

Etude de la composition biochimique globale des juvéniles des nématodes

Meloidogyne javanica
et *Heterodera oryzae*

Georges REVERSAT

Laboratoire de Nématologie,
ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal.

RÉSUMÉ

On mesure à l'aide de réactions colorimétriques spécifiques les teneurs en glucides totaux, lipides totaux et protéines totales des juvéniles fraîchement éclos de *Meloidogyne javanica* et d'*Heterodera oryzae*.

A partir d'une suspension purifiée de juvéniles sont réalisés des échantillons numériquement identiques d'environ 30 000 juvéniles. Quelques échantillons sont utilisés pour un dénombrement exact et d'autres pour la détermination du poids sec après déshydratation à 110°C. Les réactions colorimétriques sont réalisées chacune sur des échantillons distincts et débutent par une digestion totale des juvéniles dans un réactif approprié.

Les teneurs mesurées, exprimées en pourcentage du poids sec, sont de 6,9 % pour les glucides, 40,4 % pour les lipides et de 40,9 % pour les protéines chez les juvéniles de *M. javanica*. Les chiffres correspondants chez les juvéniles d'*H. oryzae* sont de 13,9 %, 24,4 % et 40,7 %.

ABSTRACT

Quantitative chemical and dry weight determinations were made upon known counts of freshly hatched juveniles of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera oryzae* in order to obtain estimates of carbohydrates, lipids and proteins per juvenile.

The preparation of samples of equivalent numbers (in the range of 30 000) of juveniles was made by the drop by drop addition of the homogeneous suspension of juveniles into the sample centrifuge tubes. Some samples were used for counting the exact number of juveniles per sample and some others for the measurement of the dry weight after desiccation at 110°C. The remaining samples were divided into three parts: the first for carbohydrate determination; the second for lipid determination; and the third for protein determination.

For carbohydrate determination, juveniles were first digested in the sample tubes in 30 % KOH by heating at 100°C for 1/2 hour. Total carbohydrates were determined spectrophotometrically in the potassic solution by the anthrone reagent. Juveniles of *M. javanica* and *H. oryzae* contained respectively 6,9 % and 13,9 % of the dry weight as carbohydrates.

For lipids, juveniles in the sample tubes were first digested in 95 % sulphuric acid by heating at 100°C for 10 minutes. Lipids were determined spectrophotometrically in the sulphuric acid solution by the sulphophosvanillic reac-

tion. On a dry weight basis, the lipid content was 40,4 % for juveniles of *M. javanica* and 24,4 % for juveniles of *H. oryzae*.

For proteins, juveniles were first digested in the sample tubes in 1 N NaOH by heating at 100°C for 5 minutes. Proteins dissolved in the sodic solution were determined spectrophotometrically with the Folin reagent. Juveniles of *M. javanica* contained 40,9 % of the dry weight as proteins and juveniles of *H. oryzae* 40,7 %. The indirect determination based on the total nitrogen content gave larger values.

The accuracy of the methods used and the possible nature of the non determined portion of the dry weight are discussed.

1. INTRODUCTION.

Les connaissances acquises concernant la composition biochimique des nématodes phytoparasites ont fait l'objet d'une revue bibliographique récente de Krusberg (1971). Les travaux mentionnés par cet auteur ainsi que les études parues plus récemment sont le plus souvent consacrés à un seul des trois groupes de substances: glucides, lipides ou protéines, étudié d'une façon approfondie. Par ailleurs les espèces qui ont fait l'objet de ces recherches sont très diverses. Dans ces conditions, il apparaît difficile d'établir un bilan global de la composition biochimique de ces parasites.

L'objet du présent travail est de déterminer simultanément le poids sec et les teneurs en glucides, lipides, protéines chez les juvéniles fraîchement éclos des nématodes *Meloidogyne javanica* et *Heterodera oryzae*.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

2.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

La première espèce est un clone de *Meloidogyne javanica* obtenu par le prélèvement d'une seule masse

d'œufs (n° 12 465, clone 7). Elle est élevée sur kénaf (*Hibiscus cannabinus*, variété BG 52-71 de l'IRAT).

Dans des cuves étanches parallélépipédiques en fibrociment, de 1 m × 0,2 m × 0,2 m, contenant 20 litres de terre dénématisée par autoclavage, sont plantées sur deux lignes 50 graines de kénaf. Après 4 semaines de développement, chaque cuve est inoculée uniformément sur toute sa surface à l'aide d'un demi million de juvéniles fraîchement éclos. Cinq à six semaines après l'inoculation, les systèmes racinaires des plantes sont extraits du sol, lavés avec précaution afin de ne pas en détacher les masses d'œufs puis placés dans un asperseur à brouillard de type Seinhorst (1950). Les juvéniles éclosent à partir des masses d'œufs et sont recueillis toutes les 24 heures. A partir des racines provenant d'une cuve, on récolte environ 1 million de juvéniles par jour pendant 2 semaines.

La souche et la production de masses d'œufs de la seconde espèce, *Heterodera oryzae*, ont été décrites précédemment (Reversat, 1975). La seule modification concerne la variété de riz utilisée : I Kong Pao. Après leur récolte, les masses d'œufs sont gardées pendant 2 semaines dans une solution de NaCl 0,3 M qui inhibe l'éclosion mais permet le développement (Dropkin *et al.*, 1958). Elles sont ensuite placées à l'asperseur à brouillard et les juvéniles éclos sont recueillis 48 heures après. Cette pratique, qui permet de recueillir un grand nombre de juvéniles du même âge, n'affecte ni la viabilité ni la capacité de pénétration des juvéniles (Reversat, 1975).

