stérilisés »<sup>1</sup> vivaient moins long-temps et leur pouvoir de reproduction diminuait. Les femelles opérées après l'infection de leur ovaire se comportaient en revanche tout à fait normalement. Les mâles, qui perdent une partie de leurs symbiotes après la troisième mue, supportaient mieux l'absence de leurs mycétomes. Une injection intrarectale d'extrait de levure atténuait les conséquences de l'intervention.

Quoi qu'il en soit, est-il permis par analogie avec ce cas, de supposer que chez la Blatte aussi, les bactéries symbiotiques ont une influence sur la reproduction ? Les expériences que GLASER a publiées en 1946 appuient pleinement cette hypothèse. Chez toutes les Blattes femelles que l'auteur avait

<sup>1</sup> Nous emploierons toujours le mot « stérilisé » dans le sens de « exempt de bactéries symbiotiques ».

débarrassées de leurs symbiotes par un séjour prolongé à une température élevée (39°) ou par des injections d'antibiotiques, les ovaires étaient atrophiés. Pour le reste, les femelles ne semblaient nullement souffrir de l'absence des bactéries. Chez les mâles, aucune altération n'était perceptible. (Voir p. 288 les réserves qu'il convient de faire au sujet de ces expériences.) Chez d'autres insectes tels que *Pseudococcus citri* (selon FINK), la « stérilisation » entraîne des pontes stériles.

2. Les insectes ont besoin de vitamines, celles du complexe B, et de certains facteurs de croissance, pour pouvoir se développer normalement. Toutefois, ces besoins varient d'un groupe à l'autre. Si *Tribolium*, *Ptinus* et bien d'autres ne peuvent se passer, dans leur nourriture, des cinq principaux facteurs du complexe B (thiamine, riboflavine, acide nicotinique, pyridoxine, acide pantothénique), *Sitodrepa*, *Orizaephilus*, *Lasioderma*, par exemple, se développent facilement en l'absence d'une ou de plusieurs de ces substances (sauf la thiamine, indispensable à tous les insectes). Or les expériences que KOCH, FRÄNKEL et BLEWETT, PANT et FRÄNKEL ont faites de 1933 à 1950 ont montré que des larves de *Lasioderma* et *Sitodrepa*, sitôt privées de leurs symbiotes, cessent tout développement s'il leur manque une seule de ces vitamines. La croissance des insectes reprend dès qu'on leur réinocule des symbiotes. On peut même faire un échange de symbiotes entre les différentes espèces, leur fonction subsiste. L'absence des symbiotes peut être compensée en partie tout au moins par une adjonction de levure dans la nourriture. Chez *Coptosoma*, la croissance ne se fait de toute manière qu'en présence des symbiotes. D'après les études de BECKER, le développement des larves de *Hylotrypes*, xylophage sans symbiotes, dépend beaucoup plus de la teneur du bois en protéines et en vitamines B que celui des larves de xylophages porteurs de symbiotes. Les insectes piqueurs, suceurs de sang ou de sève, ne trouvent pas dans leur alimentation une dose suffisante de vitamines. Force est d'attribuer à leurs symbiotes la mission de fournir les substances indispensables.

En ce qui concerne les Blattes, NOLAND, LILLY et BAUMANN (1949) ont étudié de manière systématique leurs besoins en

vitamines. Ils comparaient des animaux élevés avec une nourriture complète à des séries dont la nourriture manquait d'une certaine vitamine. Si le développement des deux séries comparées était identique, ils concluaient que la vitamine en question n'était pas nécessaire aux insectes, c'est-à-dire que les symbiotes la leur fournissaient. C'est ainsi que ces auteurs établirent que les symbiotes ne produisent en tout cas pas de choline, d'acide pantothénique ni d'acide nicotinique. Toutefois, les Blattes peuvent transformer de la bétaïne en choline. Les symbiotes produisent de la pyridoxine, de la thiamine, de la riboflavine. En effet, les insectes se passent de ces substances dans leur nourriture quoique leur développement se fasse alors plus lentement. Ils se passent de biotine et d'acide folique, substances qui sont indispensables à tous les insectes sans symbiose ou à ceux qu'on a privés de leurs symbiotes. On peut donc supposer que les symbiotes les produisent en quantité suffisante. En revanche l'inositol, la vitamine K et l'acide p-amino-benzoïque seraient inutiles à tous les insectes. Mais aucune de ces expériences n'a été faite sur des Blattes privées de symbiotes, ce qui serait le seul critère absolu.

3. SCHANDERL, en 1941, disait des levures symbiotiques qu'elles ne produisent pas seulement des vitamines, mais qu'elles assimilent encore l'azote moléculaire de l'atmosphère. Elles auraient ainsi une fonction analogue à celle de l'*Azotobacter* des Légumineuses qui capte l'azote atmosphérique et qui fait la synthèse des protéines nécessaires à son hôte. Cette comparaison a souvent été faite. Il faut reconnaître qu'il y a des analogies étonnantes entre les symbiotes des Légumineuses et ceux des Insectes. PEKLÓ, en 1912, plaçait ceux des Aphidiens dans le groupe de l'*Azobacter*. Il retrouva en 1946 cette même bactérie en symbiose avec le Bostryche (*Ips typographus*). Son rôle serait aussi, selon PEKLÓ, de capter l'azote atmosphérique et de faire la synthèse des protéines. En 1915 déjà, CLEVELAND pensa que les Insectes fabriquent eux-mêmes leurs protéines. De nombreux Insectes, en effet, se nourrissent de substances dépourvues d'azote ou ne contenant qu'une quantité de protéines nettement inférieure à leurs besoins. Cela ne concerne évidemment pas les Blattes, omnivores, qui

trouvent dans leur nourriture une surabondance de protéines. La présence des symbiotes n'est-elle donc indispensable que lorsque l'alimentation de l'hôte est pauvre en substances azotées ?

TÓTH, dans ses récents travaux, a cherché à démontrer cette assimilation d'azote par les symbiotes. Selon BUCHNER, dit TÓTH, l'endosymbiose bactérienne semble être en rapport avec une nutrition incomplète de l'hôte. En fait, tous les insectes xylophages ont des symbiotes<sup>1</sup>. Or, ils trouvent dans leur nourriture une quantité insuffisante de protéines, et au surplus en rejettent une partie avec leurs matières fécales. D'autre part, leur quotient respiratoire, qui devrait être de 1 environ pour ce régime presque essentiellement glucidique, se trouve être en réalité de 0,86, ce qui indiquerait la présence de protides dans le métabolisme.

Les grands Flagellés de la flore intestinale des Termites procèdent à la décomposition de la cellulose (les Termites se nourrissent essentiellement de bois). Mais pour la transformer ensuite en acides aminés, il faut une source d'azote. L'accès de l'air vers les mycétomes ou les lobules du corps adipeux étant toujours assuré par un abondant réseau de trachées, les conditions seraient remplies pour que les symbiotes en captent l'azote. Reste à savoir s'ils en sont capables. BECKER a publié en 1943 des expériences qui appuient cette hypothèse. Les larves d'un Coléoptère, *Ergates faber*, porteuses de symbiotes, se passent d'albumines dans leur nourriture. De même celles d'un genre voisin, *Leptura*. Au contraire, celles de *Hylotrupes*, qui, lui, est dépourvu de bactéries symbiotiques, ne supportent pas cette carence. Certaines larves d'Anobiidae, d'autre part, présentent le même caractère.

TÓTH compare les symbiotes aux bactéries de la panse des Ruminants, qui peuvent, en culture artificielle, capter l'azote atmosphérique. Il se réfère ensuite aux cultures que MERCIER et GROPENGIESER disent avoir faites des bactéries symbiotiques de la Blatte. Selon ces deux auteurs, les symbiotes peuvent être cultivés sur des milieux exempts d'azote; les

<sup>1</sup> Remarquons que BECKER cite *Hylotrupes* comme xyloophage sans symbiotes.

milieux se chargent alors peu à peu de cet élément. Les bactéries assimileraient donc l'azote de l'air et le rendraient sous forme d'un composé à leur milieu. GROENGIESER précisait que la proportion d'azote atteignait toujours environ 3 mg/100 ml du milieu, mais ne dépassait jamais cette marge, même si le milieu en contenait déjà précédemment. Mais TÓTH n'a jamais effectué ces cultures lui-même. En revanche, il a pris des mycétomes de toute une série d'insectes, et les a maintenus en survie « *in vitro* » avec leurs symbiotes. Par la méthode micro-analytique de Kjeldahl, il mesurait à intervalles réguliers la quantité d'azote présente dans l'organe. L'action d'un « catalyseur », tel que les acides oxalo-acétique, fumrique ou succinique était indispensable à l'assimilation d'azote. Cette méthode me semble critiquable. Elle présente de nombreux inconvénients, notamment du fait que l'asepsie est très difficile à garder. Les conditions aussi sont bien différentes dans un liquide physiologique artificiel et « *in situ* ». D'autre part, si une augmentation de l'azote est constatée, est-elle vraiment due aux symbiotes ? Enfin le système en survie contient une forte proportion de composés azotés (de même que le milieu intérieur de l'insecte !), surtout en ce qui concerne le corps adipeux chargé d'acide urique. Or, d'après ce que nous venons de voir, les bactéries symbiotiques ne capterait plus d'azote si le milieu en est richement pourvu (3 mg/100 ml). En 1948, TÓTH et ČSÁKY constataient même une perte d'azote dans les mycétomes en survie. Il y aurait libération d'azote gazeux ou d'un composé simple, mais jamais d'ammoniaque<sup>1</sup>.

La mise en survie de tissu adipeux s'avère donc inutilisable pour résoudre ce problème. Des mesures barométriques dans des récipients d'élevage fermés n'ont pas davantage indiqué une absorption d'azote atmosphérique. La pression baisse, mais la proportion d'azote reste constante ou ne diminue que très faiblement. SMITH, (Cambridge 1948), a tenté de suivre l'assimilation d'un isotope de l'azote: N<sup>15</sup>. Cette expérience, particulièrement intéressante, n'a donné que des résultats négatifs. Ce même auteur, qui a tenté de reproduire les expériences de

<sup>1</sup> TÓTH contredira plus tard cette dernière affirmation.

TÓTH, conteste aussi tout gain d'azote dans les milieux de culture. Enfin, il pense que, contrairement à l'opinion exprimée par TÓTH, les sucs végétaux contiennent une quantité bien suffisante de composés azotés pour la nutrition des insectes (il se réfère pour cela à l'analyse du liquide des tubes criblés du cotonnier, effectuée par MASKELL et MASON). C'est certainement le cas, sinon pour les protéines, du moins pour les acides aminés. Enfin, CHAUVIN et NOIROT ont élevé des Termites dans une atmosphère où l'azote était remplacé par de l'argon, sans que les symbiotes (il s'agit toutefois de la flore intestinale) en soient affectés.

D'ailleurs, à la suite de ces échecs, TÓTH admet que l'aptitude des bactéries à capter l'azote ne doit guère jouer de rôle dans la symbiose, et il élargit son hypothèse: les bactéries, pense-t-il, seraient les agents d'un cycle de l'azote dans le corps de l'insecte. Elles contribueraient à récupérer l'azote des substances de déchet et à reconstituer des protéines au moyen de cet azote. Précisons davantage.

