



HAL
open science

Etude expérimentale de l'action pathogène du nématode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser ; recherches gnotobiologiques chez l'insecte *Galleria mellonella* L.(1)

Noël Boemare, Eliane Bonifassi, Christian Laumond, Jean Luciani.

► To cite this version:

Noël Boemare, Eliane Bonifassi, Christian Laumond, Jean Luciani.. Etude expérimentale de l'action pathogène du nématode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser ; recherches gnotobiologiques chez l'insecte *Galleria mellonella* L.(1). *Agronomie*, 1983, 3 (5), pp.407-415. hal-00884527

HAL Id: hal-00884527

<https://hal.science/hal-00884527>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Etude expérimentale de l'action pathogène du nématode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser ; recherches gnotobiologiques chez l'insecte *Galleria mellonella* L.⁽¹⁾

Noël BOEMARE, Eliane BONIFASSI (*), Christian LAUMOND (*) & Jean LUCIANI.

I.N.R.A.-C.N.R.S., Station de Recherches de Pathologie comparée, F 30380 Saint-Christol-les-Alès.

(*) I.N.R.A. Station de Recherches sur les Nématodes, F 06602 Antibes.

RÉSUMÉ

Une nouvelle méthode d'obtention d'individus axéniques de *Neoaplectana carpocapsae* a été mise au point à partir des larves néonates après aseptisation des œufs. En condition parasitaire dans l'insecte hôte axénique, les larves L₁ stériles inoculées se développent jusqu'au stade adulte, mais ne peuvent donner de descendance. En condition saprophyte, l'élevage axénique du nématode a été rendu possible après dépôt de L₁ stériles sur un milieu stérile ayant subi une supplémentation bactérienne. Les bactéries, ensemencées sur le milieu destiné aux nématodes, le transforment et produisent une biomasse que l'on inactive ensuite pour offrir aux L₁ stériles un substrat bioconverti stérile. Dans ces conditions on obtient un élevage axénique au rendement comparable à l'élevage holoxène.

En absence de toute bactérie, les nématodes axéniques ont un effet délétère sur les insectes axéniques (*Galleria mellonella*) dans un délai de 5 j., ce qui suggère une action toxémique propre au nématode. Cette action explique, dans les conditions naturelles, les septicémies à germes banaux engendrées par le nématode, sans qu'il s'agisse obligatoirement de germes entomopathogènes.

En condition parasitaire, dans l'insecte-hôte axénique, si l'on associe aux larves L₁ stériles des souches bactériennes, on obtient des nématodes gnotoxéniques qui peuvent se multiplier abondamment. L'action du complexe nématode-bactéries provoque toujours la mortalité des insectes dans un laps de temps plus court (3 j. maximum). Plusieurs souches bactériennes ont été reconnues comme propices à la multiplication ; elles appartiennent aux espèces : *Enterobacter agglomerans*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xenorhabdus nematophilus* (13 souches sur 72 souches testées). Les L₃ issues de ce premier élevage ont été transférables sur d'autres insectes axéniques et donnent des séries gnotoxéniques viables.

En condition saprophyte, les combinaisons avec *X. nematophilus* sont les plus efficaces pour le développement du nématode sur des milieux empiriques utilisés habituellement pour l'élevage de masse du nématode. L'importance de *X. nematophilus*, espèce sous-dominante dans la microflore de *N. carpocapsae*, est principalement nutritionnelle.

Mots clés additionnels : *Xenorhabdus nematophilus*, élevage axénique, élevage gnotoxénique, nutrition, toxine.

SUMMARY

Pathogenicity of the nematode Neoaplectana carpocapsae Weiser ; gnotobiological investigations in the insect host Galleria mellonella L.⁽¹⁾

A new method has been developed to obtain axenic animals of *Neoaplectana carpocapsae* from first instar larvae (L₁) after axenization of eggs. This has been used to produce gnotoxenic nematodes. Of the 72 strains of bacteria tested and isolated from *N. carpocapsae* (American ecotype « DD 136 » and French ecotype « Plougastel ») or other *Rhabditida*, the 13 efficient strains belonged to the following species : *Enterobacter agglomerans*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xenorhabdus nematophilus*. They allowed growth and reproduction of the nematodes after association with the axenic L₁ and inoculation into axenic insects of *G. mellonella*. " Dauer larvae " of the third instar (L₃) obtained from this first association were infectious for other axenic insects and gave viable gnotoxenic animals in parasitic conditions (in their hosts).

Axenic culture of *N. carpocapsae* was successful after addition of inactivated bacteria to the sterile medium. Axenic nematodes were lethal for axenic insects (*Galleria mellonella*) suggesting a toxemic action of nematodes alone without the aid of any bacteria. This is why septicemia occurred under natural conditions even in the absence of entomopathogenic bacteria such as *X. nematophilus*, *S. liquefaciens* or *P. fluorescens*, or some non-entomopathogenic bacteria. *X. nematophilus* appears to be a sub-dominant species in the microflora of *N. carpocapsae*. Its role is more important in the nutrition and the reproduction of the nematode than in the pathogenic action of the complex. It is a regulator of dominant bacterial populations in the nematode microflora. Gnotoxenic associations with *X. nematophilus* are most efficient during saprophytic growth on the sterile diet used for mass propagation of the nematode.

Additional key-words : *Xenorhabdus nematophilus*, axenic culture, gnotoxenic culture, nutrition, toxin.

⁽¹⁾ Travail réalisé dans le cadre d'une convention I.N.R.A.-C.E.T.I.O.M.-COVAGRI.

I. INTRODUCTION

La mise en évidence des propriétés des souches bactériennes hébergées par une espèce animale ne doit pas se limiter aux études de la bactériologie usuelle. Si cette 1^{re} étape est indispensable à la reconnaissance des espèces microbiennes isolées, elle n'est que le point de départ d'études plus complexes où, sur l'animal axénique dépourvu de sa flore holoxène (cf. Annexe I, glossaire), on implante une ou plusieurs souches qui lui sont habituellement inféodées. Les animaux gnotoxéniques ainsi obtenus, protégés de toute contamination microbienne ultérieure, sont suivis au cours de leur développement, dans le but de définir de nouvelles propriétés bactériologiques n'apparaissant qu'*in vivo* et d'étudier leurs effets sur la physiologie de l'animal.

Le nématode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, a suscité de nombreux travaux depuis sa découverte (WEISER, 1955; DUTKY & HOUGH, 1955), en raison des espoirs que son utilisation en lutte biologique contre les insectes déprédateurs des cultures a fait naître (NIKLAS, 1967, 1969; POINAR, 1975; LAUMOND *et al.*, 1979; POINAR, 1979). Les larves infestantes de ce nématode (larves de 3^e stade ou L₃) vivent normalement dans le sol; ingérées par un insecte, elles transitent par le tractus digestif, passent à travers la paroi de l'intestin, envahissent l'hémocoèle en se transformant en L₄, puis en adultes. L'insecte meurt en 24 à 48 h. Deux à 3 générations de nématodes se succèdent dans le cadavre de l'hôte. Les L₃ s'échappent à l'extérieur et sont capables de survivre très longtemps dans le sol en attendant la rencontre avec un nouvel hôte.