La suspension de juvéniles provenant de l'asperseur est purifiée et concentrée à l'aide du dispositif représenté par la fig. 1. La suspension est répartie dans des Erlenmeyers de 1 litre fermés par un tissu de cellulose Kleenex plié en quatre, serré sur le col par un élastique. Chaque Erlenmeyer est renversé sur un verre contenant 60 ml d'eau déminéralisée, aérée par bullage d'air. Les éléments en suspension, juvéniles et impuretés sédimentent jusqu'au contact du kleenex. Seuls les juvéniles traversent activement le kleenex et passent dans le verre. Vingt-quatre heures après, la suspension purifiée et concentrée est recueillie et utilisée immédiatement pour l'échantillonnage.

Compte tenu des délais successifs de l'éclosion et de la purification, l'âge moyen des juvéniles au moment de l'échantillonnage est de $1,5 \pm 0,5$ jours pour *M. javanica* et 2 ± 1 jours pour *H. oryzae*.

2.2. L'ÉCHANTILLONNAGE.

La suspension purifiée est diluée avec de l'eau déminéralisée jusqu'à une concentration d'environ 3 000 juv./ml. Pour chaque espèce la suspension est

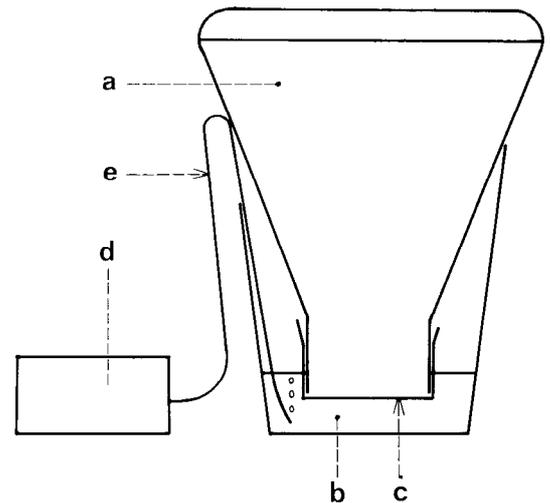


FIG. 1. — Purification des juvéniles (a : 1 litre de suspension provenant de l'asperseur contenant environ $5 \cdot 10^5$ juvéniles; b : 60 ml d'eau déminéralisée; c : kleenex plié en quatre; d : pompe à aquarium; e : aération par bullage d'air).

distribuée dans onze tubes à centrifuger, à raison de 10 ml/tube pour *M. javanica* et 8 ml/tube pour *H. oryzae*. Cette différence est nécessitée par l'écart des poids secs qui existe entre les juvéniles des deux espèces.

Les tubes à centrifuger sont obtenus par étirage au chalumeau de canne de verre. Leur forme (fig. 2) permet, après centrifugation et élimination du surnageant, que le volume résiduel total, comprenant le culot de juvéniles et l'eau en excès, soit de l'ordre de 0,03 ml.

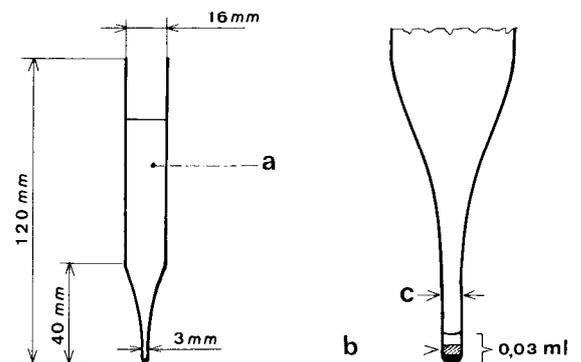


FIG. 2. — Tube à centrifuger étiré (a : 10 ml de suspension purifiée diluée contenant $3 \cdot 10^4$ juvéniles; b : culot de juvéniles après centrifugation; c : coupure du tube pour le dosage de l'azote total - voir 2.6.).

La distribution de la suspension purifiée dans les tubes à centrifuger est réalisée à l'aide d'un système de goutte à goutte schématisé par la figure 3. Un tube vertical transparent d'un diamètre d'environ 35 mm contient 250 ml de suspension purifiée diluée, constamment homogénéisée par bullage d'air. Le bouchon qui ferme le fond du tube est traversé par un capillaire souple d'un diamètre interne de 1 mm et d'une longueur de 60 cm. La suspension s'écoule goutte à goutte par l'extrémité libre du capillaire. L'écart vertical (h sur la fig. 3) entre le niveau de la suspension dans le tube et l'extrémité libre du capillaire est maintenu à une valeur constante d'environ 15 cm par des déplacements fréquents du tube de façon à assurer un débit de 80 à 100 gouttes par minute (30 gouttes représentent à peu près un volume de 1 ml).

On délivre 30 gouttes successivement dans chacun des onze tubes, puis à nouveau 30 gouttes successivement dans chacun des onze tubes, etc. Le processus est répété jusqu'au volume désiré : 300 gouttes représentant 10 ml et 30 000 juvéniles pour *M. javanica* et 240 gouttes représentant 8 ml et 24 000 juvéniles pour *H. oryzae*.

Les tubes sont alors centrifugés pendant 1 minute à 1 000 tours/minute de façon à assurer la formation du culot de juvéniles puis les surnageants sont éliminés au maximum (fig. 2) par aspiration. Les 11 tubes sont