4. Les bactéries symbiotiques produiraient une uréase, ferment décomposant l'urée par hydrolyse, pour en former de l'ammoniaque et du gaz carbonique. ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$ .) En effet, lors d'expériences où TÓTH maintenait des symbiotes dans des tissus en survie en présence d'urée ou d'acide urique, ces cultures dégageaient de l'ammoniaque; ce phénomène cessait après élimination des bactéries par filtration. Les symbiotes assimileraient alors eux-mêmes cet ammoniaque pour fabriquer les acides aminés, les peptides puis les protéines de leur propre protoplasme. Ce sont enfin les bactéries mortes qui, absorbées par l'organisme de l'insecte, restitueraient à celui-ci, sous forme des protéines de leur protoplasme, les substances de déchet récupérées. Certains symbiotes, cultivables sur milieu sans azote, dégradent les composés azotés (peptone, sulfate d'ammonium, urée, acide urique) si l'on ajoute ces produits au milieu. On constate d'abord, dit TÓTH, une forte synthèse de protéines plasmatiques des bactéries, puis un dégagement d'ammoniaque. Des bactéries symbiotiques de Termites et de Fourmis, même mortes, agissent encore par leur uréase.

Toujours selon TÓTH, cela permettrait de comprendre deux faits: d'abord la fréquente localisation de symbiotes dans les tubes de Malpighi, ensuite l'absence des tubes excréteurs chez certains insectes, notamment les Pucerons, dont les mycétomes serviraient en quelque sorte de reins. Les cellules animales ne synthétisent jamais d'enzymes qui puissent éliminer les produits d'excrétion. Cette tâche incomberait tout naturellement aux micro-organismes symbiotiques. Les recherches que SCHNEIDER, élève de Koch, a faites sur les symbiotes de *Mesocerus marginatus* lui ont effectivement montré qu'en culture artificielle ils décomposent l'acide urique<sup>1</sup> en ammoniaque et CO<sub>2</sub>. KOCH pense qu'il n'y a pas de raison pour que cela se passe autrement « *in vivo* ». Il est probable que dans ce processus l'élimination des déchets a plus d'importance que la récupération de l'azote, en tout cas en ce qui concerne les Blattes.

Par ailleurs, on trouve des symbioses bactériennes de l'organe excréteur chez d'autres animaux, notamment le Lombric, la Sangsue, le gastéropode *Cyclostoma*. Mais la fonction peut en être fort différente.

5. Que l'on suppose chez les symbiotes une production de vitamines ou de facteurs de croissance, une assimilation de l'azote atmosphérique, une récupération des composés azotés, ou que l'on considère la présence des symbiotes comme inutile, le fait est certain que les nombreux corps bactériens résorbés par l'organisme de l'insecte après leur mort lui sont un a p p o r t n o t a b l e d e p r o t é i n e s . En effet, FINK trouve sur des frottis d'organes prélevés sur des insectes de tout âge une proportion de 46,7% de bactéries en dégénérescence et de 53,3% en voie de multiplication. Une récente expérience de GRAEBNER citée par BUCHNER est plus spectaculaire. Il s'agit de l'observation de symbiotes de *Ernobia* et de *Rhagium* selon la méthode de STRUGGER. Après coloration par une solution très diluée d'acridine orange, le protoplasme vivant se voit vert clair au microscope à fluorescence, alors que le protoplasme mort y apparaît rouge vif. Dans les mycétomes que GRAEBNER a examinés ainsi, une partie des cellules ne contiennent que des

<sup>1</sup> Il s'agirait donc d'une « uricase ».

levures mortes. Plus rarement, il trouvait quelques levures mortes parmi les vivantes.

6. BUCHNER, à la fin de son chapitre sur la symbiose des Blattes, attire l'attention sur le fait que les bactéries symbiotiques produisent, outre une uréase, encore une lipase. Selon FINK, celles de *Pseudococcus citri*, *Corynebacterium dactylopis*, qui vivent dans un mycétome séparé de l'intestin, fabriquent encore bien d'autres f e r m e n t s : une désaminase des acides aminés; des enzymes de transamination; une desmolase, car elles attaquent aussi les monosaccharides. D'ailleurs, selon la concentration d'azote dans le milieu, les fermentes destructeurs des sucres peuvent diminuer en faveur des désaminases. Il semble, conclut Koch qui rapporte ces faits, que l'on soit en présence d'un « système adaptatif de fermentes » (adaptatives Fermentensystem), selon l'expression de VIRTANEN.

7. WIGGLESWORTH propose encore une autre hypothèse: les symbiotes produiraient un a n t i b i o t i q u e qui préserverait l'hôte de toute infection par d'autres microbes. *Actinomyces rhodnii*, symbiose intestinal d'un insecte piqueur, *Rhodnius*, sécrète des substances antibiotiques. En fait, on ne constate dans l'intestin de *Rhodnius* la présence d'aucun autre micro-organisme.

#### E. RÉSUMÉ ET CONCLUSION DE L'ÉTUDE THÉORIQUE.

La symbiose bactérienne intracellulaire des Blattes est donc déjà bien connue. Nous pouvons affirmer que les corpuscules de Blochmann sont des bactéries; qu'on ne les trouve jamais à l'état libre, ni chez aucun hôte différent; que les Blattes en ont toutes, et cela dans toutes les espèces du genre. Mais leur nombre est limité chez chaque individu à une proportion précise. Il existe dans le corps adipeux de ces insectes des cellules spéciales, spécifiques, les bactériocytes, qui hébergent les symbiotes. Les bactériocytes s'approchent des ovaires et les bactéries pénètrent dans les ovocytes de l'insecte, assurant ainsi la survie de leur espèce chez ses descendants. Peut-on parler là d'un système de transmission propre à l'insecte et spécialement adapté à sa fonction ? De toute manière cette

association a toutes les apparences d'une symbiose vraie. Mais dans une symbiose vraie, il y a action réciproque des deux partenaires; l'association est indispensable à l'un comme à l'autre. Or nous ne savons pas d'une manière certaine si dans le cas des Blattes la présence des bactéries est utile à l'insecte.

C'est une symbiose très ancienne. Ne peut-elle avoir perdu son utilité et n'avoir subsisté que grâce à l'inaffabilité de son système de transmission interne ? Ne faudrait-il pas rechercher ce qu'a pu être le rôle de cette symbiose, plutôt que chez les Blattes, chez leur ancêtre du Carbonifère ? Certaines symbioses sont en régression. Ne sommes-nous pas devant un cas semblable ? Il est de nombreux exemples d'associations inutiles entre insectes et micro-organismes. L'espèce *Calandra granaria*, ainsi que l'a montré MANSOUR, a une race qui possède des symbiotes et une autre, la variété *aegypta* vivant en Egypte, qui n'en a pas et qui s'en passe fort bien. KOCH a privé certains insectes, des Scarabées, de leurs symbiotes sans pouvoir constater de différence dans leur comportement ou leur biologie à la suite de cette intervention. Il est vrai que de nombreux auteurs, et KOCH lui-même, ont fait des expériences semblables sur d'autres espèces, et ont obtenu un résultat opposé. Qu'en est-il chez les Blattes ?

Les expériences de GLASER permettent de considérer comme presque certaine l'action des symbiotes dans les fonctions de reproduction de l'Insecte femelle. Celles de HOLMAN, LILLY et BAUMANN font fortement présumer que les bactéries fournissent certaines vitamines à leur hôte. On peut être sûr en tout cas que ces micro-organismes constituent pour l'Insecte une source appréciable de protéines. D'où les microbes prennent-ils l'azote nécessaire à la synthèse de ces substances, dont est composé leur protoplasme ? Nous avons vu que c'est très probablement l'acide urique accumulé dans le corps adipeux de la Blatte qui leur sert de source d'azote. Enfin il n'est pas impossible que les bactéries symbiotiques produisent une sorte d'antibiotique évitant à l'Insecte une infection par d'autres microbes.

Ainsi, si certaines hypothèses sont à rejeter à la suite d'expériences négatives, telle l'idée de l'assimilation par les symbiotes de l'azote moléculaire de l'atmosphère, il faut en

revanche en retenir plusieurs autres. Les bactéries remplissent peut-être toutes ces diverses fonctions à la fois. C'est à cette conclusion qu'arrive BUCHNER à la fin de son ouvrage.

Je ne pense pas qu'il soit possible d'affirmer catégoriquement quoi que ce soit sans avoir réussi à privier des insectes de leurs partenaires, à déterminer l'insuffisance qui résulterait de cette absence, et surtout à remédier à la dite insuffisance par un traitement approprié. Mais c'est cela même qui, sur le plan expérimental, se heurte aux plus grandes difficultés.

C'est pourquoi je me suis donné comme tâche de tenter de réaliser la dissociation de cette symbiose.

---

## CHAPITRE 2

**Description des organes symbiotiques et des symbiotes.**

Nous voudrions montrer ici quelques figures qui permettent au lecteur de se faire une idée précise de la symbiose bactérienne intracellulaire des Blattes, mieux qu'à la seule lecture d'une description verbale. Ces images serviront en même temps de point de comparaison pour celles que nous donnons plus loin.

**A. COUPES DE CORPS ADIPEUX ET D'OVAIRES DE *B. germanica*.  
LOCALISATION DES SYMBIOTES.**

Les symbiotes sont groupés dans des cellules isolées, éparses, du corps adipeux de l'insecte, les bactériocytes (fig. 1).

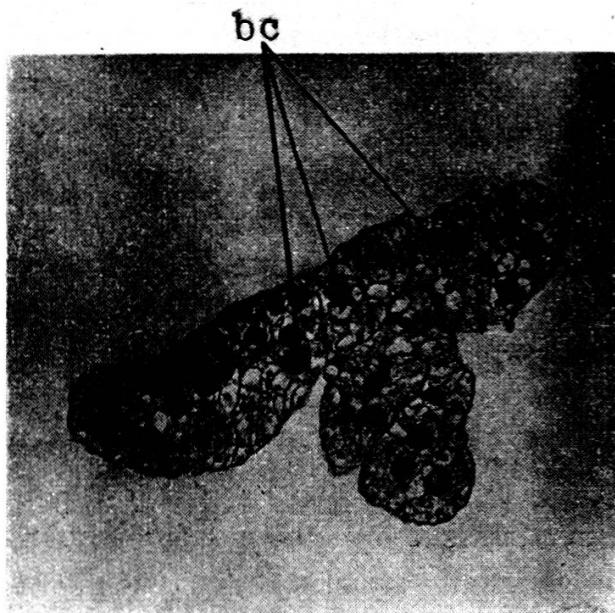


Fig. 1.

Lobule de tissu adipeux. Coupe montrant les bactériocytes (bc).  $\times 60$ .