Bien que *N. carpocapsae* ait été isolé sur insecte et élevé à l'origine sur *Galleria mellonella* L. (DUTKY *et al.*, 1964), on s'est rapidement aperçu que la multiplication de l'écotype américain, DD 136, était possible sur milieu nutritif artificiel (HOUSE *et al.*, 1965). La présence d'une bactérie associée: *Xenorhabdus nematophilus* Poinar & Thomas (syn.: *Achromobacter nematophilus* Poinar & Thomas), localisée dans la partie antérieure de l'intestin des L₃, a été mise en évidence par POINAR (1966). Les critères taxonomiques de ce bacille Gram - aérobic facultatif, ont été récemment révisés (THOMAS & POINAR, 1979). Un élevage de masse à grande échelle de *N. carpocapsae* est actuellement développé (BEDDING, 1981) en utilisant certains variants de *X. nematophilus* (AKHURST, 1980). Des élevages axéniques de *N. carpocapsae*, réalisées à partir de L₃ infestantes ont été tentés à plusieurs reprises (JACKSON, 1965; HANSEN *et al.*, 1968; TARAKANOV & ANDREEVA, 1974).

LYSENKO & WEISER (1974) ont cependant montré, en isolant une microflore plus complexe comprenant plusieurs bacilles Gram - aérobies chez *N. carpocapsae*, que *X. nematophilus* n'était pas la seule bactérie associée à ce nématode. Des travaux portant sur l'étude bactériologique d'un élevage de masse de l'écotype DD 136 sur milieu nutritif empirique ont confirmé ce fait (LAUMOND & BOEMARE, 1976; BOEMARE, *trav. non publ.*). Le cortège bactérien est constitué de germes aérobies stricts, des *Pseudomonadaceae*, mais aussi de germes aérobies facultatifs, des *Vibrionaceae* et des *Enterobacteriaceae*. *X. nematophilus* est, dans ces conditions, difficile à mettre en évidence en présence de la flore dominante et une méthode de sélection est nécessaire pour lever sa sous-dominance, comme par exemple la technique d'isolement décrite par POINAR & THOMAS (1967). Sans sous-estimer la permanence et l'importance de *X. nematophilus* en qualité d'espèce sous-dominante tout au long du cycle du nématode, les analyses qualitatives et

quantitatives effectuées ont permis de caractériser plusieurs genres et espèces bactériennes dominantes dans le tractus digestif de *N. carpocapsae* DD 136 et il a été possible de définir la pathogénicité de plusieurs autres souches vis-à-vis des insectes (BOEMARE, *trav. non publ.*)

A ce stade des recherches, connaissant d'une part et globalement le comportement du nématode normalement associé à ses bactéries chez l'insecte et sur milieu artificiel, d'autre part la composition de la microflore et son action sur l'insecte germe par germe, il convenait de tenter de comprendre les mécanismes complexes de cette association. Le rôle du nématode ne semble pas se limiter à la seule fonction de vecteur de bactéries entomopathogènes et sa pathogénicité propre vis-à-vis de l'insecte, déjà suggérée par POINAR (1966), est nettement confirmée.

Les travaux ici présentés constituent une 1^{re} approche de l'ensemble du problème. Les conditions préliminaires de l'étude résident dans la maîtrise de l'élevage axénique de l'écotype DD 136. Une technique d'obtention de nématodes axéniques, à partir de L₁ néonates issues d'œufs désinfectés, a été développée, qui semble la meilleure voie garantissant la stérilité des individus (NEUSCHULZ, 1977; VANFLETEREN, 1978). L'insecte utilisé pour les expériences, *Galleria mellonella* L., a également été relevé axéniquement afin d'éviter toute interférence avec la flore intestinale de l'hôte. Grâce à ces méthodes rigoureuses, l'action des larves L₁ néonates axéniques a pu être étudiée sur *G. mellonella*. Par ailleurs, à partir des souches bactériennes précédemment isolées, les combinaisons gnotoxéniques ont été effectuées entre les L₁ primitivement axéniques et un certain nombre de germes; leur viabilité a été testée sur insecte et sur milieu nutritif artificiel. Enfin, dans le but de déterminer le rôle des bactéries dans la nutrition des nématodes, des essais d'élevage axénique ont été effectués à partir des L₁ axéniques sur des milieux artificiels enrichis par de la biomasse bactérienne préalablement inactivée.

La finalité de ces travaux est triple:

- Au plan pathologique, l'évaluation du pouvoir pathogène du nématode seul et des nématodes gnotoxéniques.
- Au plan physiologique, la définition des associations nématode-bactéries les plus viables pour la reproduction du nématode dans l'insecte (conditions naturelles), puis sur milieu artificiel (de ce point de vue, le passage dans un 1^{er} temps dans l'insecte postule que ce sont là les meilleures conditions nutritionnelles de base à partir desquelles il est alors possible d'évaluer l'incidence du facteur bactériologique introduit).
- Au plan pratique, l'appréciation des possibilités de multiplication de masse à très grande échelle des nématodes gnotoxéniques, ce qui présente le double avantage de maîtriser le processus de production (puisque tous les composants biologiques sont connus) et d'éliminer un germe indésirable lorsqu'il n'est pas indispensable.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les manipulations en asepsie décrites ci-après, sont effectuées sous hotte à flux laminaire, avec les précautions d'usage en bactériologie. Afin de détecter les contaminations accidentelles, les étapes délicates de transfert sont contrôlées sur bouillon nutritif ordinaire, gélose trypticase-soja, gélose brewer en jarre anaérobie, ainsi que sur bouillon thioglycolate-résazurine pour la recherche simultanée des

aérobies et des anaérobies. La composition de ces milieux répond aux normes des pharmacopées française et américaine.

A. Elevage de l'insecte *G. mellonella*

1) L'élevage holoxène, maintenu à 28°C, est réalisé, soit sur pollen et cire, soit sur milieu empirique (milieu 1) : miel 250 g, farine de froment 340 g, cire d'abeille 50 g, glycérol 220 ml, levure sèche 100 g, nipagine (parahydroxybenzoate de méthyle) 1,75 g.

