

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
ET MUSEUM NATIONAL D' HISTOIRE NATURELLE

THESE

présentée
pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par
Georges REVERSAT

RECHERCHES SUR LA SURVIE ET LE METABOLISME ENERGETIQUE
DES STADES INFESTANTS CHEZ *HETERODERA ORYZAE*,
MELOIDOGYNE JAVANICA ET *HIRSCHMANNIELLA SPINICAUDATA*,
NEMATODES PHYTOPARASITES DE LA ZONE INTERTROPICALE

Soutenue le 29 Janvier 1986 devant la Commission d' Examen :

MM. CHABAUD	Président
DOUMENGE	
ECHALIER	
FOURCHE	
LUC	
TOULMOND	

ORSTOM
PARIS
1986

REMERCIEMENTS

Cette thèse est présentée dans le cadre de l'association de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris et du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Je remercie Monsieur le Professeur CHABAUD et Monsieur le Professeur DOUMENGE, du Muséum, d'avoir bien voulu accepter de participer à ce jury et pour Monsieur le Professeur CHABAUD d'en assurer la présidence.

Je remercie Monsieur le Professeur ECHALIER et Monsieur le Professeur TOULMOND, de l'Université Pierre et Marie Curie pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail en acceptant de le juger.

Je remercie Monsieur le Professeur FOURCHE, qui a participé au début de ce travail en m'enseignant la technique du ludion et qui a accepté de venir en juger les résultats. Je remercie Monsieur LUC, Inspecteur Général de Recherches à l'ORSTOM, qui a encouragé l'insertion, de ces recherches dans le cadre des activités de la Nématologie à l'ORSTOM, pour sa participation à ce jury.

Je dois à Mademoiselle Jacqueline REVERSAT, la frappe de ce mémoire et à Monsieur MAIGA, dessinateur de l'ORSTOM à Dakar, la réalisation de nombreuses figures.

La participation de Madame SUAVIN, de Madame MONTEIRO et de Monsieur SOUCHAUD, de l'ORSTOM à la réalisation du mémoire est vivement appréciée.

Enfin je remercie, pour sa précieuse assistance, les techniciens des deux laboratoires de Nématologie de l'ORSTOM, d'Adiopodoumé et de Dakar, où a été réalisé ce travail.

SOMMAIRE

	<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
CHAPITRE 1	<u>L'ELEVAGE ET LA MANIPULATION DES ESPECES ETUDIEES</u>	
1.1.	<u>INTRODUCTION</u>	5
1.2.	<u>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ESPECES ETUDIEES</u>	7
1.2.1.	<u>Généralités</u>	7
1.2.2.	<u>Heterodera oryzae</u>	10
1.2.3.	<u>Meloidogyne javanica</u>	13
1.2.4.	<u>Hirschmanniella spinicaudata</u>	15
1.3.	<u>L'ELEVAGE DES ESPECES ETUDIEES</u>	16
1.3.1.	<u>Préparation du substrat</u>	16
1.3.2.	<u>Inoculation</u>	19
1.3.3.	<u>Développement</u>	21
1.4.	<u>LA MANIPULATION DES ESPECES ETUDIEES</u>	22
1.4.1.	<u>Heterodera oryzae</u>	22
1.4.2.	<u>Meloidogyne javanica</u>	29
1.4.3.	<u>Hirschmanniella spinicaudata</u>	31
1.5.	<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	34
1.5.1.	<u>Les contraintes de l'élevage</u>	34
1.5.2.	<u>Les limitations de l'élevage</u>	36
1.5.3.	<u>La pureté du matériel biologique obtenu</u>	37
1.5.4.	<u>L'homogénéité du matériel biologique obtenu</u>	40
1.5.5.	<u>Les contraintes du stockage</u>	41
CHAPITRE 2	<u>RECHERCHES SUR LA SURVIE DES STADES INFESTANTS</u>	
2.1.	<u>INTRODUCTION</u>	45
2.2.	<u>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	47
2.2.1.	<u>La survie des stades infestants</u>	47
2.2.2.	<u>La survie des oeufs</u>	49
2.2.3.	<u>La pénétration des stades infestants dans les racines de l'hôte</u>	50
2.3.	<u>LA SURVIE DES STADES INFESTANTS</u>	51
2.3.1.	<u>Principe de l'étude</u>	51
2.3.2.	<u>Méthodologie</u>	52
2.3.2.1.	<u>Survie et test de survie par passage actif</u>	52
2.3.2.2.	<u>Survie des lots chez Heterodera oryzae</u>	53
2.3.2.3.	<u>Sondages chez Meloidogyne javanica</u>	53
2.3.2.4.	<u>Détermination de la courbe de survie par l'examen des individus chez Hirschmaniella spinicaudata</u>	54

2.3.2.5.	Survie en conditions d'anaérobiose.....	55
2.3.2.6.	Survie en conditions d'osmobiose.....	56
2.3.3.	Résultats.....	57
2.3.3.1.	Survie des juvéniles d' <u>Heterodera oryzae</u>	57
2.3.3.2.	Survie des juvéniles de <u>Meloidogyne javanica</u>	59
2.3.3.3.	Survie des adultes d' <u>Hirschmanniella spinicaudata</u>	59
2.3.4.	Discussion.....	59
2.3.4.1.	Critique de la méthodologie.....	59
2.3.4.2.	Interprétation mathématique des courbes de survie.....	61
2.4.	<u>LA SURVIE DES OEUFS D'HETERODERA ORYZAE EN OSMOBIOSE</u>	66
2.4.1.	Principe de l'étude.....	66
2.4.2.	Méthodologie.....	67
2.4.3.	Résultats.....	68
2.4.3.1.	Influence de la durée de l'inhibition.....	68
2.4.3.2.	Influence de la concentration de la substance employée...	70
2.4.3.3.	Influence de la nature de la substance employée.....	72
2.4.3.4.	Influence du dessèchement en atmosphère contrôlée.....	76
2.4.4.	Discussion.....	76
2.4.4.1.	Influence de la durée de l'inhibition.....	76
2.4.4.2.	Influence de la concentration de la substance employée...	77
2.4.4.3.	Influence de la nature de la substance employée.....	80
2.5.	<u>LE POUVOIR INFESTANT DES JUVENILES D'HETERODERA ORYZAE ET DE MELOIDOGYNE JAVANICA</u>	83
2.5.1.	Principe de l'étude.....	83
2.5.2.	Méthodologie.....	85
2.5.3.	Résultats.....	88
2.5.3.1.	Influence des facteurs externes sur le pouvoir infestant.	88
2.5.3.2.	Influence de la durée du jeûne sur le pouvoir infestant..	94
2.5.3.3.	Compétition à l'infestation.....	98
2.5.4.	Discussion.....	100
2.5.4.1.	L'analyse des chiffres obtenus.....	100
2.5.4.2.	Influence des facteurs externes sur l'infestation.....	104
2.5.4.3.	Influence des facteurs internes sur l'infestation.....	107
2.5.4.4.	Compétition à l'infestation.....	112
2.6.	<u>LA REPRODUCTION CHEZ MELOIDOGYNE JAVANICA</u>	112
2.6.1.	Principe de l'étude.....	112
2.6.2.	Méthodologie.....	114
2.6.3.	Résultats.....	116
2.6.4.	Discussion.....	118
2.7.	CONCLUSION.....	119
2.7.1.	Le pouvoir infestant initial.....	119
2.7.2.	La survie en conditions standard.....	120
2.7.3.	La survie en conditions particulières.....	121

CHAPITRE 3 RECHERCHES SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE DES STADES INFESTANTS.

3.1.	<u>INTRODUCTION</u>	123
------	---------------------------	-----

3.2.	<u>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	124
3.2.1.	La composition chimique des nématodes.....	124
3.2.2.	La consommation des réserves.....	126
3.2.3.	Les échanges non gazeux avec le milieu externe.....	128
3.2.4.	La fonction respiratoire chez les nématodes.....	129
3.2.5.	Variations de la consommation d'oxygène chez les nématodes.....	132
3.3.	<u>LA CONSOMMATION DES RESERVES</u>	135
3.3.1.	<u>Principe de l'étude</u>	135
3.3.2.	<u>Méthodologie</u>	136
3.3.2.1.	Echantillonnage.....	136
3.3.2.2.	Détermination du poids sec.....	143
3.3.2.3.	Dosage des lipides totaux.....	144
3.3.2.4.	Dosage des glucides totaux.....	147
3.3.2.5.	Dosage des protéines totales et de l'azote total.....	148
3.3.2.6.	Détermination de la demande chimique d'oxygène.....	150
3.3.2.7.	Détermination de l'opacité.....	152
3.3.3.	<u>Résultats</u>	154
3.3.3.1.	Variations de la composition chimique au cours du jeûne..	154
3.3.3.2.	Variations de la demande chimique d'oxygène au cours du jeûne.....	161
3.3.3.3.	Variation de l'opacité au cours du jeûne.....	166
3.3.4.	<u>Discussion</u>	169
3.3.4.1.	La composition chimique des nématodes.....	173
3.3.4.2.	La notion de réserves chez les nématodes.....	173
3.3.4.3.	Le sort des réserves consommées.....	174
3.3.4.4.	Variations de la vitesse de consommation des réserves....	174
3.3.4.5.	Les quiescences.....	175
3.3.4.6.	La demande chimique d'oxygène.....	175
3.3.4.7.	L'opacité.....	178
3.4.	<u>LA CONSOMMATION D'OXYGENE</u>	180
3.4.1.	<u>Principe de l'étude</u>	180
3.4.2.	<u>Méthodologie</u>	181
3.4.2.1.	Description du ludion à bouchon.....	181
3.4.2.2.	Mise en oeuvre du ludion à bouchon.....	183
3.4.2.3.	L'appareil de mesure.....	187
3.4.2.4.	La mesure.....	189
3.4.2.5.	Calcul de l'intensité respiratoire (IR).....	191
3.4.3.	<u>Résultats</u>	193
3.4.3.1.	Les contraintes de la technique.....	193
3.4.3.2.	Influence des facteurs externes sur l'IR.....	197
3.4.3.3.	Influence du jeûne sur l'IR.....	206
3.4.4.	<u>Discussion</u>	211
3.4.4.1.	Critique de la méthodologie.....	211
3.4.4.2.	Influence du milieu sur l'intensité du métabolisme.....	220
3.4.4.3.	Influence du jeûne sur l'intensité du métabolisme.....	225
3.4.4.4.	Relations entre la consommation d'oxygène et la consommation des réserves.....	229
3.5.	<u>CONCLUSIONS</u>	230
3.5.1.	Le bilan métabolique.....	230
3.5.2.	La nature des réserves consommées.....	232
3.5.3.	L'intensité du métabolisme.....	233

CONCLUSION GENERALE

A.	<u>APPORTS DE L'ETUDE</u>	235
A.1.	Le bilan du métabolisme.....	235
A.2.	Etat des réserves et survie.....	236
A.3.	Etat des réserves et pouvoir infestant.....	237
A.4.	Variations d'intensité du métabolisme.....	237
A.5.	Implications pratiques.....	239
B.	<u>PERSPECTIVES</u>	239
B.1.	Exploitation du modèle juvéniles infestants.....	239
B.2.	Exploitation du modèle adultes infestants.....	240
B.3.	Exploitation du modèle oeuf.....	241

<u>PUBLICATIONS HORS TEXTES</u>	243
---------------------------------------	-----

<u>REFERENCES</u>	245
-------------------------	-----

<u>ANNEXE 1 : Le marquage d'<u>Heterodera oryzae</u> et <u>H. sacchari</u> par le soufre radioactif ³⁵S</u>	257
--	-----

<u>ANNEXE 2 : La fabrication des ludions à bouchon</u>	265
--	-----

INTRODUCTION GENERALE

Parmi les acquis de la physiologie animale, la place occupée par les nématodes phytoparasites est réduite, voire insignifiante. Cette situation contraste avec le développement considérable qui a été donné à l'étude de la physiologie des deux groupes voisins : nématodes zooparasites et nématodes libres. Les nématodes constituent pourtant un groupe d'animaux à l'organisation particulièrement homogène, bien propre dans son ensemble à susciter l'intérêt de la physiologie comparée. L'introduction de cette division en trois groupes repose d'une part sur des différences d'intérêt pratique, liées à l'intervention de ces animaux dans l'activité humaine, et d'autre part sur des différences dans les possibilités expérimentales qu'ils offrent. Dans cette dernière perspective, rappelons que la condition initiale d'une étude physiologique consiste à réunir une quantité suffisante d'un matériel biologique homogène, afin de réaliser une mesure ou un dosage. Si chez certains groupes, un individu ou une de ses parties suffit, chez d'autres, la quantité requise ne peut être atteinte qu'en réunissant un échantillon contenant de nombreux individus. Dans ces conditions, il est essentiel que tous les individus de l'échantillon présentent le même stade de développement et le même état physiologique, d'où la nécessité d'une synchronisation.

Les nématodes zooparasites ont forcé l'attention depuis longtemps à cause de la taille macroscopique des adultes chez certaines espèces et du rôle qu'ils jouent en médecine humaine et vétérinaire. Les

stades macroscopiques peuvent être recueillis en abondance lors de l'abattage d'animaux contaminés. Par ailleurs, les stades infestants, microscopiques, peuvent être obtenus synchronisés et en grande quantité à partir des coprocultures (Gevrey, 1971) ou de culture d'oeuf in vitro (Kerboeuf, 1978). L'ensemble de ces motivations a conduit à un développement sans pareil des études physiologiques allant des fonctions intégrées (respiration, excrétion, ...) à l'analyse la plus fine (enzymologie). Inaugurée en 1859 par une publication de Claude Bernard, la physiologie des nématodes zooparasites fait l'objet actuellement de plusieurs centaines de publications par an (Von Brand, 1970).

L'essor que connaît depuis une trentaine d'années l'étude de la physiologie des nématodes libres n'a pas la même origine. En effet, ces animaux, d'une taille microscopique, vivent dans le sol où, loin de représenter une menace, on leur attribue même un rôle bénéfique par la prédation qu'ils exercent sur la flore tellurique (Mercer & Cairns, 1973). Ce sont principalement des considérations théoriques qui ont conduit à s'intéresser à ces animaux. La brièveté de leur cycle (5-10 jours), leur fécondité, leur aptitude à l'élevage *in vitro* sur milieu vivant ou inerte, en font des modèles biologiques satisfaisants pour l'étude de certains mécanismes : vieillissement, adaptation (Erlanger & Gershon, 1970 ; Zuckerman, 1976). Ceci a permis des études physiologiques dont certaines sont au moins aussi avancées que celles réalisées avec les nématodes zooparasites. Cependant l'exploitation de ces possibilités connaît actuellement une difficulté majeure. Les élevages de ces animaux ne fournissent spontanément que des stades mélangés. La synchronisation n'a pu être obtenue jusqu'à présent que par des moyens chimiques, comme des inhibiteurs (Hieb & Rothstein, 1975), ou des moyens physiques comme des tamisages (Tilby & Moses, 1975 ; Patel & Mac Fadden, 1978a). Or, certains auteurs mettent actuellement en cause les répercussions de ce traitement initial, destiné à la synchronisation, sur les paramètres physiologiques étudiés (Klefenz & Zuckerman, 1978).

La connaissance du rôle néfaste que les nématodes phytoparasites exercent sur le rendement des plantes cultivées ne date guère que d'une soixantaine d'années. Ces animaux sont exclusivement phytoparasites et leur élevage est obtenu par l'inoculation d'une plante

supérieure, qui doit être maintenue dans un bon état physiologique (lumière, température, nutrition) tout au long d'un cycle de développement relativement étalé (de 4 à 8 semaines). Il est compréhensible que ces servitudes aient éloigné ceux qui recherchaient un matériel facile à manipuler, et l'étude de la physiologie des nématodes phytoparasites est restée à la charge des spécialistes de la défense des cultures. Cette étude n'a vraiment commencé que dans les années 60, dans les laboratoires américains, anglais et australiens.

L'étude des nématodes phytoparasites d'Afrique intertropicale est encore plus récente, puisque le premier laboratoire spécialisé n'a été fondé qu'en 1955 à Abidjan en Côte d'Ivoire. Une première vague de travaux a été consacrée à l'inventaire et à la description des espèces nouvelles. Une deuxième vague, encore actuellement en cours, a permis de préciser la biologie des espèces importantes.

Ce mémoire est consacré à des recherches sur le métabolisme énergétique des nématodes phytoparasites d'Afrique intertropicale. Ce travail fait partie d'une troisième vague de travaux, consacrée à la physiologie et qui a deux autres composantes dont nous aurons à tenir compte dans le contexte de notre étude : la résistance à la sécheresse (Demeure, 1975) et l'attraction des nématodes par les plantes (Prot, 1975). D'après ce qui précède, il apparaît que cette étude manque de références à double titre, d'une part parce que ces problèmes commencent à peine à être abordés chez les nématodes phytoparasites et d'autre part parce que les espèces parmi lesquelles ont été choisies les objets de ces recherches n'ont été décrites que récemment.

Dans ces conditions, il a paru justifié de limiter l'étude aux fonctions physiologiques générales du métabolisme énergétique : consommation des réserves et consommation d'oxygène. De cette façon, on respecte la démarche qui a été naguère employée lors de l'étude des nématodes zooparasites et qui a conduit à des approfondissements ultérieurs motivés. L'étude de ces deux fonctions principales a un corollaire qui est l'étude de leur effet sur les fonctions dont dépend le caractère parasitaire de ces animaux : activité, survie et pouvoir infestant.

Les facteurs dont l'influence sur ces fonctions a été étudiée sont de deux ordres : externe et interne. Parmi les facteurs externes, l'étude a été strictement limitée aux paramètres physiques et chimiques : tensions gazeuses, température, substances en solution, granulométrie, etc ... La prise en considération des facteurs externes d'origine biotique n'est pas envisageable actuellement tant ils sont mal connus (Van Gundy, 1965 ; Jones, 1975a). Les facteurs internes comprennent la différence spécifique (l'étude sera conduite sur plusieurs espèces) et le jeûne. Dans le cycle des nématodes zoo ou phytoparasites, le jeûne constitue une contrainte naturelle, correspondant à une phase nécessaire de l'extension du parasite : le passage à un nouvel hôte. On peut penser que la persistance de ces espèces dans le milieu naturel, même après un jeûne prolongé pouvant atteindre plusieurs années, représente le problème, à la fois pratique et théorique, le plus intéressant posé par la physiologie de ces animaux.

Ce mémoire est divisé en trois chapitres : le premier traite du choix des espèces étudiées, de leur élevage et de leur manipulation au laboratoire ; le second s'occupe de l'activité, de la survie et du pouvoir infestant, le troisième est consacré au métabolisme énergétique.

CHAPITRE 1

L'ELEVAGE ET LA MANIPULATION DES ESPECES ETUDIEES

1.1. INTRODUCTION

La plupart des nématodes qui parasitent les plantes supérieures restent à ce jour strictement phytoparasites. Il n'a pas été possible en effet, jusqu'à présent, de mettre au point pour ces animaux des milieux inertes permettant l'élevage artificiel, comme cela a été réalisé pour d'autres organismes phytoparasites tels que certains champignons, certaines bactéries ou certains insectes. Les rares cas où la recherche de ces milieux, pour les nématodes phytoparasites, a connu des succès ne concernent que des espèces très marginales (parasites foliaires) dont le choix eût réduit l'intérêt de l'étude (Zuckerman, 1971). L'élevage au laboratoire d'un nématode phytoparasite implique donc

d'abord l'inoculation d'une plante hôte, croissant en pot dans une serre, par un inoculum constitué de stades infestants, puis la récolte, au terme d'un cycle de développement de l'ordre d'un mois, des descendants, recueillis également au stade infestant.

L'amélioration de la productivité de tels élevages n'avait pas fait, jusqu'à présent, l'objet de recherches particulières. Les données disponibles dans la littérature traitent généralement d'élevages à caractère qualitatif, destinés à entretenir les espèces au laboratoire et à fournir les petites quantités de matériel vivant, nécessaires aux études de systématique et de biologie. Au cours du présent travail, la production des grandes quantités d'animaux exigées par les dosages biochimiques (chapitre 3) a conduit à la mise au point de méthodes d'élevage plus performantes. Pour cette raison, il apparaît utile de décrire les méthodes utilisées au cours de ce travail. De plus si la maîtrise et la productivité des élevages sont suffisantes pour réaliser le dosage des réserves, elles ne permettraient pas, néanmoins, d'envisager actuellement des dosages d'enzymes ou de pigments. Dans cette perspective, les méthodes décrites ici ne représentent qu'une étape vers des méthodes plus élaborées.

Concernant le choix des espèces étudiées, les considérations théoriques et pratiques évoquées dans l'introduction générale peuvent être traduites sous la forme des deux critères suivants : a) L'espèce choisie doit être représentative de l'un des grands groupes trophiques (ectoparasite, endoparasite migrateur, endoparasite sédentaire) et sa biologie doit être suffisamment connue par des travaux antérieurs. b) La productivité en matériel biologique doit être élevée, soit du fait d'une fécondité importante, soit du fait de la taille des animaux.