Ces cellules, de forme variable, en général arrondie, souvent étoilée, ne contiennent, outre leur noyau, rien d'autre que des bactéries (fig. 2). Le noyau des bactériocytes est particuliè-

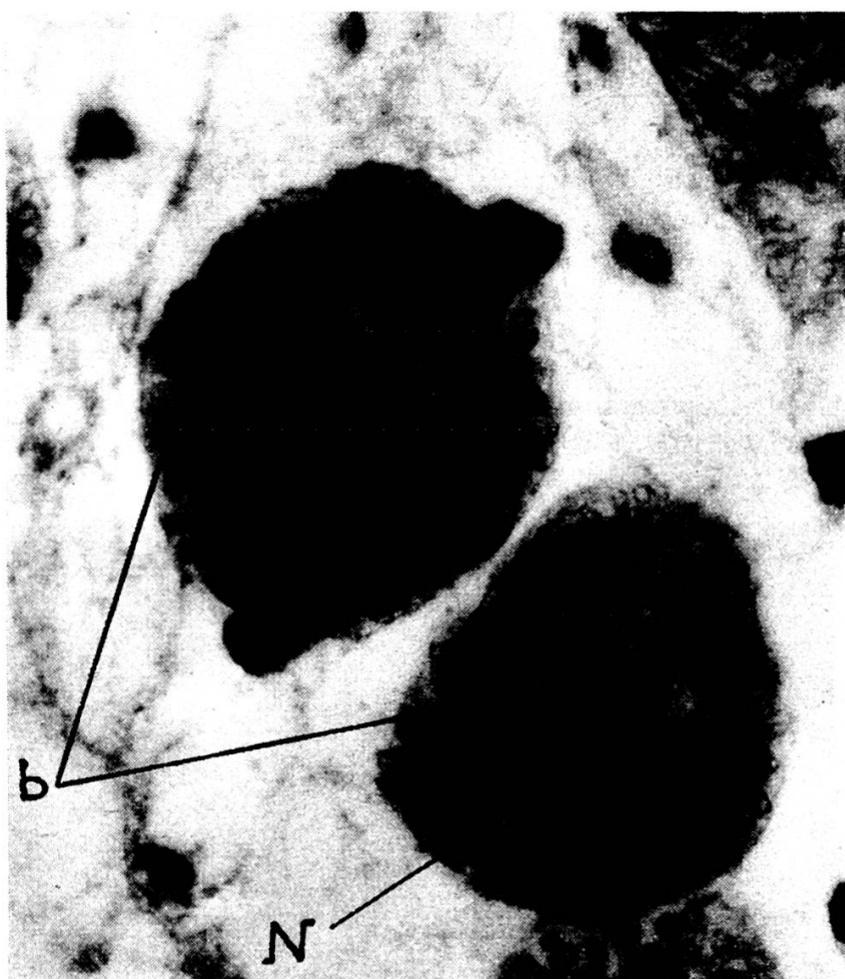


Fig. 2.

Deux bactériocytes.  
N: noyau; b: bactéries symbiotiques.  $\times 1000$ .

ment volumineux (fig. 2). Il arrive assez fréquemment qu'on trouve deux noyaux dans un bactériocyte. Cet état précède sans doute une division amitotique de la cellule (fig. 3).

Les auteurs, FRÄNKEL notamment, parlent d'une disposition en ligne des bactériocytes à l'intérieur des lobes adipeux chez la plupart des Blattes, entre autres *P. orientalis* et *B. germanica*. Je n'ai jamais pu retrouver un alignement quelconque de ces cellules chez ces deux espèces (fig. 1).

On trouve des bactériocytes au voisinage immédiat de l'ovaire, et d'autres à l'intérieur même de cet organe,

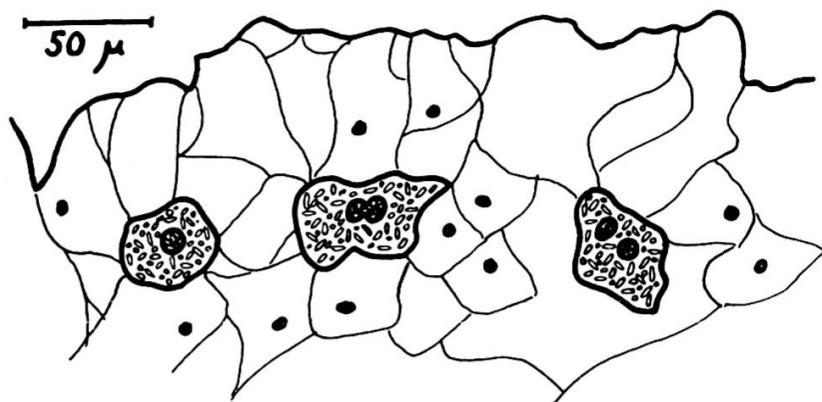


Fig. 3.

Division amitotique du noyau des bactériocytes,  
Trois stades successifs.

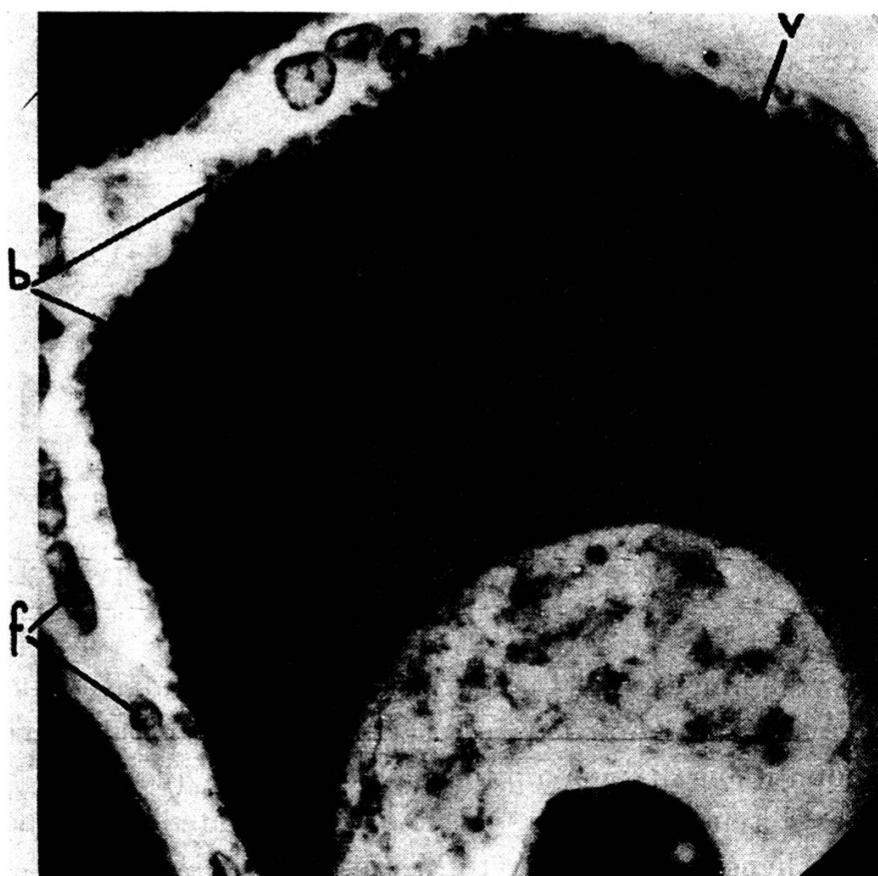


Fig. 4.

Couche de bactéries symbiotiques à la surface d'un ovocyte.  
v: vitellus; b: bactéries; f: noyau des cellules folliculaires.

serrés entre les tubes ovariens. A l'intérieur des tubes ovariens, les symbiotes tapissent la surface des ovocytes d'une certaine dimension (fig. 4). Les petits ovocytes ne sont pas infectés. La figure 5 montre dans un tube ovarien

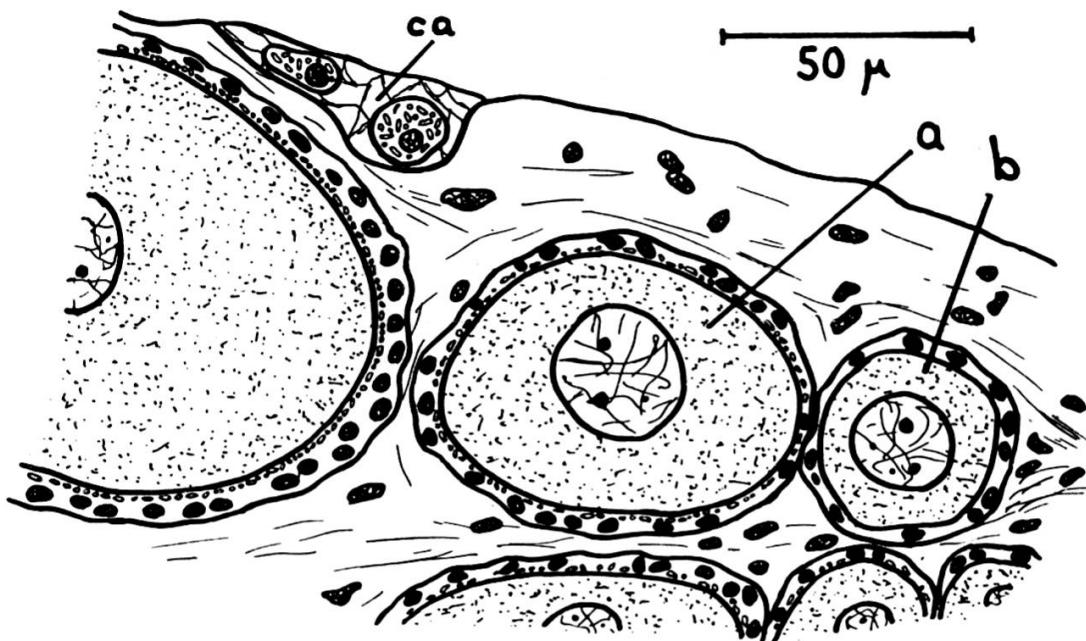


Fig. 5.

Ovocyte de  $70 \mu$  (a) avec bactéries, et ovocyte de  $35 \mu$  (b) sans bactéries.  
c.a.: lobule de corps adipeux incrusté dans la paroi de l'ovaire.

un ovocyte de  $70 \mu$  qui présente, sous ses cellules folliculaires, une mince couche de symbiotes, à côté d'un autre, de  $35 \mu$ , qui en est encore exempt.

L'étude histologique de l'évolution des symbiotes au cours de l'embryogénie de la Blatte a été faite par KOCH (voir p. 238 et 239). Elle sort du cadre de ce travail.

#### B. FROTTIS DE CORPS ADIPEUX. EXAMEN DU SYMBIOTE.

Un frottis effectué au moyen d'un broyat d'organe disperse à tel point les symbiotes que leur recherche sur la préparation est fastidieuse, et leur étude presque impossible. Lorsque, au contraire, on procède par apposition d'un fragment d'organe sur la lame de verre, on laisse sur celle-ci une véritable image de la surface de section qui l'a touchée. On obtient ainsi

des « empreintes » dans lesquelles les bactériocytes ont abandonné à leurs emplacements respectifs des amas de symbiotes (fig. 6) que l'on peut examiner aisément.

