

Short notes

UTILISATION D'ENZYMES DIGESTIVES POUR L'ÉTUDE DU PARASITISME DES *STEINERNEMA* ET DES *HETERORHABDITIS* ENVERS LES LARVES D'INSECTES

Hervé MAULEON *, Sophie BRIAND *, Christian LAUMOND ** et Éliane BONIFASSI **

* INRA, Centre Antilles-Guyane, Station de Recherches de Zoologie et de Lutte Biologique, 97170 Petit Bourg, Guadeloupe

et ** INRA, Laboratoire de Biologie des Invertébrés, B.P. 2078, 06606 Antibes Cedex, France.

Accepted for publication 10 July 1992.

Key-words : Nematodes, *Steinernema*, *Heterorhabditis*, enzymes.

L'évaluation du pouvoir pathogène (capacité de pénétration et possibilité de développement) des différentes espèces et souches de *Steinernema* et d'*Heterorhabditis* est primordiale pour l'expérimentation au laboratoire et les essais sur le terrain. Cependant, les dissections d'insectes sont longues et ne permettent pas toujours d'évaluer avec précision le nombre de nématodes qui ont pénétré et le stade évolutif qu'ils ont atteint. Les protéines digestives telles la pepsine et la papaïne sont couramment utilisées en recherche vétérinaire pour obtenir à l'état libre certains nématodes (*Trichostrongylidae*) localisés dans les tissus du tractus gastro-intestinal des ruminants (Langeron, 1949; Herlich, 1956). Après quelques modifications, cette méthode a été appliquée à la recherche des différents stades de *Steinernema* et d'*Heterorhabditis* dans la cavité générale des larves d'insectes. Par ailleurs, il est apparu intéressant d'étudier l'application de la digestion enzymatique aux insectes parasités conservés par congélation (Hubert, 1980), ce qui permettrait dans la pratique de différer des manipulations souvent difficiles à effectuer dans les meilleurs délais.

La méthode a été mise au point avec *Galleria mellonella* (chenille au stade pré-cocon), insecte très largement utilisé au laboratoire pour étudier la biologie des *Steinernema* et des *Heterorhabditis* ainsi que sur le terrain pour la recherche des nématodes (*Galleria* traps). Trois nématodes différents ont été utilisés : *Steinernema carpocapsae* souche DD 136, *S. carpocapsae* souche All et *Heterorhabditis* sp. (origine Guadeloupe).

Dans un premier temps, l'efficacité d'une solution pepsinique (pepsine : 8 g, NaCl : 23 g, HCl : 20 ml, eau : 940 ml) et celle d'une solution papainique (papaïne : 8 g, NaCl : 23 g, HCl : 20 ml, eau : 940 ml) ont été comparées. Soixante *Galleria* ont été mises en infes-

tation artificielle en boîte de Petri sur papier filtre humidifié, à la dose de 1000 larves infestantes (L3) de *Steinernema carpocapsae* souche DD 136 par chenille, à 25 °C et à l'obscurité. Trois jours après la mort, les *Galleria* ont été divisées en deux lots de 30. Les chenilles de chaque lot, placées individuellement dans des boîtes de Petri (diam. : 55 mm) contenant 3 ml de solution pepsinique ou papainique, ont été légèrement dilacérées après avoir été débarrassées de leur cuticule. Les boîtes de Petri ont été ensuite placées sur un agitateur horizontal (120 mouvements/min) à 37 °C. La digestion est considérée comme suffisante après deux heures; les nématodes sont alors morts et prennent une couleur plus ou moins noire qui permet de les repérer aisément.

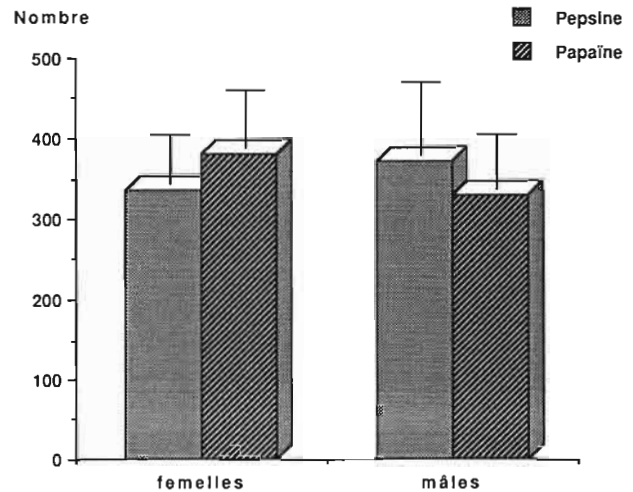


Fig. 1. Comparaison digestion pepsinique - digestion papainique; nombre moyen de nématodes adultes (*Steinernema carpocapsae* DD136) comptés par *Galleria*.

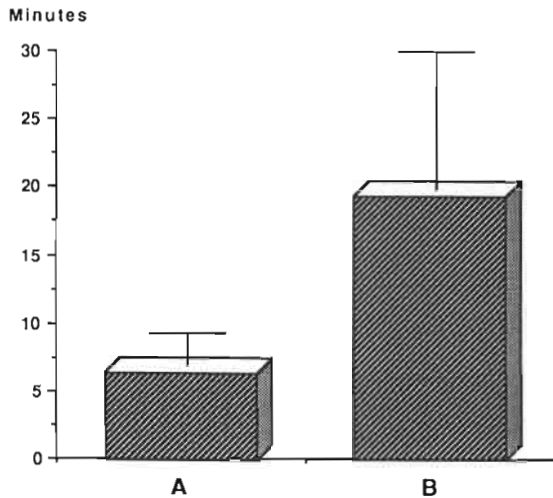


Fig. 2. Durée moyenne d'un comptage (*Heterorhabditis* sp. Guadeloupe) dans une *Galleria*. A : Après digestion pepsinique; B : Par dissection manuelle.