2) L'élevage axénique, maintenu à 28°C, est réalisé sur le même substrat nutritif, mais sans nipagine (milieu 2). Ce milieu est stérilisé par autoclavage pour la fraction énergétique et par filtration pour la fraction vitaminique. Les œufs d'une ponte de 3 à 4 j., sont désinfectés avec de l'hypochlorite de Na (12° Chl.) à 3 p. 100 pendant 30 mn dans une fiole à conduit latéral permettant un rinçage abondant à l'eau distillée stérile, afin d'éliminer toute trace de désinfectant. Après élimination de l'eau résiduelle dans la fiole, on y dépose de petites cupules de verre contenant le milieu stérilisé. Les œufs éclosent en 2 à 3 j. et les larves néonates vont directement se fixer sur les cupules nutritives. Lorsque la récolte est estimée suffisante, les cupules sont prélevées, ce qui évite de léser les jeunes larves très fragiles, et sont transférées dans des tubes ou des fioles de plus grand volume (100 à 500 ml) contenant le milieu 2 en quantité suffisante pour les besoins d'un développement larvaire. Après 30 j. en moyenne, on dispose d'insectes axéniques au dernier stade larvaire en quantité suffisante pour les manipulations envisagées.

B. Elevage du nématode *N. carpocapsae*

Les *Neoaplectana* utilisés sont : *N. carpocapsae* écotype « DD 136 » (provenance U.S.A.), *N. carpocapsae* écotype « Agriotos » (provenance U.R.S.S.), *N. carpocapsae* écotype « Plougastel » (provenance France ; interfécond avec les écotypes précédents, POINAR, comm. pers.).

1. L'élevage holoxène est réalisé à 25°C :

— soit par infestation naturelle de *G. mellonella*.

— soit sur un milieu empirique (milieu 3) à base d'aliments pour animaux : biscuit (commercialisé sous le nom de « Friskies foie ») 300 g., agar 15 g., eau distillée 1 000 ml. Ce milieu est autoclavé 40 mn à 110°C en tubes à essai, puis coulé en boîtes de Petri. Les nématodes (larves infestantes L₃ ou population tous stades) sont désinfectés par immersion dans de l'hypochlorite de Na (12° Chl.) à 10 p. 100 pendant 20 mn, rincés 3 fois dans une solution de Ringer stérile et déposés dans les boîtes de Petri.

— soit sur milieu semi-synthétique (milieu 4), dont la composition sera publiée ultérieurement (FARAUT, comm. pers.).

2. L'élevage axénique est réalisé par stérilisation en surface des œufs provenant de femelles gravides géantes de 1^{re} génération, obtenues après 4 j. d'un élevage holoxénique sur *G. mellonella* ou sur les milieux 3 ou 4. Deux méthodes peuvent être utilisées pour recueillir et traiter les œufs :

— Les femelles sont broyées modérément avec un agitateur en verre sur un tamis au-dessus d'une boîte de Petri. Le broyat est récupéré dans une solution de Ringer et traité par centrifugation en gradient de densité qui permet d'obtenir une grande quantité d'œufs en un temps relativement

court. Un gradient de sucrose (d = 1,02 à 1,18) est préparé, sur lequel le broyat est déposé. Après centrifugation (4.000 g, 10 mn, 8°C), on obtient une couche surnageante de lipides, une zone où sont concentrés les œufs et un culot de débris cellulaires. Après prélèvement, la zone centrale est rincée par 3 centrifugations successives (2.000 g, 10 mn, 8°C) dans une solution de Ringer stérile. La densité des micro-organismes et des débris cellulaires étant différente de celle des œufs, cette méthode réalise à la fois une bonne séparation et une 1^{re} décontamination par voie physique. Les œufs sont alors désinfectés dans de l'hypochlorite à 10 p. 100 pendant 30 mn, rincés par 3 centrifugations en solution de Ringer stérile et déposés dans un verre de montre avec une solution de Ringer stérile où l'éclosion a lieu dans les 24 h.

— Les femelles sont disséquées en solution de Ringer et les œufs, récupérés par pipetage, sont placés dans un tamis de maille 5 µm. Le tamis est immergé dans l'hypochlorite de Na à 10 p. 100 pendant 30 mn, rincé 3 fois en solution de Ringer stérile, puis déposé dans un verre de montre contenant la solution de Ringer stérile. Les jeunes larves éclosent en 24 h, passent à travers les mailles et sont prêtes à être utilisées.

Quelle que soit la méthode employée, les larves néonates ne survivent pas plus de 24 h dans la solution de Ringer ; il convient donc de les utiliser le plus rapidement possible.

C. Etude de l'action des L₁ axéniques de *N. carpocapsae* sur *G. mellonella*

Les L₁ axéniques sont prélevées à la seringue dans les verres de montre d'éclosion et sont administrées, soit par ingestion forcée, soit par injection dans l'hémocoèle, à des lots de *G. mellonella* provenant d'élevages holoxéniques ou axéniques maintenus à 25°C. Après la mort, les *Galleria* sont disséquées et l'état de développement des nématodes est noté. Les témoins sont constitués par des *G. mellonella* axéniques auxquelles on fait ingérer ou auxquelles on injecte une solution de Ringer stérile.

D. Réalisation des combinaisons gnotoxéniques

Les L₁ axéniques sont contaminées :

— Avec un seul type de bactéries isolées à l'origine chez *N. carpocapsae* écotype « DD 136 » (monoxénie holoxène), ou chez d'autres nématodes : *N. carpocapsae* écotype « Plougastel », *Neoaplectana* spp., *Caenorhabditis elegans* Dougherty (monoxénies hétéroxènes).

— Avec 2 types de germes appartenant, soit à 2 souches de la même espèce bactérienne (dixénie holoxène de souches), soit à 2 espèces bactériennes différentes (dixénie holoxène vraie).

— Avec 3 types de germes appartenant, soit à 2 espèces bactériennes dont une sous forme de 2 souches différentes (trixénie holoxène, dont une dixénie de souche), soit 3 espèces bactériennes différentes provenant de *N. carpocapsae* écotype « DD 136 » (trixénie holoxène vraie), ou d'autres nématodes (trixénie hétéroxène vraie).

Les L₁ axéniques sont contaminées par une immersion de 5 mn dans un bouillon de culture de 24 h de la souche bactérienne sélectionnée. Dans le cas d'une dixénie ou d'une trixénie, les bouillons des différentes cultures bactériennes ne sont mélangés qu'extemporanément avant immersion des nématodes.