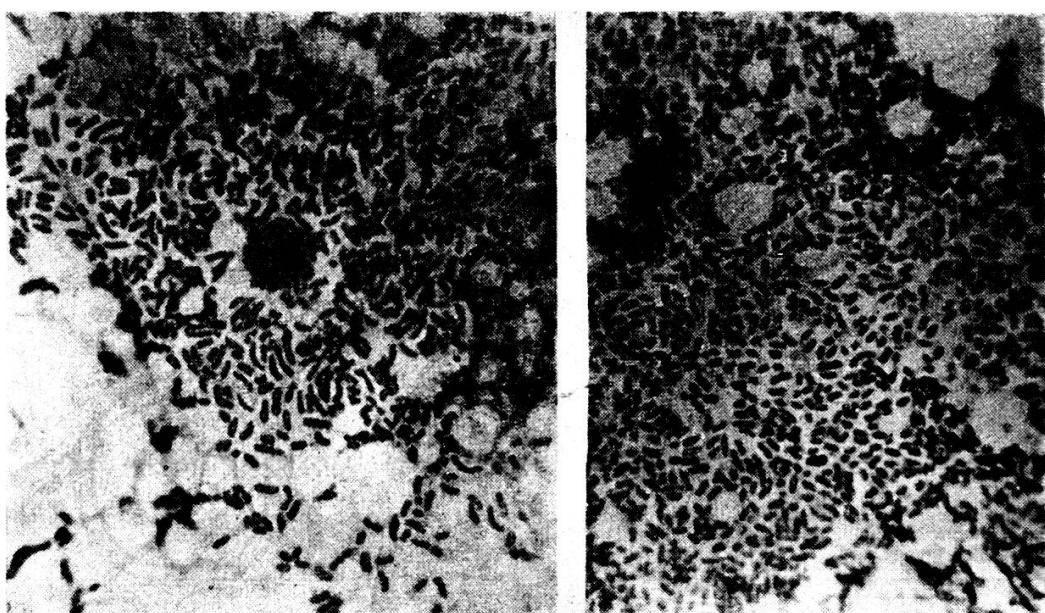


Fig. 6.

Frottis par apposition. Traces laissées par des bactériocytes. A gauche: symbiotes d'une Blatte ♀ adulte; à droite: ceux d'une larve.

Comme fixateurs j'ai employé, pour les frottis courants, la chaleur (passage dans la flamme d'un bec Bunsen), pour des études détaillées, l'alcool, le picro-formol acétique de Bouin, les vapeurs de formol (30 min. à 3 heures) et les vapeurs osmiques (20 secondes). Les colorations furent faites au moyen de fuchsine de Ziehl diluée ou concentrée, de bleu de méthylène, de bleu de toluidine, de violet de gentiane, d'hématoxyline ferrique, de panchrome de Laveran; la recherche de spores par la coloration de Zetti (éosine-lugol phéniquée et bleu de méthylène alcoolique) et le Ziehl décoloré par l'acide nitrique.

Les symbiotes sont des bactéries de très grande dimension. En forme de bâtonnets, ils ont une longueur très variable, allant de 1,5 à 9  $\mu$ . Leur épaisseur, de 1  $\mu$  en moyenne, peut varier de 0,8 à 1,5  $\mu$ . Ils sont souvent légèrement arqués. Leurs bouts sont arrondis. Les formes très courtes peuvent être tout à fait sphériques, coccoïdes.

C'est dans les ovocytes et chez les jeunes larves qu'on trouve les formes les plus courtes (fig. 6 à droite), alors que les insectes

adultes présentent dans leur corps adipeux des bactéries longues (fig. 6 à gauche). Nul doute que l'intense multiplication des symbiotes chez les insectes jeunes soit la cause de leur petitesse. On observe, en effet, déjà la division de cellules d'à peine  $3-4 \mu$ .

Cette division a lieu par un étranglement transversal à un niveau quelconque de la bactérie (fig. 7a). Parfois le symbiose se rompt par une cassure transversale, nette et rectiligne. Le niveau de cette rupture est également variable (fig. 7b).

Presque toutes les colorations révèlent une ou deux, parfois trois zones claires dans le corps bactérien, séparées par des bandes opaques (fig. 6 et 7). Lors d'une division, chaque partie reçoit au moins une de ces zones claires.

Parfois le contraste est si net qu'on pourrait croire à la présence d'une spore. Toutefois, aucune coloration caractéristique n'a jamais pu mettre des spores en évidence; d'autre part, le violet phéniqué ne fait pas apparaître ces zones claires.

Les symbiotes sont Gram-positifs, non acido-résistants. Ils se colorent aisément par tous les colorants bactériologiques ordinaires, mais plus intensément sur les frottis que sur les coupes.

Une étude plus poussée de la structure interne des symbiotes fera l'objet d'un travail spécial.

#### C. EXAMEN DES SYMBIOTES AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE.

(Fait au Centre de microscopie électronique de l'Institut de physique de l'Université de Genève. Directeur: M. E. KELLEN-BERGER, P.-D.)

Les microphotos électroniques des symbiotes de la Blatte confirment ce qu'indique la microscopie ordinaire. On voit des figures de division, et parfois les zones claires. Aucune ciliation n'est décelable; il ne semble pas qu'il y ait une capsule.

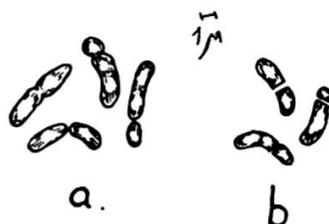


Fig. 7.

Division des symbiotes.  
a) par étranglement;  
b) par cassure.

Ces préparations ont été faites par « filtration sur agar » d'une suspension de symbiotes provenant d'un broyat centrifugé de corps adipeux. Un prochain travail fera état d'essais effectués par d'autres méthodes.

---

## CHAPITRE 3

**Isolement du symbiose.**

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 symbiose, 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 préférerais ne pas m'attarder aux cultures et tenter l'isolation des symbiotes par d'autres expériences.

La première partie de ce troisième chapitre est consacrée à ces essais de cultures sur milieux gélosés, à l'acide urique ou à l'extrait d'organes symbiotiques; la deuxième à des greffes d'organes symbiotiques (corps adipeux ou ovaires) sur d'autres insectes. Les résultats de ces deux séries d'expériences nous incitèrent à faire des transplantations 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 épingle 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<sup>3</sup> 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 pince 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  $5 \mu \times 1 \mu$ , 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 pepsone, 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 procépais par « touches », comme pour les fragments de corps adipeux, en terminant par une trainée 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<sup>3</sup> de ce liquide avec 8 cm<sup>3</sup> 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 symbiose, 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  $\text{CO}_2$ ; s'occuper du facteur redox, etc. C'est un travail de longue haleine, car les conditions de vie du symbiose 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 <sup>1</sup>	16	0	14	2	2	0	2	0

<sup>1</sup> 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<sup>1</sup>. 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 procépais:

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 ovariens, étaient

<sup>1</sup> 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-greffé. 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-greffé. 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-greffé. 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 planter 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 aéritaires, 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 imaginaire. 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 *Lucanuses* (*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 *Grylliides*, des *Acridiens*, des *Locustides*. Là encore, les insectes porteurs de greffes ne vivaient très souvent pas au-delà du 5<sup>e</sup> 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

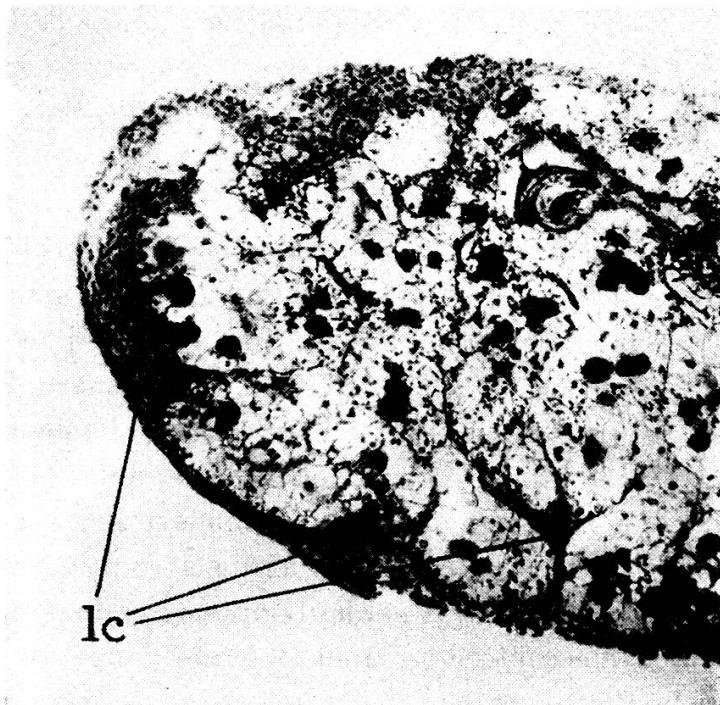


Fig. 8.

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

origine des bactéries ou des spores libérées par la lésion inévitale 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 adipex 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 turgescents. 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:

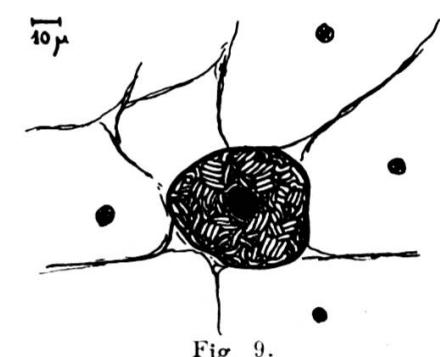


Fig. 9.

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

quatre jours après l'implantation, aucun symbiose n'est plus visible à la surface des ovocytes, lesquels sont au contraire couverts et souvent pénétrés par les lymphocytes du porte-greffé.

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 rata-tinés, opaques.

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.

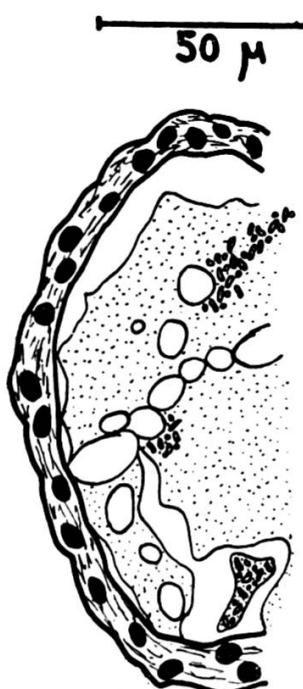


Fig. 11.

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



Fig. 10.

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

*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-greffé 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-greffé. Dans des délais variables, on voit les symbiotes s'agglutiner, perdre leur colorabilité. Les bactériocytes sont réduits souvent très tôt à

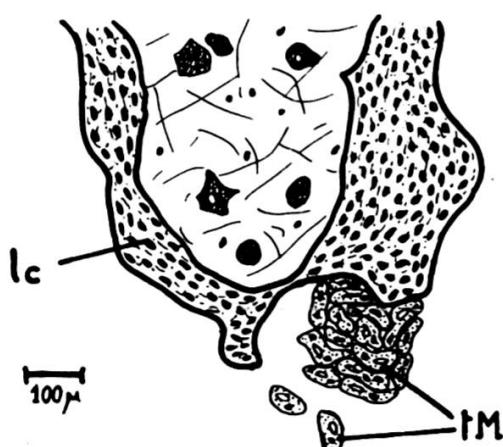


Fig. 12.

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

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-

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 symbiose 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'hémolymphé, car on voit parfois du tissu implanté dégénérer sans aucune action visible de la part du porte-greffe<sup>1</sup>.

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

<sup>1</sup> 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<sub>2</sub> 0,025 g, NaHCO<sub>3</sub> 0,02 g, dextrose 0,25 g, eau dist. 90 cc.

