

Inhibition et réactivation des acétylcholinestérases amphidiales de *Meloidogyne javanica* par l'éthoprophos et l'aldicarbe : tentative de corrélation avec une réaction comportementale

André CUANY, Jean-Baptiste BERGÉ, Jean-Marc BRIDE et Samira HAMADÈNE-SELLAMI

INRA, Station de Recherches sur les Nématodes,
123, boulevard Francis Meilland, B.P. 78, 06602 Antibes, France

RÉSUMÉ

Les amphides des nématodes sont des récepteurs sensoriels riches en acétylcholinestérases. Celles-ci, aisément révélables en histochimie, sont très facilement accessibles et inhibées par l'aldicarbe et l'éthoprophos à des concentrations dix fois inférieures à celles qui provoquent la paralysie des animaux. D'autre part, l'inhibition de l'activité acétylcholinestérasique est soit réversible après un traitement à l'aldicarbe, soit plus ou moins définitive après un traitement à l'éthoprophos. L'effet perturbateur de ces produits sur les possibilités de réponse aux stimuli chimiques a été mesuré au travers du comportement d'orientation des nématodes dans un gradient attractif de dithionite. Il se fait sentir à des concentrations de pesticides encore plus faibles que celles nécessaires à l'inhibition des acétylcholinestérases amphidiales. Il est possible que la précision de la technique histochimique mise en œuvre dans cette étude soit insuffisante pour que l'on soit sûr du rôle de ces acétylcholinestérases dans la perception des stimuli par les nématodes, à moins qu'il n'y ait indépendance relationnelle.

SUMMARY

Inhibition and reactivation of Meloidogyne javanica amphidial acetylcholinesterases by ethoprophos and aldicarb : correlation attempt with a behavioural reaction

Nematodes amphids are sensory receptors rich in acetylcholinesterases. These esterases are easily revealed by histochemistry and are easily reached and inhibited by aldicarb and ethoprophos at one tenth the concentration that causes paralysis. On the other hand, acetylcholinesterasic activity inhibition is either reversible after aldicarb application or more or less permanent after an incubation in ethoprophos. The effect of these products on ability to recognise chemical stimuli has been measured through the orientation behaviour of nematodes in an attractive gradient of dithionite. Effects on orientation appear at concentrations even lower than those necessary to inhibit amphidial acetylcholinesterases. The sensitivity of histochemical techniques used for this study is not sufficient to define the role of the acetylcholinesterases in stimuli perception by nematodes, and there may be no relations between both effects.

Les pesticides organophosphorés, comme l'éthoprophos et les carbamates tels que l'aldicarbe agissent au niveau moléculaire en inhibant les acétylcholinestérases (AChE). Cette inhibition réversible dans certains cas (Bergé *et al.*, 1983) se traduit par une perturbation de la transmission de l'influx nerveux dans les jonctions cholinergiques neuro-neurales et neuro-musculaires. Une des résultantes physiologiques mesurables est la paralysie des stades mobiles de nématodes.

Pour des concentrations données d'aldicarbe et d'éthoprophos, on connaît les temps d'incubation minima qui conduisent à la paralysie des larves infestantes de *Meloidogyne arenaria* (Hamadène, 1982 ; Mitiche, 1980). Des concentrations très inférieures aux précédentes sont cependant susceptibles de perturber certains paramètres comportementaux (Nelmes, 1970 ; Di Sanzo, 1975 ; Hough & Thomason,

1975 ; Bunt, 1975). Par ailleurs, les chémorécepteurs de nématodes et, en particulier, les amphides (Coomans & De Grisse, 1981) sont riches en AChE (Janati, 1979). Ceci nous a conduits à déterminer les concentrations d'aldicarbe et d'éthoprophos nécessaires à l'inhibition et à la réactivation des AChE amphidiales de *M. arenaria* et à comparer ces concentrations à celles qui modifient l'orientation de ces larves dans un gradient réducteur de dithionite ($S_2O_4N_2$).

Matériel et méthode

Les larves infestantes de *M. arenaria* (population de Montoux) proviennent de masses d'œufs prélevées sur racines de tomate, *Lycopersicon esculentum*. CV Marmande.

INHIBITION ET RÉACTIVATION DES AChE AMPHIDIALES

La coloration marron des AChE amphidiales apparaît après une incubation des animaux durant deux heures dans une solution à base d'acétylthiocholine, selon la technique décrite par Karnovsky et Roots (1964). Si les AChE sont inhibées, cette coloration est moins intense et, si l'inhibition est totale, le conduit amphidial apparaît translucide en microscopie optique.