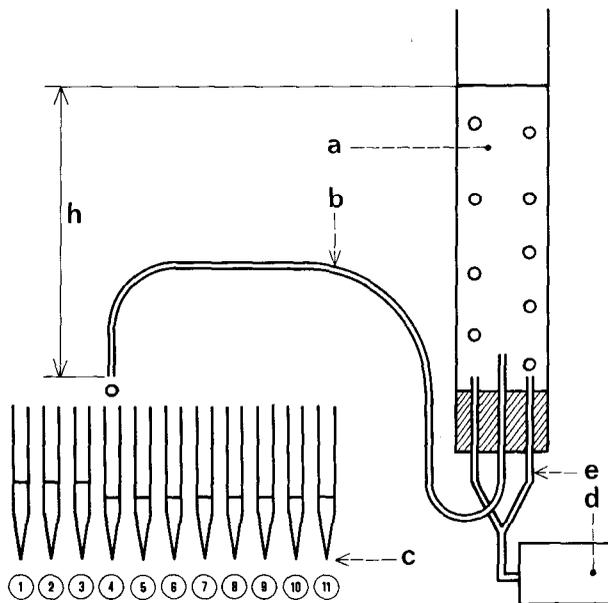


FIG. 3. — Schéma du dispositif employé pour l'échantillonnage au goutte à goutte de la suspension de juvéniles (a : suspension purifiée et diluée de juvéniles à 3 000 juvéniles/ml; b : capillaire souple; c : série de 11 tubes à centrifuger; d : pompe à aquarium; e : homogénéisation par bullage d'air; h : hauteur constante).

distribués de la façon suivante. Trois d'entre eux, les tubes de rangs 1, 5 et 8 (voir fig. 3), sont gardés en vue d'un dénombrement précis de l'échantillon. Deux autres tubes sont utilisés immédiatement pour la détermination du poids sec (voir 2.3). Les 6 derniers tubes sont bouchés et placés au congélateur à -20°C jusqu'au moment du dosage : deux tubes seront alors utilisés pour le dosage des glucides (voir 2.4), deux pour le dosage des lipides (voir 2.5) et enfin deux pour le dosage des protéines (voir 2.6).

Pour le dénombrement de l'échantillon, chacun des tubes 1, 5 et 8 est dilué à 250 ml. Pour chacun de ces trois échantillons dilués, à l'aide du système de goutte à goutte (fig. 3) sont garnies directement deux lames de comptage avec chacune 75 gouttes. Une autre fraction de 75 gouttes recueillie dans un tube est pesée afin de définir le volume exact de l'aliquot. Puis les juvéniles sont comptés sous la loupe binoculaire : le nombre moyen de juvéniles dans l'échantillon est ainsi déterminé par la moyenne de 6 comptages.

2.3. MESURE DU POIDS SEC.

Le poids sec est déterminé à l'aide d'une balance à torsion d'une portée de 1 mg et d'une précision pratique de $\pm 5 \mu\text{g}$. Cet instrument est manipulé dans une boîte à gants étanche garnie en permanence de silicagel rénové. Le plateau de la balance est remplacé par des coupelles d'une masse équivalente, confectionnées avec de la feuille d'aluminium. Ces coupelles, à usage unique, sont tout d'abord placées au four à 110°C pendant une heure. Après refroidissement chaque coupelle est pesée individuellement sur la balance. Le culot de juvéniles de chacun des deux tubes réservés précédemment est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur et déposé dans une coupelle avec un volume d'eau minimum.

La dessiccation est conduite au four électrique en deux temps. Les coupelles sont tout d'abord portées à 80°C pendant une heure : les juvéniles meurent aussitôt et l'eau s'évapore sans projections. Puis la température est portée à 110°C pendant deux heures : la déshydratation est alors complète. Les coupelles sont refroidies dans un dessiccateur garni de silicagel puis sont repesées.

La pipette Pasteur qui a servi au transfert ainsi que le tube à centrifuger qui a contenu l'échantillon sont rincés soigneusement au-dessus d'un récipient gradué. Le comptage d'aliquots des eaux recueillies permet d'évaluer le nombre des juvéniles non transférés. Ce nombre sera ultérieurement déduit du nombre moyen de juvéniles par échantillon lors du calcul du poids sec.

2.4. DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX.

Principe.

Les juvéniles sont digérés à chaud dans la potasse concentrée : les glucides, oses et polyosides, sont solubilisés. En milieu sulfurique à chaud les polyosides sont tout d'abord hydrolysés en oses, puis l'ensemble des oses réagit avec l'anthrone pour développer une coloration bleue dosable par spectrophotométrie. Cette réaction est employée pour le dosage du glycogène dans les tissus animaux sans extraction préalable (Seifter *et al.*, 1950).

Réactifs.

- Solution de potasse (KOH, pour analyse) à 30 %.
- Réactif à l'anthrone : solution d'anthrone à 0,2 % dans l'acide sulfurique à 95 %. Ce réactif est gardé au maximum une semaine à 4 °C.
- Solutions étalons de glucose : la gamme comprend quatre solutions à 25, 50, 75 et 100 µg/2 ml. Ces solutions sont gardées au maximum 24 h à 4 °C.

Digestion potassique.

A chacun des deux tubes à centrifuger sont ajoutés, dès la sortie du congélateur, 0,5 ml de potasse à 30 %. Puis les tubes fermés par une bille de verre sont placés dans un bain-marie à 100 °C pendant 1/2 heure. Les juvéniles sont entièrement digérés. Après refroidissement, 2 ml d'eau sont ajoutés dans chaque tube. Les 2,5 ml de digestat potassique dilué sont alors soigneusement homogénéisés par pipetage.

Réaction colorée.

L'addition des réactifs (tabl. I) est effectuée dans des tubes à essai refroidis dans un bain de glace fondante. Le second réactif, phase aqueuse, est ajouté lentement de façon à ne pas provoquer de mélange. Cette phase aqueuse se dépose au-dessus de la phase acide. Lorsque la série de tubes est prête, les deux phases sont rapidement mélangées et les tubes sont immédiatement placés au bain-marie à 100 °C pour 10 minutes. La coloration se développe. Puis les tubes sont replacés dans le bain de glace fondante afin d'arrêter l'évolution de la coloration.

Les intensités des colorations sont alors mesurées au spectrophotomètre à 620 mµ avec des cuves de 1 cm d'épaisseur, le zéro étant fait sur le témoin. Pour la gamme étalon, la densité optique augmente linéairement avec la quantité de glucose de 0 à 100 µg et présente une valeur de 0,62 pour 100 µg de glucose.