Parmi la vingtaine d'espèces de nématodes phytoparasites d'Afrique de l'Ouest, entretenues en élevage dans les laboratoires de Nématologie de l'ORSTOM d'Abidjan et de Dakar, trois, répondant à ces critères, ont été choisies : deux espèces parasites du riz inondé, Heterodera oryzae endoparasite sédentaire, et Hirschmanniella soinicaudata endoparasite migrateur, et une espèce endoparasite sédentaire des plantes maraichères, Meloidogyne javanica.

Après avoir examiné les données bibliographiques relatives à ces trois espèces, nous verrons successivement leur élevage et leur manipulation.

1.2. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ESPECES ETUDIEES

1.2.1. Généralités

Le cycle de développement d'un nématode comprend quatre stades larvaires et un stade adulte séparés par quatre mues. La première mue, qui fait passer le juvénile du premier au second stade larvaire, se déroule à l'intérieur de la coque de l'oeuf, avant l'éclosion. Les différents stades n'ont pas des aptitudes équivalentes de résistance au jeûne : seuls les stades infestants, capables éventuellement de reprendre le cycle, après une absence momentanée de la plante hôte, sont alors intéressants à considérer. Chez Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica, seuls les juvéniles du second stade sont infestants et ont été étudiés ici, soit sous forme de juvéniles libres, après l'éclosion, soit sous forme d'oeufs, avant l'éclosion. Chez Hirschmanniella spinicaudata, dont les trois derniers stades larvaires et les adultes sont infestants, seuls les adultes ont été étudiés.

Les stades infestants étudiés, dont l'aspect est schématisé par la figure 1, présentent la même morphologie. Il s'agit d'animaux à l'aspect vermiforme, à section ronde et d'une taille réduite, inférieure au demi millimètre chez H. oryzae et M. javanica, mais plus grande chez H. spinicaudata. Des caractéristiques morphométriques plus précises sont données par le tableau 1. Leur corps, qui affecte une forme cylindrique amincie aux deux extrémités, est recouvert d'une cuticule. A l'extrémité antérieure s'ouvre la bouche, munie d'un stylet, d'origine cuticulaire, protractile et que l'animal utilise pour percer les parois cellulaires des couches superficielles de la racine dans laquelle il va pénétrer. Sur la face interne de la cuticule est appliquée une couche musculaire mince délimitant ainsi la cavité pseudocoelomique remplie d'un liquide pseudocoelomique. Dans ce dernier baigne le tractus digestif composé d'un oesophage musculeux, dont le lumen est en relation avec celui du stylet,

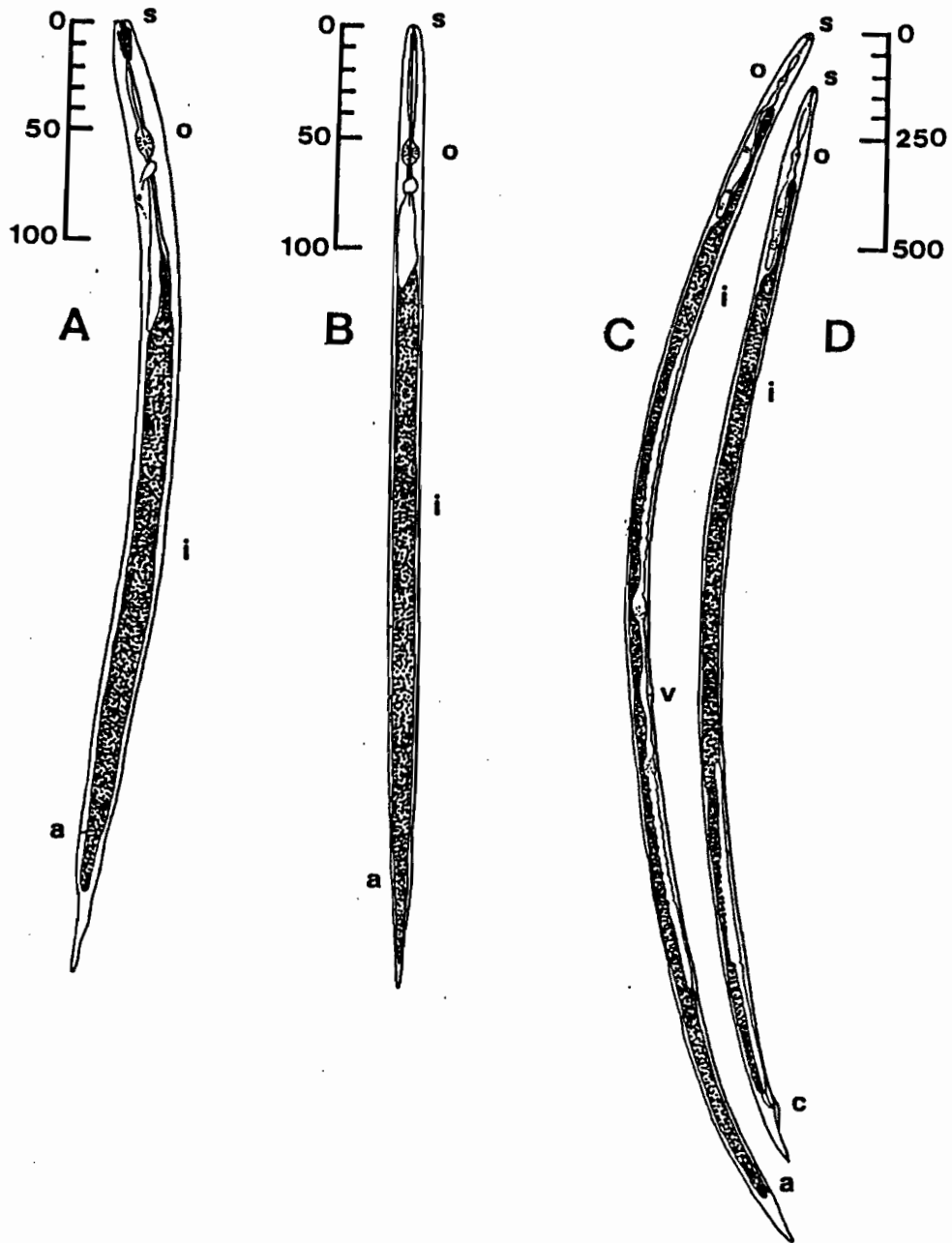


Fig. 1. - Représentation schématique des animaux étudiés (échelles en microns ; a : anus ; c : cloaque ; i : intestin ; o : oesophage ; s : stylet ; v : vulve).
 A : Juvénile du second stade d'Heterodera oryzae (modifié, d'après Luc et Taylor, 1977).
 B : Juvénile du second stade de Meloidogyne javanica (modifié, d'après Orton Williams, 1972).
 C et D : Respectivement, femelle et mâle d'Hirschmanniella spinicaudata (modifié, d'après Luc et Fortuner, 1975).

TABLEAU 1. Caractéristiques morphométriques des animaux étudiés

Espèce		Heterodera oryzae	Meloidogyne javanica	Hirschmanniella spinicaudata	
Stade		Juvénile du 2ème stade	Juvénile du 2ème stade	Femelle	Mâle
Longueur μm	Moyenne	440 ¹	417 ²	2.840 ³	2.370 ³
	Extrêmes	373-507 ¹	387-459 ²	2.440-3.160 ³	2.120-2.640 ³
Rapport Longueur/Diamètre	Moyenne	24,7 ¹	30,6 ²	55,8 ³	56,2 ³
	Extrêmes	22,6-28,0 ¹	27,1-35,9 ²	49,4-62,9 ³	48,7-60,7 ³
Volume moyen μm^3		109.930 ⁴	60.974 ⁴	5.792.700 ⁴	3.318.745 ⁴
Nombre moyen par mm ³ de matière		9.100	16.400	173	300

- 1) Luc & Berdon-Brizuela, 1961.
- 2) Orton Williams, 1972.
- 3) Luc & Fortuner, 1975.
- 4) Calculé d'après la formule d'Andrassy, 1956.

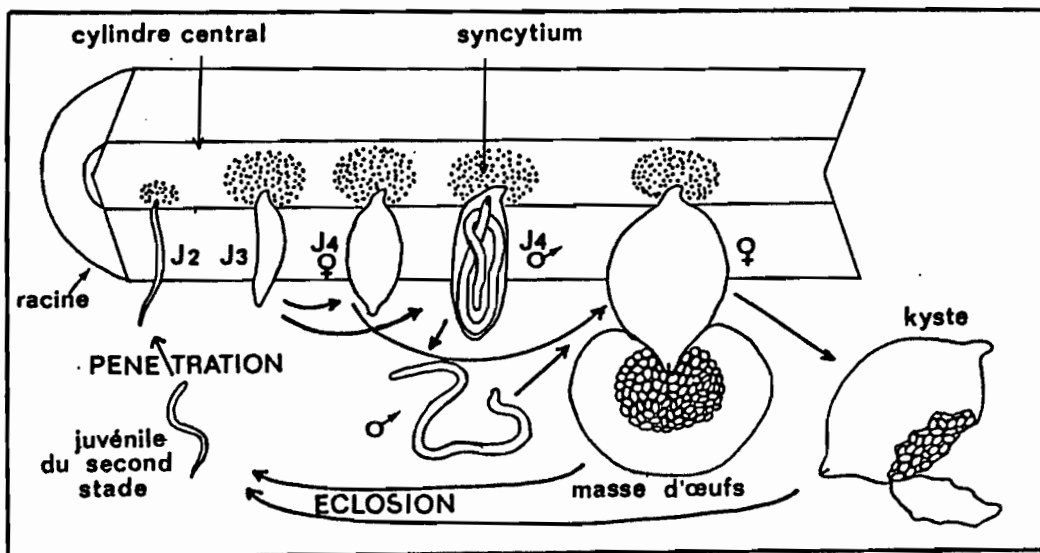


Fig. 2. - Représentation schématique du cycle de développement d'*Heterodera oryzae* (modifié, d'après Merny, 1972. J2, J3, J4 : respectivement, juvéniles des second, troisième et quatrième stade. Voir également les explications du texte).

et d'un intestin qui débouche à l'extérieur par un anus situé en position prédistale. Chez les juvéniles d'H. oryzae et M. javanica, les organes sexuels sont à l'état de primordium ne comprenant que quelques cellules. Chez les adultes d'H. spinicaudata, ces mêmes organes sont parfaitement développés et baignent dans le liquide pseudocoelomique. Chez la femelle deux gonades opposées débouchent dans une vulve située en position médiane, tandis que chez le mâle la gonade unique débouche en même temps que le tube digestif dans un cloaque récelant l'appareil copulateur, les spicules. Dans leur biotope habituel, ces animaux se déplacent dans les pores du sol, tout en restant dans le film liquide qui adhère aux particules du sol. Sous le loupe binoculaire, dans un milieu convenablement humide (lame d'eau), ces animaux manifestent une activité spontanée par des courbures et des oscillations de fréquence peu élevée (de 20 à 60 par minute).

Des données bibliographiques disponibles pour ces trois espèces, nous retiendrons celles relatives à la répartition, au cycle et à la biologie. Dans la mesure où certains éléments sont identiques chez les trois espèces, une description détaillée ne sera donnée que pour la première espèce, Heterodera oryzae, à laquelle on comparera les autres.

1.2.2. Heterodera oryzae

Répartition géographique

Heterodera oryzae a été décrit en 1961 par Luc et Berdon Brizuela à partir d'échantillons provenant d'une rizière inondée en Côte d'Ivoire. Dans le même pays, Merny (1970b) l'a également trouvé comme parasite des graminées et cypéracées sauvages, adventices des rizières. Depuis, cette espèce a été retrouvée sur riz irrigué au Sénégal (Fortuner & Merny, 1973), sur bananier au Sénégal (Taylor, 1978), sur riz irrigué en Inde (Rao & Jayaprakash, 1977). Deux espèces très voisines, se développant également sur riz inondé, ont été décrites : en Inde, Heterodera oryzicola (Rao & Jayaprakash, 1978) et au Japon, Heterodera elachista (Ohshima, 1974).

Cycle de développement

Ce cycle, décrit par Berdon et Merny en 1964 est schématisé par le diagramme de la figure 2. Les juvéniles du second stade (fig. 1A), infestants, sont libres et mobiles dans le sol. Ces juvéniles pénètrent obliquement dans le tissu cortical des racines de la plante hôte, le riz, et leur extrémité antérieure se loge dans la couche externe du cylindre central. On observe alors au niveau de la tête du juvénile une lyse des parois cellulaires des tissus végétaux, aboutissant à la formation d'un syncytium. Cette lyse est attribuée à l'action d'enzymes dissous dans la salive excrétée par les glandes salivaires, situées dans l'oesophage de l'animal, et qui parvient au contact de la plante par le canal du stylet. Ce syncytium sert de substrat nutritif au juvénile qui a désormais perdu sa mobilité. La seconde mue commence trois ou quatre jours après la pénétration et dure trois jours. Chez les juvéniles du troisième stade, issus de cette mue, la distinction des sexes devient possible au niveau du primordium génital : indivis chez les mâles et divisé en deux branches chez les femelles. Au cours du troisième stade, la croissance est plus importante chez les femelles que chez les mâles. La troisième mue intervient vers le neuvième jour chez les juvéniles mâles et vers le dixième jour chez les juvéniles femelles et dure environ deux jours. Au cours du quatrième stade, le dimorphisme sexuel s'accroît : le juvénile femelle croît en largeur après s'être libéré de l'ancienne cuticule, tandis que le juvénile mâle, qui a subi une véritable métamorphose, croît en longueur à l'intérieur de la cuticule du troisième stade et s'y replie trois fois sur lui-même. La quatrième mue a lieu vers le seizième jour chez les juvéniles femelles et la cuticule se détache. Chez les juvéniles mâles, cette mue, qui dure du treizième au seizième jour a lieu dans la cuticule du quatrième stade. Le mâle est donc enfermé dans les cuticules des deux stades précédents.

Chez cette espèce, le sexe est prédéterminé (Cadet et al., 1975) et, dans des conditions normales de développement, les nombres de mâles et de femelles sont équivalents. Les mâles émergent de leurs enveloppes, se déplacent dans le sol et vont féconder les femelles sédentarisées dont la partie postérieure, portant la vuive, est

extérieure à la racine. Les spermatozoïdes sont stockés dans la spermathèque et les oeufs qui y défilent, au fur et à mesure de leur formation, y sont fécondés : l'espèce est amphimictique (Netscher, 1969). Les oeufs fécondés sont tout d'abord pondus par la femelle dans une masse mucilagineuse émise par des glandes périanales, ce qui constitue la masse d'oeufs. Les autres oeufs restent à l'intérieur du corps de la femelle. Celle-ci meurt et sa cuticule, blanche et souple à l'origine, devient dure et brune, aboutissant ainsi à la formation d'un kyste. Les oeufs fécondés se divisent pour aboutir au terme de leur développement embryonnaire au juvénile du premier stade. La première mue se déroule à l'intérieur de l'oeuf, avant l'éclosion. C'est sous cette forme de juvéniles du second stade non éclos que les juvéniles d'Heterodera oryzae, et d'ailleurs des autres espèces du même genre, peuvent attendre des temps assez longs avant que l'éclosion ne se produise, offrant ainsi l'occasion de la synchronisation. Comme ce cycle de développement, de juvénile à juvénile, dure environ cinq semaines et que la culture de la plante hôte, le riz, dure de trois à quatre mois, deux ou trois générations peuvent se succéder au cours d'une culture.

Biologie

Merny (1966, 1972), a étudié l'éclosion des oeufs. Les masses d'oeufs libèrent rapidement dans l'eau des juvéniles éclos, tandis que l'éclosion des oeufs des kystes est beaucoup plus lente. Dans le sol humide les juvéniles éclos ne survivent que 4 semaines et en sol inondé leur survie est plus brève (Merny, 1972).

Quelques expériences ont été réalisées avec une espèce très voisine, Heterodera sacchari, décrite à l'origine comme parasite de la canne à sucre au Congo (Luc & Merny, 1963), mais qui a été retrouvée sur riz en Côte d'Ivoire (Merny, 1970b) et au Sénégal (Fortuner & Merny, 1973). Le cycle d'Heterodera sacchari est très semblable à celui d'Heterodera oryzae avec néanmoins quelques différences essentielles : l'espèce est parthénogénétique, les mâles sont rares dans les conditions normales d'élevage, et la masse mucilagineuse, bien que présente sous un faible volume, ne se remplit pas d'oeufs.

1.2.3. Meloidogyne javanica

Répartition géographique

Meloidogyne javanica a été décrit en 1885 par Treub comme parasite de la canne à sucre dans l'île de Java (Orton Williams, 1972). Cette espèce très cosmopolite est trouvée dans toutes les zones chaudes et tropicales des cinq continents. Sa gamme d'hôtes comprend actuellement plus de 770 espèces végétales.

Cycle de développement

Le cycle a été redécrit par Ritter (1965) et par de Guiran et Netscher (1970). Dans ses lignes générales, ce cycle est semblable à celui d'Heterodera oryzae, et on peut limiter sa description à une représentation schématique (fig. 3) et à la caractérisation des différences principales :

- Après la pénétration dans les racines de la plante hôte, l'établissement des juvéniles dans les racines s'accompagne de la formation de cellules géantes plurinuclées, qui servent de substrat nutritif au parasite, et d'une hypertrophie des tissus adjacents qui provoque sur la racine une nodosité caractéristique nommée galle.

- L'espèce est parthénogénétique et le sexe n'est pas prédéterminé. L'apparition des mâles correspond à des conditions nutritionnelles insuffisantes : surpopulation, plante hôte en mauvais état physiologique ou carencée. Dans des conditions normales, la plupart des juvéniles qui ont pénétré dans les racines évoluent en femelles.

- Les oeufs sont émis par la femelle dans une masse mucilagineuse et l'ensemble constitue la masse d'oeufs. Dans les conditions d'une inoculation légère cette masse d'oeufs est extérieure à la galle (fig.3). Lors d'inoculations plus importantes, ou en seconde génération, une fraction notable des masses d'oeufs est enfermée à l'intérieur de grosses galles. La cohésion des oeufs, assurée par la masse mucilagineuse est très lâche, et les masses d'oeufs sont, de ce fait, peu résistantes aux manipulations (aspersion par jet d'eau), ce qui aura de l'influence sur les méthodes de récolte.

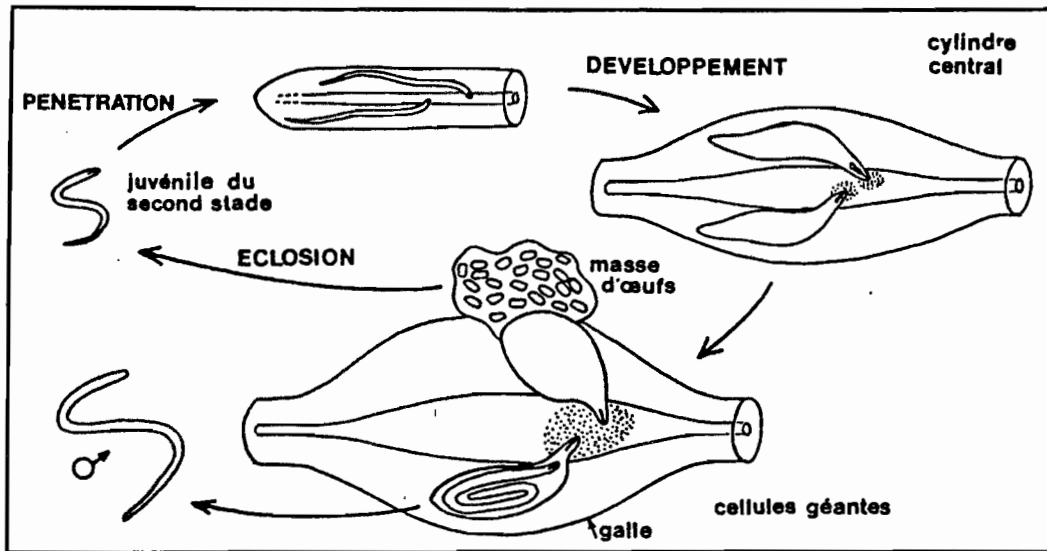


Fig. 3. - Représentation schématique du cycle de développement de *Meloidogyne javanica* (modifié, d'après de Guiran et Netscher, 1970 ; J2, J3, J4 respectivement juvéniles des 2ème, 3ème et 4ème stade ; voir également les explications du texte).