Pour juger de la valeur de ces recombinaisons gnotoxé-

niques par rapport à l'élevage de *N. carpocapsae* DD 136 doté de l'ensemble de sa flore bactérienne (élevage holoxène), les L₁ gnotoxéniques sont injectées à des *Galleria* axéniques (*Galleria* 1) élevées en tube individuel sur le milieu 2. Si l'association est fonctionnelle, l'insecte meurt et les nématodes se reproduisent. En fin de multiplication, les L₃ infestantes sont recueillies et mises en présence d'une autre *Galleria* axénique (*Galleria* 2) qu'elles doivent envahir naturellement, afin de juger si l'éthologie est conservée. Si la *Galleria* 2 meurt et que les nématodes se reproduisent convenablement, les L₃ infestantes sont à nouveau récupérées, transférées sur un 1^{er} substrat d'élevage (milieu 3) et éventuellement, si la multiplication est correcte, sur un 2^e substrat (milieu 4). La multiplication des nématodes recombinés sur les milieux 3 et 4 est réalisée en parallèle à 2 températures (20 et 25°C).

E. Elevage axénique sur milieu empirique enrichi en biomasse bactérienne inactivée

Les souches bactériennes sélectionnées à partir des essais de gnotoxénie viables sont mises à cultiver en bouillon. Ce dernier estensemencé sur les milieux 3 et 4 stériles dont les compositions, proches de celles des milieux bactériologiques usuels, permettent d'assurer une certaine croissance des souches que l'on laisse incuber 48 h. La culture est alors inactivée par la chaleur (80°C, 30 mn). Un prélèvement du milieu inactivé estensemencé en bouillon trypticase-soja pour vérifier l'absence de germes viables. La présence de bactéries sporulées, dont la germination pourrait être favorisée par la procédure d'inactivation (sélection par thermorésistance), est vérifiée par un repiquage sur gélose à l'extrait de viande sans peptone, où le contaminant éventuel sporule en 2 à 15 j. On élimine les contaminations accidentelles et on ne retient que les essais parfaitement aseptiques.

TABLEAU 1

Souches utilisées au cours de l'étude
Strains used

Origine	Espèce microbienne	Nbre de souches
<i>N. carpocapsae</i> « DD 136 »	<i>Aeromonas hydrophila</i>	10
	<i>Alcaligenes spp.</i>	3
	<i>Bacillus megaterium</i>	2
	<i>Bacillus coagulans</i>	2
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	6
	<i>Flavobacterium spp.</i>	4
	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	2
	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	3
	<i>Serratia liquefaciens</i>	6
	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	20
	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> (ATCC 19061)	1
<i>N. carpocapsae</i> « Plougastel »	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	3
<i>Neoaplectana spp.</i>	<i>Xenorhabdus spp.</i>	6
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	2
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
		72

Les L₁ stériles sont alors déposées sur ces milieux inactifs et on suit l'évolution de leur croissance et des générations successives pendant 1 mois à 25°C.

F. Cultures microbiennes

L'origine et les conditions d'isolement des cultures microbiennes utilisées dans cette étude seront publiées par ailleurs. Les germes proviennent essentiellement des écotypes « DD 136 » et « Plougastel » de *N. carpocapsae*. A des fins de comparaison, certaines cultures sont issues de nouvelles espèces de *Neoaplectana* sp. récoltées dans différentes régions de France, d'un élevage de *C. elegans* (OUAZANA *et al.*, 1978) et de la culture de collection ATCC 19061 de *X. nematophilus*. Le tableau 1 résume l'origine et le nom des espèces microbiennes.

Après une opération d'implantation de souches bactériennes avec un nématode axénique (monoxénie, dixénie, trixénie, etc.), le maintien et la persistance de la ou des souches introduites sont contrôlés bactériologiquement sur les animaux de différentes générations obtenus à partir de la combinaison initiale. Ce contrôle comprend une numération ainsi qu'une reconnaissance morphologique et biochimique selon les caractéristiques de la ou des souches introduites.

III. RÉSULTATS

A. Action des L₁ axéniques sur *G. mellonella*

Les L₁ axéniques inoculées à des *Galleria* axéniques par injection directe ou ingestion forcée provoquent la mort au bout de 5 j. Toutes les répétitions effectuées conduisent à une mortalité totale. La dissection des *Galleria* montre que les nématodes se développent jusqu'au 4^e stade, parfois jusqu'à l'adulte, mais sans donner de descendance. Les *Galleria* axéniques témoins inoculées avec la solution de Ringer stérile ne meurent pas ; on note seulement dans l'essai par injection un léger retard de l'ecdysis larvo-nymphale sans que la mue imaginale en soit affectée.

Les L₁ axéniques inoculées par injection à des *Galleria* holoxéniques provoquent également la mort en 5 j., ce qui est normal puisque l'hémocoèle d'un insecte est stérile. Une septicémie *post-mortem* se déclare néanmoins, provoquée par l'intrusion, dans la cavité générale, des bactéries provenant du tube digestif de l'hôte à la suite de la lyse de la paroi intestinale qui survient très rapidement au moment de la mort. Les nématodes peuvent alors atteindre le stade adulte et donner, dans certains cas, un début de descendance dû vraisemblablement à la présence des bactéries de l'hôte.

Les L₁ axéniques inoculées par ingestion forcée aux *Galleria* holoxéniques, provoquent la mort plus rapide en 2 ou 3 j. Cette mort plus précoce est la conséquence du franchissement de la barrière intestinale par les nématodes qui entraînent avec eux des bactéries du tractus digestif de l'hôte, bactéries qui sont à l'origine de la septicémie.

Si l'on met en présence les L₁ axéniques (et des *Galleria* axéniques sur un papier filtre stérile en boîte de Petri, l'infestation naturelle se produit et les insectes meurent de la même façon que précédemment quand ils sont contaminés par injection ou ingestion forcée. On notera, par conséquent, que la réalisation expérimentale du cycle biologique de *N. carpocapsae* peut être effectuée, non pas uniquement à partir du stade infestant L₃, mais aussi à partir des L₁.

B. Elevages gnotoxéniques**1. Combinaisons monoxéniques (tabl. 2)**

Quel que soit le type de combinaison, holoxène ou hétéroxène, les L₁ axéniques associées avec l'un des germes isolés (tabl. 1) et injectées à une *Galleria*, provoquent la mort. Celle-ci apparaît en 2 j avec *Aeromonas hydrophila* Stanier, *Enterobacter agglomerans* Beijerinck, *Serratia liquefaciens* Beijerinck et *X. nematophilus*, en 3 j avec les autres espèces. Les bactéries, quelle que soit leur appartenance systématique, renforcent donc très notablement l'action pathogène propre du nématode en provoquant une mort

beaucoup plus rapide par une septicémie irréversible. On observe, si la multiplication a été favorable dans la *Galleria* 1, que les L₃ infestantes recueillies et utilisées pour infester la *Galleria* 2, induisent un développement complet en conservant l'intégrité de leur comportement. Dès que ce test se révèle positif, les transferts successifs sur plusieurs autres insectes axéniques n'offrent pas de difficultés majeures. Avec *A. hydrophila*, *Bacillus megaterium* De Bary, *Bacillus coagulans* Hammer, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas maltophilia* Hugh & Ryschenkow et *Pseudomonas saccharophila* Doudoroff, le développement ne se produit pas dans la *Galleria* 2.