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-

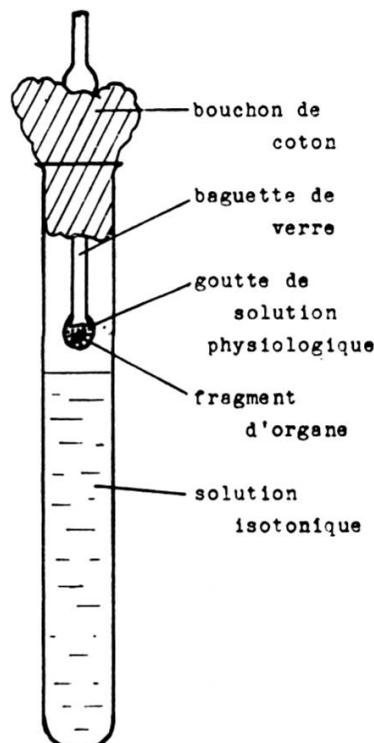


Fig. 13.

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

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 ovariens 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).

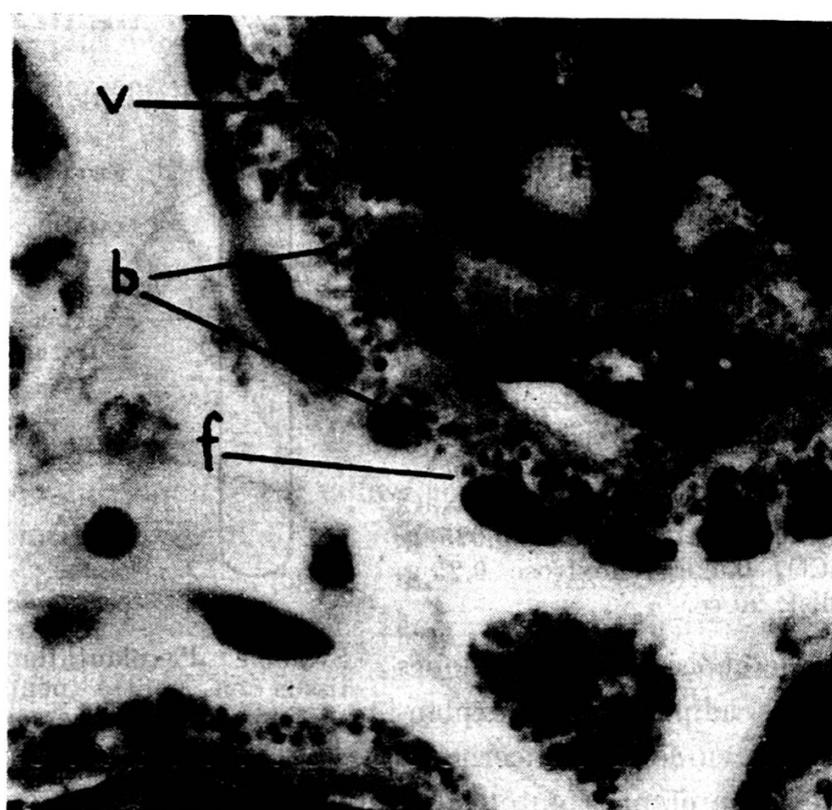


Fig. 14.

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 dégénérerait.

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<sup>1</sup>. 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

<sup>1</sup> 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 considérerai 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 micro-organismes 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 turgescents; 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:

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

<i>e</i> (tissu peut-être vivant, symbiotes morts):	0
<i>f</i> » 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 14<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour, les 8 autres au-delà du 25<sup>e</sup> jour, dont les 3 derniers le 34<sup>e</sup> 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 14<sup>e</sup> jour, 1 corps adipeux jusqu'au 21<sup>e</sup> jour, et 2 jusqu'au 28<sup>e</sup> 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 7<sup>e</sup> 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

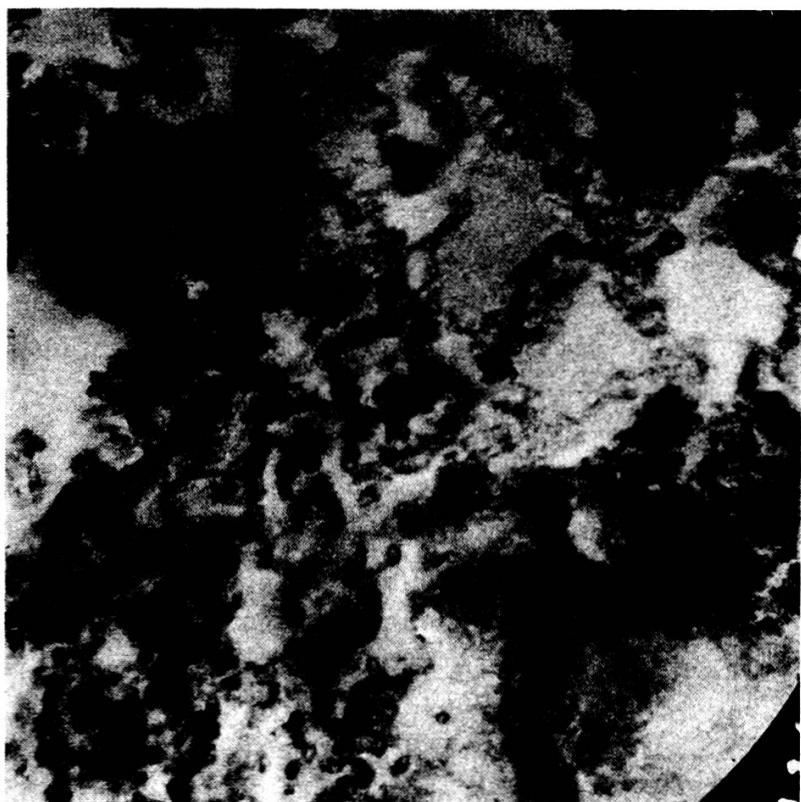


Fig. 15.

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 symbiose, il n'aurait pu s'agir que d'une exception, d'un mutant. Or, si la culture du symbiose 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 symbiose 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 symbiose. 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
<i>a</i>						2								2 (2)	2 (2)
<i>b</i>				1	1		2	2	1	3			4 (4)	6 (0)	10 (4)
<i>c</i>	1		3	1		1	1	1	1				6 (1)	3 (2)	9 (3)
<i>d</i>			1		4				1		1	1	7 (1)	1 (0)	8 (1)
<i>e</i>															
<i>f</i>				1	1		3				1		5 (1)	1 (0)	6 (1)
<i>g</i>					1				1				1 (1)	1 (1)	2 (2)
<i>h</i>	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
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>	
Agar, acide urique . . .	2	4	1	1					12
Agar, acide urique, peptone		1	6						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 milieux sucrés (catégories *d* et *f*).

## CHAPITRE 4

**Isolement de l'hôte.**

Chez de nombreuses espèces d'insectes vivant en symbiose avec des bactéries, il est relativement aisé d'obtenir expérimentalement des individus, et même des générations, des souches entières, dépourvus de symbiotes. C'est que très souvent la transmission des bactéries de l'insecte mère à ses descendants se fait par un mécanisme externe, c'est-à-dire que l'animal n'infecte ses œufs qu'après les avoir pondus. Il enduit leur coque d'un liquide rempli de symbiotes. Il est facile de désinfecter ces œufs avant que n'éclosent les larves. Celles-ci, qui d'ordinaire acquièrent leurs symbiotes en dévorant la coque de leurs œufs, en sont ainsi privées.

Dans d'autres cas, on peut soumettre les œufs à une centrifugation qui déplace les bactéries. Ne pouvant atteindre leur mycétome, les symbiotes disparaissent. On obtient de cette façon des individus ou des pontes entières sans symbiotes.

Parfois il est possible de priver l'insecte de ses symbiotes en extirpant ses mycétomes.

On peut alors étudier les effets produits chez l'hôte par l'absence des symbiotes.

Mais aucun de ces procédés n'est applicable aux Blattes, du fait que l'infection des œufs a lieu déjà dans l'ovaire. En outre, les œufs sont pondus dans une oothèque que la femelle porte jusqu'au moment de l'éclosion, ce qui rend impossible une désinfection quelconque. Car une oothèque se dessèche et « meurt » si on la sépare de l'insecte qui la porte, même si l'on prend soin de la placer dans un endroit humide, aéré et stérile. D'ailleurs les œufs sont très fragiles; ils éclatent dès que l'on touche à l'oothèque. Enfin une extirpation n'est pas possible puisque les bactériocytes sont épars dans tout le corps adipeux et dans les ovaires.

Nous avons déjà dit de quelle manière plusieurs auteurs ont cherché à détruire les symbiotes dans la Blatte vivante. L'un utilisait les antibiotiques, un autre les rayons ultraviolets ou encore la chaleur. On pourrait penser aux rayons X ou aux ultra-sous. La méthode par la chaleur est de loin la plus simple. Elle évite une intervention particulière sur chaque individu, et une lésion mécanique. Elle peut être appliquée massivement à des quantités d'insectes sans nécessiter d'installations coûteuses pour un résultat peu sûr. En outre, c'est probablement la méthode qui porte le moins atteinte aux insectes, quoiqu'elle entraîne encore une mortalité de l'ordre de 75%. C'est pour ces raisons que j'ai choisi la méthode de destruction des symbiotes par la chaleur. J'ai cité (pp. 244-245) les résultats obtenus par GLASER en 1946 grâce à cette méthode. Il faut cependant remarquer que cet auteur n'a travaillé que sur des séries d'insectes très restreintes. En outre, l'examen qu'il faisait de Blattes sans symbiotes après 590 jours me paraît sujet à caution. J'ai souvent trouvé des Blattes normales âgées dont les ovaires étaient plus ou moins atrophiés.

#### A. MÉTHODE.

Un bocal d'élevage (cristallisoir) de 17 cm de diamètre et de 14 cm de hauteur, contenant un certain nombre de Blattes (jusqu'à 30 à la fois), est placé dans une étuve relativement spacieuse (65 × 60 × 60 cm), mais sans système d'aération, dans une atmosphère très humide (95 à 100%). Le bocal contient un petit flacon d'eau, bouché par une mèche de coton qui reste constamment imbibée. Le fond est couvert de sciure de bois, et dans un verre de montre se trouve de la nourriture ordinaire (biscuit de chiens et lait en poudre) en large quantité. Le bocal est fermé par une toile de gaze.

Une température de 35°C peut suffire pour détruire les symbiotes, mais nécessite un séjour prolongé des élevages dans l'étuve. Même après 6 semaines de ce traitement, certaines Blattes ne sont pas complètement débarrassées de leurs symbiotes.

Avec 38°, un séjour de 4 semaines n'est pas suffisant, mais ce délai convient pour une température de 39°, tout en étant un minimum. Les insectes eux-mêmes ne supportent pas une chaleur excessive. Placés dans une étuve à 40°, ils périssent en quelques jours.

Il faut donc s'en tenir à la température de 39°, pas trop nocive pour les Blattes, et qui agit sur les symbiotes d'une manière sûre dans un délai raisonnable. Un tel traitement entraîne une mortalité des insectes d'environ 65% pendant le séjour à l'étuve, puis de 10% après leur sortie de l'étuve.

La mortalité est particulièrement forte pendant les dix premiers jours. Puis survient un palier d'une dizaine de jours, suivi d'un nouvel accroissement de mortalité jusqu'à la fin du traitement. La mortalité de 10 % qui suit le traitement correspond à celle des élevages ordinaires.