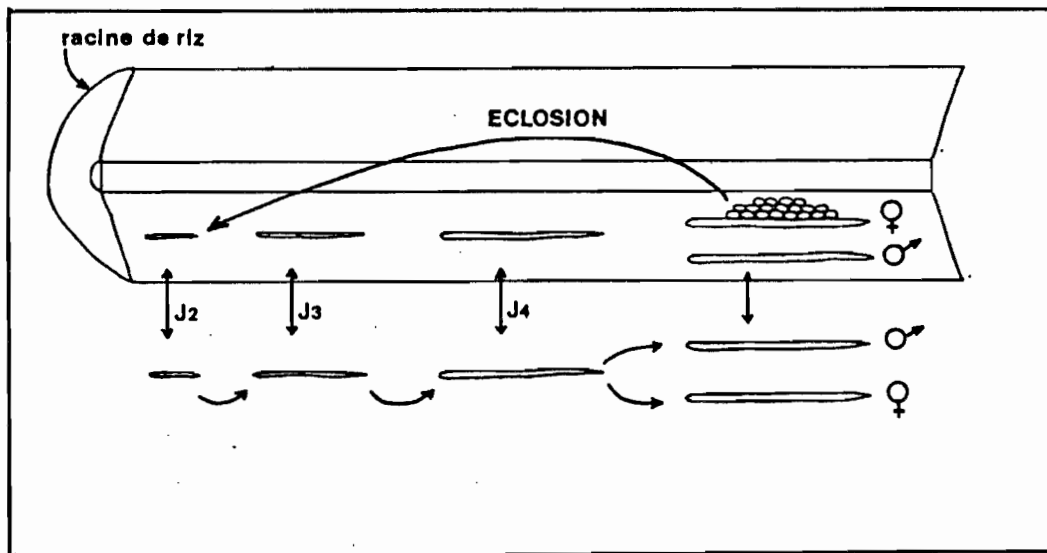


Fig. 4. - Représentation schématique du cycle de développement d'*Hirschmanniella spinicaudata* (modifié, d'après Merny, 1972 ; J2, J3, J4 respectivement juvéniles des 2ème, 3ème et 4ème stade ; voir également les explications du texte).

- Au terme de la ponte, la femelle ne retient pas d'oeufs en quantités appréciables à l'intérieur de son corps et sa cuticule ne se transforme pas après la mort : il n'y a pas formation de kyste.

Biologie

Il s'agit d'une des espèces de nématodes phytoparasites les plus étudiées et l'on peut estimer que tous les aspects de sa biologie ont été abordés. Dans cette perspective, elle représente, dans notre étude, l'espèce de référence.

1.2.4. Hirschmanniella spinicaudata

Répartition géographique

Cette espèce a été décrite en 1944 par Schuurmans-Stekhoven à partir d'échantillons sans plante hôte signalée, provenant de marais au Zaïre. Son statut taxonomique actuel a été établi en 1963 par Luc et Goodey : Hirschmanniella spinicaudata. Cette espèce a été trouvée parasitant le riz inondé en Afrique tropicale : Cameroun (Luc, 1957), Gambie (Fortuner & Merny, 1973), Côte d'Ivoire (Sher, 1968 ; Merny, 1970b), Nigeria (Caveness, 1967), Sénégal (Fortuner & Merny, 1973), Haute Volta (Germani, communication personnelle). On l'a également trouvée sur la même plante au Vénézuéla (Sher, 1968) et à Cuba (Fernandez & Ortega, 1981).

Cycle de développement

Ce cycle, décrit par Merny (1970 a & b ; 1972), est schématisé par la fig. 4. Cette espèce représente le cas typique d'un nématode endoparasite migrateur : les quatre stades larvaires et les adultes peuvent pénétrer ou quitter les racines du riz. La durée du cycle, d'oeuf à oeuf, est d'environ 40 jours. Au cours de la phase de croissance du riz, la population est principalement endoracinaire et on ne trouve que peu d'animaux dans le sol. Par contre dès l'apparition des panicules, les animaux ont tendance à quitter les racines et à se retrouver dans le sol. L'espèce est bisexuée et les nombres de mâles et

de femelles sont équivalents. Le dimorphisme sexuel n'apparaît clairement qu'au quatrième stade larvaire : les ébauches des organes génitaux contrastent alors par leur transparence avec le tractus digestif qui reste très opaque.

Biologie

La biologie d'H. spinicaudata a été étudiée par Merny (1970, a & b ; 1972) et Babatola et Bridge (1979, 1980). La persistance de cette espèce dans le sol est très longue, soit en l'absence d'hôte, soit en présence de repousses de riz ou de plantes adventices, qui peuvent lui servir d'hôte. Dans du sol humide non saturé, l'espèce peut survivre plus de dix mois.

1.3. L'ELEVAGE DES ESPECES ETUDIEES

L'élevage comporte trois étapes. Il s'agit dans un premier temps de préparer un substrat favorable à la multiplication des nématodes : pour cela dans des pots contenant de la terre arable dénématée est plantée, à partir de graines, la plante hôte correspondant à l'espèce considérée. Ensuite, lorsque la plante a atteint un développement suffisant, on procède à l'inoculation en introduisant des stades infestants dans la terre des pots. Enfin, les pots sont gardés en serre pendant le temps nécessaire au développement des nématodes.

1.3.1. Préparation du substrat

Préparation des pots de terre dénématée

Cette préparation est valable pour les trois espèces. On emploie de la terre prélevée en terrain découvert à proximité du laboratoire dans l'horizon de terre arable (de 0 à 40 cm de profondeur). Pour Dakar, les éléments constituant cette terre étaient : sable grossier (supérieur à 200 microns) : 44,16 %, sable fin (de 50 à 200 microns) : 49,70 %, limon grossier (de 20 à 50 microns) : 0,93 %, limon fin (de 2 à 20 microns) : 1,13 %, argile (inférieur à 2 microns) : 4,00 %. Cette terre, préalablement humidifiée est stérilisée à l'autoclave à vapeur à 120° pendant quatre heures dans des boîtes cylindriques de un litre.

Cette terre fraîchement stérilisée se révèle à l'expérience peu apte à la germination des graines ou au repiquage des plantules. On lui impose donc, avant usage, un repos de trois ou quatre semaines au terme duquel cet inconvénient a disparu. Cette terre est alors distribuée dans des pots tronconiques en matière plastique noire d'une ouverture de 18 cm et d'une capacité d'environ 2,5 litre (4 Kg de terre). Le fond de ces pots est percé de deux trous garnis par sertissage à chaud de toile à tamis en acier inoxydable d'une maille de 100 microns. Cette toile retient la terre mais permet le drainage après arrosage. Chaque pot est placé dans un pot semblable, vide, lui même enfoui dans le sable d'une banquette en ciment, construite sur le sol de la serre, comme l'indique la figure 5 . On arrose la terre abondamment et on la laisse réessuyer jusqu'au lendemain : les pots sont alors prêts à recevoir la plante hôte.

Croissance des plants de riz

Cette plante hôte convient pour Heterodera oryzae, H. sacchari et Hirschmanniella spinicaudata. Sur une ligne tracée diamétralement à la surface de la terre du pot, on enfonce à l'aide d'une pince à 2,5 cm de profondeur, une dizaine de graines de riz réparties régulièrement. Il s'agit de riz asiatique : Oryza sativa, généralement la variété Morobérékan, traditionnelle en Côte d'Ivoire, puis plus récemment la variété IR 1529, provenant de l'Institut international de recherches sur le riz (IRRI) aux Philippines, et dont la culture commence à être vulgarisée dans le Sud du Sénégal. Le trou provoqué par l'introduction de la graine dans le sol n'est pas rebouché, ce qui facilite l'émergence ultérieure du coléoptile et uniformise ainsi la levée sur l'ensemble des pots. Pour éviter d'avoir à arroser avant cette émergence, ce qui boucherait ces trous, chaque pot est recouvert d'un pot identique renversé, qui maintient l'humidité. Une semaine après, l'émergence des coléoptiles s'est produite et le pot couvrant peut être retiré, on procède alors à un arrosage abondant. L'arrosage des pots est désormais quotidien.

Les pots sont ensuite gardés tels quels pendant trois semaines. On peut alors les utiliser directement pour l'inoculation d'H. oryzae. Par contre, avant de pouvoir inoculer des pots identiques

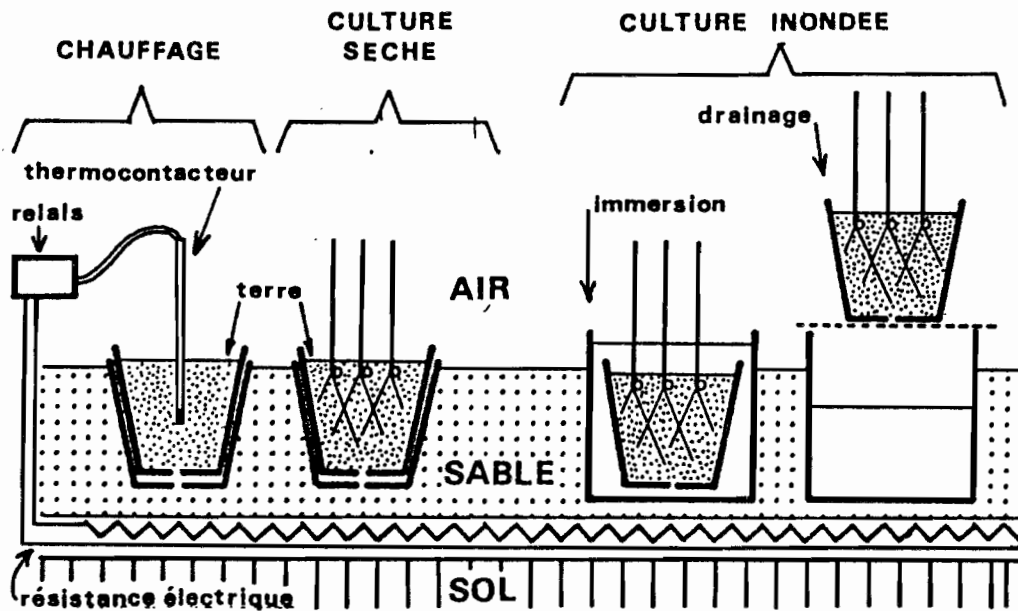


Fig. 5. - Représentation schématique des dispositifs de culture employés pour les différents élevages (Voir également les explications du texte).

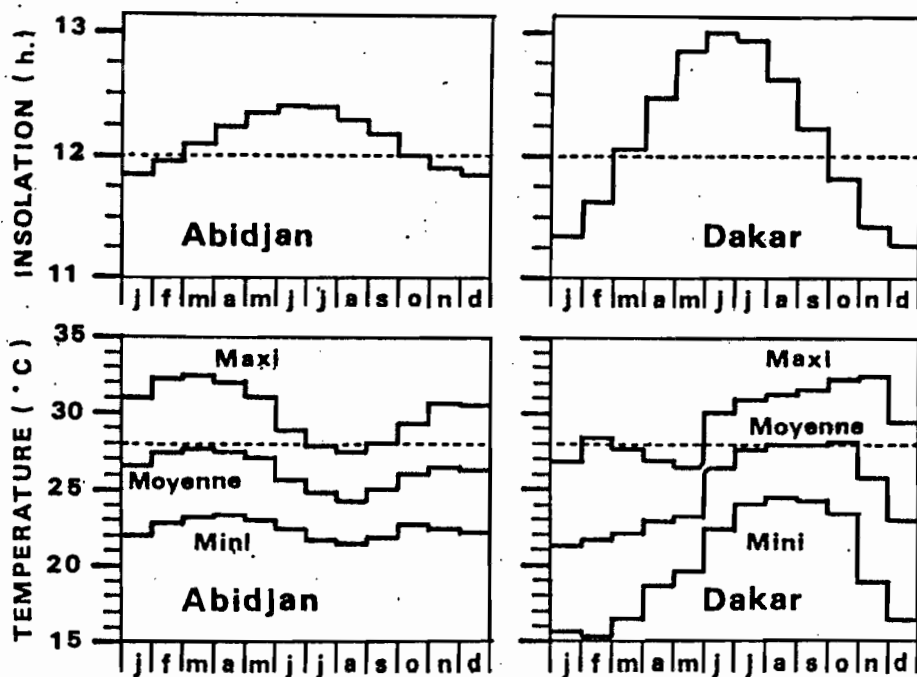


Fig. 6. - Caractéristiques climatiques des lieux d'implantation des élevages : Abidjan (5° de latitude) et Dakar (15° de latitude).
En haut : insolation en heures par jour au cours de l'année.
En bas : température de l'air sous abri au cours de l'année.

avec H. spinicaudata, il faut transférer les pots en culture inondée. Pour cela des jardinières pleines d'eau sont enfouies dans le sable des bacs (fig. 5) et les pots y sont immergés : une lame d'eau de 1 cm d'épaisseur recouvre la surface de la terre des pots. Une fois par semaine, pendant 48 heures, les pots sont sortis de la jardinière et posés sur une grille : il y a alors drainage de l'eau (fig. 5). Cette alternance d'immersion et de drainage représente la condition optimale de développement pour les populations d'H. spinicaudata (Fortuner, 1976).

Croissance des plants de kénaf

Cette plante hôte convient pour Meloidogyne javanica. Parmi différentes plantes hôtes dont la culture est possible à Dakar, où l'étude de M. javanica a été réalisée, le kénaf, Hibiscus cannabinus L. a été choisi à l'issue d'un test comparatif avec la tomate, l'aubergine, et le niébé. Le kénaf s'est révélé le meilleur producteur de juvéniles, plus résistant aux maladies des plantes en serre et, enfin, son système racinaire, fibreux, résiste mieux sans pourrir à la méthode d'extraction par aspersion utilisée pour recueillir les juvéniles. La mise en place des graines est identique à celle du riz décrite précédemment et l'on attend que les plantes soient âgées de quatre à cinq semaines avant de les inoculer.

1.3.2. Inoculation

Heterodera oryzae

On dispose d'une suspension aqueuse de juvéniles fraîchement éclos, contenant de 500 à 1 000 animaux par ml, et dont le mode d'obtention sera vu plus loin (1.4.1.). Lorsque les plants de riz sont âgés de quatre semaines, on perce, à l'aide d'une tige, six trous verticaux (diamètre 5 mm, profondeur 10 cm), trois répartis de chaque côté de la ligne de semis. L'inoculum nécessaire, de 10 à 40 ml de suspension, est alors introduit à la pipette de façon équitable entre ces trous. Pour l'élevage d'entretien, l'inoculum par pot est voisin de 5 000 individus, mais la récolte n'est effectuée qu'après deux ou trois générations. Pour la production, l'inoculum est voisin de 30 000 individus et la récolte s'effectue au terme de la première génération.

Meloidogyne javanica

On dispose également d'une suspension de juvéniles (1.4.2.) que l'on inocule à la pipette dans des trous pratiqués dans la terre des pots. Cependant, pour cette espèce, un soin particulier doit être apporté à la répartition de l'inoculum. En effet, lorsque l'inoculum est déposé de façon très localisée dans le pot, les juvéniles de M. javanica ont tendance à pénétrer en groupe dans les racines de la plante hôte pour y former de grosses galles où sont incluses les masses d'oeufs. Le produit obtenu lors de la récolte est alors de mauvaise qualité : les oeufs des masses d'oeufs incluses n'éclosent pas. Il est préférable de disperser au maximum l'inoculum, de façon à obtenir une multitude de petites galles à la surface desquelles les masses d'oeufs sont apparentes. Pour cela, on pratique une vingtaine de trous d'inoculation par pot et cela à trois niveaux de profondeur : profonds (15 cm), moyens (10 cm) et superficiels (5 cm), dans lesquels l'inoculum est réparti de façon équitable. L'inoculum habituel est de l'ordre de 20 000 à 40 000 juvéniles par pot. Un inoculum supérieur crée des conditions de surpopulation se traduisant par une proportion élevée de mâles mélangés à la récolte.

Hirschmanniella spinicaudata

Dès que les plantes de riz ont été transférées en culture inondée, l'inoculation peut être pratiquée. L'inoculum est constitué par une suspension d'un mélange comprenant tous les stades de développement, du second stade larvaire aux adultes (1.4.3.). Cette suspension est déposée à la pipette dans la lame d'eau qui recouvre la terre des pots à raison de 500 à 3 000 individus par pot.

1.3.3. Développement

Après l'inoculation les pots sont laissés dans leur emplacement (fig. 5) pour le temps requis. Il est indispensable de veiller aux conditions de développement de la plante hôte, qui sert de substrat nutritif aux animaux, et qui doit rester dans le meilleur état physiologique possible. Pour cela la lumière doit être suffisante et l'arrosage doit être quotidien. De plus, un apport régulier d'éléments nutritifs est effectué sous forme de 50 ml de solution nutritive minérale (Hoagland et Arnon, 1950) par semaine et par pot. Dans le cas du riz inondé, outre le drainage hebdomadaire dont la nécessité a déjà été signalée, il faut prévoir d'ajouter aux stades avancés du développement, 175 mg d'urée à l'apport hebdomadaire précédent. De façon à ne pas concurrencer la nutrition des nématodes, la plante ne doit pas être parasitée par un autre organisme. En particulier, en serre, il faut prévoir des traitements phytosanitaires réguliers contre les acariens, les aleurodes, les cochenilles et les pucerons, avec des produits non toxiques pour les nématodes, ce qui réduit le choix des matières actives.

Par ailleurs, la température de développement, qui ne concerne que le système racinaire où se trouvent les nématodes, doit être voisine de 28°. Le climat d'Abidjan convient naturellement (fig. 6.), par contre à Dakar, où la saison froide (de Décembre à Mars) est plus marquée (fig. 6), il est nécessaire de chauffer le sable, dans lequel sont enfouis les pots. Une résistance électrique, scellée dans le ciment qui constitue le fond du bac, est commandée par un relais et un thermomètre à contact au mercure (fig.5).

La durée de développement accordée est propre à chaque espèce. Pour Heterodera oryzae, on compte donc cinq semaines par génération et l'on récolte, au terme de cette durée, les pots destinés à la production (inoculum fort : 30 000 juvéniles/pot) ou après dix semaines les pots d'entretien (inoculum faible : 5 000 juvéniles/pot). Pour Meloidogyne javanica, il est impératif de ne travailler qu'avec la première génération, obtenue cinq semaines après l'inoculation. Dès la seconde génération, l'inoculum est tellement important que les plantes

peuvent mourir. Pour Hirschmanniella spinicaudata, la croissance du riz est poursuivie jusqu'au stade précédant l'épiaison. De cette façon la multiplication des animaux atteint son maximum et la population reste principalement dans les racines, point important pour la récolte.

1.4. LA MANIPULATION DES ESPECES ETUDIEES

Au terme de l'élevage, les animaux issus de la multiplication sont extraits du substrat. Les trois espèces étant des endoparasites, la plus grande partie des stades intéressants se trouve présente à ce moment là dans les racines de la plante. Les animaux présents dans le sol sont dans un état physiologique indéterminé et ils présentent de ce fait peu d'intérêt pour l'expérimentation. En effet, la date de leur éclosion, pour Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica, ou la date de la rupture de leur contact alimentaire avec la plante, pour Hirschmanniella spinicaudata, reste inconnue. On n'utilisera donc pour les études ultérieures que les animaux extraits des racines. Pour réaliser l'inoculation des élevages (1.3.2.), ces mêmes animaux extraits des racines sont en nombre suffisant, sauf quelquefois dans le cas d'H. spinicaudata et l'on a alors recours à une extraction à partir du sol.

1.4.1. Heterodera oryzae

Extraction des masses d'oeufs

Après le temps de développement requis, les pots sont traités pour la récolte. Les parties aériennes sont coupées au ras du substrat et le bloc constitué par la terre et les racines est sorti du pot avec précaution. On plonge alors ce bloc dans un seau plein d'eau où on l'agite doucement en le tenant immergé juste sous la surface de l'eau : la terre tombe peu à peu au fond du seau. On procède ainsi à plusieurs lavages successifs dans des eaux renouvelées, en ayant soin de ne pas malmenier les racines, afin de ne pas en détacher les masses d'oeufs. Le système racinaire parfaitement propre est ensuite étalé sur un tamis en acier inoxydable à maille de 2 mm, lui même posé sur un autre tamis à maille de 160 microns. A l'aide d'un jet d'eau fin et puissant,

le système racinaire est alors soigneusement aspergé : les masses d'oeufs, détachées des racines passent à travers le tamis supérieur et sont retenues sur le tamis inférieur. On obtient ainsi un mélange de nématodes (femelles et masses d'oeufs) et d'impuretés (fragments de racines et de matière organique du sol). L'efficacité de cette méthode est excellente.

Conservation des masses d'oeufs

L'utilisation directe du produit de la récolte précédente est possible. Pour cela, sous la loupe binoculaire on prélève à la pince les masses d'oeufs seules, une par une. C'est notamment de cette façon qu'est réalisé l'inoculum de l'élevage d'entretien de l'espèce. Cependant les masses d'oeufs ainsi récoltées donnent des éclosions étalées sur plusieurs semaines, ainsi que l'a montré Merny (1966, 1972). Ceci est dû au fait qu'à l'âge de 5 semaines beaucoup d'oeufs ne sont pas parvenus au terme du développement embryonnaire. On préfère garder le produit, de la récolte précédente immergé, dans une solution de NaCl à 0,3 M qui inhibe réversiblement l'éclosion, mais permet au développement embryonnaire de s'achever. Ce délai aboutit en fait à synchroniser les oeufs au niveau du juvénile du second stade prêt à éclore. Cette propriété des pressions osmotiques élevées vis à vis des oeufs a été mise en évidence par Dropkin et al., (1958) chez Heterodera rostochiensis et semble avoir été retrouvée, depuis, valable pour un grand nombre de nématodes phytoparasites. L'application de cette technique au cas du produit de la récolte de l'élevage d' H. oryzae requiert néanmoins deux exigences : l'aération et le renouvellement du milieu. Les conditions les plus favorables à l'aération s'obtiennent en étalant la suspension du mélange, nématodes et impuretés, dans NaCl 0,3 M, sur de grandes surfaces, de façon à ce que l'épaisseur ne dépasse pas 4 mm. L'aération par diffusion est alors excellente. La solution de sel est renouvelée après un, deux, quatre et sept jours, puis ultérieurement toutes les semaines. Ce traitement permet d'une part de compenser la dilution due à la sortie de l'eau des débris racinaires et d'autre part provoque pratiquement une fixation de ces débris et les empêche de se décomposer. Le séjour dans le sel peut se poursuivre pendant plusieurs semaines : on a alors intérêt à garder les suspensions dans une pièce climatisée (22 à 25°) plutôt qu'en étuve, de façon à minimiser l'intensité du métabolisme des oeufs.