TABLEAU 2

Essais de monoxénie
Monoxenic assays

Nature de l'association inoculée dans l'insecte axénique	Mortalité en jours (1)	Développement dans la <i>Galleria</i> 1			Développement dans la <i>Galleria</i> 2 (5)	Transfert sur				
		Nombre d'essais (2)	Nombre de succès (3)	L ₃ infestantes (4)		Milieu 3 20°C (6)	25°C (6)	Milieu 4 20°C (6)	25°C (6)	
A. Essais holoxéniques										
L ₁ + <i>A. hydrophila</i>	2	10		—						
L ₁ + <i>Alcaligenes</i>	3	3		—						
L ₁ + <i>B. megaterium</i>	3	2		—						
L ₁ + <i>B. coagulans</i>	3	2		—						
L ₁ + <i>E. agglomerans</i>	2	6	1	+	+	—	—			
L ₁ + <i>Flavobacterium</i>	3	4		—						
L ₁ + <i>P. maltophilia</i>	3	2		—						
L ₁ + <i>P. saccharophila</i>	3	3		—						
L ₁ + <i>S. liquefaciens</i>	2	6	1	+	+	+	—	—		
L ₁ + <i>X. nematophilus</i>	2	20	1	+	+	—	—			
L ₁ + <i>X. nematophilus</i>	2	20	1	+	+	+	+	—	—	
L ₁ + <i>X. nematophilus</i>	2	20	1	+	+	+	—	+	—	
L ₁ + <i>X. nematophilus</i>	2	20	2	+	+	+	+	+	—	
L ₁ + ATCC 19061	2	1	1	+	+	+	—	+	—	
L ₁ + <i>X. nematophilus</i>	2	20	1	+	+	+	+	+	+	
B. Essais hétéroxéniques										
L ₁ + <i>A. hydrophila</i>	2	1		—						
L ₁ + <i>E. agglomerans</i>	2	2	1	+	+	—	—	—	—	
L ₁ + <i>P. fluorescens</i>	2	1	1	+	+	+	—	+	—	
L ₁ + <i>X. nematophilus</i>	2	3	1	+	+	+	+	—	—	
L ₁ + <i>Xenorhabdus</i> spp.	2	6	1	+	+	+	+	—	—	
Témoins										
L ₁ stériles sur insectes axéniques	5	32		—						
L ₁ stériles ingérées par insectes holoxéniques	3	9	2	(+) ⁽⁷⁾						
L ₁ stériles inoculées à insectes holoxéniques	5	13	4	(+) ⁽⁷⁾						

(1) Mortalité moyenne après inoculation de la *Galleria* 1 (en nombre de jours) ;

(2) Nombre de combinaisons effectuées sur la *Galleria* 1 à partir de souches différentes de la même espèce bactérienne ;

(3) Nombre de combinaisons réussies (multiplication des nématodes dans l'insecte) ;

(4) Présence de L₃ s'échappant du cadavre de la *Galleria* 1 ;

(5) Développement dans la *Galleria* 2 par infestation naturelle à partir de L₃ provenant de la *Galleria* 1 ;

(6) Présence ou absence de développement ;

(7) Présence de générations agnotobiontiques.

(1) Average mortality after inoculation of *Galleria* 1 (expressed in number of days) ;

(2) Number of combinations carried out on *Galleria* 1 using different strains of the same species of bacteria ;

(3) Number of successful combinations (multiplication of the nematode in the insect) ;

(4) Presence of L₃ escaping from the dead *Galleria* 1 ;

(5) Development in *Galleria* 2 by natural infection using L₃ migrating from *Galleria* 1 ;

(6) Presence or absence of development ;

(7) Presence of agnotobiontic generations.

Le passage ultérieur sur milieu artificiel (milieux 3 et 4) s'avère beaucoup plus aléatoire. Seules 8 souches de *X. nematophilus* (sur 24), une souche de *Xenorhabdus* sp. (sur 6), une souche de *S. liquefaciens* (sur 6) et *Pseudomonas fluorescens* Migula induisent un développement sur ces milieux. Tous les autres germes entrent en compétition avec le nématode dont le développement est inhibé par une prolifération excessive des micro-organismes sur les milieux. Sur 13 monoxénies viables sur insecte, 10 sont transférables sur le milieu 3 à 20°C (perte de la monoxénie avec une souche de *X. nematophilus* et des monoxénies à *E. agglomerans* holoxène et hétéroxène) et seulement 6 d'entre elles donnent un bon développement à 25°C (perte de la monoxénie à *P. fluorescens* hétéroxène, de celle à *S. liquefaciens* et de 2 à *X. nematophilus*). Seules 2 des 3 monoxénies à *X. nematophilus*, viables à 25°C sur le milieu 3, ont donné une bonne multiplication à 20°C sur le milieu 4, mais ont été abandonnées à 25°C en raison de la faiblesse de leur rendement. Une seule souche de *X. nematophilus* a été transférable en toute circonstance sur les 2 milieux. La souche de collection de *X. nematophilus* (ATCC 19061) ne se conserve pas dans les monoxénies à 25°C sur les 2 milieux. Hors des conditions idéales du milieu intérieur de l'insecte, ces résultats soulignent l'importance de l'aliment et de la température dans le processus de développement saprophyte de *N. carpocapsae*. Les effets observés sont la conséquence, pour une part, de la prolifération bactérienne observée au-delà de 20°C. Cette compétition, sur le substrat alimentaire, entre les 2 éléments biotiques de l'association expérimentale doit être rapprochée du fait que les bactéries utilisées ont un optimum thermique à 30°C pour la plupart d'entre elles. On note, d'autre part, que les différentes souches de la même espèce bactérienne n'induisent pas le même degré de multiplication du nématode. Il existe donc une spécificité de souche au sein d'une même espèce et sur les 72 associations monoxéniques tentées, 13 seulement ont donné un résultat sur insecte.

Les témoins constitués par des *Galleria* axéniques, inoculées par injection avec les L₁ axéniques, et par des *Galleria* holoxéniques, inoculées par injection ou ingestion forcée également avec des L₁ axéniques, donnent des résultats comparables à ceux enregistrés précédemment (action des L₁ axéniques sur *G. mellonella*), c'est-à-dire aucun développement dans le 1^{er} cas, développement limité, aléatoire, agnotobiontique dans le 2^e cas, n'aboutissant pas à des L₃ infestantes permettant le passage à la *Galleria* 2.

2. Combinaisons dixéniques et trixéniques (tabl. 3)

Parmi les combinaisons tentées, en nombre cependant limité, le tableau 3 résume les cas favorables et seulement 2 cas négatifs à titre d'exemples.