TABLEAU I

Addition des réactifs pour le dosage des glucides totaux par l'anthrone

Réactifs dans l'ordre d'addition	Témoin	Gamme étalon	Essai nématodes*
1 - Réactif à l'anthrone	5 ml	5 ml	5 ml
2 {	- Eau	2 ml	0
	- Solution étalon de glucose	0	2 ml
	- Digestat potassique dilué	0	0
			2 ml

* 1 répétition pour chacun des 2 tubes échantillons

2.5. DOSAGE DES LIPIDES TOTAUX.

Principe.

Les juvéniles sont digérés à chaud en milieu sulfurique : leurs lipides passent en solution. Les lipides à chaud en milieu sulfophosphorique développent avec la vanilline une coloration rose dosable au spectrophotomètre. Cette réaction, mise en évidence par Chabrol et Charonnat (1937), est couramment utilisée pour le dosage des lipides sériques sans extraction préalable (Drevon & Schmit, 1964; Crehange & Metais, 1972).

Réactifs.

- Acide sulfurique pour analyse à 95 % (d = 1,84).
- Acide phosphorique pour analyse à 85 % (d = 1,71).
- Solution aqueuse de vanilline (Merck) à 0,6 %. Cette solution est gardée au maximum une semaine à 4 °C.
- Solutions étalons d'huile d'olive (qualité alimentaire) dans l'acide sulfurique à 95 %. Pour la gamme, quatre solutions sont utilisées : à 50, 100, 150 et 200 µg/2 ml. Ces solutions sont préparées pour chaque dosage à partir d'une solution mère à 1 mg/ml qui est gardée au maximum 3 mois à 4 °C.

Digestion sulfurique.

A chacun des deux tubes à centrifuger sont ajoutés, dès la sortie du congélateur, 5 ml d'acide sulfurique. Les deux tubes fermés par une bille de verre sont alors portés au bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes. Les juvéniles sont entièrement digérés. Au cours du chauffage, il est nécessaire d'agiter une fois les tubes de façon à disperser une coloration brune, due à la

digestion, localisée à la surface de l'acide. Les tubes sont refroidis sous un courant d'eau, puis le digestat contenu dans chaque tube est soigneusement homogénéisé par pipetage.

Réaction colorée.

Dans des tubes à essai, les réactifs sont ajoutés selon les indications du tableau II. Après leur addition dans le tube, les deux premiers réactifs (acide phosphorique et solution sulfurique) sont soigneusement mélangés par agitation du tube. On attend ensuite pendant 1/4 heure à la température ambiante que le dégagement thermique provoqué par ce mélange se soit dissipé. Le troisième réactif (vanilline) est alors ajouté lentement afin de ne pas provoquer de mélange : il se dépose au-dessus de la phase acide. Lorsque la série de tubes est prête, les deux phases sont mélangées par agitation des tubes, à des intervalles de temps réguliers pour chaque tube. On attend à nouveau pendant 1/4 heure la dissipation du dégagement thermique provoqué par le mélange. La coloration a commencé à se développer moins d'une minute après le mélange. Les tubes sont alors bouchés puis placés à l'étuve à 40 °C pendant une heure : la coloration prend son maximum d'intensité. Les tubes sont sortis de l'étuve et placés à refroidir pendant 1/4 heure à la température ambiante.

Les colorations sont alors lues au spectrophotomètre à 550 m μ avec des cuves de 1 cm d'épaisseur, le zéro étant fait sur le témoin. On respecte, pour la lecture, l'ordre des tubes et l'intervalle de temps observé lors du mélange des deux phases. Pour la gamme étalon la densité optique augmente linéairement avec la quantité d'huile de 0 à 200 μ g et présente une valeur de 0,83 pour 100 μ g d'huile.

TABLEAU II

Addition des réactifs pour le dosage des lipides totaux par la vanilline

Réactifs dans l'ordre d'addition	Témoin	Gamme étalon	Essai nématodes*
1 - Acide phosphorique	2 ml	2 ml	2 ml
2 - Acide sulfurique - Solution étalon d'huile d'olive dans l'acide sulfurique	2 ml	0	0
	0	2 ml	0
- Digestat sulfurique	0	0	2 ml
3 - Solution de vanilline à 0,6 %	1 ml	1 ml	1 ml

* 2 répétitions pour chacun des 2 tubes échantillons

Pouvoir chromogène des lipides de juvéniles.

On compare, à poids égal, les densités optiques des colorations obtenues avec la vanilline entre la substance étalon (huile d'olive) et les lipides extraits des juvéniles de *M. javanica*.

L'extraction s'inspire d'une méthode décrite par Faure (1963). Environ 2 millions de juvéniles fraîchement éclos et purifiés sont rassemblés en suspension dans un volume d'environ 2 ml. Après congélation, les juvéniles sont lyophilisés. Aussitôt après sont introduits dans le tube 10 ml d'une mélange extracteur, chloroforme-méthanol (2 : 1 V/V), puis le tube est laissé à la température ambiante pendant 24 heures. La suspension est filtrée sur verre fritté, puis le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite à la température ambiante. Le résidu est desséché une nuit en présence de silicagel puis repris par 5 ml de chloroforme pur. Celui-ci dissout les lipides à l'exclusion des substances non lipidiques entraînées par le méthanol lors de l'extraction.

Des aliquots de 0,2 ml de cette solution chloroformique sont délivrés d'une part dans des tubes à essais et d'autre part dans des coupelles à pesée tarées (voir 2.3.). Le chloroforme est évaporé à l'étuve à 40 °C. Les coupelles sont placées pendant 24 heures en dessiccateur avec du silicagel avant la pesée. Les tubes sont dosés par la méthode décrite précédemment.