Ce sont surtout les larves qui succombent à la chaleur, car dans la plupart des cas, la mort survient au moment d'une mue. L'insecte semble avoir de la peine à sortir de son exuvie, les antennes ou les pattes restent prises dans leur cuticule. On trouve une quantité de Blattes qui se sont desséchées avant que le nouveau tégument ait pu prendre sa consistance dure et imperméable. Tous ces phénomènes sont probablement dus à la chaleur qui dessèche le liquide exuvial. On remarque aussi que les insectes ayant mué abandonnent leur exuvie, alors que dans les conditions normales ils la mangent. J'étudierai plus loin les répercussions physiologiques et anatomiques du traitement.

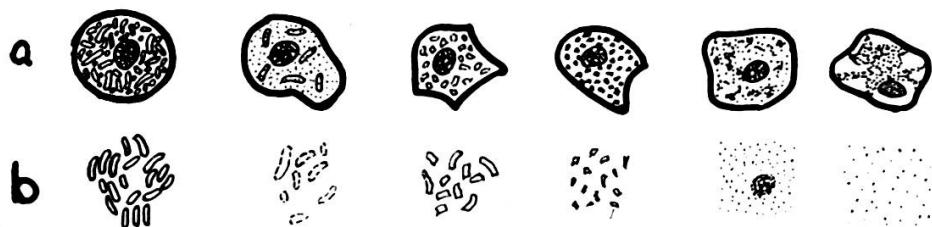


Fig. 16.

Dégénérescence progressive des bactériocytes lors du traitement par la chaleur. *a*) aspect sur coupes; *b*) sur frottis.

L'action sur les symbiotes est nette. Sur les frottis, on constate une altération notable des bactéries, qui se colorent mal, deviennent granuleuses, se fragmentent. La figure 16

montre la dégénérescence progressive des bactéries dans les bactériocytes et leur aspect sur les frottis correspondants.

La destruction des symbiotes est irrégulière. On peut trouver des bactériocytes à symbiotes dégénérés après 15 jours de traitement, comme aussi, exceptionnellement, des symbiotes encore vivants après 4 semaines. Un séjour de 4 semaines à 39° ne permet donc pas de considérer d'une manière absolue l'ensemble des insectes traités comme privés de leurs symbiotes. Ce n'est qu'au moment de la mort de chaque individu qu'un frottis de son corps adipeux donnera une indication sur l'état de ses bactéries, indication qui devra être complétée par l'examen histologique de l'organe. Cependant, ainsi qu'il ressort des comptes rendus d'expérience donnés dans les prochains chapitres, la présence, dans les séries, d'insectes possédant encore leurs symbiotes est un avantage plus qu'un inconvénient, car ces individus servent d'éléments de comparaison, de témoins, au reste du lot.

#### B. EXPÉRIENCES.

Sept séries d'essais, totalisant 108 Blattes, n'entrent pas en ligne de compte; elles ne servirent qu'à mettre au point la méthode.

Des 262 Blattes qui constituent 11 séries d'expériences, 196 ont péri pendant ou après le traitement, et sont inutilisables. Treize autres furent prises au moment même de leur mort; un examen utile de l'état de leur symbiose est encore possible. Enfin 53 survivent, permettant l'étude de leur état et de leurs symbiotes après des délais allant jusqu'à 190 jours dès la fin du traitement. Nous disposons ainsi de 66 pièces à étudier.

L'examen de l'état de la symbiose porte d'une part sur le corps adipeux, d'autre part, chez les femelles, sur l'ovaire. Dans l'ovaire, il faut considérer la couche superficielle des ovocytes et les bactériocytes. Un insecte est considéré comme privé de la symbiose si aucun symbiose n'est plus visible ni dans les bactériocytes du corps adipeux, ni dans ceux des ovaires ou à la surface des ovocytes.

Il est curieux de constater que ces trois localisations ne sont pas touchées uniformément par la chaleur. Il est fréquent de

trouver des ovocytes dépourvus de symbiotes chez une Blatte dont les bactériocytes de l'ovaire, plus rarement aussi ceux du corps adipeux, sont encore remplis de symbiotes. Le corps adipeux est souvent « stérilisé » alors que les bactériocytes de l'ovaire sont normaux. D'une manière générale, on peut dire que les symbiotes des ovocytes sont atteints les premiers, puis viennent ceux des bactériocytes du corps adipeux, enfin ceux des bactériocytes de l'ovaire.

Cela m'a amené à faire six catégories, expliquées dans le tableau 5. L'annotation est faite ainsi:

- (symbiose négative) = les symbiotes ont disparu.
- + (symbiose positive) = les symbiotes sont présents, vivants.
- . (incertain) = le renseignement fait défaut.

TABLEAU 5.

Catégories	Corps adipeux	Ovaire	
		Bactériocytes	Ovocytes
<i>a</i>	—	—	—
<i>b</i>	—	.	.
<i>c</i>	—	+	—
<i>d</i>	—	+	+
<i>e</i>	+	+	—
<i>f</i>	+	(+)	(+)

Pour les mâles, seules les catégories *a* et *f* entrent en ligne de compte.

## C. RÉSULTATS.

Les animaux traités, classés en fonction de la température et de la durée du traitement, se répartissent comme suit dans les diverses catégories:

TABLEAU 6.

*Effet de la chaleur sur les symbiotes,  
en fonction de la température et de la durée du traitement.*

Tempé- rature ° C.	Durée Jours	Catégories					
		a	b	c	d	e	f
35	28					1	1
35	37						1
35	42	5	3	2		2	
36	15						1
36	23						1
36	42	3	3	1			4
38	28	4					1
38	31		1				
39	28	6	5				
39	36	2					
39	41	1	1				
39	42	15	2				
Totaux . . .		36	15	3		3	9
66							

Nous avons donc obtenu 36 Blattes totalement dépourvues de symbiotes (catégorie *a*), dont 28 vécurent, soit environ 10% des insectes mis en expérience. Ce n'est que dans les séries traitées par 39° pendant au moins 28 jours qu'aucun symbiose n'est plus décelable (aucun cas dans les catégories *c* à *f*).

L'âge des insectes au moment du traitement n'influence pas le résultat.

La destruction des symbiotes est définitive. Dans aucun cas les bactéries ne reprennent leur prolifération après le traitement. Qu'on les examine dès la sortie de l'étuve ou plus de 3 mois plus tard, les bactériocytes sont et restent vides; ils s'amenuisent même jusqu'à disparaître complètement.

En effet, la grande taille moyenne des bactériocytes du corps adipeux diminue avec le temps. Le diamètre normal d'une de ces cellules mesure environ trois ou quatre fois celui

de son noyau ( $10 \mu$ ), soit  $30$  à  $40 \mu$ . Pendant les trois premières semaines qui suivent le traitement, cet ordre de grandeur se maintient. Plus tard, il est rare d'en voir de cette dimension, et le diamètre moyen s'abaisse à environ deux fois celui du noyau. Souvent les bactériocytes dépassent à peine la taille de leur propre noyau (fig. 17). Au-delà de 120 jours après le traitement, on ne trouve généralement plus aucun bactériocyte.

On voit encore les débris des symbiotes peu après leur destruction, sous forme de granulations dans le protoplasme du bactériocyte. Mais peu à peu le protoplasme s'éclaircit, devient homogène. Après 80 jours, les bactériocytes ne se différencient fréquemment plus d'aucune manière des autres cellules du tissu adipeux. On a l'impression, en examinant des pièces fixées au Bouin et coupées dans la paraffine, d'être en présence d'un

tissu vide, composé uniquement de membranes cellulaires et de noyaux. Seule, la grosseur typique d'un noyau peut trahir ça et là la présence de ce qui fut un bactériocyte (fig. 18).

Les noyaux des bactériocytes évoluent de diverses manières et très irrégulièrement, pendant la dégénérescence des cellules. Parfois ils se ratatinent, s'amenuisent en prenant des formes anguleuses. D'autres fois, au contraire, on les voit s'hyperfrophier, se gonfler. Il semble

dans de nombreux cas, que le noyau tende à se diviser amitotiquement, comme il le fait dans les circonstances ordinaires, mais que la cellule ne suive pas le mouvement — peut-être

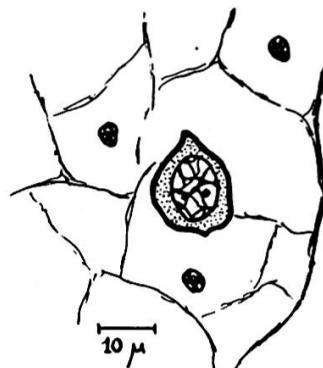


Fig. 17.

Fragment de corps adipeux 28 jours après le traitement bactéricide (42 jours à  $35^\circ$ ). Bactériocyte réduit.

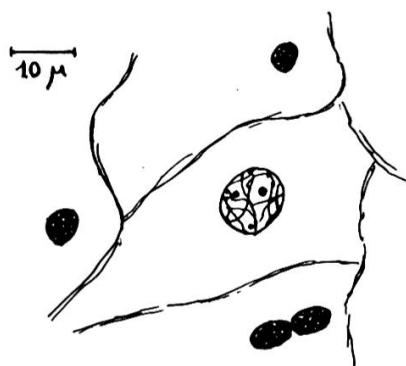


Fig. 18.

Fragment de corps adipeux 80 jours après le traitement bactéricide (42 jours à  $39^\circ$ ). Le noyau typique trahit seul l'existence d'un bactériocyte.

faute d'un accroissement de la quantité des symbiotes qu'elle devrait contenir — et qu'alors le noyau reste à mi-chemin de

sa division. Il a dans ce cas une forme lobée (fig. 19). Mais après 120 jours, les noyaux mêmes ont disparu avec les bactériocytes.

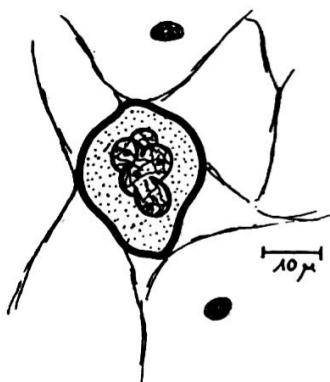


Fig. 19.

Noyau hypertrophié et lobé d'un bactériocyte de corps adipeux, 77 jours après le traitement bactéricide (28 jours à 38°).

Dans l'annexe qui termine ce travail, j'indique quelques données que j'ai pu recueillir sur les insectes de mes séries quant aux conséquences qu'entraîne pour l'hôte l'absence de ses symbiotes.

#### D. CONCLUSION.

Nous disposons donc d'une méthode très simple qui, bien que sacrifiant à priori une proportion considérable des insectes mis en expérience, permet d'obtenir un nombre élevé de Blattes dépourvues de symbiotes. Telle était la condition indispensable à l'étude systématique de cette symbiose.