Éclosion des oeufs

Dès que des masses d'oeufs qui ont séjourné dans la solution de sel pendant plusieurs jours sont replacées dans l'eau distillée, les éclosions des oeufs reprennent dans un délai de quelques heures.

Lorsqu'on veut obtenir des juvéniles en grand nombre, on prend le produit d'une récolte de première génération (5 semaines) qui a séjourné pendant 2 à 3 semaines dans NaCl 0,3 M. Le mélange de nématodes et de débris est replacé sur le tamis à maille de 160 microns, puis soigneusement rincé du sel, pendant plusieurs minutes, par aspersion d'eau courante. Le mélange rincé est alors étalé sur un tissu de cellulose (mouchoir Kleenex) supporté par le dispositif représenté par la figure 7. Il s'agit en fait d'une version de l'entonnoir de Baerman, améliorée par Merny et Luc (1969). Les juvéniles éclos, actifs, doués d'un géotropisme positif, traversent rapidement le tissu de cellulose et le tamis en acier inoxydable à maille de 100 microns qui le soutient, et se retrouvent à l'état actif dans le fond de la boîte. Les débris sont retenus par le tissu de cellulose. Après 72 heures, les juvéniles sont rassemblés par sédimentation et soumis à nouveau au même dispositif pendant 24 heures, en vue d'une seconde purification. On obtient alors des juvéniles propres, en suspension dans l'eau, que l'on considère d'âge zéro. En fait, en supposant que le nombre des juvéniles libérés croisse proportionnellement avec le temps, au cours de l'éclosion (fig. 7), l'âge moyen réel des juvéniles est de 60 ± 36 heures. Ces juvéniles sont utilisés soit pour l'inoculation des élevages de production, soit pour l'expérimentation.

Une étude fine des cinétiques d'éclosion des masses d'oeufs d'H. oryzae a été réalisée en fonction de deux facteurs : variabilité et âge des masses d'oeufs. Pour cela on a réalisé des échantillons de masses d'oeufs individualisés dans de petits tamis et que l'on met à éclore séparément dans des boîtes de Petri. A des dates régulières chaque tamis est transféré dans une boîte propre et les juvéniles éclos dans la boîte précédente sont comptés. Pour chaque échantillon on tient un compte cumulé du nombre des éclosions. On observe tout d'abord que les contenus

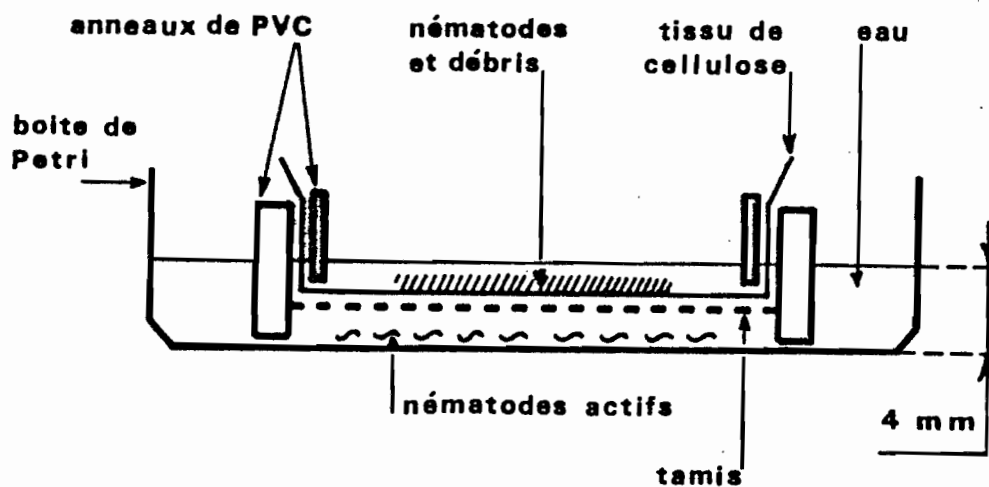


Fig. 7. - Représentation schématique du dispositif utilisé pour la purification des nématodes par passage actif à travers un filtre en tissu de cellulose.

TABLEAU 2. Influence du nombre de masses d'oeufs par répétition sur l'éclosion des masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après 8 jours d'inhibition dans NaCl 0,3 M

Nombre de masses d'oeufs par répétition	10	20	40
Nombre de répétitions	10	6	4
Nombre d'éclosions après (1) :			
1 jour	188 ± 22	172 ± 17	187 ± 4
7 jours	362 ± 23	343 ± 22	358 ± 13
28 jours	366 ± 22	348 ± 18	362 ± 7

(1) Nombre d'éclosions par masse d'oeufs (moyenne) et intervalle de confiance à 5 % de risque.

en juvéniles des masses d'oeufs varient très peu (tableau 2). Par ailleurs, le nombre des éclosions en fonction de l'âge de la masse d'oeufs (fig. 8, A à E) est nul à deux semaines, croit de trois à cinq semaines puis décroît de cinq à sept semaines. L'allure de la courbe ainsi obtenue (fig. 8 F) peut s'expliquer par le fait que les femelles ne subissent pas un développement synchronisé à cause d'un étalement de la pénétration des juvéniles dans les racines (fig. 8, G et H).

Les éclosions très nombreuses obtenues à partir des oeufs d'Heterodera oryzae sont tout à fait exceptionnelles dans le genre Heterodera et sont dues à l'existence, chez cette espèce, de la masse d'oeufs. En particulier les autres espèces disponibles en Afrique de l'Ouest, Heterodera sacchari et Heterodera gambiensis ne présentent pas de masses d'oeufs et les éclosions à partir des kystes sont extrêmement lentes. Les exsudats radiculaires des plantes hôtes sont connus pour provoquer des éclosions abondantes chez les espèces du genre qui se développent en zone tempérée (Shepherd, 1962 b). De la même façon Merny (1972) a montré que des exsudats radiculaires de riz stimulaient fortement l'éclosion des kystes d'Heterodera oryzae. Mais le délai nécessaire à la manipulation de cette stimulation, qui est de plusieurs semaines, ne convient pas pour des études chez des animaux dont la longévité est également de quelques semaines. Le degré d'incertitude sur l'âge physiologique des juvéniles que l'on obtiendrait dans ces conditions serait trop élevé. Récemment, au cours d'essais de détermination de la viabilité des oeufs par la méthode de coloration au permanganate de Jatala (1975) nous avons trouvé que cette substance à la concentration de 0,0625 % stimulait fortement l'éclosion des oeufs d'Heterodera sacchari (tableau 3). Depuis cette propriété a été vérifiée chez Heterodera gambiensis et Sarisodera africana, deux autres nématodes à kystes, parasites de graminées tropicales. Ainsi ces espèces, qui, jusqu'à présent, à cause de leur faible taux spontané d'éclosion, étaient difficiles à étudier, sont maintenant parfaitement accessibles pour une approche physiologique. L'écrasement des kystes, préalable nécessaire à l'exposition des oeufs au permanganate, peut être réalisé à grande échelle sur des tamis en acier inoxydable à maille de 250 microns.

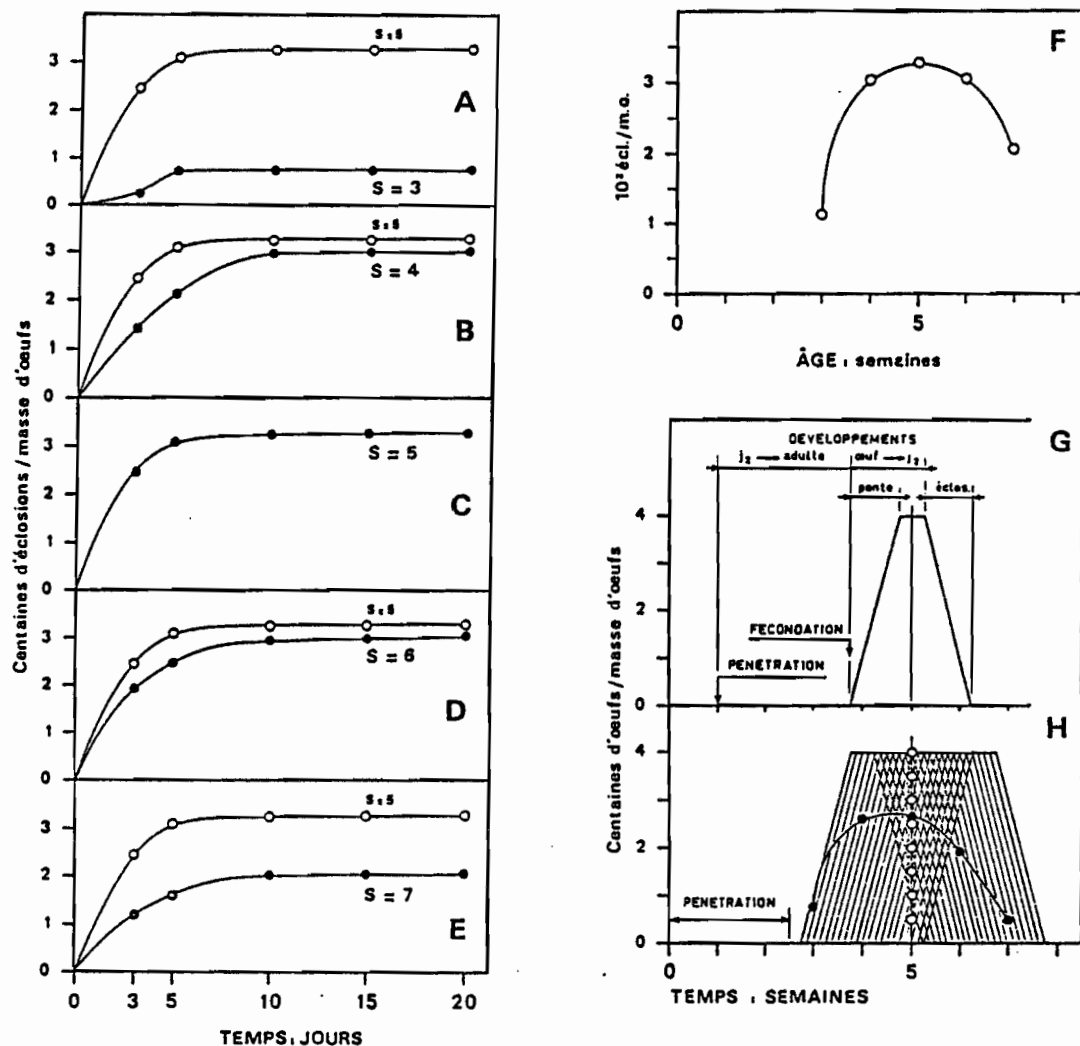


Fig. 8. - Etude fine de l'éclosion des oeufs des masses d'oeufs chez *Heterodera oryzae*.

- De A à E : Cinétiques d'éclosion (nombres cumulés d'éclosions en fonction du temps) de masses d'oeufs d'âges croissants (cet âge, S, représente en semaines le temps écoulé entre l'inoculation des juvéniles et la récolte des masses d'oeufs). Dix répétitions de 25 masses d'oeufs pour chaque âge.
- F : Influence de l'âge des masses d'oeufs sur le nombre d'éclosions à 20 jours (chiffres provenant des courbes A à E).
- G et H : Modèles théoriques de développement.
 - G / Hypothèse d'un développement synchronisé des femelles faisant suite à une pénétration groupée des juvéniles.
 - H : Hypothèse d'un développement non synchronisé des femelles faisant suite à une pénétration des juvéniles étalée dans le temps (Cercles blancs : nombres potentiels individuels d'éclosions de masses d'oeufs prélevées à l'âge de cinq semaines ; cercles noirs : nombres potentiels moyens d'éclosions de masses d'oeufs prélevées aux âges de 3, 4, 5, 6 et 7 semaines).

TABLEAU 3. Effet du permanganate de potassium sur l'éclosion des oeufs de kystes d'Heterodera sacchari

Traitement n°	Milieu	Temps d'exposition	Nombre de juvéniles éclos (1)	Éclosion en % du contenu du kyste (2)
1	eau	8 jours	1.700 ± 330	9
2	eau et plantule de riz	8 jours	1.620 ± 325	9
3	Potassium permanganate 0,0625 %	1 jour	16.680 ± 1.800	93

(1) Moyenne de 4 répétitions de 50 kystes écrasés ± écart type.

(2) Une estimation du contenu des kystes, obtenue en disséquant 10 kystes, a donné une moyenne de 360 oeufs par kyste.

TABLEAU 4. Effet de la présence des mâles sur le nombre d'oeufs par ponte chez Hirschmanniella spinicaudata

Inoculum	1 femelle				1 femelle et 3 mâles			
Nombre d'oeufs par ponte	1	3	4	6	10	11	18	25
	8	9	10	11	25	28	28	28
	14	15	16	18	28	29	30	34
	23	26	26	40	47	54	58	61
	55	55	58	71	87	68	79	
Moyenne	23,2				36,4			

1.4.2. Meloidogyne javanica

Extraction des racines

Comme dans le cas du riz, les systèmes racinaires des pots de kénaf inoculés par Meloidogyne javanica sont recueillis et débarrassés de la terre avec précautions, pour ne pas détacher les masses d'oeufs apparentes à la surface des galles. Cependant, contrairement au cas d'H. oryzae, il n'est pas possible de recueillir avec un bon rendement les masses d'oeufs de M. javanica par aspersion des racines. En effet sous l'effet du jet d'eau qui les arrache aux galles, ces masses d'oeufs se désagrègent en partie en libérant une fraction notable des oeufs, qui ne sont pas retenus par le tamis de 160 microns. L'emploi d'un tamis plus fin capable de retenir ces oeufs (à maille de 25 microns) pose d'autres problèmes, car il se colmate très rapidement. On est donc conduit à utiliser le produit brut de la récolte, constitué par des systèmes racinaires portant des masses d'oeufs.

Eclosion des oeufs

Les systèmes racinaires sont placés dans un dispositif dit "asperseur", dont le principe a été décrit par Seinhorst en 1950 et qui est schématisé par la figure 9. Le poste dans lequel est placé l'échantillon est constitué en premier lieu d'une boîte cylindrique en matière plastique pourvue d'un trou latéral de trop plein, efficace dès que le volume d'eau contenu dans la boîte dépasse 250 ml. Par ailleurs le système racinaire est déposé sur un tamis de toile à moustiquaire en matière plastique supporté par un anneau en matière plastique, posé dans la boîte, et qui maintient les racines au dessus du niveau limité par le trop plein. Le poste repose sur une pailleasse dans une pièce au plafond de laquelle fonctionnent des brumisateurs d'eau intermittents : 30 secondes de fonctionnement toutes les dix minutes, donnant une précipitation de 120 mm d'eau par 24 heures. Les juvéniles qui éclosent des masses d'oeufs sont entraînés par les gouttes d'eau qui se rassemblent sur les racines, au travers du tamis, vers le fond de la boîte. Le courant ascendant créé par l'apport d'eau intermittent est trop faible pour entraîner les juvéniles par le trop plein : ceux-ci restent au fond de la boîte. A des intervalles de temps variés, au minimum de

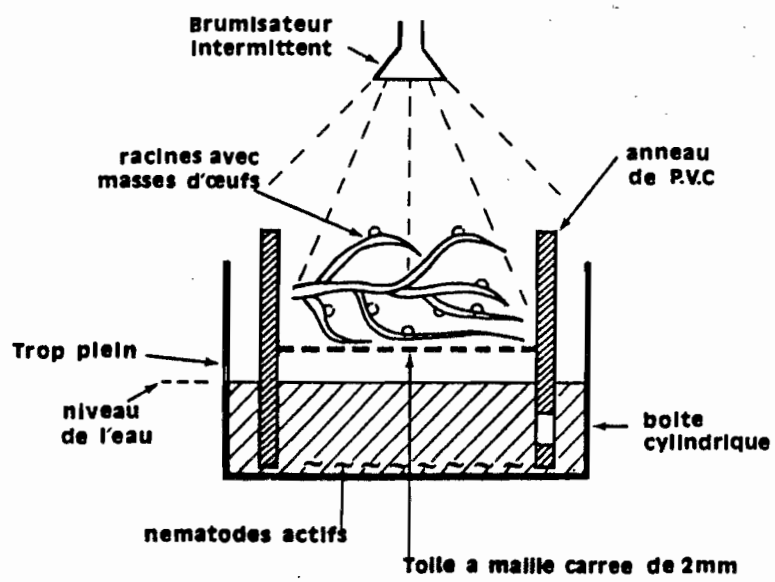


Fig. 9. - Représentation schématique du dispositif dit "asperseur" permettant de recueillir les nématodes à partir des racines infestées (Voir également les explications du texte).

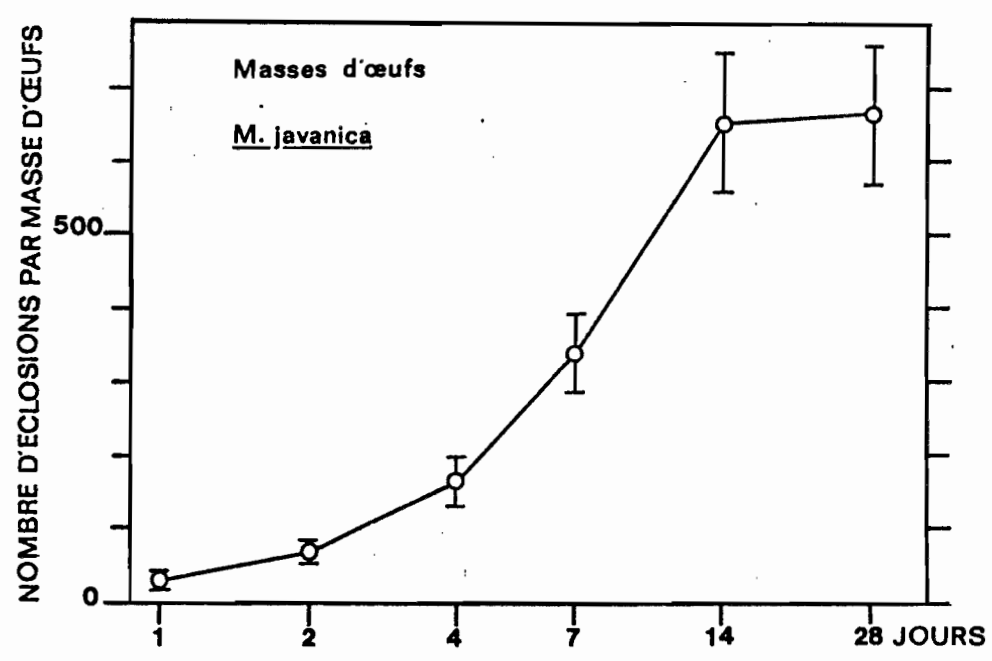


Fig. 10. - Cinétique d'éclosion des masses d'œufs de *Meloidogyne javanica* (Cinq répétitions de 5 masses d'œufs ; la ligne verticale égale l'écart type).

24 heures et au maximum d'une semaine, le tamis est transféré dans une boîte propre, tandis que l'on recueille les juvéniles dans la boîte précédente. Les animaux sont concentrés par sédimentation puis purifiés par un passage de 24 heures sur tissu de cellulose (fig. 7).

A partir d'un pot inoculé avec 20 000 juvéniles, on obtient ainsi 200 000 juvéniles par jour pendant dix à douze jours. Pour l'expérimentation on utilise des juvéniles, éclos au cours d'une période de 48 heures. Ces juvéniles considérés comme étant d'âge zéro ont en fait, si l'on suit un calcul analogue à celui qui a été fait pour les juvéniles d'H. oryzae, un âge réel de $48 + 24$ heures. Pour l'inoculation de l'élevage de production (voir 1.3.2.) on peut utiliser sans inconvénient des juvéniles provenant des boîtes ayant passé une semaine à l'asperseur.

La cinétique d'éclosion de masses d'oeufs de M. javanica prélevées sur les racines lors de la récolte (fig. 10) révèle que le nombre d'éclosions par masses d'oeufs est plus élevé que dans le cas d'H. oryzae, de l'ordre de 700 individus. L'étalement des éclosions sur deux semaines, observé dans la même expérience, montre que, comme dans le cas d'H. oryzae, les oeufs des masses d'oeufs de M. javanica n'ont pas tous achevé leur développement lors de la récolte. Des essais de synchronisation par trempage des systèmes racinaires entiers dans une solution de NaCl 0,3 M ont été réussis. Cependant les productions obtenues par l'éclosion, en conditions normales, des masses d'oeufs des systèmes radiculaires récoltés sur une centaine de pots ont toujours été suffisantes pour ne pas y avoir recours.