2.6. DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES.

Principe.

Les juvéniles sont digérés à chaud en milieu sodique et leurs protéines sont solubilisées. Les protéines sont alors dosées dans ce digestat sodique par la méthode colorimétrique de Lowry *et al.* (1951).

Réactifs.

- Solution de soude 1 N pour analyse.
- Solution cuivrique alcaline : préparée pour chaque dosage en mélangeant : 50 ml d'une solution de Na₂CO₃ à 2 % dans NaOH, N/10, 1 ml d'une solution à 2 % de tartrate double de sodium et de potassium et 1 ml d'une solution à 1 % de Cu SO₄.
- Réactif de Folin dilué : réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2 avec de l'eau.
- Solutions étalons de protéines : préparées pour chaque dosage à partir d'une solution mère de sérumbumine bovine à 100 mg/ml (Sigma) gardée à 4 °C. Quatre dilutions sont préparées : à 50, 100, 150 et 200 μ g/1 ml.

Digestion sodique.

A chacun des deux tubes à centrifuger sont ajoutés dès leur sortie du congélateur 2,5 ml de soude normale. Les tubes fermés par une bille de verre sont alors placés au bain-marie à 100 °C jusqu'à digestion complète des juvéniles : 5 minutes pour *M. javanica* et 1/4 heure pour *H. oryzae*. Les tubes sont ensuite refroidis sous un courant d'eau et on ajoute 2,5 ml d'eau dans chacun. Les 5 ml de digestat dilué sont homogénéisés par pipetage.

Réaction colorée.

Dans des tubes à essais les réactifs sont ajoutés selon les indications du tableau III. Les tubes de la gamme étalon sont soumis au même traitement thermique que les juvéniles : un séjour de 5 minutes au bain-marie à 100 °C suivi d'un refroidissement sous un courant d'eau. Après l'addition du second réactif (solution cuivrique alcaline), le contenu des tubes est mélangé par agitation et les tubes sont placés à l'étuve à 28 °C à l'obscurité pendant 1/2 heure. On ajoute ensuite le troisième réactif (Folin), le contenu des tubes est homogénéisé par agitation puis les tubes sont à nouveau laissés 1/2 heure à l'obscurité à 28 °C.

L'intensité de la coloration bleue développée est lue aussitôt après au spectrophotomètre à 750 m μ dans des cuves de 1 cm d'épaisseur, le zéro étant fait sur le témoin. Dans les limites choisies de la gamme étalon, de 0 à 200 μ g de sérualbumine, la densité optique est sensiblement proportionnelle à la quantité de protéines. La densité optique présente une valeur de 0,220 pour 100 μ g de sérualbumine.

Dosage de l'azote total.

Les résultats de la méthode précédente peuvent être comparés avec la teneur en protéines déduite de la teneur en azote total. Celle-ci est mesurée après minéralisation par colorimétrie avec le réactif de Nessler.

L'extrémité d'un tube à centrifuger supplémentaire est soigneusement lavée à l'alcool puis coupée (flèche C sur la fig. 2) et placée dans un tube à essai. On ajoute alors 1 ml d'acide sulfurique à 95 % et le tube est chauffé sur la veilleuse d'un bec Bunsen. Après environ 10 minutes de chauffage, la carbonisation est complète. Le tube est laissé à refroidir, puis on ajoute 0,5 ml d'eau oxygénée à 100 volumes. Le chauffage sur la veilleuse est repris : la solution devient rapidement limpide. Le chauffage est poursuivi jusqu'à élimination complète de l'eau oxygénée, pendant 20 minutes environ. Le volume est complété à 20 ml avec de l'eau déminéralisée.

TABLEAU III

Addition des réactifs pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et al. (1951)

Réactifs dans l'ordre d'addition	Témoin	Gamme étalon	Essai nématodes*
1	- Na OH 1 N	1 ml	0
	- Eau	1 ml	0
	- Solution étalon de sérualbumine	0	1 ml
	- Digestat sodique dilué	0	0
2	- Solution cuivrique alcaline	5 ml	5 ml
3	- Réactif de Folin dilué au 1/2	1 ml	1 ml

* 2 répétitions pour chacun des 2 tubes échantillons

Dans des tubes à essais sont déposés 3 ml de réactif de Nessler. Puis à des intervalles de temps réguliers sont ajoutés dans les tubes et mélangés soit 3 ml de la solution à doser, soit 3 ml de solution étalon (deux solutions contenant du sulfate d'ammonium à 5 μ g et 10 μ g d'azote par 3 ml dans de l'acide sulfurique à 95 % dilué au 1/20) soit enfin 3 ml d'acide sulfurique à 95 % dilué au 1/20 (témoin).

Après une 1/2 heure de développement à la température ambiante, la coloration jaune est mesurée au spectrophotomètre à 420 m μ . On respecte, pour la lecture, l'ordre des tubes et l'intervalle de temps observé lors du mélange des réactifs. La densité optique est proportionnelle à la quantité d'azote et présente une valeur de 0,375 pour 10 μ g d'azote.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.

3.1. ECHANTILLONNAGE.

Au sein d'une suspension homogénéisée, les nématodes sont répartis au hasard. Les nombres de nématodes contenus dans des aliquots prélevés dans cette suspension suivent une loi de Poisson : la variance est égale à la moyenne (Southey, 1970). Dans le cas présent le comptage des juvéniles de *M. javanica* contenus dans 25 gouttes consécutives écoulées de l'appareil de la fig. 3 a donné une moyenne de 111,5 et une variance de 93. Un test de χ^2 effectué sur l'indice de dispersion de cette distribution montre que ce résultat est compatible avec une loi de Poisson. Le prélèvement par pipetage d'un aliquot de 10 ml de cette suspension contenant environ 33 000 juvéniles devrait conduire à une incertitude relative inférieure à 1 % (Southey, 1970). L'expérience prouve qu'il n'en est rien. En effet

des échantillons réalisés à l'aide d'un seul pipetage révèlent des écarts de l'ordre de 15 % entre deux échantillons lors de la mesure du poids sec ou lors des dosages. Lors d'échantillonnages destinés également à des dosages, Van Gundy *et al.* (1967) observent des écarts aussi importants que 20 % entre les nombres de nématodes contenus dans les différents échantillons. Il paraît vraisemblable que le pipetage altère la distribution au hasard des nématodes dans la suspension.