---

## ANNEXE

**Effets de l'absence de symbiotes sur les Blattes.****A. CROISSANCE.**

Au moment de son éclosion, une larve mesure 2,5 à 3 mm de longueur. Dans des conditions normales d'élevage à 23° C, son développement l'amène en une centaine de jours en moyenne à la mue imaginale. Il y a des exceptions, en ce sens que certains individus peuvent se métamorphoser déjà après 72 jours, d'autres seulement beaucoup plus tard. La longueur des imagos est de 13 à 44 mm. La croissance normale des Blattes est représentée sur la figure 20 par une zone pointillée dont les marges indiquent respectivement le maximum et le minimum de grandeur atteint par ces insectes en un temps donné. A partir de la métamorphose, on compte en moyenne 80 jours jusqu'à l'éclosion de la génération suivante: 30 à 50 jours pour la maturation des ovaires et autant pour le développement embryonnaire après la ponte de l'oothèque. Une femelle peut pondre 2 ou 3 oothèques, donnant naissance chaque fois à 20, 30, ou même 36 larves.

Qu'en est-il chez les Blattes dépourvues de bactéries symbiotiques ? Nous avons vu que dès la fin du traitement, la courbe de mortalité reprend un tracé parallèle à celle des élevages ordinaires. Cependant, pour être tout à fait sûr de ne pas prendre en considération des cas de mort dus au traitement lui-même, j'éliminerai dans cette étude les individus qui périrent moins de 30 jours après la sortie de l'étuve. D'autre part, les insectes complètement dépourvus de symbiotes entrent évidemment seuls en ligne de compte.

Chez la plupart des Blattes sans symbiotes, le développement subit un certain ralentissement. La métamorphose, si elle a lieu, est tardive; elle ne survient guère avant l'âge de 120 jours, parfois seulement à 190, voire à 230 jours. Une partie des

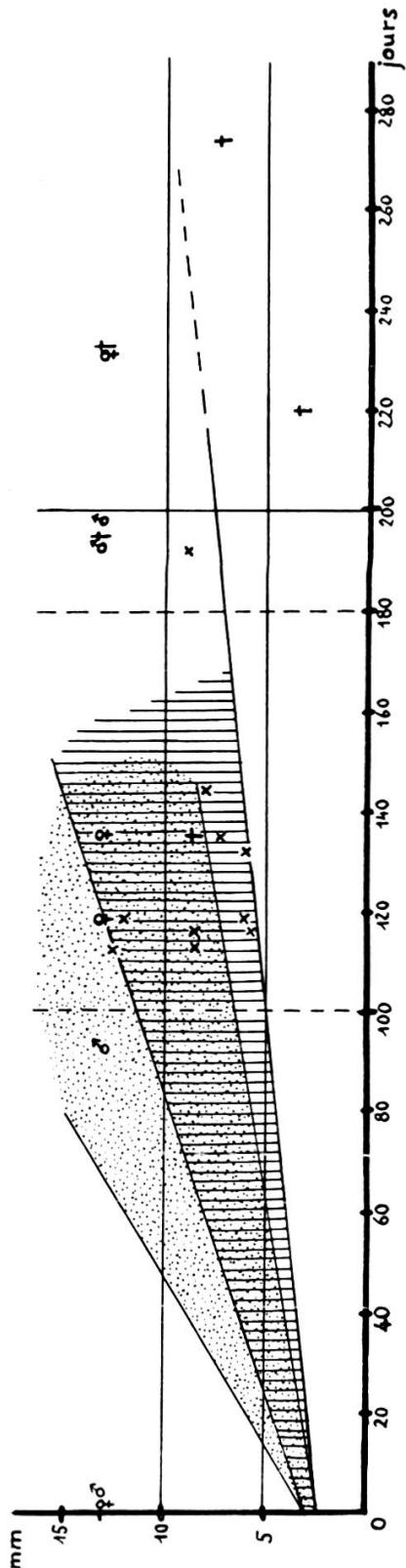


Fig. 20.

Développement comparé de Blattes avec et sans symbiotes.

Zone pointillée: développement ordinaire.

Zone hachurée: développement en absence de symbiotes.

♀♂: métamorphose de Blattes sans symbiotes.

♀†, ♂†: métamorphose suivie immédiatement de la mort de l'insecte.

×: Blattes prélevées à l'état larvaire.

†: Blattes mortes sans avoir atteint le stade adulte.

Trois cas exceptionnels figurent en dehors de la zone hachurée.

insectes succombe immédiatement après la mue imaginale. Enfin beaucoup meurent avant d'avoir atteint le stade adulte, quoique à des âges allant jusqu'à 275 jours. La zone hachurée du graphique indique le développement maximum et minimum des Blattes sans symbiotes. Trois cas exceptionnels figurent en dehors de ses marges. Il s'agit, d'une part, d'un mâle métamorphosé à l'âge de 92 jours, soit dans un délai normal; les deux autres sont des larves qui moururent à l'âge de 221 et de 274 jours, ayant atteint respectivement une taille de 3,5 et 7,5 mm (taille adulte: 13 mm).

De toutes les Blattes femelles dépourvues de symbiotes, aucune ne pondit d'oothèque.

Les données ci-dessus ne sont évidemment que des indications. Cette étude du développement de Blattes sans symbiotes n'a porté que sur les vingt cas qui, dans mes séries, s'y prêtaient.

#### B. DÉVELOPPEMENT DES OVAIRES (VÉRIFICATION DE L'HYPOTHÈSE DE GLASER).

L'ovaire d'une Blatte normale mesure toujours à peu près le dixième de la longueur totale de l'insecte, sauf pendant la période qui précède la ponte, où il dépasse cette proportion. Pendant le développement larvaire, il a une structure en ruban,

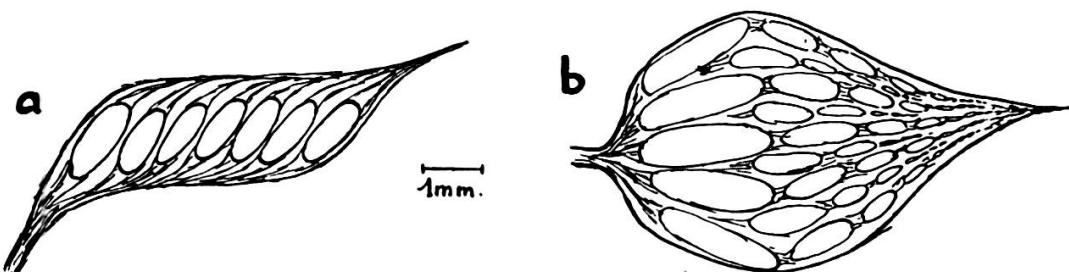


Fig. 21.

- a) ovaire de type larvaire, en ruban.
- b) ovaire de type adulte, en bouquet.

alors que chez l'adulte il est en bouquet (fig. 21). Les œufs atteignent au moment de la ponte 3 mm de long.

Parmi les 36 Blattes étudiées et sûrement dépourvues de symbiotes, 10 sont des femelles, dont 2 prises au moment de leur métamorphose, 13 des mâles et 15 des larves.

1. Des 8 femelles adultes, 6 ont des ovaires réduits, atrophiés, dont 3 sans aucun ovocyte (fig. 22). Les deux autres

présentent des ovaires morphologiquement normaux, mais à l'examen histologique, leurs ovocytes se révèlent dégénérés dès la dimension de  $200 \mu$ . Ceux de  $150 \mu$  sont déjà plus ou moins fortement vacuolisés (fig. 23).

2. L'une des deux femelles prises au moment de la métamorphose a des ovaires normaux pour ce stade: un ovaire de type

Ovaire d'une Blatte adulte sans symbiotes, 160 jours après le traitement bactéricide (42 jours à  $39^\circ$ ).  
a) entier; b) coupe. od: oviducte; to: tubes ovariens.

adulte jeune (en bouquet, mais sans gros ovocytes), l'autre encore de type larvaire (en ruban).

Chez l'autre femelle, l'ovaire gauche est atrophié, sans ovocytes; l'ovaire droit manque complètement. Ce dernier cas reste énigmatique.

3. Trois femelles adultes chez qui l'absence de symbiotes est incertaine présentent deux cas d'ovaires atrophiés et un cas où les ovaires sont légèrement réduits, les ovocytes dégénérés.

4. Une femelle adulte qui subit le traitement par la chaleur dans la même série que deux des cas d'ovaires atrophiés cités sous 1 (42 jours à  $35^\circ$ ), mais qui conserva ses symbiotes, a des ovaires normaux.

5. Parmi 7 larves femelles étudiées au cours de leur développement, soit pendant le traitement, soit plus tard, 5, âgées de 111 à 135 jours, ont des ovaires de proportion et de structure normales. Les ovaires des deux autres, prises à l'âge de 135 et

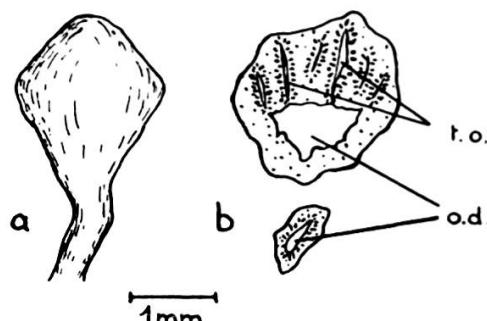


Fig. 22.



Fig. 23.

Ovaire d'une Blatte adulte à la fin du traitement bactéricide (28 jours à  $38^\circ$ ). Les ovocytes qui dépassent  $150 \mu$  dégénèrent en formant des vacuoles.

de 192 jours, sont atypiques: leurs tubes ovariens sont en désordre, portant ça et là des ovocytes (fig. 24). Ces ovocytes sont par ailleurs normaux dans un des cas, légèrement vacuolisés dans l'autre.

En résumé, toutes les femelles adultes certainement dépourvues de symbiotes présentent une altération (2 cas), voire une atrophie (6 cas) des ovaires, avec arrêt du développement des ovocytes. Une Blatte ayant subi le traitement mais conservé ses symbiotes a des ovaires normaux. L'atrophie n'est donc pas due au traitement par la chaleur lui-même.

Pendant le développement larvaire, l'absence de symbiotes ne semble pas avoir de répercussion sur la croissance de l'ovaire.



Fig. 24.

Ovaire d'une larve de 8 mm. 18 jours après le traitement bactéricide (42 jours à 39°). Cas exceptionnel.

### C. CONCLUSION.

Pour autant que le petit nombre de cas envisagés ici permette de se prononcer, l'absence de symbiotes entraîne chez la Blatte femelle une atrophie des ovaires. Cette constatation confirme pleinement celle de GLASER. Ce que l'on peut en outre conclure de notre série d'observations, c'est que cette atrophie est due, plutôt qu'à un développement insuffisant des ovaires eux-mêmes, à une inhibition de la croissance des ovocytes.

## RÉSUMÉ

Les bactéries intracellulaires des Blattes sont déjà bien connues quant à leur localisation, leur cytologie, leur comportement. Leur présence régulière, sans exception, chez toutes les espèces de Blattes, dans des cellules spécialisées du corps adipeux, les bactériocytes, et dans les ovaires de ces insectes, et la manière infaillible dont elles sont transmises aux générations successives de leur hôte, tendent à faire considérer cette association comme une symbiose.

Toutefois, s'il est certain que les bactéries ne peuvent vivre que grâce à l'existence de l'insecte, le rôle que joueraient réciproquement les symbiotes en faveur de l'hôte reste énigmatique. Aucune des nombreuses hypothèses émises à ce sujet n'a reçu jusqu'ici une confirmation suffisante, du fait notamment qu'on n'a jamais réussi à séparer systématiquement les deux organismes, afin de les étudier en l'absence l'un de l'autre.