Comme dans les essais monoxéniques, la combinaison de 2 ou 3 souches ou espèces différentes provoque la mort de la *Galleria* 1 en 2 j. A l'exception de la dixénie de souche *A. hydrophila* et de la trixénie comportant *B. megaterium*, les autres combinaisons ont donné un excellent développement des nématodes dans la *Galleria* 1 et les L₃ recueillies ont infesté correctement la *Galleria* 2. Les L₃ recueillies à partir de ces séries gnotoxéniques peuvent infester des insectes holoxéniques, leur activité étant comparable à celle des nématodes holoxènes. Leur microflore va alors dériver progressivement en présence des micro-organismes du milieu ambiant.

Les transferts sur milieux 3 et 4 sont également, comme en monoxénie, beaucoup plus aléatoires. On constate que les associations les plus fonctionnelles sont celles où *X. ne-*

matophilus a été implanté, ce qui confirme l'intérêt de ce germe pour la croissance du *Neoaplectana* en conditions saprophytes.

La présence de 2 ou 3 souches ou espèces a permis de tenter d'apprécier le devenir respectif de celles-ci au fur et à mesure des transferts, bien qu'il soit impossible de repérer, dans les dixénies de souches ou les trixénies contenant une dixénie de souches, lequel des 2 variants domine ou s'ils sont en proportions égales. Lorsque l'association comporte la présence de *B. coagulans*, on constate que les L₃ sont seulement porteuses de spores, le bacille Gram + ayant sa croissance végétative inhibée. Lorsque 3 bacilles Gram - se trouvent associés (2 souches d'*E. agglomerans* et *P. saccharophila*; *X. nematophilus*, *P. saccharophila* et *E. agglomerans*), ils se maintiennent au cours des transferts, mais ne sont efficaces que sur la multiplication du nématode dans l'insecte. Alors que *B. coagulans* est dominé, *B. megaterium*, autre espèce Gram +, inhibe *X. nematophilus* et la recombinaison n'est pas viable. Lorsque *S. liquefaciens* est associé à *X. nematophilus*, le premier nommé tend à supplanter le deuxième, alors que l'association est fonctionnelle, mais seulement sur le milieu 3 à 20°C. Inversement, si l'on adjoint à *B. coagulans* et *X. nematophilus* une souche hétéroxène de *P. fluorescens*, la trixénie est fonctionnelle sur insecte et sur le milieu 3, alors que *X. nematophilus* est dominant et ses 2 associés sont peu représentés. *X. nematophilus* et *E. agglomerans* semblent cohabiter sans apparente compétition et donnent des élevages dixéniques (ou trixéniques avec *B. coagulans*) sur insecte et sur les milieux 3 et 4 à 20°C. Les dixénies de souche à *X. nematophilus* ou trixénies (avec *B. coagulans*) induisent les meilleures conditions de développement du nématode sur les milieux 3 et 4 à 20° et 25°C.

Les apparentes contradictions mises en évidence (*Bacillus* dominant ou dominé, *Xenorhabdus* dominant ou dominé, etc.) démontrent que la distinction bactériologique basée sur une identification morphologique et biochimique aboutissant à des critères d'espèces, est impuissante à rendre compte de la spécificité des souches. D'autre part, il est évident que la combinaison de 3 souches seulement est insuffisante pour donner une image, même simplifiée, des équilibres microbiocénologiques de l'élevage holoxène.

C. Elevage axénique de *N. carpocapsae* sur milieu enrichi en biomasse bactérienne

Les *Neoaplectana* axéniques, obtenus à partir de la désinfection des œufs, ne se développent pas sur *Galleria* axénique ni sur les milieux stériles 3 et 4. Or, ces milieux sont aptes à assurer une croissance optimale d'un élevage saprophyte de nématodes holoxènes. Les expériences de combinaisons gnotoxéniques ayant démontré le rôle des bactéries dans la reproduction des nématodes, des souches de *X. nematophilus* et d'*E. agglomerans*, choisies pour leurs bons résultats en gnotoxénie, ont été cultivées sur les milieux et inactivées.

Le dépôt des larves néonates axéniques sur les milieux à bactéries inactivées conduit à un très bon développement, comparable à celui de l'élevage holoxène. La biomasse bactérienne conserve ses propriétés stimulantes sur la production du nématode, même après traitement thermique à 80°C pendant 30 mn. Les L₃ axéniques recueillies sont infestantes en conditions stériles. Elles provoquent la mort des *Galleria* axéniques comme avec les L₁ axéniques précédentes et sont également infestantes pour les insectes holoxènes.

TABLEAU 3
Essais dixéniques et trixéniques
Dixenic and trixenic assays

Nature de l'association inoculée dans l'insecte axénique	Mortalité en jours (1)	Développement dans la <i>Galleria</i> 1			Développement dans la <i>Galleria</i> 2 (5)	Transfert				Persistence des souches implantées		
		Nombre d'essais (2)	Nombre de succès (3)	L ₃ infestantes (4)		Milieu 3 20°C (6)	25°C (6)	Milieu 4 20°C (6)	25°C (6)	(7)	(7)	(7)
A. Essais holoxéniques												
Dixénies de souches												
L ₁ + <i>A. hydrophila</i> (2 souches)	2	1		—								
L ₁ + <i>E. agglomerans</i> (2 souches)	2	1	1	+	+	+	—		—	+	+	
L ₁ + <i>S. liquefaciens</i> (2 souches)	2	1	1	+	+	+	—		—	+	+	
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> (2 souches)	2	4	4	+	+	+	+	+	+	+	+	
Dixénies vraies												
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>B. coagulans</i>	2	3	1	+	+	+	+	+	+	+	+	
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>E. agglomerans</i>	2	1	1	+	+	+	—	+	—	+	+	
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>S. liquefaciens</i>	2	1	1	+	+	—	—			+	+	
Trixénies dont une dixénie de souches												
L ₁ + <i>E. agglomerans</i> (2 souches)	2	1	1	+	+	—	—			+	+	+
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> (2 souches)	2	6	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>B. coagulans</i>	2	1	1	—	—	—	—			—	—	+
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>B. megaterium</i>	2	1	1	—	—	—	—			—	—	+
Trixénies vraies												
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>P. saccharophila</i> <i>E. agglomerans</i>	2	1	1	+	+	—	—			+	—	+
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>S. liquefaciens</i> <i>B. coagulans</i>	2	1	1	+	+	—	—			(+) ⁽⁸⁾	+	(+)
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>E. agglomerans</i> <i>B. coagulans</i>	2	1	1	+	+	+	—	+	—	+	+	(+)
B. Essai hétéroxénique												
L ₁ + <i>X. nematophilus</i> <i>B. coagulans</i> « <i>P. fluorescens</i> » ⁽⁹⁾	2	1	1	+	+	+	+	—	—	+	(+)	(+)

(1) Mortalité moyenne après inoculation de la *Galleria* 1 (en nombre de jours) ;

(2) Nombre de combinaisons effectuées sur la *Galleria* 1 à partir de souches différentes de la même espèce bactérienne ;

(3) Nombre de combinaisons réussies (multiplication des nématodes dans l'insecte) ;

(4) Présence de L₃ s'échappant du cadavre de la *Galleria* 1 ;

(5) Développement dans la *Galleria* 2 par infestation naturelle à partir des L₃ provenant de la *Galleria* 1 ;

(6) Présence ou absence de développement ;

(7) Présence ou absence des souches introduites dans l'ordre de leur présentation ;

(8) () = pour une bactérie sporulée : présence de spores uniquement ;

() = pour une bactérie Gram — : sous-dominance ;

(9) Souche hétéroxénique.