Leur inhibition est mesurée en préincubant durant des temps variables (1, 3, 6, 10, 12 heures à $5 \cdot 10^{-5}$ M ; 24, 30, 48 heures à $5 \cdot 10^{-6}$ M et 4 à 8 jours à 10^{-7} M) une suspension de nématodes dans des solutions d'aldicarbe ou d'éthoprophos, préalablement à leur transfert, après rinçage, dans la solution révélatrice de Karnovsky et Roots. Par ailleurs, la réactivation est appréciée en disposant, à l'issue des traitements et pendant des temps variables, les animaux dans de l'eau avant la coloration. Le temps de révélation colorimétrique est de deux heures et les pourcentages présentés dans les résultats sont estimés à partir de cinq comptages de vingt nématodes.

ETUDE DE LA DÉSORIENTATION DES ANIMAUX DANS UN GRADIENT RÉDUCTEUR DE DITHIONITE

Nous avons utilisé, pour cette étude, le technique décrite par Bird (1962). Une suspension aqueuse de larves de nématodes est homogénéisée dans un milieu gélosé en cours de refroidissement. Ce milieu, qui contient ou non l'aldicarbe à $2,6 \cdot 10^{-6}$ M, est ensuite coulé dans des boîtes de Petri en plastique de 5 cm de diamètre sur lesquelles ont été tracés des cercles concentriques servant de repères pour le dénombrement. Après solidification de la gélose (à 1% final), on enlève au centre à l'emporte-pièce une pastille cylindrique que l'on remplace par un milieu gélosé sans nématode contenant ou non de la dithionite à $2,5 \cdot 10^{-2}$ M. En début d'expérience, l'homogénéité de la distribution des nématodes dans les différents anneaux concentriques est vérifiée en les comparant deux à deux à l'aide d'un test « t ». L'attractivité de la pastille centrale est testée en dénombrant, à intervalles réguliers, les nématodes présents dans les différents anneaux. Dans le calcul de l'occupation de chacun d'eux, un coefficient est appliqué qui corrige les différences existant entre leurs surfaces respectives.

Résultats et discussion

INHIBITION ET RÉACTIVATION DES AChE AMPHIDIALES

A la figure 1 sont portés les pourcentages d'individus présentant une activité AChE non inhibée à l'issue des traitements. Cette méthode reste cepen-

dant semi-quantitative car elle ne permet qu'un classement dichotomique (inhibé ou non inhibé), les états intermédiaires d'inhibition pouvant difficilement être appréciés.

Dans la limite de précision de la méthode, il n'y a pas de différence significative entre l'effet inhibiteur de l'aldicarbe et de l'éthoprophos qui dépend de la résultante « concentration-temps ». L'inhibition des AChE amphidiales sur 50% des animaux est observée après une incubation de 6 h dans des solutions à $5 \cdot 10^{-5}$ M, de 22 h dans des solutions dix fois moins concentrées et de 140 h à 10^{-7} M.

Les résultats présentés au tableau 1 montrent que le phénomène de réactivation dépend en outre de la nature du pesticide.

L'activité des AChE amphidiales réapparaît presque totalement après un traitement à l'aldicarbe dans un délai d'autant plus long que la concentration de la solution pesticide est élevée ou que le temps d'incubation est important. Avec l'éthoprophos, au contraire, un pourcentage plus élevé d'animaux n'est pas capable de retrouver une activité AChE complète.

Enfin, dans tous les cas, une proportion non négligeable d'animaux présente une activité AChE partielle, notamment dans le cas de l'aldicarbe (coloration ponctuée le long des conduits ou coloration peu intenses des poches amphidiales). Ce phénomène de réactivation résulte d'une propriété générale des interactions AChE/organophosphorés ou carbamates