En employant le procédé d'échantillonnage par goutte à goutte (fig. 3), les écarts observés entre les échantillons lors de la mesure du poids sec ou lors des dosages sont compris entre 0 et 3 %. La précision obtenue ressort directement de l'application du théorème des limites centrales (Snedecor & Cochran, 1971). Le nombre de nématodes par goutte étant distribué selon une loi de Poisson de moyenne m et de variance S^2 ($S^2 = m$), les moyennes d'échantillons de 300 gouttes seront distribuées selon une loi normale de moyenne m et de variance $m/300$. Pour une suspension contenant 100 juvéniles par goutte, l'intervalle de confiance à 95 % de risque serait de $100 \pm 1,96 \times \sqrt{100}/\sqrt{300}$, soit $100 \pm 1,1$; ce qui correspond à une incertitude relative de l'ordre de 1 % au niveau de l'effectif réel de l'échantillon.

Le tableau IV donne les résultats du comptage des 3 tubes prévus à cet effet après un échantillonnage. L'intervalle de confiance à 95 % de risque est de $291 \pm 1,96 \times \sqrt{73}/\sqrt{6}$, soit 291 ± 7 ce qui correspond à une incertitude relative de l'ordre de 2,4 % au niveau de l'effectif connu de l'échantillon. La précision du comptage est donc inférieure à celle de l'échantillonnage. En conséquence les résultats des dosages rapportés en pourcentage du poids sec seront plus précis que ceux exprimés par juvénile.

3.2. GLUCIDES.

Les teneurs en glucides totaux sont données par le tableau V : (b). Ces glucides représentent respectivement 6,9 % et 13,9 % du poids sec des juvéniles de *M. javanica* et d'*H. oryzae*.

TABLEAU IV

Exemple de comptage du nombre de juvéniles dans les échantillons

Tube échantillon de rang n°	1	5	8
Nombre de juvéniles * : 1	290	301	299
(2 comptages par tube) 2	292	289	277
Moyenne : 291	Variance : 73		

* Aliquots de 75 gouttes (2,55 ml) de l'échantillon dilué à 250 ml.

Tracey (1958) estime à 10 % du poids sec la teneur en glucides de *Ditylenchus dipsaci*. Petriello et Myers (1971) trouvent une teneur moyenne en glucides égale à 3,2 % du poids sec chez *Aphelenchoides* sp.; ils établissent de plus, que 86 % de ces glucides sont constitués par du glycogène. Dropkin et Acedo (1974) déterminent histologiquement la présence et la localisation anatomique du glycogène chez *Meloidogyne incognita*. Par ailleurs des oses libres sont également mis en évidence chez les nématodes phytoparasites : glucose et fructose chez *Ditylenchus dipsaci* et *Aphelenchoides ritzemabosi* (Krusberg, 1961), thréhalose et mannose chez *Aphelenchoides* sp. (Petriello & Myers, 1971).

Les causes d'erreurs lors de la détermination des glucides totaux par l'anthrone sont principalement liées à la nature des glucides dosés et aux interférences avec les composants non glucidiques du digestat.

Les différents oses donnent avec l'anthrone des intensités de coloration différentes. Dans le cas présent, la gamme étalon étant constituée par des solutions de glucose, le dosage sera d'autant plus précis que la proportion de cet ose sera importante parmi les glucides totaux du digestat. D'après les données citées plus haut, il apparaît que le glucose et surtout un de ses polymères le glycogène sont représentés chez les nématodes phytoparasites. Un calcul plus précis exigerait que l'on tienne compte du gain de masse de 10 % que subit le glycogène lors de son hydrolyse en glucose. Cependant cette correction n'est pas envisageable avant de connaître la composition des glucides des deux espèces : on peut simplement noter que les chiffres donnés sont évalués avec un excès compris entre 0 et 10 %.

Le problème posé par les interférences dues aux composants non glucidiques du digestat a été étudié par Seifter *et al.* (1950). D'après cette étude, les protéines du digestat donnent une coloration avec l'anthrone, équivalente à 5 µg de glycogène pour 1 mg d'azote total. D'après la teneur en azote observée chez les juvéniles des deux espèces (tabl. V : (e)), cette interférence peut être tenue pour négligeable.

3.3. LIPIDES.

Les teneurs en lipides (tabl. V : (c)) sont respectivement de 40,4 % et 24,4 % du poids sec chez *M. javanica* et *H. oryzae*.