(1) Average mortality after inoculation of *Galleria* 1 (expressed in number of days) ;

(2) Number of combinations carried out on *Galleria* 1 using different strains of the same species of bacteria ;

(3) Number of successful combinations (multiplication of the nematode in the insect) ;

(4) Presence of L₃ escaping from the dead *Galleria* 1 ;

(5) Development in *Galleria* 2 by natural infection using L₃ migrating from *Galleria* 1 ;

(6) Presence or absence of development ;

(7) Presence or absence of strains introduced, (in the order of their arrangement) ;

(8) () = for the sporulating bacteria : presence of spores ;

() = for Gram — negative bacteria : sub-dominance ;

(9) Heteroxenic strain.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Tous les auteurs qui ont tenté l'élevage axénique de *N. carpocapsae* ont utilisé, comme point de départ, les larves infestantes L₃ désinfectées dans des solutions d'antiseptiques, puis maintenues pendant des périodes prolongées dans des bains d'antibiotiques (JACKSON, 1965 ; HANSEN *et al.*, 1968 ; TARAKONOV & ANDREEVA, 1974). POINAR & THOMAS (1966) utilisent la même procédure, mais à partir des adultes. Lors de la désinfection des larves, l'antiseptique peut endommager irréversiblement l'épithélium s'il pénètre dans le tractus digestif. Les larves rescapées d'une désinfection sont donc celles qui ont eu le moins à souffrir des effets internes de l'action antiseptique. C'est cette méthodologie qui est suivie par les auteurs pour obtenir couramment des nématodes monoxéniques à *X. nematophilus* : désinfection des L₃ suivie d'un contrôle de la présence de ce germe. Les nématodes sont alors utilisés pour lancer un élevage (POINAR & THOMAS, 1966 ; BEDDING, 1981), ce qui est la reconnaissance implicite que les L₃ initiales n'étaient pas axéniques. D'autre part, dans le cas de l'emploi d'antibiotiques, on doit toujours craindre qu'une bactériostase dissimule une bactéricide supposée ou qu'une sélection de bactéries résistantes se produise.

Au contraire, les œufs viables récoltés après aseptisation chimiothérapique, sont débarrassés de toute flore extérieure hormis les symbiotes transmis par voie transovocytaire, ce qui n'est pas le cas ici. Cette méthode, qui garantit la stérilité des individus obtenus, permet de montrer que l'élevage axénique de *N. carpocapsae* est impossible en l'absence d'apport bactérien, aussi bien dans les insectes axéniques (alors que l'hémocoel semble, *a priori*, le plus favorable des milieux) que sur les milieux nutritifs propres au développement xénique des nématodes. En réalité, l'élevage axénique sera possible dans l'avenir, dans la mesure où l'on parviendra à apporter tous les éléments de remplacement dans la ration alimentaire. Lorsque le rôle des bactéries sera mieux connu (bioconversion opérée sur l'aliment, biosynthèse d'éléments indispensables, biomasse bactérienne elle-même), il est probable que l'élaboration de milieux synthétiques aptes à la production de masse de nématodes axéniques pourra être menée à bien. Dans l'état actuel des recherches, l'élevage axénique véritable n'est possible que sur milieu empirique enrichi par un apport microbien, admis à cultiver pendant un certain temps sur le substrat, puis inactivé pour en assurer l'asepsie.

Ainsi, l'obtention garantie de larves L₁ stériles de *N. carpocapsae* a permis de montrer qu'elles pouvaient se développer jusqu'au stade L₄ et parfois adulte dans des insectes axéniques sans toutefois obtenir de descendance. Comme la mort de l'insecte survient dans un délai de 5 j,

l'action délétère consécutive au développement larvaire du nématode dans son hôte a fort probablement une origine toxique, principalement au moment où le nématode est au stade L₄. Le développement peut se poursuivre au-delà, en donnant plusieurs générations, si les L₁ ont été associées avec une souche bactérienne définie avant leur introduction dans l'insecte axénique. D'autre part, ces résultats mettent pour la 1^{re} fois en évidence, que le cycle biologique de *N. carpocapsae* peut être obtenu expérimentalement à partir de larves néonates L₁, alors que la reprise du cycle s'effectue toujours à partir des larves L₃ infestantes dans les conditions naturelles.

Les expériences de recombinaisons gnotoxéniques ont montré toute l'importance de l'aliment (insecte ou milieu nutritif) offert au nématode, qui oriente la croissance des espèces microbiennes. Ceci explique en partie les échecs des séries gnotoxéniques viables sur l'insecte, lorsqu'elles sont transférées sur milieu artificiel. Les monoxénies viables dans l'insecte, qui ont été retenues, sont celles qui résultent des combinaisons avec *E. agglomerans*, *S. liquefaciens*, *P. fluorescens* et *X. nematophilus*, en tenant compte également du fait qu'il existe une spécificité de souche au sein de l'espèce bactérienne morphologiquement et biochimiquement définie. Les dixénies de souche corroborent des monoxénies obtenues avec *E. agglomerans*, *S. liquefaciens* et *X. nematophilus*, cette dernière association étant la meilleure pour les transferts sur milieux empiriques. Ces résultats sont en accord avec les données de AKHURST (1980) et de BEDDING (1981).

Dans les conditions d'un développement saprophyte sur milieu nutritif, *X. nematophilus* s'avère donc la meilleure bactérie pour assurer un bon développement du nématode. Son rôle pathologique peut se comparer à celui d'autres germes entomopathogènes comme *S. liquefaciens* ou *P. fluorescens* présents dans la flore du nématode. La pérennité de la présence de *X. nematophilus* à tous les stades du développement du nématode holoxène, en qualité d'espèce sous-dominante vis-à-vis des autres populations bactériennes, témoigne d'un rôle de régulation dans l'écosystème bactérien de *N. carpocapsae* qui doit être recherché.