C'est à cette dissociation de la symbiose Blatte-Bactéries que je me suis attaché.

L'isolement des symbiotes sur des milieux artificiels et naturels n'a jamais réussi. Les résultats positifs de tels essais, annoncés par certains auteurs, n'ont pas pu être répétés.

Des inoculations de ces bactéries, pas plus que des greffes d'organes symbiotiques entiers (corps adipeux et ovaires) à d'autres insectes, n'ont permis d'obtenir les symbiotes en dehors du cadre strict de leur symbiose, l'insecte récepteur éliminant rapidement les bactéries inoculées ou les greffons.

En revanche, les bactéries symbiotiques se sont développées indépendamment de leur hôte dans des fragments de tissus symbiotiques qui, explantés aseptiquement dans des milieux artificiels, avaient dégénéré. Cette méthode des explantations pourrait permettre une étude de la biologie des symbiotes.

L'isolement de l'hôte, c'est-à-dire la destruction des bactéries symbiotiques dans l'insecte vivant, est obtenu au moyen d'un traitement des élevages par la chaleur. Un séjour de 4 à

6 semaines dans une étuve chauffée à 39° C provoque la disparition progressive, non seulement des bactéries, mais encore des bactériocytes. Malgré la forte mortalité entraînée par ce traitement, on peut obtenir ainsi des séries importantes de Blattes sans symbiotes.

L'absence de symbiotes intracellulaires chez les Blattes entraîne, s'il s'agit de larves, un ralentissement de leur développement; ce retard peut aller jusqu'à l'arrêt complet de la croissance, bien avant la métamorphose.

Chez la femelle adulte, elle provoque une atrophie des ovaires. C'est sur le développement des ovocytes que l'absence de symbiotes semble agir en premier lieu.

#### BIBLIOGRAPHIE

BECKER, G. 1942. *Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie der Hausbockäferlarve*. Z. vergl. Physiol., 29.

— 1943. *Beobachtungen und experimentelle Untersuchungen zur Kenntnis des Mulmbockkäfers (Ergates faber L.)*, 2. Mitt., Z. angew. Entomol., 30.

BLOCHMANN, Fr. 1887. *Über das regelmässige Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten*. Z. Biol. 24 (N.F. 6).

— 1892. *Über das Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten*. Zbl. Bakt., 11.

BODE, H. 1936. *Die Bakteriensymbiose der Blattiden und das Verhalten der Blattiden bei aseptischer Aufzucht*. Arch. Mikrobiol., 7.

BRUES, Ch. T. et R. C. DUNN, 1945. *The effect of penicillin and certain sulfa drugs on the intracellular bacteroids of the cockroach*. Science, 101.

BUCHNER, P. 1930. *Tier und Pflanze in Symbiose*. Berlin, Bornträger.

— 1953. *Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen*. Basel Stuttgart, Birkhäuser.

CHAUVIN, R. 1949. *Physiologie de l'Insecte*. Paris, Minist. de l'Agric., Inst. nat. de la Rech. agron.

ČSAKY, T. et L. TÓTH. 1948. *Enzymatic breakdown of nitrogen compounds by the nitrogen fixing bacteria of insects*. Experientia, 4.

FRAENKEL, G. 1951. *The nutritional requirements of insects for known and unknown vitamins*. Trans. IXth Intern. Congr. Entom. Amsterdam.

FRAENKEL, G. 1952. *The role of symbionts as sources of vitamins and growth factors for their insect hosts*. Symposium sur la « Symbiose chez les insectes » (Amsterdam, 1951). *Tijdschr. Entomol.*, 95 et *Union intern. Sc. biol.*, sér. B, n° 10.

FRAENKEL, G. et M. BLEWETT. 1943. *Intracellular symbionts of insects as sources of vitamins*. *Nature*, 152.

GIER, H. T. 1936. *The morphology and behaviour of the intracellular bacteroids of roaches*. *Biol. Bull.*, 71.

— 1937. *Growth of the intracellular symbionts of the cockroach, Periplaneta americana*. *Anat. Record*, 70.

— 1947. *Intracellular bacteroids in the cockroach (Periplaneta americana L.)*. *J. Bacteriol.*, 53.

GLASER, R. W. 1920. *Biological studies on intracellular bacteria*. *Biol. Bull.*, 39.

— 1930. *On the isolation, cultivation and classification of the so-called intracellular « symbionts », or « Rickettsiae », of Periplaneta americana*. *J. exper. Med.*, 51.

— 1930. *Cultivation and classification of « bacteroids », « symbionts » or « Rickettsiae » of Blatella germanica*. *J. exper. Med.*, 51.

— 1946. *The intracellular bacteria of the cockroach in relation to symbiosis*. *J. Parasitol.*, 32.

GRASSÉ, P.-P. 1949. *Traité de Zoologie*, t. IX, Paris, Masson.

GROPENGIESSER, C. 1925. *Untersuchungen über die Symbiose der Blattiden mit niederen pflanzlichen Organismen*. *Zbl. Bakteriol.*, 64.

GUBLER, H. U. 1947. *Versuche zur Züchtung intracellulärer Insekten-symbionten*. Dissertation, Zurich et Schw. *Ztschr. Pathol. u. Bakt.*, 11 (1948).

HENNEGUY, L. F. 1904. *Les Insectes*. Paris, Masson.

HERTIG, M. 1921. *Attempts to cultivate the bacteroids of the Blattidae*. *Biol. Bull.*, 41.

HOLLANDE, A. Chr. 1951. *L'évolution des endosymbioses des Termites et des Blattes*. Symposium sur la « Symbiose chez les Insectes », Amsterdam, 1951. *Tijdschr. Entomol.*, 95 (1952).

HOLLANDE, A. Chr. et R. FAVRE. 1931. *La structure cytologique de Blattabacterium cuenoti (Mercier) n.g., symbiose du tissu adipeux chez les Blattides*. *C. R. Soc. Biol.*, 107.

JAVELLY, E. 1914. *Les corps bactérioides de la Blatte (Periplaneta orientalis) n'ont pas encore été cultivés*. *C. R. Soc. Biol.*, 77.

JUCCI, C. 1930. *Sulla presenza di batteriociti nel tessuto adiposo dei Termitidi*. *Boll. Zool.*, 1 et *Arch. Zool. Ital.*, 16 (XI Congr. Intern. Zool.).

— 1951. *Symbiosis and phylogenesis in insects*. *Trans. IXth int. Congr. Entomol.* Amsterdam.

KELLER, H. 1950. *Die Kultur der intracellulären Symbionten von Periplaneta orientalis*. *Z. Naturf.*, 5b.

KOCH, A. 1933. *Über künstlich symbiontenfrei gemachte Insekten.* Verh. dtsch. Zool. Ges., 1933.

— 1948. *Wege und Ziele der experimentellen Symbioseforschung.* Naturw. Rundschau, 1948.

— 1949. *Die Bacteriensymbiose der Küchenschaben.* Microkosmos, 38.

— 1951. *Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete der experimentellen Symbioseforschung.* Symposium sur la « Symbiose chez les Insectes », Amsterdam. Tijdschr. Entomol., 95.

LWOFF, A. 1923. *Nature et position systématique du bactéroïde des Blattes.* C. R. Soc. Biol. 89.

MERCIER, L. 1906. *Les corps bactéroïdes de la Blatte (Periplaneta orientalis) : Bacillus cuenoti n. sp.* C. R. Soc. Biol., 61.

— 1907. *Recherches sur les bactéroïdes des Blattides.* Arch. Protistenk., 9.

— 1907. *Cellules à Bacillus cuenoti dans la paroi des gaines ovariques de la Blatte.* C. R. Soc. Biol., 62.

MILOVIDOW, P. E. 1928. *A propos des bactéroïdes des Blattes (Blatella germanica).* C. R. Soc. Biol., 99.

— 1928. *Coloration différentielle des bactéries et des chondriosomes.* Arch. Anat. Micr., 24.

NEUKOMM, A. 1927. *Action des rayons ultra-violets sur les bactéroïdes des Blattes (Blatella germanica).* C. R. Soc. Biol., 96.

— 1927. *Sur la structure des bactéroïdes des Blattes (Blatella germanica).* C. R. Soc. Biol., 96.

— 1932. *La réaction de la fixation du complément appliquée à l'étude des bactéroïdes des Blattes (Blatella germanica).* C. R. Soc. Biol., 111.

PAILLOT, A. 1933. *L'infection chez les Insectes. Immunités et symbiose.* (G. Patissier, Trévoux).

PEKLO, J. 1947. *Symbiosis of Azotobacter with Insects.* Intern. Congr. Microbiol., Kopenhagen (Rep. Proc., 1949).

PIERANTONI, U. 1936. *Gli studii sulla endosimbiosi ereditaria nelle origini e nei più recenti sviluppi.* Attualità zool., 2.

RIES, E. 1932. *Experimentelle Symbiosestudien, 1: Mycetomtransplantationen.* Z. Morph. Oekol., 25.

— 1933. *Endosymbiose und Parasitismus.* Z. Parasitenk., 6.

— 1935. *Über den Sinn der erblichen Insektsymbiose.* Naturwissenschaften, 23.

SCHANDERL, H. 1942. *Über die Assimilation des elementaren Stickstoffs der Luft durch die Hefesymbioten von Rhagium inquisitor L.* Z. Morph. Oekol., 38.

SMITH, J. D. 1948. *Symbiotic microorganisms of Aphids and fixation of atmospheric Nitrogen.* Nature, 162.

STAMMER, H. J. 1951. *Die Verbreitung der Endosymbiose bei den Insekten.* Symposium sur la « Symbiose chez les Insectes », Amsterdam. Tijdschr. Entomol., 95.

STEINHAUS, E. A. 1947. *Insect Microbiology.* New-York, Ithaka.

TÓTH, L. 1946. *The biological fixation of atmospheric Nitrogen*. Monographs Nat. Sci., 5 (Hung. Mus. Nat. Sci., Budapest).

— 1950. *Protein metabolism and nitrogen fixation by means of microorganisms living in symbiosis with insects*. Proc. 8th Congr. Entomol., Stockholm.

— 1950. *Beiträge zur Frage des Stickstoff-Stoffwechsels der Insekten*. Ann. Agr. Coll. Sweden, 17.

— 1951. *Die Rolle der Mikroorganismen in dem Stickstoff-Stoffwechsel der Insekten*. Zool. Anz., 146.

— 1951. *The role of nitrogen-active microorganisms in the nitrogen metabolism of insects*. Symposium sur la « Symbiose chez les Insectes », Amsterdam. Tijdschr. Entomol., 95.

WEBER,?. 1933. *Lehrbuch der Entomologie*. Jena, Gustav Fischer.

WIGGLESWORTH, V. B. 1939. *Principles of Insect physiology*. London, Methuen & Co.

— 1951. *Symbiosis in blood-sucking Insects*. Symposium sur la « Symbiose chez les Insectes », Amsterdam. Tijdschr. Entomol., 95.

WOLF, J. 1924. *Contribution à la localisation des bactéroïdes dans le corps adipeux des Blattes (Periplaneta orientalis)*. C. R. Soc. Biol., 91.

— 1924. *Contribution à la morphologie des bactéroïdes dans les Blattes (Periplaneta orientalis)*. C. R. Soc. Biol., 91.