1.4.3. Hirschmanniella spinicaudata

Après élimination des parties aériennes, le contenu de chaque pot, sol et racines, est entraîné dans un seau d'eau. Les racines, débarassées de la terre, sont ensuite rincées dans plusieurs bains d'eau propre et constituent la récolte principale, dont les nématodes seront extraits. Les nématodes contenus dans le sol sont extraits par décantation, selon la méthode des seaux (Dalmaso, 1966), et sont utilisés comme inoculum pour l'élevage, mais non pour l'expérimentation.

Extraction :

Les racines extraites d'un pot sont placées à macérer dans un bocal en verre contenant deux litres d'eau déminéralisée aérée par un bulleur (fig. 11). On ajoute alors dans le bocal une solution d'Agallol, un antibiotique dont le principe actif est le 2 méthoxy éthyl mercure, jusqu'à une concentration finale de 7,5 ppm. La présence de cet antibiotique favorise la sortie des nématodes des racines (Bird, 1971) et évite leur contamination par des champignons parasites au cours de la macération. Après trois, sept et dix jours, les bocaux étant placés à 28° à l'obscurité, les racines sont transférées dans un bocal de produit propre tandis que les nématodes présents dans le liquide du bocal précédent sont concentrés par décantation et purifiés par passage actif sur tissu de cellulose (fig. 7). Notons que dans le cas des Hirschmanniella spinicaudata, dont les adultes sont très grands, le tamis supportant le tissu de cellulose doit être à grande maille afin de faciliter le passage actif. En pratique, on utilise des tamis en toile à moustiquaire plastifiée (maille de 2 mm) au lieu de la toile en acier inoxydable (maille de 0,1 mm) employée dans le cas des juvéniles d'H. oryzae et M. javanica. L'extraction à l'asperseur (fig. 9) est possible, mais beaucoup plus lente que la macération ; de plus à l'asperseur, l'addition de l'antibiotique ne peut être effectuée et on obtient souvent quelques animaux parasités par des champignons, qui risquent de contaminer les animaux sains au cours du stockage ultérieur.

Quelques expériences ont permis d'apporter des précisions complémentaires sur le cycle. Dans de petits récipients des plantules de riz de cinq jours, croissant sur sable et solution nutritive, sont inoculées avec cinq femelles. Après six, douze et dix huit jours, des systèmes racinaires sont prélevés, fixés et colorés par le lactophénol bleu coton (de Guiran, 1966). Par observation sous la loupe binoculaire, on repère alors les oeufs dans les systèmes racinaires. Dans la plupart des cas, on constate que la ponte est groupée au contact du corps de la femelle : l'animal ne se déplace donc pas au cours de la ponte. Cette disposition a été représentée dans le cycle de développement (fig. 4). Chacune de ces pontes est disséquée à l'aide d'aiguilles en verre étiré

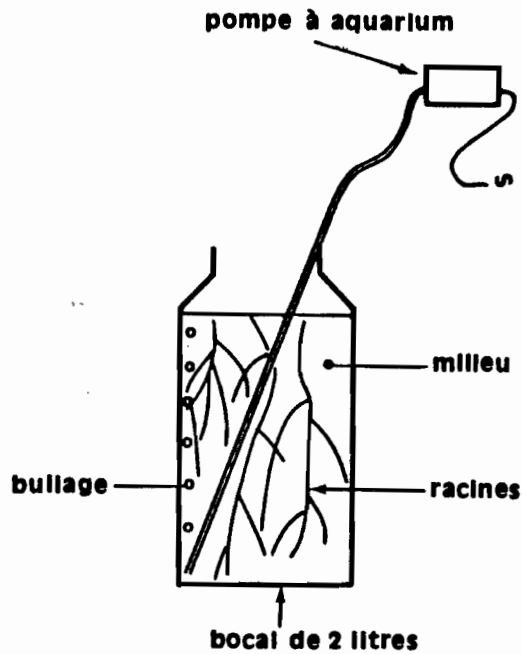


Fig. 11. - Représentation schématique du dispositif de macération permettant de recueillir les nématodes à partir des racines infestées (Voir également les explications du texte).

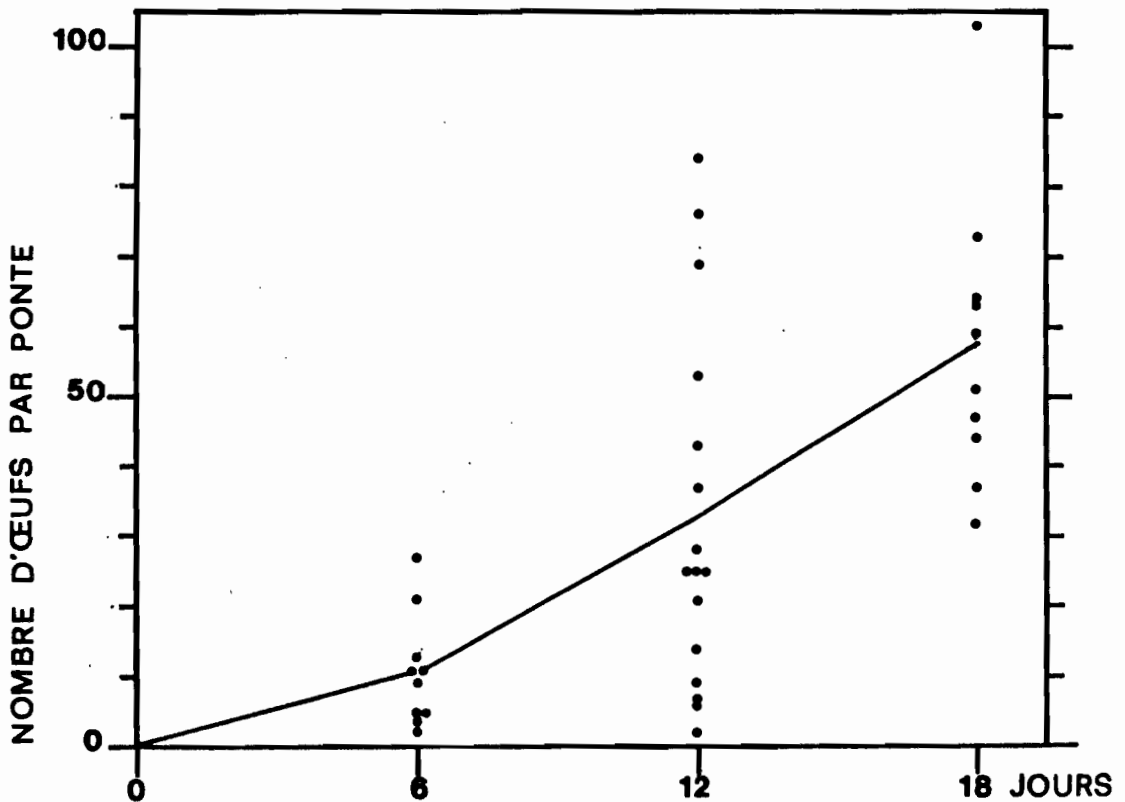


Fig. 12. - Cinétique de ponte des femelles d'*Hirschmanniella spinicaudata* (chaque point représente le nombre des œufs recueillis lors de la dissection d'une ponte ; le trait plein joint les moyennes).

et le nombre d'oeufs qu'elle contient est enregistré. La figure 12 montre que la ponte est progressive, très étalée dans le temps. A dix huit jours, les juvéniles du second stade sont bien visibles dans les oeufs et même quelques uns sont éclos. Par contre si on garde les femelles in vitro, sans plante, on n'obtient la ponte de seulement quelques oeufs pour 100 femelles au cours de la même période. La ponte ne peut donc se faire chez Hirschmanniella spinicaudata qu'à l'intérieur des racines de la plante hôte : il est vraisemblable qu'il s'agit d'une question d'alimentation. En utilisant le même dispositif on a pu comparer toutes conditions étant égales par ailleurs, les pontes obtenues en inoculant soit des femelles seules soit une femelle avec trois mâles. Les résultats (tableau 4) montrent que les mâles ont un rôle déterminant dans la fécondité, donc que l'espèce est amphimictique.

1.5. DISCUSSION ET CONCLUSION

1.5.1. Les contraintes de l'élevage

Le principe même de l'élevage est à l'origine de certaines contraintes qui peuvent exercer une véritable pression de sélection sur les animaux. On peut se demander, dans ces conditions, si les propriétés des animaux étudiés ne vont pas finir, à la longue, par s'écarter trop de celles des animaux subsistant dans le biotope original.

Dans cette perspective, ce sont les espèces amphimictiques (Heterodera oryzae, Hirschmanniella spinicaudata) pour lesquelles une dérive rapide est le plus à craindre. Jones (1975 a) estime que pour ces espèces amphimictiques, considérées dans leur biotope naturel, la tendance est à la consanguinité. Ceci est lié aux faits que les pontes sont groupées (masses d'oeufs, kystes, ...) et que les nématodes se déplacent probablement peu lorsque le réseau de racines de la plante hôte est dense. Dans l'élevage, au contraire, l'inoculum est constitué par des animaux provenant de l'ensemble de la récolte, mélangés au sein d'une suspension homogène. Dès lors, la tendance sera à la panmixie. Netscher et Pernes (1971) ont mis en évidence au moins un effet de la consanguinité chez Heterodera oryzae, qui est une homogénéisation de la longueur des juvéniles. On peut penser que cette évolution vers la panmixie pourrait affecter d'autres paramètres, en relation avec les phénomènes étudiés.

Une autre caractéristique des élevages réalisés au cours de ce travail est la constance de la température du substrat. Rappelons que cette circonstance est rendue nécessaire par l'existence d'une saison froide à Dakar (fig. 6). La vitesse de développement des nématodes est strictement dépendante de la température et la maturité (ponte des femelles) est atteinte pour un certain nombre de jours-degrés cumulés, caractéristique de l'espèce (Jones, 1975 b). Cette maturité est atteinte d'autant plus rapidement que la température est plus élevée, et pour donner aux élevages un rythme suffisamment rapide, nous avons choisi de les maintenir à 28°. C'est une température que l'on observe couramment au cours de la journée dans le sol des lieux types des espèces étudiées. Mais si la température est constante dans les conditions de l'élevage elle est fluctuante dans le sol en relation avec l'ensoleillement et la température de l'air (Jones, 1975 a). On peut raisonnablement estimer que si la température constante n'a pas d'incidence sur le développement, elle peut affecter les étapes du cycle qui nécessitent l'activité du nématode : pénétration dans les racines, copulation. En effet, Croll (1970) a montré que les variations des paramètres physiques et chimiques du milieu et, notamment celles concernant la température, sont déterminantes dans l'induction de l'activité chez les nématodes. L'élevage, sous ce rapport, est donc défavorable par rapport au développement dans le biotope. Cependant cet inconvénient ne se manifeste pas continuellement. En effet, la température ne se maintient à 28° que pendant la partie froide du nyctémère de 21 h à 9 h, et au cours des journées chaudes cette température peut croître de un à cinq degré au dessus de 28° pendant quelques heures.

Parmi les autres contraintes susceptibles d'exercer une pression de sélection, citons l'inhibition réversible des éclosions d'Heterodera oryzae par le sel et l'usage de l'agallol pour préserver Hirschmanniella spinicaudata des infections fongiques.

Un des moyens de pallier les effets de ces pressions de sélection consiste à renouveler l'élevage de temps en temps, soit à partir d'animaux prélevés dans le biotope naturel, soit à partir d'une

élevage permanent réalisé dans un buse en ciment de grand volume, enfouie dans le sol, et pour laquelle on ne pratique ni chauffage ni récolte : on se contente d'aérer le sol lors de chaque renouvellement de la plante hôte. Ce renouvellement est pratiqué tous les ans ou tous les deux ans.

1.5.2. Les limitations de l'élevage

Les limitations de l'élevage concernent les insuffisances de maîtrise des paramètres qui conditionnent la productivité.

Certaines limitations peuvent être d'origine technique comme celle qui est liée à la température. Le mode de chauffage choisi (fig. 5) par une résistance incorporée dans le fond du bac provoque pour la culture sèche un gradient de température décroissant depuis le fond des pots jusqu'à leur surface. Au maximum l'amplitude de ce gradient peut atteindre 5° : les animaux situés au fond du pot se développeront donc plus vite que ceux situés près de sa surface. Ainsi, lors d'une récolte, aux animaux prélevés à maturité seront mélangés des animaux trop vieux (dont une notable partie des oeufs a déjà éclos) et des animaux trop jeunes (qui n'ont pas fini leur ponte), de sorte que la productivité n'est pas optimisée. Notons qu'en culture inondée (fig. 5) ce gradient n'existe pas : les courants de convection, qui brassent l'eau extérieure aux pots uniformisent la température. C'est ainsi qu'une solution est suggérée à ce problème de gradient : il suffit pour les élevages de culture sèche d'utiliser des pots étanches immergés dans un bain d'eau maintenue à température constante. Cependant il s'agit là d'une technique coûteuse, que l'on ne peut appliquer pour des élevages à grande échelle.

Le rapport du nombre d'animaux récoltés au nombre d'animaux inoculés représente un autre exemple de limitation liée à l'espèce. Merny (1970a, 1972) a montré que la pénétration des nématodes endoparasites dans les racines de la plante hôte croit asymptotiquement vers un maximum lorsque l'inoculum augmente. Comme la pénétration de l'inoculum est progressive, on peut penser, soit que l'action des individus ayant déjà pénétré altère le caractère attractif des racines vis à vis de ceux qui sont encore à l'extérieur, soit que le nombre des sites de pénétration

est limité sur un système racinaire. Donc une grande partie d'un inoculum important ne pénètre pas dans les racines. Ceci conduit à un déficit de production par rapport à celui que l'on pouvait escompter d'après l'importance de l'inoculum. Dans le cas de l'élevage de Meloidogyne javanica, un inoculum de 20 000 juvéniles et une fécondité individuelle de 700 (fig. 10) pourraient en principe conduire à une production de 14 millions de juvéniles, or on n'en obtient que 2,4 millions. En inoculant 200 juvéniles d'Heterodera oryzae, Merny (1972) obtient 55 femelles, or il pourrait en obtenir 100, à condition que tous les juvéniles pénètrent. Il est évident qu'intervient un mécanisme limitatif. Comme ce mécanisme est vraisemblablement en relation avec l'effet chimique développé par le nématode à l'intérieur de la plante, il est intéressant d'envisager la recherche systématique d'une substance ou d'un procédé cultural qui l'inhiberait.

1.5.3. La pureté du matériel biologique obtenu

Malgré la stérilisation préalable de la terre et l'inoculation exclusive de nématodes phytoparasites, on trouve dans la terre des pots d'élevage, au moment de la récolte, d'autres organismes. Les unicellulaires sont à négliger puisqu'ils passent rapidement à travers les tamis utilisés pour la récolte ; seuls posent des problèmes les métazoaires d'une taille comparable à celle des animaux étudiés : nématodes libres, enchytréides, rotifères et tardigrades. En fait, pour chacune des trois espèces de nématodes étudiées, les méthodes décrites conduisent à une élimination de ces impuretés.

Pour Heterodera oryzae, le séjour préalable de quelques semaines dans NaCl 0,3 M tue ces animaux contaminants ainsi que les mâles d'H. oryzae qui n'ont pas été entraînés lors de la récolte à travers le tamis à maille de 160 microns. Lors de l'éclosion, on obtient des juvéniles d'H. oryzae dans un parfait état de pureté. Pour Meloidogyne javanica, les éclosions des juvéniles sont assez régulièrement étalées sur deux semaines et les animaux indésirables, très actifs, sortent à l'asperseur (fig. 9) au cours des premiers 24 ou 48 heures. Il est ainsi facile de les éliminer avant de commencer à recueillir les juvéniles utilisables. Seuls des éventuels mâles de M. javanica pourraient constituer par la suite des impuretés : on évite leur apparition par trois moyens complémentaires :

1) En respectant strictement le terme de 5 semaines après l'inoculation pour effectuer la récolte de façon à ce qu'il n'y ait pas d'infestation secondaire. En effet dans ces conditions, la surpopulation obtenue conduit, par compétition nutritionnelle, de nombreuses femelles à évoluer en mâles intersexués.

2) En n'inoculant que des plantes au moins âgées d'un mois, saines et rendues très vigoureuses par un apport régulier d'engrais.

3) En limitant l'inoculum à 20 000 juvéniles par pot et en dispersant sa répartition dans la terre du pot (voir 1.3.2. : inoculation) de façon à ne pas créer de surpopulation localisée.

Pour Hirschmanniella spinicaudata, la purification se fait au moment du prélèvement individuel des femelles et des mâles.

L'origine de ces contaminations n'a pu être clairement établie. Il s'agit soit d'une insuffisance de la stérilisation de la terre, soit d'apports par l'eau ou par le vent, soit enfin d'une contamination de l'inoculum depuis l'origine de l'isolement de l'espèce. Dans le cas de notre étude, des solutions satisfaisantes ont été apportées à ce problème des contaminations et elles sont applicables à de nombreuses autres espèces. On peut néanmoins envisager l'intérêt qu'il y aurait à développer les élevages monoxéniques de nématodes phytoparasites, qui constituent la solution rigoureuse à ce problème. Krusberg et Babineau (1977) ont examiné l'ensemble des données acquises sur ce sujet et considèrent deux cas : celui des espèces sans exigences nutritionnelles particulières, qui sont capables de se multiplier sur des calcs, et celui des espèces dont le développement exige la présence d'un tissu végétal vascularisé. Dans le premier cas, sur calcs, la multiplication est abondante, car le développement du tissu végétal étant lent, on peut n'effectuer la récolte qu'après plusieurs mois, ce qui correspond à deux ou trois générations du parasite. Cependant, les espèces qui se prêtent à ce mode d'élevage ne présentent pas de possibilité de synchronisation, autre que le prélèvement individuel : il s'agit par exemple des Pratylenchidae, famille à laquelle appartient le genre Hirschmanniella. Dans le second cas, le tissu vascularisé le plus

utilisé pour les élevages est constitué par des racines excisées. Ce substrat végétal convient pour les Heteroderidae (Heterodera, Meloidogyne) espèces pour lesquelles, nous l'avons vu, une synchronisation au stade oeuf est possible. Cependant la croissance de ces racines excisées est très rapide et on n'a pas le temps d'observer plusieurs générations de parasites avant que les racines n'aient rempli tout le contenant et ne rentrent en senescence. Dans les tentatives que nous avons faites avec Heterodera oryzae sur des racines excisées de riz, la production d'animaux était très faible, sans rapport avec les besoins de l'expérimentation (Reversat, 1975c). Rappelons enfin que la solution la plus élégante qui consisterait à pratiquer des élevages sur un substrat nutritif inerte (élevage axénique) n'a été obtenue, chez les nématodes phytoparasites, que dans un faible nombre de cas avec des espèces d'un intérêt marginal (Zuckerman, 1971).

Reste enfin la question des contaminations intragénériques. Dans des laboratoires où l'on manipule plusieurs espèces du même genre, en employant le même matériel, ce risque est parfaitement réel. L'expérience permet de déterminer rapidement quelles sont les espèces contaminantes et de mettre au point des tests de purification. Pour Heterodera oryzae, le contaminant principal est Heterodera sacchari qui se développe également sur riz. L'éventualité d'une contamination est examinée par le test de Merny (1970b) : sur des juvéniles fixés par la chaleur on procède à la détermination du rapport (en %) partie hyaline de la queue/longueur totale. Ce paramètre est supérieur à 7,6 chez H. oryzae et inférieur à 7,1 chez H. sacchari. Pour rétablir une culture pure d'Heterodera oryzae, on procède à la sélection de masses d'oeufs bien développées que l'on place à éclore sans kystes : cette forme n'existe pas chez H. sacchari. Pour Meloidogyne javanica, l'élevage est cloné fréquemment en prélevant une masse d'oeufs sur une femelle dont on vérifie l'espèce par l'examen de la plaque périnéale (Taylor & Netscher, 1974). Pour Hirschmanniella spinicaudata, on examine de temps en temps au microscope quelques femelles, selon le critère défini par Sher (1968) : c'est la seule espèce du genre dont le stylet de la femelle dépasse 40 microns.