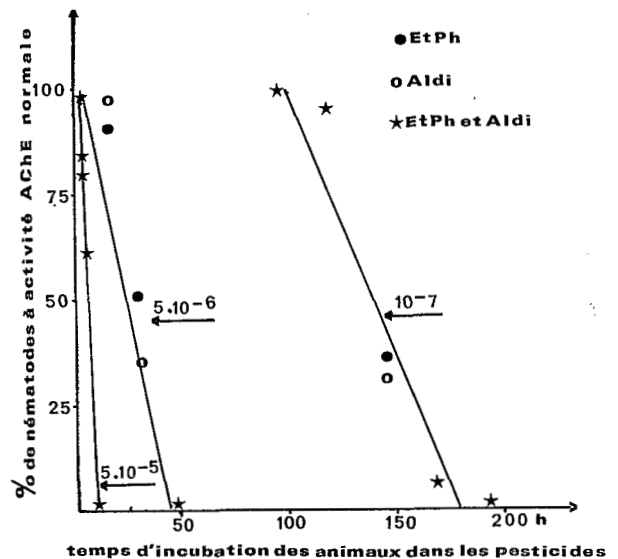


Fig. 1. Inhibition des AChE amphidiales de *M. arenaria*.

Inhibition of amphidial AChE activity in M. arenaria.

(Eto, 1974) qui se traduit physiologiquement par une reprise plus importante de l'activité motrice des nématodes traités à l'aldicarbe par rapport à ceux préalablement soumis à l'éthoprophos (Hamadène, 1982).

EFFET DE L'ALDICARBE SUR L'ORIENTATION DES NÉMATODES

La figure 2 montre les résultats de dénombrements effectués à des temps différents dans deux zones concentriques du dispositif d'expérience.

La première est la zone centrale riche en dithionite et dépourvue de nématodes en début d'expérience. Plus de 40% d'individus sont attirés dans ce compartiment après 45 minutes en présence de dithionite. Quand l'aldicarbe est introduit dans le milieu, ou en l'absence de dithionite, quelques larves pénètrent au hasard de leur déplacement dans la pastille centrale, mais il n'y a pas ultérieurement d'augmentation significative des effectifs comme dans le cas précédent.

Dans le troisième compartiment, éloigné de la pastille centrale de un centimètre, on n'observe qu'un léger déficit en présence de dithionite. En effet, la plupart des larves attirées vers le centre sont remplacées au hasard par celles venues des compartiments périphériques. Les pourcentages d'occupation

dans les autres combinaisons, sans dithionite et avec aldicarbe + dithionite, sont cependant plus élevés et demeurent constants.

Conclusion

L'inhibition des AChE amphidiales de *M. arenaria* se produit sur 50% des individus après une incubation de 22 h dans des solutions d'aldicarbe et d'éthoprophos de $5.10^{-6}M$. La désorientation des animaux repérée dans un gradient de dithionite se produit immédiatement à des concentrations d'aldicarbe de $2.6.10^{-6}$, approximativement équivalente à la moitié de la concentration précédente. Il apparaît donc difficile dans ce cas d'établir une relation entre l'effet inhibiteur de l'aldicarbe sur les AChE amphidiales et les conséquences de la présence de cette molécule sur la perception du gradient réducteur. Ceci peut s'expliquer soit par l'imprécision quantitative de la technique histochimique, soit par une absence de relation entre les AChE amphidiales et la perception par les nématodes du gradient de dithionite.

La réactivation de l'activité AChE amphidiales est cohérente avec les données déjà obtenues sur les mêmes enzymes provenant soit d'autres organismes (Eto, 1974), soit d'autres nématodes (Bergé *et al.*,

Tableau 1

Réactivation des AChE amphidiales de *M. arenaria*
Reactivation of amphidial AChE activity in M. arenaria

Traitements			Mesures de l'activité AChE amphidiale résiduelle					
Concentrations des solutions d'aldicarbe ou d'éthoprophos	Temps d'incubation	Durée du séjour dans l'eau après traitement	Après un traitement à l'aldicarbe : % de nématodes présentant une activité AChE			Après un traitement à l'éthoprophos : % de nématodes présentant une activité AChE		
			Totale *	Partielle**	Nulle***	Totale	Partielle	Nulle
$5 \cdot 10^{-5} M$	15	10	0	0	100	0	0	100
		24	0	70	30	0	40	60
		48	95	5	0	45	55	0
$5 \cdot 10^{-6} M$	70	48	0	0	100	0	0	100
		56	0	0	100	0	0	100
		72	10	40	50	0	30	70
		96	94	6	0	65	35	0

* (Coloration des amphides). ** (Coloration ponctuée des amphides). *** (Décoloration des amphides).

1983). En effet, l'inhibition de l'enzyme présente une tendance à l'irréversibilité dans le cas de l'éthoprophos alors que dans celui de l'aldicarbe on observe une restauration pratiquement totale de l'activité.