Les deux méthodes donnent des résultats similaires, les nombres de mâles et de femelles retrouvés étant sensiblement les mêmes dans les deux cas (Fig. 1). La digestion pepsinique est cependant préférable à la digestion papaïnique car cette dernière donne une coloration blanchâtre à la solution, ce qui gêne la lecture.

Le temps moyen nécessaire pour dénombrer les nématodes d'une *Galleria* infestée soumise à une digestion pepsinique, a été évalué et comparé à la même opération mais utilisant la dissection manuelle. Selon le protocole déjà exposé, deux lots de dix *Galleria* ont été infestés avec *Heterorhabditis* sp. (1000 L3/chenille). Le premier lot a été disséqué, le second soumis à la digestion pepsinique. Pour chacune des deux méthodes, le temps moyen nécessaire aux différentes opérations (incision de la cuticule, dissection, comptage des nématodes) a été évalué. Globalement, on peut estimer que la digestion pepsinique apporte un gain de temps de l'ordre de 70 % pour le comptage des nématodes par rapport à une dissection manuelle (Fig. 2). Le nombre de nématodes retrouvés est également supérieur, d'environ 25 %. La précision du comptage étant grande, on peut envisager des observations fines, irréalisables par dissection classique. Il a été par exemple possible de montrer que les capacités d'infestation des L3 d'un *Heterorhabditis* sp. (origine Cuba) produit sur insecte (*Galleria*) ou sur milieu artificiel (méthode Bedding), sont équivalentes.

L'application de la digestion pepsinique à des *Galleria* infestées et congelées a également été testée. Toujours avec le même protocole, deux lots de dix *Galleria* ont été infestés avec *S. carpocapsae* souche All (1000 L3/chenille). Le premier lot a été mis immédiatement en digestion pepsinique, le second congelé à -18 °C et mis en digestion pepsinique après trois mois. Les comptages de nématodes n'ont présenté aucune différence significa-

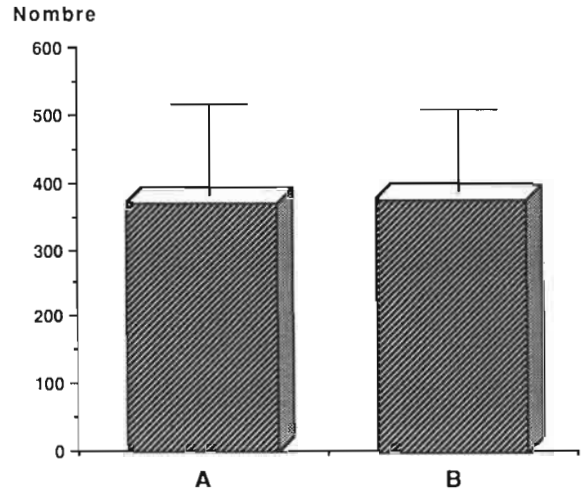


Fig. 3. Comparaison digestion immédiate (A) - digestion après congélation (B); nombre moyen de nématodes (*Steinernema carpocapsae* All) par *Galleria*.

tive entre les deux lots (Fig. 3). Le temps nécessaire à la digestion doit cependant être réduit à une heure au lieu de deux dans le cas des *Galleria* congelées.

Les expérimentations réalisées : comparaison digestion pepsinique-digestion papaïnique, évaluation du temps de comptage des nématodes, possibilités d'application à des insectes congelés, ont chacune été vérifiées avec les trois nématodes et les résultats se sont avérés comparables.

La mise au point des techniques a nécessité un certain nombre d'ajustements. Les résultats exposés sont représentatifs des valeurs moyennes enregistrées pendant les expérimentations et sont confirmés depuis par l'utilisation en routine de la méthode par nos laboratoires.

La technique de digestion enzymatique, très utilisée en helminthologie vétérinaire, peut donc être très utile pour l'étude des nématodes entomopathogènes. Elle permet d'aborder, sous un aspect quantitatif, les problèmes d'infectivité des différentes souches, de cinétique parasitaire (tous les stades sont visibles), etc. Alors qu'il n'est pas envisageable de retrouver par dissection les nématodes dans un insecte congelé, le comptage est parfaitement possible en utilisant la digestion pepsinique. Pour l'instant, la méthode n'a été utilisée que sur *Galleria*. Son extension aux larves de coléoptères, en particulier le genre *Otiorrhynchus*, est en cours.

Références

- HERLICH, H. (1956). A digestion method for post-mortem recovery of nematodes from ruminants. *Proc. helminth. Soc. Wash.*, 23 : 102-103.
- HUBERT, J. (1980). Bilans parasitaires : possibilité de congélation des tractus digestifs avant les examens. *Recl Méd. vét. Éc. Alfort*, 156 : 47-50.
- LANGERON, M. (1949). *Précis de microscopie*. Paris, Masson et Cie, 1430 p.