1.5.4. L'homogénéité du matériel biologique obtenu

Dès le début de l'introduction générale de ce mémoire, nous avons vu que se posait, de façon pressante, le problème de la synchronisation des animaux étudiés. Dans le cas des juvéniles d'Heterodera oryzae et de Meloidogyne javanica, on peut estimer que l'accession et le maintien au stade d'oeuf prêt à éclore constitue une bonne synchronisation. Pour maintenir cet acquis après l'éclosion, il suffit de rassembler des échantillons de juvéniles éclos dans des temps aussi brefs que possible. Comme les éclosions des deux espèces sont étalées dans le temps (fig. 8 et 10) il faut nécessairement aboutir à un compromis, si l'on veut néanmoins obtenir des quantités d'animaux suffisantes. Ce compromis est basé sur la comparaison de la durée de l'éclosion et de la longévité de l'animal. Pour Heterodera oryzae dont la longévité est de 35 jours et dont l'intensité du métabolisme est faible les animaux sont recueillis après trois jours d'éclosion ; pour Meloidogyne javanica dont la longévité est de 28 jours et dont l'intensité du métabolisme est intense, les animaux sont recueillis après deux jours d'éclosion. Comme le nombre des éclosions croît linéairement au cours de cette période, la mesure de l'homogénéité de l'âge physiologique des animaux obtenus est donnée par rapport à l'âge moyen des animaux éclos à la moitié de cette période : + 1,5 jour pour H. oryzae et + 1 jour pour M. javanica. On voit donc que, par rapport à la durée de vie, l'hétérogénéité introduite à ce niveau est inférieure à 5 %, ce qui est négligeable en regard des autres causes de variations. Pour Hirschmanniella spinicaudata, le degré de synchronisation obtenu est médiocre au niveau de l'âge physiologique. En effet au moment de l'inoculation tous les stades de développement sont mis en présence de la plante et cette hétérogénéité se conserve jusqu'au moment de la récolte. On obtient alors pour l'expérimentation un mélange d'adultes jeunes et d'adultes âgés, ce qui compte tenu de la longévité importante des adultes de cette espèce (voir chapitre 2) crée a priori des conditions défavorables. Par contre, compte tenu de la technique d'extraction utilisée (fig. 11), les animaux obtenus sont particulièrement homogènes quant à leur état nutritionnel : ils sont recueillis et utilisés dans un délai maximum de quatre jours après leur sortie des racines dans lesquelles ils se nourrissent.

Lors de l'obtention d'un lot de juvéniles d'Heterodera oryzae, deux sources d'hétérogénéité sont à considérer. D'une part comme le sexe est génétiquement prédéterminé (Cadet et al., 1975), on est en présence d'un mélange de juvéniles mâles et de juvéniles femelles. Il n'existe actuellement aucun moyen de séparer les deux formes, mais certains indices laissent penser que leur comportement de pénétration est différent (Cadet et al., 1975 ; Cadet & Merny, 1981). D'autre part, les éclosions sont obtenues à partir d'un mélange de masses d'oeufs et de kystes. Bien que l'éclosion des oeufs de ces derniers soit lente (Merny, 1972), une fraction non négligeable des juvéniles obtenus proviendra des kystes. Nous verrons ultérieurement qu'il n'existe apparemment pas de différence de comportement de pénétration entre ces deux formes.

1.5.5. Les contraintes du stockage

Les conditions imposées par le stockage in vitro sont très différentes de celles rencontrées par les animaux dans leur biotope. Il y a lieu de distinguer l'environnement abiotique et l'environnement biotique.

L'environnement abiotique comprend la composition minérale de la solution aqueuse qui baigne les nématodes et la composition de la phase gazeuse qui est en contact avec cette phase liquide.

Lors de la conservation in vitro des nématodes zooparasites, une meilleure longévité est obtenue en utilisant des milieux dont la composition minérale s'apparente à celle des liquides physiologiques de l'hôte : liquides de Ringer, de Tyrode, etc... (Fenwick, 1939, Von Brand, 1966). Par analogie, il aurait fallu, systématiquement, tester la survie des nématodes du sol dans des solutions de composition semblable à celle de la solution de sol : solutions nutritives minérales d'Hoagland, de Knop, etc... Cependant l'expérience prouve que ces solutions, relativement diluées et bien équilibrées, sont éminemment favorables au développement de microorganismes divers (bactéries, algues, champignons) qui se révèlent rapidement antagonistes des nématodes. Cet antagonisme relève soit d'un phénomène de compétition pour l'oxygène, soit d'un

phénomène de toxicité des produits du métabolisme. La solution consisterait à compléter alors ce milieu avec des antibiotiques. Parmi les différents essais que nous avons pratiqué dans ce sens, seul l'emploi de l'Agallol pour Hirschmanniella spinicaudata a donné une longévité plus élevée. Le même produit ou d'autres produits sont toxiques vis à vis des juvéniles d'Heterodera oryzae et de Meloidogyne javanica pour des stockages de longue durée.

In vitro, sous quatre mm de solution aqueuse l'aération des nématodes stockés par diffusion est parfaite : on peut estimer que les pressions partielles gazeuses d'oxygène et de gaz carbonique sous lesquelles vivent alors ces animaux sont équivalentes à celles de l'air ambiant. Sous ce rapport, les conditions sont très différentes de celles qui prévalent dans le sol (Dropkin, 1966 ; Van Gundy, 1965 ; Wallace, 1963, 1971b). Dans le sol, la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air, ce qui est dû à la consommation d'oxygène des organismes telluriques (animaux ou racines de végétaux) et à la diffusion limitée de l'oxygène à travers le sol à partir de l'atmosphère. Dans les cas extrêmes, comme ceux des sols submergés, la diffusion ne compense pas cette consommation et l'on observe des conditions anaérobiques (Bell, 1969) : c'est notamment le cas des rizières. En fait on n'observe d'anaérobiose dans ces sols que lorsque la plante est absente à l'intercampagne ; par contre, lors du développement du riz, un mécanisme physiologique particulier à cette plante provoque une excrétion d'oxygène à partir des racines, qui oxyde et aère le milieu (Van Raalte, 1941, 1942 ; Armstrong, 1971 ; Naphade, 1971). Par ailleurs, à cause du métabolisme des organismes telluriques et de la diffusion limitée vers l'atmosphère, la tension de gaz carbonique dans les sols est toujours supérieure à celle de l'air (Van Gundy, 1965 ; Rohde, 1960).

L'environnement biotique comprend l'ensemble des organismes qui sont susceptibles d'avoir des relations avec les nématodes et les substances chimiques émises par ces organismes, qui sont capables d'agir sur les nématodes. On n'a connaissance que de peu de cas où la présence d'un organisme autre que la plante hôte puisse être favorable à la longévité d'un nématode phytoparasite dans le sol : Mac Namara (1980) observe une longévité plus élevée en sol non stérilisé qu'en sol

stérilisé et en déduit qu'un organisme vivant sensible à la stérilisation en est responsable. Cependant, il s'agit dans ce cas d'une espèce de Xiphinema appartenant à l'ordre des Dorylaimida et l'on serait plutôt tenté de penser, d'après ces faits, que ce groupe n'est pas strictement phytoparasite. Les nématodes de l'ordre des Tylenchida, auquel appartiennent les espèces que nous avons étudiées, peuvent être par contre les proies ou les hôtes de certains de ces autres organismes telluriques : collemboles, tardigrades, protozoaires, champignons, bactéries, etc... (Wallace, 1963 ; Sayre, 1980). Dans ce cas, la longévité des nématodes ne dépend plus de facteurs intrinsèques mais de la densité du prédateur ou du parasite. Sous ce rapport, nos conditions de stockage in vitro, où les nématodes sont soustraits à ces organismes antagonistes représentent des conditions optimales pour les expériences de survie. Nous avons cependant observé deux cas où, au cours du stockage in vitro, l'intervention de ces organismes pouvait anéantir les nématodes en cours d'expérience : il s'agit des champignons prédateurs du genre Dactyella pour les juvéniles de Meloidogyne javanica et des champignons parasites du genre Catenaria pour les femelles d'Hirschmanniella spinicaudata. Nous estimons que cet anéantissement est un artéfact dû aux conditions favorables que le stockage in vitro représente pour ces deux organismes. En effet dans le sol des pots d'élevage, ces organismes sont présents mais n'empêchent pas une multiplication abondante des nématodes. Dans le cas particulier des champignons parasites des femelles d'H. spinicaudata, nous suggérons que le frottement de la cuticule du nématode contre les particules de sol ou les parois cellulaires des racines de la plante hôte, dû au déplacement, empêche la fixation des formes infestantes du champignon. In vitro, en milieu aqueux, cette possibilité de frottement n'existe plus.

En plus des constituants minéraux signalés plus haut, la solution de sol contient des constituants organiques d'origines diverses. Les racines de riz exsudent dans la rhizosphère des acides aminés, des acides organiques et de glucides (Mac Rae & Castro, 1966 ; Bourreau, 1977). La présence de ces substances dans le biotope et leur absence in vitro sont préoccupantes à double titre. D'une part se pose la question de la possibilité de nutrition osmotrophique des nématodes phytoparasites par ces substances. Nous reviendrons ultérieurement sur ce

problème. D'autre part, parmi ces substances, peuvent se trouver des stimulants ou des inhibiteurs de l'activité des nématodes. Le fait qu'un animal soit actif ou non peut influencer la vitesse d'utilisation de ses réserves métaboliques. Au cours du stockage in vitro, les juvéniles de Meloidogyne javanica sont continuellement actifs, alors que chez les juvéniles d'Heterodera oryzae, seuls quelques individus sont actifs.

CHAPITRE 2

RECHERCHES SUR LA SURVIE DES STADES INFESTANTS

2.1. INTRODUCTION

L'absence d'une plante hôte convenable contraint les nématodes phytoparasites au jeûne. Comme les réserves nutritives endogènes qu'utilisent ces animaux pour les besoins de leur métabolisme sont limitées en quantité, on peut s'attendre à ce qu'au terme de leur utilisation, ces animaux meurent d'inanition. C'est la raison pour laquelle on parle de survie lorsque l'on rapporte des observations effectuées sur des nématodes phytoparasites maintenus, en l'absence de la plante hôte, soit dans le sol, soit in vitro.

Les données concernant la survie des nématodes phytoparasites sont nombreuses. La presque totalité des études ont été effectuées sur les stades infestants et sur les oeufs, dont l'éclosion

fournit des juvéniles infestants. Il convient de noter que dans une perspective pratique, la survie des formes non infestantes ne présente aucun intérêt, puisqu'elles sont incapables, une fois séparées de la plante hôte, de reprendre le cycle de développement.

La survie des formes infestantes est appréciée généralement sur le critère de mobilité ou des caractères qui lui sont liés. Cependant la plupart des investigateurs ont convenu que le critère essentiel était constitué par la persistance de l'aptitude, pour l'animal, à pénétrer dans les racines de la plante hôte.

Il paraît tout d'abord indispensable de fixer la terminologie nécessaire. En français, le terme infecter est réservé à la pénétration dans un organisme d'un parasite unicellulaire : pour un parasite pluricellulaire, le terme obligatoire est infester. On ne peut donc employer le terme infectivité. Par ailleurs le terme infestivité, dont la racine serait alors correcte, est d'une consonnance inadéquate et partant, peu utilisé (Cabaret, 1980). Nous avons donc préféré user de l'expression pouvoir infestant, par analogie avec pouvoir fécondant ou pouvoir germinatif. Nous verrons ultérieurement que ce choix s'accommode très bien du caractère quantitatif qu'il faut adjoindre à cette notion.

Au cours de ce chapitre, nous verrons tout d'abord les données bibliographiques disponibles dans les domaines de la survie des stades infestants, de la survie des oeufs et du pouvoir infestant . L'expérimentation réalisée sera exposée en quatre parties : a) La survie des formes actives dont l'étude a été conduite chez les trois espèces. b) La survie des oeufs en osmobiose concernant seulement Heterodera oryzae. c) Le pouvoir infestant des juvéniles d'Heterodera oryzae et de Meloidogyne javanica. d) La reproduction, dont l'étude est complémentaire de celle du pouvoir infestant, et qui n'a été réalisée que pour Meloidogyne javanica.

2.2. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

2.2.1. La survie des stades infestants

Le critère le plus immédiat de la survie chez une forme infestante est l'activité spontanée et certains auteurs se sont limités à ce critère (Berliner & Busch, 1914 ; Baunacke, 1922). Cependant, des études portant sur le comportement individuel des nématodes in vitro ont montré que cette activité n'est pas continue, mais peut être interrompue par des périodes de repos, au cours desquelles l'animal adopte un habitus droit, semblable à celui d'un animal mort (Golden & Shafer, 1960 ; Doncaster & Webster, 1968 ; Croll, 1970). Ainsi le comptage instantané des animaux actifs au sein d'une suspension de nématodes conduit à une surestimation de la mortalité. Pour cette raison, d'autres tests, plus élaborés, ont été mis au point.

Passage actif : Il s'agit d'une formalisation quantitative du procédé de purification des nématodes actifs qui a été décrit au chapitre précédent (fig. 7). Un nombre connu de nématodes à tester est déposé sur un filtre en fibres de cellulose soutenu par un tamis en toile d'acier inoxydable posé dans un récipient plein d'eau. Au bout de 24 heures, les nématodes qui sont passés à travers le filtre sont comptés. Moje (1959) qui a mis au point ce test estime que 97 % des juvéniles de Meloidogyne javanica traversent le filtre en 31 heures à 25°. Ce test est employé sous sa forme originale (Thomason et al., 1964) ou sous des formes dérivées dans lesquelles notamment le filtre est remplacé par une colonne de sable fin (Van Gundy et al., 1967). Cette période de 24 heures intègre plusieurs périodes d'activité d'un individu, l'estimation de la survie est donc améliorée.

Stimulation : On procède par observation directe mais on ne considère pas a priori que les nématodes immobiles sont morts. Ceux-ci au contraire sont stimulés soit mécaniquement en les touchant avec une aiguille (Slack et al., 1972), soit électriquement à l'aide d'un champ électrique (Granek, 1976), soit chimiquement en ajoutant à la suspension certaines substances activatrices comme le sulfate de zinc (Gevrey, 1971 ; Kerboeuf, 1978).

Caractérisation des cadavres : La dégénération des structures internes, due à l'autolyse des tissus, est visible chez les cadavres de nématodes, sous la loupe binoculaire (Davies & Fisher, 1976b). Par ailleurs la turgescence, qui se traduit par l'extrusion des organes internes chez un nématode vivant dont on lèse la cuticule à l'aide d'un instrument tranchant, disparaît chez le cadavre (Slack et al., 1972). Enfin les cadavres sont colorés par un certain nombre de substances qui n'ont aucune action sur les animaux vivants : New Blue R (Shepherd, 1962a), permanganate de potassium (Jatala, 1975), rouge neutre (Bolla & Brot, 1975)...

Les durées de survie observées chez les stades infestants des nématodes phytoparasites sont très variables selon les espèces. Pour prendre le cas des juvéniles du second stade dans la famille des Heteroderidae, cette longévité *in vitro* peut aller de 32 jours chez Meloidogyne javanica à 27° (Van Gundy et al., 1967) à 7 mois chez Heterodera schachtii à 24° (Golden & Shafer, 1960). Pour les autres stades larvaires et les adultes, peu d'études ont été réalisées *in vitro* à température contrôlée : les survies sont déterminées dans du sol à la température ambiante et les résultats sont très fluctuants. Cependant pour des espèces du genre Xiphinema dont la taille s'apparente davantage à celle d'Hirschmanniella spinicaudata, la longévité dans le sol atteint selon les espèces plusieurs mois ou plusieurs dizaines de mois (Mc Namara, 1980).

Cette longévité peut être soit diminuée, soit augmentée, par un certain nombre de facteurs externes, naturels ou artificiels. Le principal d'entre eux est la température : la longévité croît en raison inverse de la température à condition que l'on maintienne celle-ci dans certaines limites : au-delà on entre dans les zones létales (Slack et al., 1972 ; Anderson, 1978 ; Bergeson, 1959 ; Thomason et al., 1964 ; Van Gundy et al., 1967). L'absence d'oxygène est rapidement fatale à certaines espèces, mais permet une survie prolongée chez certaines autres (Banage, 1966 ; Anderson, 1978 ; Abrams & Mitchel, 1978 ; Baxter & Blake, 1969 ; Van Gundy et al., 1967). Les propriétés chimiques de la solution de sol, qui baigne en permanence les nématodes, sont déterminantes : des pH

extrêmes (inférieur à 4 ou supérieur à 9) diminuent la longévité ; la présence d'acides gras ou de sulfures provenant de la décomposition de la matière organique (Yoshida, 1971) est toxique (Banage et Visser, 1965 ; Fortuner & Jacq, 1976).

2.2.2. La survie des oeufs

L'étude de la survie des oeufs n'a été conduite jusqu'à présent que sur les groupes d'oeufs que constituent les masses d'oeufs (chez Meloidogyne et certains Heterodera) et les kystes (chez Heterodera). L'appréciation de la survie se fait uniquement en suivant l'éclosion de ces oeufs, soit spontanée soit provoquée.

A partir de kystes maintenus soit dans le sol, soit in vitro, des éclosions sont obtenues après plusieurs semaines, plusieurs mois, ou plusieurs années, selon les espèces (Shepherd, 1962b ; Lewis & Mair, 1960 ; Merny, 1966, 1972).

D'une façon générale le temps de survie maximum des oeufs est plusieurs fois supérieur à celui des juvéniles qui en sortiront. Ceci concorde parfaitement avec le fait que l'intensité du métabolisme des oeufs est inférieure à celle des juvéniles (Atkinson & Ballantyne, 1977).

L'origine de cette différence est généralement attribuée aux propriétés de perméabilité de la coque de l'oeuf. Cette coque contient des protéines, de la chitine et des lipides (Clarke et al., 1967). Ces substances sont organisées en trois couches qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur de l'oeuf : la membrane vitelline, la couche chitineuse et la couche lipidique (Bird & Mc Clure, 1976 ; Bird, 1968). La perméabilité de la coque est essentiellement liée à l'intégrité de cette couche lipidique (Bird, 1971 ; Bird & Mc Clure, 1976). On a tout d'abord constaté que les oeufs lors de la ponte incorporent rapidement une certaine quantité d'eau (Flegg, 1967). Par la suite, au terme du développement embryonnaire, l'éclosion spontanée est provoquée par des mouvements du juvénile à l'intérieur de la coque (Doncaster & Shepherd, 1967) qui ne sont initiés que lorsque la teneur en eau atteint 70 %, ce qui correspond à une seconde incorporation d'eau. Puis immédiatement après l'éclosion, une troisième incorporation d'eau a lieu, portant la teneur en eau du juvénile à 75 % (Ellenby & Perry, 1976 ; Perry, 1977).

L'état d'insaturation qui précède l'éclosion est dû chez certaines espèces à la présence, dans le fluide qui entoure le juvénile de tréhalose à la concentration de 0,4 M (Clarke & Perry, 1977). Cet état peut être maintenu, en inhibant ainsi l'éclosion, en plongeant les oeufs dans des solutions de pression osmotique élevée comme du NaCl 0,3 M (Dropkin et al., 1958) ou du glycerol 0,6 M (Wallace, 1968).

2.2.3. La pénétration des stades infestants dans les racines de l'hôte

Ces données seront limitées aux seuls nématodes phytoparasites : en effet, la pénétration des nématodes zooparasites dans leur hôte relève d'un déterminisme si différent que l'on ne peut, comme pour la survie par exemple, considérer ensemble les deux groupes. Les études décrites dans la littérature ont été conduites dans les conditions les plus favorables aux déterminations quantitatives : les plantes étaient jeunes afin de réduire le volume de matière végétale à explorer pour retrouver les animaux qui ont pénétré, le volume de substrat (sol ou sable) était également faible de façon à faciliter la récupération totale du système racinaire et l'inoculum était homogène. La détermination du nombre d'individus qui ont pénétré dans les racines s'effectue le plus souvent quelques jours après l'inoculation par une fixation suivie d'une coloration des tissus végétaux : les animaux sont visibles et comptables sous la loupe binoculaire. Dans le cas des espèces appartenant au genre Meloidogyne, on peut n'effectuer qu'un comptage du nombre de galles, en admettant qu'à chaque galle correspond un individu, ce qui est vrai pour les faibles inoculums. Enfin on peut également attendre plus longtemps, que les animaux infestants aient atteint le stade adulte, qui est souvent plus facilement repérable, comme chez les espèces du genre Heterodera.

Dans ces conditions, la cinétique de pénétration est rapide : le plus souvent le nombre maximal de pénétrations est atteint en deux ou trois jours (Dropkin, 1957 ; Blake, 1962a ; de Guiran, 1960 ; Mc Clure & Robertson, 1973). Parfois la pénétration n'est pas suivie d'une immobilisation immédiate : l'animal migre dans la racine avant de se fixer (Mc Clure & Robertson, 1973). Il arrive même que le stade infestant quitte la racine dans laquelle il a pénétré s'il ne s'agit pas d'une plante hôte convenable (de Guiran, 1960).

Le nombre des pénétrations observées croît avec la taille de l'inoculum (Blake 1962a ; Merny, 1972 ; Davies & Fisher, 1976a). Mais cette relation n'est linéaire que pour les faibles inoculums, inférieurs à 100 individus (Dropkin, 1957). Au delà on constate que la fraction de l'inoculum qui pénètre diminue avec la taille de cet inoculum : le nombre de nématodes infestants qui pénètrent dans une plante croît vers un maximum avec la taille de l'inoculum (Blake, 1962a ; Merny, 1972 ; Davies & Fisher, 1976a).

L'aptitude à pénétrer dans les racines de la plante hôte diminue avec l'âge des stades infestants (Dropkin, 1957 ; Van Gundy et al., 1967 ; Merny, 1972 ; Davies & Fisher, 1976b). Enfin certains facteurs externes caractérisant le substrat, sont susceptibles de modifier quantitativement la pénétration : la granulométrie et la teneur en eau du substrat (Blake, 1962b ; Wallace, 1966b).