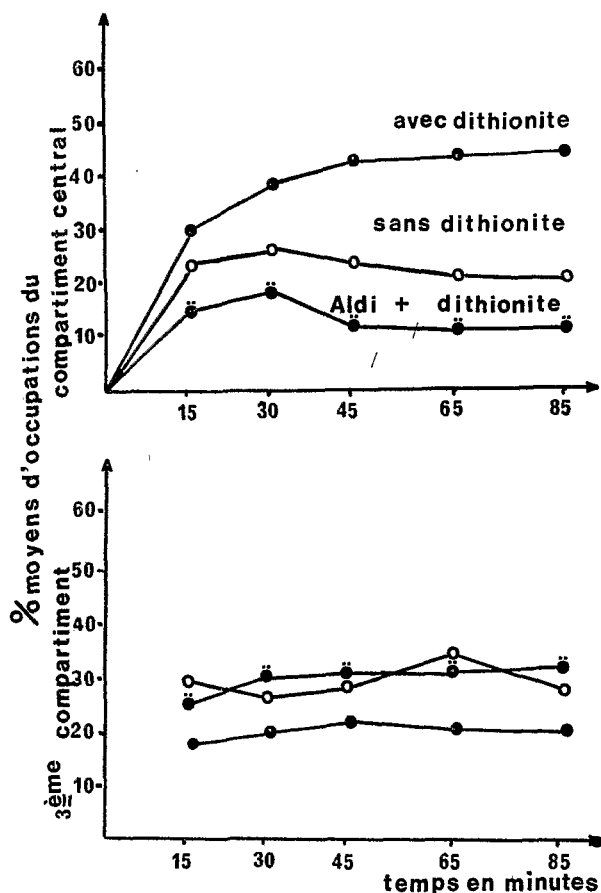


Fig. 2. Désorientation des nématodes par l'aldicarbe dans un gradient de dithionite.
Loss of nematodes orientation with aldicarb in a dithionite gradient.

Accepté pour publication le 11 juillet 1983.

RÉFÉRENCES

- BERGÉ, J. B., BRIDE, J. M., CUANY, A., FOURNIER, D. & HAMADÈNE S. (1983). Etudes comparatives des activités anticholinestérasiques de l'éthoprophos et de l'aldicarbe *in vivo* ou sur extraits enzymatiques du nématode *Neoplectana carpocapsae* (Weiser, 1955). *Soc. Phytiatr. Phytopharm.* (à paraître).
- BIRD, A. F. (1962). Orientation of the larvae of *Meloidogyne javanica* relative to roots. *Nematologica*, 7 : 275-297.
- BUNT, J. A. (1975). Effect and mode of action of oxamyl and phenamiphos. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv., Gent*, 40 : 459.
- COOMANS, A. & DE GRISSE, A. (1981). *Sensory structures*. In : Zuckerman, B. M. & Rohde, R. A. (Eds) *Plant Parasitic Nematodes*. Vol. III, New York & London, Acad. Press : 127-172.
- DI SANZO, C. P. (1975). Nematodes response to carbofuran. *J. Nematol.*, 5 : 22-27.
- ETO, M. (1974). *Organophosphorus pesticides : organic and biological chemistry*. Ed. C.R.C. Press, Inc., U.S.A., 387 p.
- HAMADÈNE, S. (1982). *Comparaisons des effets de deux nématicides utilisés à faibles doses sur des nématodes phyto et entomoparasites*. Thèse Doct.-Ing., Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, 81 p.
- HOUGH, A. & THOMASON, L. J. (1975). Effects of aldicarb on the behaviour of *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol.*, 7 : 221-229.
- JANATI, A. (1979). *Contribution à l'étude des estérases chez les Meloidogyne (Nematoda-Tylenchida)*. Thèse Doct.-Ing., Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier, 84 p.
- KARNOVSKY, M. J. & ROOTS L. (1964). A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.*, 12 : 219-221.
- MITICHE, F. (1980). *Réaction spécifique des nématodes aux pesticides : exemple de l'aldicarbe et de ses dérivés vis-à-vis de quelques espèces phytoparasites*. D.E.A.,
- NELMES, A. J. (1970). Behavioral responses of *Heterodera rostochiensis* larvae to aldicarb and its sulfoxide and sulfone. *J. Nematol.*, 2 : 223-227.