Tracey (1958) trouve une teneur en lipides égale à 33 % du poids sec chez *Ditylenchus dipsaci*, tandis que pour la même espèce Krusberg (1967) trouve une teneur de 38 %. Krusberg (1967) détermine les teneurs en pourcentage du poids sec de différentes espèces : *Ditylenchus trififormis* (23 %), *Pratylenchus penetrans* (27 %),

TABLEAU V
Composition biochimique globale * des juvéniles de *Meloidogyne javanica* et d'*Heterodera oryzae*

Paramètres	<i>M. javanica</i>		<i>H. oryzae</i>	
	ng par juvénile	%	ng par juvénile	%
Paramètres mesurés				
(a) Poids sec	23,0	100 %	29,5	100 %
(b) Glucides (Anthrone)	1,6	6,9 %	4,1	13,9 %
(c) Lipides (Vanilline)	9,3	40,4 %	7,2	24,4 %
(d) Protéines (Folin)	9,4	40,9 %	12,0	40,7 %
(e) Azote total (Nessler)	1,8	7,8 %	2,5	8,5 %
Paramètres calculés				
(f) Total : (b) + (c) + (d)	20,3	88,3 %	23,3	79,0 %
(g) Non dosé : différence (a) - (f)	2,7	11,7 %	6,2	21,0 %
(h) Azote protéique : (d)/6,25	1,5	6,5 %	1,9	6,4 %
(i) Azote non protéique : (e) - (h)	0,3	1,3 %	0,6	2,0 %
(j) Teneur en azote de la fraction non dosée : (i) x 100/(g)	—	11,1 %	—	9,6 %

* Moyenne de 3 échantillonnages pour *M. javanica* et de 2 échantillonnages pour *H. oryzae*

Tylenchorhynchus claytoni (37 %) et *Aphelenchoides ritzemabosi* (11 %). Les juvéniles de *Meloidogyne javanica* révèlent une teneur en lipides égale à 30 % de leur poids sec (Van Gundy *et al.*, 1967). Les juvéniles de *Meloidogyne arenaria* contiennent 48 % du poids sec en lipides (Krusberg *et al.*, 1973). Chez *Meloidogyne*, ces lipides sont condensés sous formes de gouttes dans l'intestin des juvéniles, et disparaissent au cours du jeûne ou du cycle évolutif (Chitwood, 1951; Van Gundy *et al.*, 1967; Dropkin & Acedo, 1974). Les lipides représenteraient l'aliment énergétique principal des juvéniles de *Meloidogyne*.

Cette méthode de dosage présente a priori une source d'erreur liée à la différence d'origine des lipides objet du dosage et des lipides constituant la gamme étalon. Chabrol et Charonnat (1937) ainsi que Drevon et Schmit (1964) soulignent en effet des différences de pouvoir chromogène vis-à-vis de la réaction vanillique entre les différentes classes de lipides. Une similitude de composition à ce niveau entre la substance étalon et les nématodes n'est pas évidente. La comparaison des pouvoirs chromogènes des lipides des deux origines (voir 2.5) a donné les résultats suivants. Un aliquot de la solution de lipides de *M. javanica* contient, mesuré par la méthode pondérale, 343 µg de lipides (répétitions : 340-350-340). Le même aliquot d'après la réaction colorée, basée sur l'étalon d'huile d'olive, contient 348 µg de lipides (répétitions : 340-335-368).

L'accord est satisfaisant : la comparaison des compositions en acides gras de l'huile d'olive et des lipides d'un nématode permet de le confirmer. Le pouvoir chromogène des lipides vis-à-vis de la réaction avec la vanilline semble en effet essentiellement lié aux acides gras (Chabrol & Charonnat, 1937; Drevon & Schmit, 1964). Les acides gras de l'huile d'olive contiennent 83 % d'acide oléique (18 : 1) (*), 9,4 % d'acide palmitique (16 : 0) et 4 % d'acide linoléique (18 : 3).

Les acides gras des juvéniles de *Meloidogyne arenaria* contiennent 71 % d'acide (18 : 1), 9,3 % d'acide (16 : 0) et 6 % d'acide (18 : 0) (Krusberg *et al.*, 1973).

Drevon et Schmit (1964) estiment faibles les interférences avec les autres constituants du sérum : glucides et protéines.

3.4. PROTÉINES ET AZOTE TOTAL.

Les protéines totales dosées par la méthode de Lowry *et al.* (1951) représentent respectivement 40,9 % et 40,7 % du poids sec chez les juvéniles de *M. javanica* et d'*H. oryzae* (tabl. V : (d)).

(*) Le premier chiffre indique le nombre d'atomes de carbone de l'acide et le second le nombre de ses liaisons insaturées.

Les chiffres concernant les teneurs en protéines totales des nématodes phytoparasites sont particulièrement rares. Tracey (1958) en se basant sur un dosage d'azote total après minéralisation estime à 40 % du poids sec la teneur en protéines de *Ditylenchus dipsaci*. Chez les juvéniles de *Meloidogyne javanica* une fraction appréciable de ces protéines est condensée sous forme de granules dans l'intestin; ces granules sont métabolisés au cours du jeûne, (Chitwood, 1951; Van Gundy *et al.* 1967). L'effet des composants non protéiques sur la précision de la méthode a été étudié systématiquement par Lowry *et al.* (1951). D'après cette étude la présence de lipides ou d'extraits trichloroacétiques (glycogène) peut conduire à une surestimation de la teneur en protéines de l'ordre de 3 à 6 %.

L'azote total (tabl. V : (e)) représente respectivement 7,8 % et 8,5 % du poids sec des juvéniles de *M. javanica* et d'*H. oryzae*. Calculées à partir de cette teneur en azote en la multipliant par 6,25, les teneurs en protéines sont respectivement de 48,7 % et 53,1 % du poids sec chez *M. javanica* et *H. oryzae*. Pour différents tissus animaux Lowry *et al.* (1951) notent que la détermination indirecte basée sur la teneur en azote total est de 15 à 20 % supérieure à celle obtenue par le réactif de Folin. Il est évident que la teneur en azote total comprend de l'azote non protéique, et dans cette perspective, les résultats obtenus par la méthode de Lowry *et al.* (1951) apparaissent comme les plus crédibles.