2.3. LA SURVIE DES STADES INFESTANTS

2.3.1. Principe de l'étude

Chez les métazoaires, la survie des individus d'une population d'âge homogène peut être commodément représentée par la courbe de survie (Teissier, 1934). D'après les exemples rapportés par cet auteur, aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés, cette courbe de survie, strictement décroissante, affecte une forme sigmoïdale. Les paramètres mathématiques de cette courbe sont caractéristiques de l'espèce et des conditions expérimentales (comme la température pour les invertébrés par exemple) et l'on a pu établir pour certaines espèces des tables de mortalité qui servent de référence. Chez les nématodes, de telles courbes de survie sigmoïdales ont été déjà observées (Golden & Shafer, 1960 ; Bolla & Brot, 1975 ; Anderson, 1978 ; Kahn & Enesco, 1981).

Nous avons donc entrepris la détermination des courbes de survie chez les stades infestants des trois espèces étudiées. Après une description de la méthodologie suivie seront données les courbes de

survie obtenues pour les juvéniles d'Heterodera oryzae , les juvéniles de Meloidogyne javanica et les adultes d'Hirschmanniella spinicaudata . Comme variante à la survie en conditions standard seront étudiées la survie en conditions d'anaérobiose chez Heterodera oryzae et la survie en conditions d'osmobiose chez Meloidogyne javanica. Au cours de la discussion sera abordé le problème de l'interprétation mathématique des courbes obtenues.

2.3.2. Méthodologie

2.3.2.1. Survie et test de survie par passage actif

Survie : Chez les juvéniles d'Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica, les courbes de survie ont été déterminées à l'aide de tests de survie par passage actif à des intervalles d'une semaine. D'un test à l'autre, les populations étaient conservées in vitro, en étuve à 28°, à l'obscurité, dans de bonnes conditions d'aération. Chez H. oryzae, on a procédé à un suivi de la population totale des lots étudiés, tandis que chez M. javanica ont été effectués des sondages.

Test de survie par passage actif : On utilise le dispositif employé précédemment pour la purification des nématodes, décrit par la fig. 7. Un tamis en acier inoxydable à maille de 100 microns supportant une quadruple épaisseur de tissu de cellulose (mouchoirs kleenex), est posé dans une boîte de Petri remplie d'eau. La suspension contenant les nématodes à soumettre au test est versée sur le tissu de cellulose avec précautions : les animaux sont retenus par le tissu, et l'on peut vérifier qu'aucun animal n'a été entraîné dans le liquide sous jacent. On laisse alors le dispositif en place pendant 24 heures : dès la première heure des juvéniles actifs traversent le tissu et migrent dans la boîte ; puis leur nombre croît asymptotiquement avec le temps, pour atteindre son maximum en huit ou dix heures. la durée de 24 heures que nous donnons à ce test représente donc une sécurité, mais également une commodité. Les juvéniles morts restent sur le tamis : on a pu vérifier ce résultat en soumettant au test des populations de juvéniles tués par la chaleur ou le formol.

2.3.2.2. Survie des lots chez *Heterodera oryzae*

A partir d'une suspension homogène de juvéniles fraîchement éclos et purifiés d'*H. oryzae*, on réalise quatre lots d'environ 8 000 individus. D'après les conditions de préparation, ces juvéniles sont considérés comme étant d'âge zéro et ils sont tous actifs. Dans une tube gradué, le volume de chaque lot est complété à 100 ml et au sein de cette suspension, homogénéisée par bullage d'air, trois échantillons identiques de 5 ml sont prélevés à l'aide d'une pipette et déposés chacun dans une lame de comptage. Après un comptage sous la loupe binoculaire (environ 400 individus par échantillon), les trois prélèvements sont restitués à la suspension. Les tubes sont alors gardés pendant 24 heures à l'étuve à 28° pour permettre aux animaux de sédimenter. On élimine alors le surnageant en ne gardant que les 25 ml du fond qui sont placés dans une boîte de Pétri de diamètre 120 mm (l'épaisseur de la lame d'eau, compte tenu du volume d'eau nécessaire au rinçage du tube, est alors de 3,5 mm), déposée à l'étuve. Six jours après, chaque lot est récupéré et soumis au test de survie. Au matin du septième jour, la suspension contenue dans la boîte de Petri est étendue à 100 ml, et on procède, comme précédemment, à trois prélèvements en vue du dénombrement. Pour chaque lot, on obtient ainsi, toutes les semaines, un dénombrement du nombre de survivants. Pour réaliser la moyenne des quatre répétitions, ces chiffres sont tout d'abord transformés en pourcentages : on peut alors tracer la courbe représentant le pourcentage de survivants en fonction du temps (semaines).

2.3.2.3. Sondages chez *Meloidogyne javanica*

Une suspension homogène de juvéniles de *M. javanica*, fraîchement éclos et purifiés, contient environ 4 millions d'individus dans un volume d'environ 400 ml. Ces juvéniles, considérés comme étant d'âge zéro, et tous actifs, sont placés dans quatre boîtes de Roux de un litre à raison de 100 ml/boîte (épaisseur de la lame d'eau 4 mm). Six jours après, l'ensemble des juvéniles est réuni dans une éprouvette et, au sein de la suspension homogénéisée par bullage d'air, on procède à 10 prélèvements de 0,8 ml. Les cinq prélèvements de rangs impairs sont placés dans des tubes gradués et dilués à 100 ml en vue d'un comptage direct. Chacun des cinq prélèvements de rang pair est soumis au test de

survie. Au matin du septième jour, les juvéniles survivants sont comptés. On peut alors calculer p_1 , le pourcentage de survivants à l'âge d'une semaine. De la même façon, le reste de la suspension de juvéniles a été soumis au test de survie, mais sans comptage, en éliminant ainsi les animaux morts. Les animaux survivants sont alors replacés en boîte de Roux à l'étuve. A la fin de la deuxième semaine, on procède de même et on obtient un pourcentage p_2 d'animaux survivants par rapport aux animaux survivants de la première semaine. La survie par rapport à la population initiale est donnée par le produit $p_1 \times p_2$. D'une façon générale, en poursuivant l'application de cette méthode, la proportion de survivants à la fin de la n ième semaine est égale au produit $p_1 \times p_2 \times \dots \times p_n$, résultat qui permet également de construire la courbe de survie en fonction du temps.

2.3.2.4. Détermination de la courbe de survie par l'examen des individus chez *Hirschmanniella spinicaudata*

Au sein d'une population d'*H. spinicaudata* fraîchement extraite, trois jours après la récolte des racines, on prélève individuellement 300 femelles actives et 300 mâles actifs, que l'on rassemble par lots de 25 individus du même sexe. Chaque lot est placé dans une boîte séparée dans du milieu Agallol-tamponné (7,5 ppm d'Agallol dans du tampon phosphate pH 7 à la concentration de 8 mM). A cet instant, au temps zéro, tous les animaux sont actifs, donc vivants. Ces boîtes sont gardées à l'étude à 28° à l'obscurité. Par la suite, toutes les trois semaines, le contenu de chaque boîte est examiné sous la loupe binoculaire, et on transfère dans une boîte garnie de milieu frais, les individus vivants. Lors de l'examen, on distingue tout d'abord les individus actifs que l'on transfère en premier et les individus inactifs. Ces derniers sont constitués par deux catégories : d'une part des individus dont l'habitus est contourné, évoquant une prise de vue photographique d'un animal actif, et d'autre part des individus dont l'habitus est droit. Les animaux de la première catégorie, lorsqu'ils sont stimulés par le contact du fil monté qui sert au transfert, reprennent toujours leur activité : après les avoir réactivés, on peut donc procéder à leur transfert. Certains des animaux de la seconde catégorie (en habitus droit), stimulés très énergiquement (en les roulant

entre le fil et le fond de la boîte) peuvent manifester une activité limitée, par une flexion un peu en arrière de l'extrémité antérieure : ces animaux, vivants, sont donc également transférés. La plupart des autres animaux trouvés en habitus droit ne répondent pas à cette stimulation énergétique et sont donc considérés comme morts. Ainsi, toutes les trois semaines, pendant les 36 semaines qu'a duré l'expérience, on peut enregistrer un décompte rigoureux du nombre des animaux survivants. Ces chiffres sont transformés en pourcentages pour le tracé de la courbe de survie.

2.3.2.5. Survie en conditions d'anaérobiose (méthode au sulfite)

Principe : Pour placer les nématodes en condition d'anaérobiose, on ajoute du sulfite de sodium (Na_2SO_3) à la solution aqueuse dans laquelle ils se trouvent en suspension : l'oxygène dissous oxyde le sulfite en sulfate (Na_2SO_4) et, si le sulfite est en excès, on élimine ainsi complètement l'oxygène dissous. L'innocuité de ces deux substances (sulfite et sulfate), aux concentrations nécessaires (environ 400 ppm), vis à vis des nématodes phytoparasites, a été montrée par Feldmesser et Feder (1954) et Feder et Feldmesser (1955). L'élimination complète de l'oxygène dissous par un excès de sulfite a été démontrée sur un appareil de polarographie par Kolthoff et Laitinen (1940). D'après les travaux de Reinders et Vless (1925), la cinétique d'oxydation du sulfite en sulfate est rapide : il importe donc que la manipulation soit brève. De plus, une fois le sulfite ajouté, la suspension de nématodes est enfermée hermétiquement dans un récipient sans volume d'air, afin de ne pas renouveler l'oxygène dissous.

Solution mère de sulfite : Dans un flacon bouchant à l'émeri, contenant un petit barreau d'agitation aimanté et dont on a déterminé le volume exact avec le bouchon en place (110 ml), on introduit 800 mg de sulfite de sodium anhydre. On remplit rapidement d'eau déminéralisée, on bouche à l'émeri en ayant soin de ne pas capturer de bulle d'air et on dissout le sulfite par agitation magnétique en quelques minutes. Une fois le flacon ouvert, cette solution mère, à environ 7 000 ppm, doit être utilisée dans la demi heure qui suit.

Garniture des tubes d'anaérobiose : A partir d'une suspension homogène de juvéniles fraîchement éclos et purifiés d'Heterodera oryzae des lots équivalents d'environ 8 000 individus sont distribués par pipetage dans des tubes à essai en pyrex de 18 x 180. Un certain nombre de tubes prélevés au hasard dans la série sont alors mis de côté en vue d'un dénombrement précis des nématodes. Dans les autres tubes sont ajoutés 3,5 ml de tampon phosphate pH 7,5 mM et de l'eau déminéralisée jusqu'à environ quatre centimètres de l'orifice du tube. On laisse alors sédimenter les nématodes pendant deux heures, on ajoute alors rapidement deux ml de la solution mère de sulfite et on complète avec de l'eau déminéralisée jusqu'à l'orifice du tube. Chaque tube est alors fermé hermétiquement avec un bouchon en Rhodorsil, en ayant soin de ne pas capturer de bulle d'air. Puis le contenu des tubes est homogénéisé par plusieurs retournements. Compte tenu du volume de ces tubes (35 ml), la concentration finale du tampon phosphate est alors de 50 mM et la concentration finale du sulfite est de 400 ppm. Un litre d'eau déminéralisée, saturé d'air à la température du laboratoire (25°) contient, à l'état dissous, 28,31 ml d'oxygène. D'après la relation stoechiométrique d'oxydation du sulfite en sulfate, il faut, pour éliminer complètement cette quantité d'oxygène, 318 mg de sulfite. Le sulfite à 400 ppm est donc largement en excès.

Suite de l'expérience : Les tubes préparés sont gardés à l'horizontale (pour étaler les juvéniles), immergés dans l'eau pendant le temps nécessaire. A la fin de l'expérience, chaque tube est placé la veille en position verticale, afin que tous les nématodes se rassemblent dans le fond du tube. De cette façon, l'ouverture du tube, puis l'élimination de la plus grande partie du milieu d'anaérobiose par aspiration, s'effectuent sans risque de perdre des animaux. Chaque culot est alors soumis au test de survie par passage actif.

2.3.2.6. Survie en conditions d'osmobiose

Principe : Pour placer les nématodes en conditions d'osmobiose, on ajoute progressivement, à la solution aqueuse dans laquelle sont placés les animaux, une solution 3 M de NaCl afin d'obtenir une concentration finale de 0,3 M de NaCl. Des essais préliminaires ont en effet montré qu'avec

cette substance et cette concentration, la survie des juvéniles d'Heterodera oryzae et de Meloidogyne javanica est maximale alors que le comportement (immobilisation, diminution du volume) laisse présumer que le métabolisme est profondément modifié. De plus, au cours de mêmes essais, il est apparu que l'augmentation progressive de la pression osmotique (ainsi que la diminution progressive lors du retour au milieu témoin) améliorerait la survie et la vitesse de récupération de l'activité.

Pratique : Les juvéniles de Meloidogyne javanica sont stockés dans des fioles de Roux de 1 litre posées à plat, ce qui ménage une surface d'échanges gazeux de 220 cm^2 entre l'air et la suspension de nématodes. Dans chacune des fioles, on place 100 ml d'une suspension contenant un million de juvéniles dans une solution de tampon phosphate pH 7 à 4 mM. Pour atteindre la concentration finale de 0,3 M NaCl, il faut ajouter 11,1 ml de NaCl 3 M. On procède à une addition partielle toutes les heures de deux ml (cinq fois) et de 1,1 ml. Lors du retour aux conditions normales (en milieu dilué) on ajoute dans chaque fiole 55 ml de tampon 4 mM et les 166 ml sont placés dans deux tubes de 25 x 250 pour sédimentation. Deux heures après, les juvéniles ayant sédimenté, le surnageant des deux tubes est ramené à 25 ml et on ajoute alors 25 ml de tampon 4 mM. Deux heures plus tard, après sédimentation le surnageant est éliminé et les juvéniles sont alors rincés par centrifugation avec du tampon 4 mM. La suspension obtenue peut être alors soumise au test de survie par passage actif (fig. 7). On procède alors par la méthode des sondages décrite précédemment.

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Survie des juvéniles d'Heterodera oryzae

La courbe de survie des juvéniles d'Heterodera oryzae en conditions standard, donnée par la figure 13, est typiquement sigmoïdale. Il n'y a aucun survivant à six semaines.

En conditions d'anaérobiose (fig. 14), les juvéniles ont une mortalité diminuée : la proportion de survivants se maintient à environ 90 % pendant au moins quatre semaines.

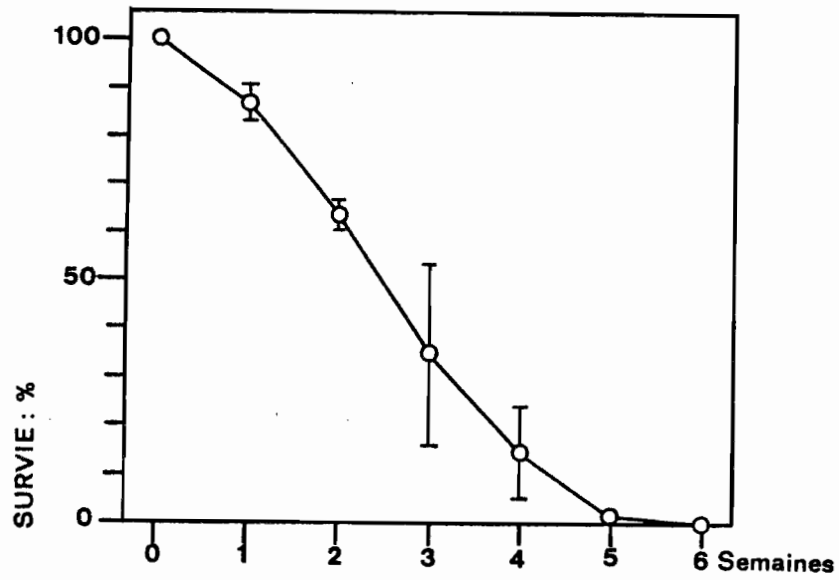


Fig. 13. - Courbe de survie (activité) des juvéniles d'*Heterodera oryzae* à 28° (On a suivi l'évolution de 4 populations distinctes et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

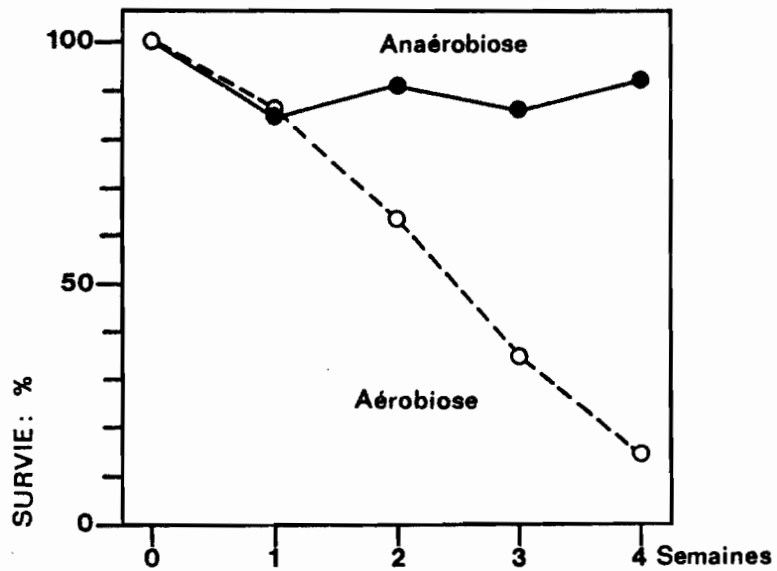


Fig. 14. - Courbe de survie (activité) des juvéniles d'*Heterodera oryzae* à 28° en aérobiose (○) et en anaérobiose (●).

2.3.3.2. Survie des juvéniles de *Meloidogyne javanica*

En conditions standard (fig. 15 : milieu dilué), la survie des juvéniles de *Meloidogyne javanica* décroît rapidement avec le temps. A cinq semaines, il n'y a aucun survivant.

En conditions d'osmobiose (fig. 15 : milieu concentré), la proportion de survivants se maintient vers 90 % pendant au moins dix semaines.

2.3.3.3. Survie des adultes d'*Hirschmanniella spinicaudata*

En conditions standard , en présence de l'antibiotique nécessaire pour éviter les infections fongiques, les mâles et les femelles d'*Hirschmanniella spinicaudata* voient leur survie décroître avec le temps selon une allure sigmoïdale (fig. 16). A 33 semaines pour les femelles et 36 semaines pour les mâles, il n'y a plus de survivants.

2.3.4. Discussion

2.3.4.1. Critique de la méthodologie

Parmi les différentes courbes de survie obtenues (fig. 13 à 16), seules deux l'ont été par une détermination directe de la mort effective des individus : il s'agit des courbes relatives aux adultes d'*H. spinicaudata* (fig. 16). Les autres courbes ont été obtenues par le biais de l'activité, paramètre dont on ne peut être sûr, a priori, qu'il corresponde exactement à la mortalité. En effet, dans notre méthodologie sont considérés comme morts les juvéniles qui, en 24 heures, n'ont pas manifesté une activité suffisante pour traverser le kleenex, et se retrouver dans la suspension soumise au comptage, lors du test de survie (fig. 7).

On a évidemment entrepris au cours de ce travail d'obtenir quelques données supplémentaires relatives à la validité de ce test de survie par passage actif. La récupération des juvéniles restés sur le

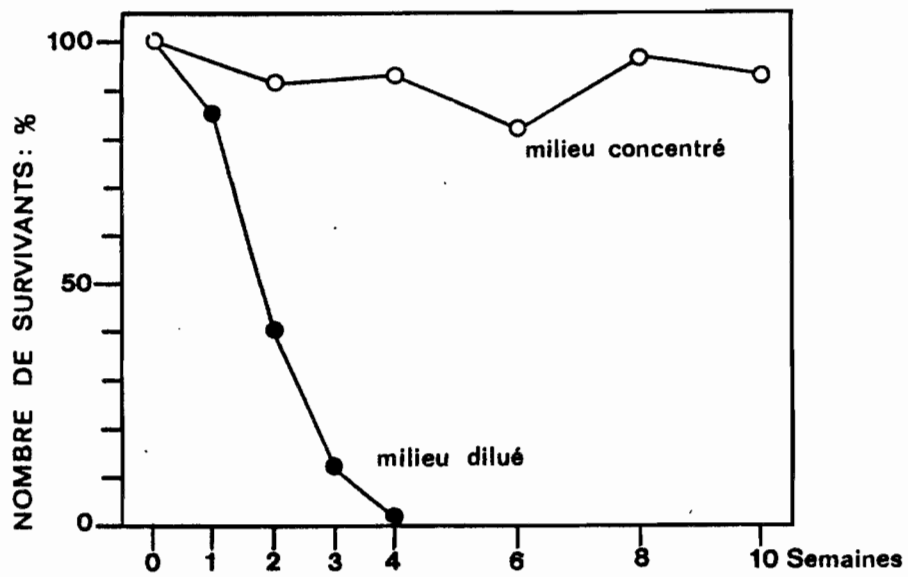


Fig. 15. - Courbes de survie (activité) des juvéniles de *Meloidogyne javanica* à 28° : en milieu dilué (0 : tampon phosphate 4 mM, pH 7) et en milieu concentré (0 : 0,3 M NaCl dans le milieu dilué).