On peut considérer, dans les conditions naturelles, que *N. carpocapsae* est un prédateur qui tue sa proie conjointement par une action toxémique et grâce au concours de bactéries dont il prédispose l'action septicémique. Son régime alimentaire semble partiellement « microbivore ». Sa qualité de prédateur explique son absence de spécificité parasitaire, ce qui doit être pris en compte au niveau de l'utilisation dans la pratique en lutte biologique.

Reçu le 21 juillet 1982.
 Accepté le 6 janvier 1983.

ANNEXE I

Glossaire des termes gnotobiologiques utilisés
Glossary of gnotobiological terms used

Les définitions sont empruntées à DUCLUZEAU & RAIBAUD (1979) :

animal axénique ou *abiontique* : animal vivant sans germe.
axénie, *abiontie* : vie sans germe (*asepsie* = absence de germes).
animal mono-, di-, tri-, ... polyxénique ou *polybiotique* : animal associé avec une population d'une, 2, 3, ... plusieurs espèces microbiennes.
monoxénie, *dixénie*, etc. : vie avec 1, 2 populations microbiennes, etc.
animal gnotoxénique ou *gnotobiontique* : pour lequel on connaît l'identité exacte des espèces microbiennes implantées.
gnotoxénie ou *gnotobiontie* : vie animale avec un ensemble de germes définis.
animal holoxénique : animal hébergeant les micro-organismes habituels de son espèce.
animal hétéroxénique : animal auquel l'on a associé durablement une ou plusieurs espèce(s) microbienne(s) étrangère(s).
animal agnotoxénique ou *agnotobiontique* : animal associé à des germes non définis.
 Par extension : *bactérie holoxénique* : souche issue de l'espèce animale étudiée ; *bactérie hétéroxénique* : souche étrangère de l'espèce animale.
Dauer larvae : (emprunté à l'allemand) : larves L₃ quiescentes, stade libre des *Rhabditidae* parasites d'insectes, à l'origine des infestations.

axenic animal : animal free from microorganisms.
mono-, di-, tri-, ... polyxenic or *polybiontic animal* : animal associated with one, 2, 3, ... several species of clearly defined microorganisms.
gnotoxenic or *gnotobiontic animal* : animal which carries certain species of clearly defined microorganisms.
holoxenic animal : animal carrying the normal microorganisms for its species.
heteroxenic animal : animal associated with one or several foreign species of microorganisms.
agnotoxenic animal : animal with an unknown associated microflora.
holoxenic strain : normal strain of bacteria associated with the animal studied ; *heteroxenic strain* : foreign strain of bacteria for the animal studied.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akhurst R.J., 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. gen. Microbiol.*, **121**, 303-309.
- Bedding R.A., 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (*Nematoda*) for field control of insect pests. *Nematologica*, **27**, 109-114.
- DucluzEAU R., Raibaud R., 1979. *Ecologie microbienne du tube digestif*. Masson, Paris, 96 p.
- Dutky S.R., Hough W.S., 1955. Note on a parasitic nematode from codling moth larvae, *Carpocapsa pomonella* (*Lepidoptera, Olethreutidae*). *Proc. entomol. Soc. Wash.*, **57**, 244.
- Dutky S.R., Thompson J.V., Cantwell G.E., 1964. A technique for the mass propagation of the DD 136 nematode. *J. Insect. Pathol.*, **6**, 417-422.
- Hansen E.D., Yarwood E.A., Jackson G.J., Poinar G.O., 1968. Axenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* in liquid media. *J. Parasitol.*, **54**, 1236-1237.
- House H.L., Welch K.E., Cleugh T.R., 1965. Food medium of prepared dog biscuit for the mass-production of the nematode DD 136 (*Nematoda, Steinernematidae*). *Nature*, **206**, 847.
- Jackson G.J., 1965. Differentiation of three species of *Neoaplectana* (*Nematoda, Rhabditida*), grown axenically. *Parasitology*, **55**, 571-578.
- Laumond C., Boemare N. 1976. Relationships between *Neoaplectana* and its associated bacteria. *Proc. Coll. europ. Soc. Nematol.*, Dublin.
- Laumond C., Mauleon H., Kermarrec A., 1979. Données nouvelles sur le spectre d'hôtes et le parasitisme du nématode entomophage *Neoaplectana carpocapsae*. *Entomophaga*, **24**, 13-27.
- Lysenko O., Weiser J., 1974. Bacteria associated with the nematode *Neoaplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, **24**, 332-336.
- Neuschulz V.N., 1977. Axenische Nematodenkultivierung. *Z. Versuchstierkd.*, **19**, 241-247.
- Niklas O.F., 1967. Die Nematoden DD 136 (*Neoaplectana* sp.) und *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, 1955 (*Rhabditoidea*) als Insektenparasiten. Eine Literaturübersicht. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft*, Berlin-Dahlem, **124**, 40 pp.
- Nicklas O.F., 1969. Ergänzungen zum Literaturbericht über die Nematode DD 136 (*Neoaplectana carpocapsae* Weiser, strain DD 136 ; *Rhabditida*). *Nach. Dtsch. Pflanzensch.*, **5**, 71-78.
- Ouazana R., Bosch C., Boemare N., 1978. Some observations on cultivation of N₂ Bristol strain of *Caenorhabditis elegans* on the A₁ medium. *Worm Breed. Gaz.*, **3**, 32.
- Poinar G.O., 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (*Steinernematidae, Nematoda*). *Nematologica*, **12**, 105-108.
- Poinar G.O., 1975. Entomogenous nematodes. *E.J. Brill*, Leiden, Netherlands, 317 p.
- Poinar G.O., 1979. Nematodes for biological control of insects. *C.R.C. Press. Inc.*, Florida, 277 pp.
- Poinar G.O., Thomas G.H., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (*Achromobacteriaceae, Eubacteriales*) in the development of the nematode DD 136 (*Neoaplectana* sp., *Steinernematidae*). *Parasitology*, **56**, 385-390.
- Poinar G.O., Thomas G.M., 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *J. Invertebr. Pathol.*, **9**, 510-514.
- Tarakanov V.I., Andreeva G.N., 1974. Méthodes d'élevage axénique des nématodes du genre *Neoaplectana* (en russe). *Bull. Inst. Helminthol. Skryabine*, Moscou, **13**, 108-113.
- Thomas G.M., Poinar G.O., 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. *Inst. J. Syst. Bacteriol.*, **29**, 352-360.
- Vanfleteren J.R., 1978. Axenic culture of free-living, plant parasitic and insect parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **16**, 131-157.
- Weiser J., 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (*Anguillulata, Steinernematidae*), nový Cizoposník housenek obalečeče jablečného, *Carpocapsa pomonella* L. *Věstník Česk. Zool. Spol.*, **19**, 44-52.