3.5. BILAN.

Sans oublier les incertitudes relatives qui s'attachent à chacune des déterminations effectuées, on peut néanmoins confronter la somme des teneurs en glucides, lipides et protéines au poids sec (tabl. V : (f) et (g)). Ce calcul met en évidence l'existence d'une fraction non dosée égale à 11,7 % du poids sec chez *M. javanica* et à 21 % du poids sec chez *H. oryzae*. A titre d'hypothèse concernant la nature de cette fraction, on peut noter le parallélisme qui existe entre son importance et l'importance de certaines structures anatomiques chez les juvéniles des deux espèces. Chez les juvéniles d'*H. oryzae* dont le stylet et la sclérotisation céphalique sont particulièrement développés, cette fraction non dosée est relativement importante. Par contre, chez les juvéniles de *M. javanica* dont les structures correspondantes sont beaucoup moins développées, cette fraction non dosée est relativement plus faible.

Il est par ailleurs évident que cette fraction non dosée comprend les sels minéraux dont la teneur est très mal connue chez les nématodes phytoparasites (Krusberg, 1971). Chez les nématodes zooparasites la fraction représentée par les cendres est de l'ordre de 5 % du poids sec (von Brand, 1966).

Si l'on considère comme exacte la teneur en protéines obtenue par la méthode de Lowry *et al.* (1951), il est possible de calculer la teneur en azote de la fraction non dosée (tabl. V : (h), (i) et (j)). Ce dernier paramètre est égal à 11,1 % chez *M. javanica* et à 9,6 % chez *H. oryzae*. La convergence de ces deux résultats suggère la présence chez les deux espèces du même composé azoté. Parmi les composés qui ne réagissent pas avec les méthodes de dosage employées au cours de cette étude, excepté celle de l'azote total, figurent les sucres aminés. Le cas de la chitine, forme polymérisée de l'un d'entre eux, semble exclu depuis que Tracey (1958) a montré l'absence de ce composé chez les juvéniles d'*Heterodera rostochiensis*. Cependant les sucres aminés figurent dans d'autres composés notamment les mucopolysaccharides, dont le rôle structural a été établi chez de nombreux parasites (von Brand, 1966).

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail doit beaucoup à un stage effectué dans le laboratoire d'Entomologie dirigé par M. le Professeur Le Berre à la faculté des Sciences d'Orsay, en suivant les activités de M^{lle} Mainguet. L'auteur les remercie vivement l'un et l'autre.

Manuscrit reçu au S.C.D. de l'ORSTOM le 2 août 1976.

BIBLIOGRAPHIE

- BRAND (T., von), 1966. — *Biochemistry of parasites*. Academic Press New York., 429 pp.
- CHABROL (E.), CHARONNAT (R.), 1937. — Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides : l'oleidémie. *Presse méd.*, 96, 1713-1714.
- CHITWOOD (M. D.), 1951. — Notes on the physiology of *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885). *J. Parasit.*, 37 : 96-98.
- CREHANGE (J.), METAIS (P.), 1972. — Etude comparative de quatre méthodes de dosage des lipides totaux sériques. *Bull. Soc. Pharm. Strasbourg* 15 : 185-197.
- DREVON (B.), SCHMIT (J. M.), 1964. — La réaction sulfophosphovanillique dans l'étude des lipides sériques. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon.*, 8 : 173-178.
- DROPKIN (V. H.), MARTIN (G. C.), JOHNSON (R. W.), 1958. — Effect of osmotic concentrations on hatching of some plant parasitic nematodes. *Nematologica* : 115-126.
- DROPKIN (V. H.), ACEDO (J.), 1974. — An electron microscopic study of glycogen and lipid in female *Meloidogyne javanica* (Root knot nematode). *J. Parasitol.*, 60 : 1013-1021.

- FAURE (M.), 1963. — Les lipides. In : *Techniques de laboratoire*. Ed. : J. Loiseleur; Masson et Cie Paris; Tome 1 : 1247-1308.
- KRUSBERG (L. R.), 1971. — Chemical composition of nematodes. In : *Plant parasitic nematodes*. Ed : B. M. Zuckerman, W. F. Mai & R. A. Rohde. Academic Press, New York. Vol 2 : 213-234.
- KRUSBERG (L. R.), 1967. — Analysis of total lipids and fatty acids of plant parasitic nematodes and host tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 21 : 83-90.
- KRUSBERG (L. R.), 1961. — Studies on the culturing and parasitism of plant parasitic nematodes in particular *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfalfa tissues. *Nematologica*, 6 : 181-200.
- KRUSBERG (L. R.), HUSSEY (R. S.), FLETCHER (C. C.), 1973. — Lipid and fatty acid composition of females and eggs of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45 B : 335-341.
- LOWRY (O. H.), ROSEROUGH (N. J.), FARR (A. L.), RANDALL (R. J.), 1951. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, : 265-275.
- PETRIELLO (R. P.), MYERS (R. F.), 1971. — Nutrient media for plant parasitic nematodes III. Carbohydrate investigations on *Aphelenchus* sp. *Expl. Parasitol.*, 29 : 423-432.
- REVERSAT (G.), 1975. — Influence d'une inhibition préalable par la pression osmotique sur l'éclosion des masses d'œufs du nématode *Heterodera oryzae*. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.* vol. X, n° 3 : 189-206.
- SEIFTER (S.), DAYTON (S.), NOVIC (B.), MUNTWYLER (E.), 1950. — The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem.*, 25 : 191-200.
- SEINHORST (J. W.), 1950. — De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting dor het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev). *Tijdschr. Pl Ziekt.*, 56 : 291-349.
- SNEDECOR (G. W.), COCHRAN (W. G.), 1971. — *Statistical methods*. The Iowa State University Press. Ames, U.S.A., 593 pp.
- SOUTHEY (J. F.), 1970. — *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Technical Bulletin 2. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- TRACEY (M. V.), 1958. — Cellulase and chitinase in plant nematodes. *Nematologica*, 3 : 179-183.
- VAN GUNDY (S. D.), BIRD (A. F.), WALLACE (H. R.), 1967. — Aging and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology*, 57 : 559-571.