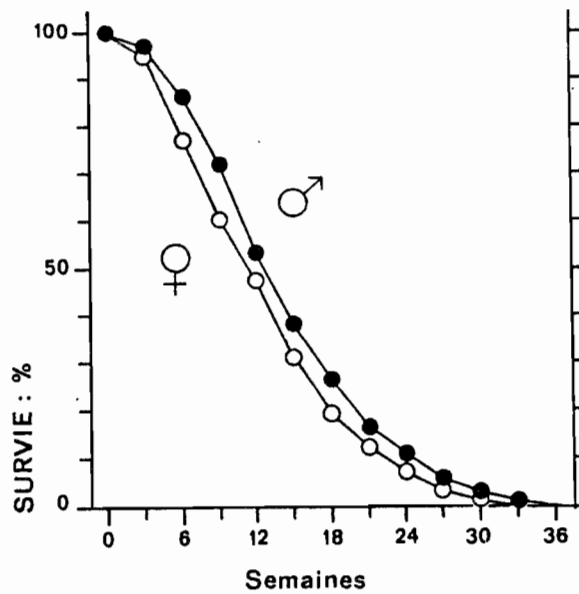


Fig. 16. - Courbes de survie des femelles et des mâles d'*Hirschmanniella spinicaudata* à 28°.

kleenex à l'aide d'un jet d'eau se fait avec un mauvais rendement, mais parmi les quelques juvéniles ainsi récupérés, on n'a jamais pu mettre en évidence que certains soient susceptibles de manifester une quelconque activité, soit immédiatement, soit ultérieurement au cours d'une conservation in vitro sur plus de deux semaines. D'une façon complémentaire, on a cherché à déterminer l'effet d'une prolongation du test de survie. Pour cela, à l'issue de la période de 24 heures du test normal, les tamis ont été transférés chacun dans une boîte de Pétri propre garnie de liquide frais. Une semaine plus tard, un comptage soigneux était effectué, après sédimentation en tube, sur la totalité du contenu de la boîte. L'ordre de grandeur des comptages représentait un effectif maximum de l'ordre de 1 % de la population initiale soumise au test. Une seconde prolongation d'une semaine ne donnait aucune sortie. Donc la fixation de la durée du test à 24 heures n'élimine qu'une faible fraction (au maximum 1 %) des survivants.

Nous avons également émis l'hypothèse que les juvéniles retenus dans le kleenex n'étaient pas morts, mais rendus réversiblement inactifs, et qu'une stimulation judicieuse pouvait les activer. A cet effet, nous avons testé des substances chimiques dissoutes dans l'eau des boîtes où sont placés les tamis, au terme du test de 24 heures. Le permanganate de potassium qui, outre son rôle sur l'éclosion des oeufs (voir 1.4.1. et le tableau 3), augmente l'activité des juvéniles, réagit chimiquement avec la cellulose du kleenex et n'est donc pas utilisable dans ce cas. Des substances comme l'acide citrique et l'acide ascorbique qui sont des activateurs du métabolisme intermédiaire se sont révélés sans effet par rapport à celui de l'eau pure. De la même façon, la présence dans cette eau de jeunes plantules de l'hôte (Heterodera oryzae, kenaf pour Meloidogyne javanica) n'a pas conduit à une récupération plus importante.

Compte tenu de ces diverses vérifications, il semble justifié d'assimiler la courbe d'activité à la courbe de survie.

2.3.4.2. Interprétation mathématique des courbes de survie

Les quatre courbes de survie obtenues en conditions standard (fig. 13, 15 et 16) présentent l'allure sigmoïdale caractéristique que l'on connaît pour un certain nombre d'organismes variés (Teissier, 1934)

et que l'on a déjà retrouvée chez quelques espèces de nématodes. Il est donc tout à fait opportun d'entreprendre l'interprétation mathématique de ces quatre courbes en s'appuyant sur les travaux de Teissier (1934). Comme hypothèse de base, cet auteur propose que l'espérance de vie d'une espèce décroît exponentiellement avec le temps. L'espérance de vie, $E(t)$, est une fonction du temps t , résultant d'une transformation de la fonction de survie $S(t)$ par la relation :

$$E(t) = \frac{S(t)}{2} + S(t+1) + \dots + S(t+n)$$

La fonction de survie $S(t)$, ou proportion de survivants en fonction du temps, peut être commodément représentée par un chiffre compris entre 0 et 1 variant en fonction du temps t , de $t = 0$ (origine), pour lequel $S(0) = 1$, à la date d'extinction $t = n$, pour laquelle, $S(n) = 0$. A partir de ces prémisses, et en fonction des courbes obtenues, deux modes de calcul ont pu être développés : le premier a été mis au point par Inagaki (1977) et le second a été établi par un collègue mathématicien, P. Bernhard.

Premier mode de calcul (Tableau 5 et fig. 17 et 18)

La méthode suivie par Inagaki (1977) s'appuie sur le résultat de l'intégration obtenu par Teissier (1934) :

$$S(x) = e^{1+x-e^x} \quad \text{avec } x = at + b$$

Il suffit donc de déterminer les paramètres a et b . Pour cela à partir du relevé de $S(t)$ en fonction de t on calcule x en fonction de t par l'intermédiaire de l'expression $1 - \ln S(t) = e^x - x$. On dispose alors grâce à la relation $x = at + b$ à laquelle on applique chaque couple de valeurs x_i, t_i , d'un réseau d'équations linéaires à deux variables a et b . Un mode de résolution graphique de ce réseau d'équations est donné par la figure 17. On obtient alors les valeurs de a et b , que l'on peut introduire dans les deux relations initiales et à l'aide d'une calculatrice programmable pour tracer la courbe point par point. Ce mode de calcul a été appliqué au cas des mâles d'Hirschmanniella spinicaudata

TABLEAU 5. Calcul du temps biologique x pour les mâles d'*Hirschmanniella spinicaudata*

t sem.	S(t)	$\frac{1-\ln S(t)}{e^x - x}$	x	
0	1,000	1	0	1ère étape
3	0,970	1,030	0,24	
6	0,863	1,147	0,50	
9	0,720	1,328	0,71	
12	0,533	1,629	0,95	
15	0,383	1,960	1,13	
18	0,263	2,336	1,29	2ème étape
21	0,167	2,790	1,44	
24	0,110	3,207	1,56	
27	0,060	3,813	1,71	
30	0,030	4,506	1,85	
33	0,010	5,605	1,96	
36	0,000			

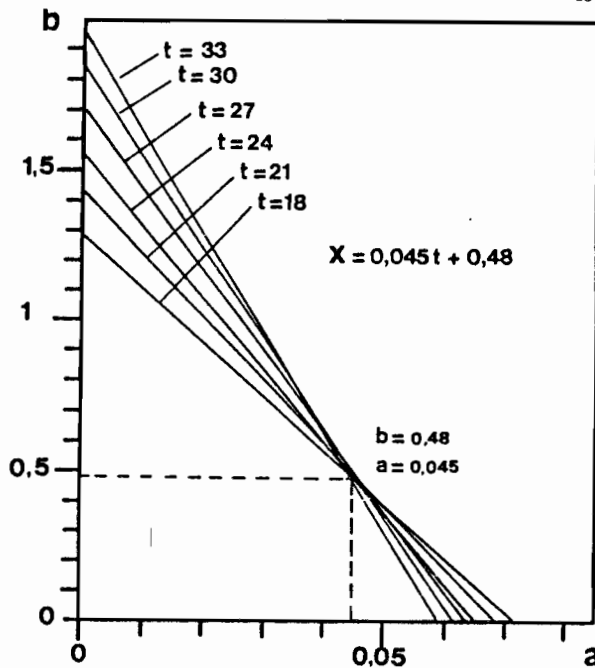


Fig. 17. - Détermination graphique des paramètres a et b de la courbe de survie de Teissier et Inagaki pour les mâles d'*Hirschmanniella spinicaudata*.

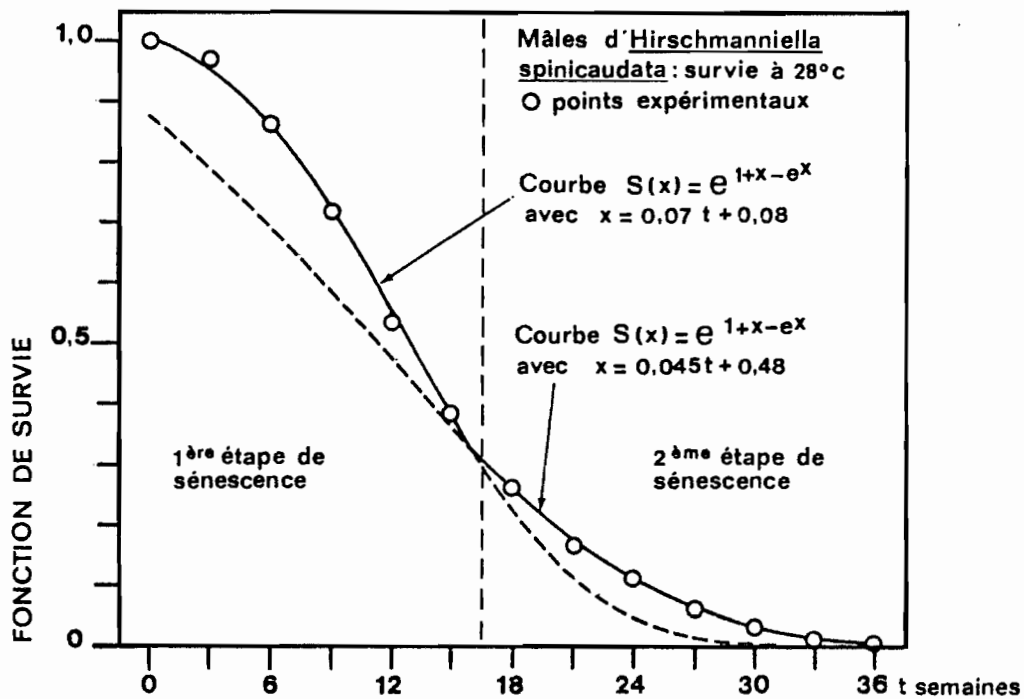


Fig. 18. - Ajustement de la courbe de survie des mâles d'*Hirschmanniella spinicaudata* (fig. 16) à la loi de Teissier et Inagaki.

(fig. 16). On calcule tout d'abord pour chaque date la valeur x , que Teissier (1934) appelle le temps biologique (tableau 5). Puis pour chaque couple de valeurs x_i, t_i on trace la droite $b = x_i - t_i \times a$. Ces droites se coupent en un point de coordonnées a et b (fig. 17). En fait, dans l'exemple choisi, comme dans l'exemple choisi par Inagaki (1977) concernant la mouche domestique, on est obligé d'admettre que le courbe se compose de deux parties dans lesquelles ces paramètres a et b sont différents : ceci définit deux étapes successives de sénescence. Le tracé point par point des deux courbes s'ajuste bien aux points expérimentaux (fig. 18).

Second mode de calcul (Tableau 6 et fig. 19 et 20).

L'hypothèse de base de Teissier (1934), la décroissance exponentielle de l'espérance de vie avec le temps, se traduit, lors de l'intégration qui permet l'expression de la fonction de survie, par la formule suivante :

$$S(t) = e^{-\alpha t + 1/\alpha E_0} \times (1 - e^{-\alpha t})$$

avec α et E_0 qui représentent deux paramètres d'intégration. Pour déterminer ces deux paramètres, il suffit, à partir du relevé de $S(t)$, de calculer $E(t)$ puis de tracer $\ln E(t) = f(t)$. La droite de régression des points ainsi obtenue coupe l'axe des ordonnées en E_0 (espérance de vie au temps zéro) et présente une pente égale à α . L'emploi d'un programme simple sur une calculatrice programmable permet alors de tracer la courbe point par point. Ce mode de calcul a été appliqué au cas de la courbe de survie des juvéniles d'Heterodera oryzae (fig. 13). On calcule tout d'abord, pour chaque date, l'espérance de vie et son logarithme (tableau 6). Le tracé de la droite de régression sur le graphique représentant $\ln E(t) = f(t)$ permettent de déterminer $E_0 = 2,524$ semaines et $\alpha = -0,335$ (figure 19). Le tracé point par point de la courbe théorique s'ajuste très bien aux points expérimentaux (fig. 20).

Outre le cas des juvéniles d'Heterodera oryzae, ce second mode de calcul s'adapte bien aux cas des juvéniles de Meloidogyne javanica (fig. 15) et des juvéniles d'Heterodera schachtii (Golden &

TABLEAU 8. Calcul de l'espérance de vie des juvéniles d'Heterodera oryzae

t sem.	S(t)	E(t)	ln E(t)
0	1,000	2,508	0,919
1	0,864	1,824	0,601
2	0,635	1,301	0,263
3	0,348	0,963	-0,038
4	0,147	0,595	-0,519
5	0,014	0,500	-0,693
6	0,000		

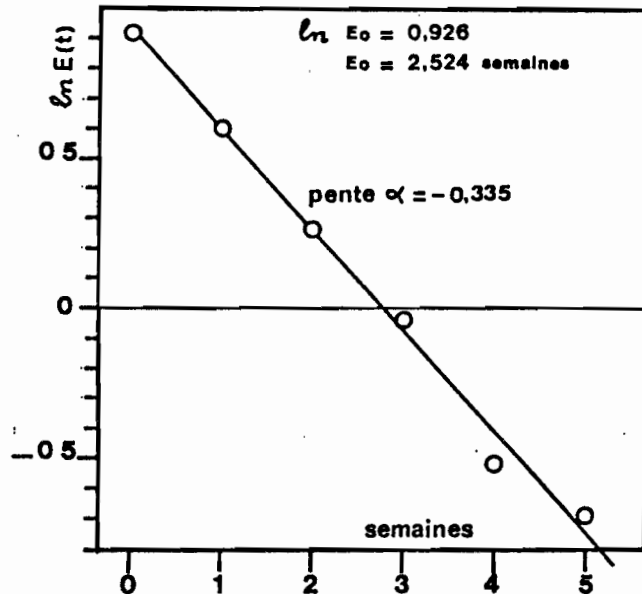


Fig. 19. - Détermination graphique des paramètres E_0 et α de la courbe de survie de Teissier pour les juvéniles d'Heterodera oryzae.

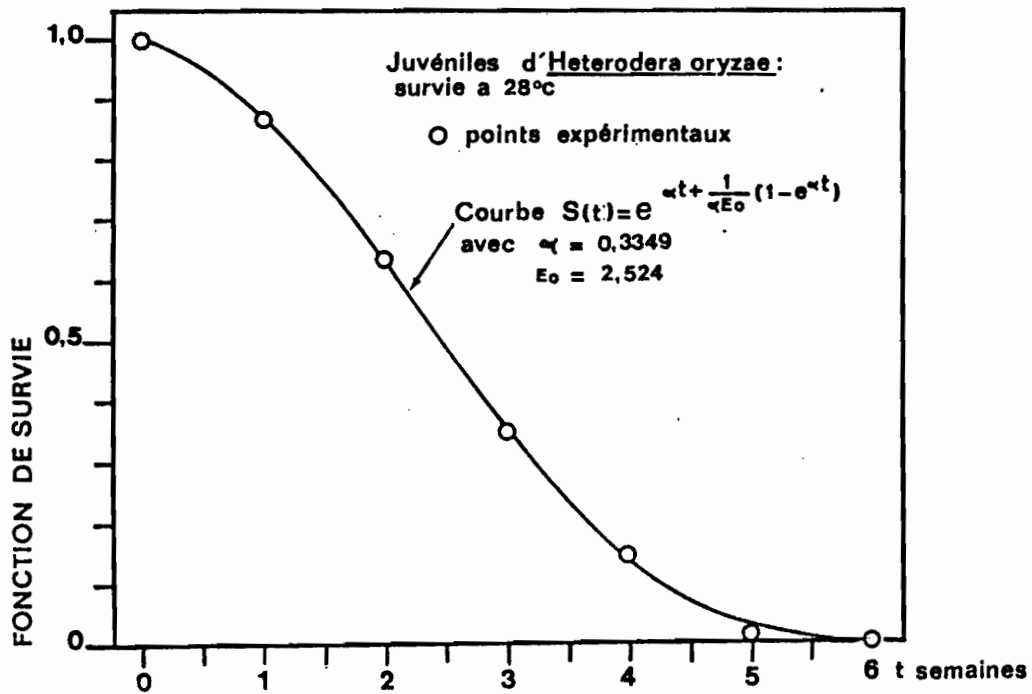


Fig. 20. - Ajustement de la courbe de survie des juvéniles d'Heterodera oryzae (fig. 13) à la loi de Teissier.

Shafer, 1960). Le premier mode de calcul s'adapte mieux au cas des mâles et femelles d'Hirschmanniella spinicaudata (fig. 16). L'interprétation biologique des coefficients $E(o)$ et b impliqués dans le second mode de calcul est simple $E(o)$ est l'espérance de vie initiale tandis que b est la constante de décroissance. Il suffirait maintenant de procéder à d'autres études dans des circonstances différentes (autres espèces, températures différentes, etc...) pour connaître l'influence de différents facteurs sur ces deux paramètres. L'interprétation biologique des coefficients a et b impliqués dans le premier mode de calcul est beaucoup moins évidente : Inagaki (1977), lui même, n'en fournit pas. Cependant ce premier mode semble permettre des ajustements plus souples.

2.4. LA SURVIE DES OEUFS D'HETERODERA ORYZAE EN OSMOBIOSE

2.4.1. Principe de l'étude

Une population d'oeufs de nématodes phytoparasites extraite de kystes ou de masses d'oeufs n'est pas stable. En effet des éclosions ne tardent pas à se produire, qui rompent l'homogénéité de l'échantillon. Ce phénomène rend impossibles des études de moyenne et longue durée sur ces oeufs, tels que des mesures de métabolisme par exemple. Afin de préserver l'homogénéité d'un tel lot d'oeufs, il est nécessaire de recourir à l'inhibition de l'éclosion. Des différents facteurs externes capables d'inhiber réversiblement l'éclosion des oeufs des nématodes phytoparasites, l'emploi de la pression osmotique est expérimentalement l'un des plus commodes.

En plus de la maîtrise de l'emploi des oeufs en groupes, l'étude de l'effet de la pression osmotique sur les oeufs est intéressante parce que l'effet principal d'une solution hyperosmotique est de soustraire de l'eau à l'organisme qui y est plongé, ce qui s'apparente à une contrainte de dessèchement. Grâce au jeu des concentrations, l'intensité de cette contrainte est alors modulable de façon continue.

Il importait d'approfondir l'influence des différents paramètres de cette inhibition (durée, concentration de la substance utilisée, nature de cette substance) sur la conservation des potentialités d'éclosion des oeufs.

Dans cette partie nous verrons d'abord la méthodologie employée puis les éclosions obtenues après une inhibition par la pression osmotique. Dans un premier temps seront étudiées les influences de la durée de l'inhibition, de la concentration de la substance employée et de la nature de cette substance. Dans un deuxième temps on établira une équivalence entre la contrainte osmotique et la contrainte de dessèchement.

2.4.2. Méthodologie

Echantillonnage des masses d'oeufs

Des masses d'oeufs d'Heterodera oryzae sont récupérées à partir de racines de riz inoculées cinq semaines auparavant. Sous la loupe binoculaire on sélectionne les masses d'oeufs intactes et on les débarasse soigneusement du corps de la femelle qui y est accolée. Pour réaliser des échantillons homogènes de masses d'oeufs, on procède par distribution, selon la technique qui a été précédemment employée pour obtenir les résultats du tableau 2.

Inhibition

Dans une boîte de Petri (diamètre 80 mm) sont versés 15 cm³ de la solution testée (épaisseur d'environ 3 mm) et au centre de la boîte est déposé le tamis contenant les masses d'oeufs, préparé précédemment. Chacune de ces boîtes représente une répétition. Les boîtes fermées sont déposées dans des récipients hermétiquement clos, contenant un coton humide destiné à maintenir une humidité saturante, qui sont placés à l'étuve à 28° à l'obscurité.

A côté de cette méthode que l'on peut appeler inhibition par "voie humide" a été employée pour une seule expérience une méthode d'inhibition par "voie sèche" pour laquelle le tamis préparé est

rapidement rincé dans l'eau déminéralisée, puis égoutté sur du papier filtre et enfin déposé dans un fond de boîte de Petri sec dans un récipient. La solution inhibitrice étudiée (50 cm^3) est déposée dans un autre fond de boîte, placé à côté de celui contenant le tamis. Le récipient est hermétiquement clos, puis traité comme le précédent.

Les produits employés dans les expériences sont purs pour analyse et sont dissous dans de l'eau déminéralisée.

Eclosion

Après le temps de séjour requis dans ou à côté de la solution testée, chaque tamis est rincé rapidement dans de l'eau déminéralisée puis replacé dans une boîte de Petri identique contenant 15 cm^3 d'eau déminéralisée qui est alors gardée en récipient fermé, comme pour l'inhibition. A des intervalles de temps réguliers, à partir de ce transfert, le tamis est placé dans une nouvelle boîte identique et les juvéniles éclos sont comptés dans la boîte que le tamis vient de quitter. Chaque tamis représente une répétition. Pour chaque traitement, comprenant une ou plusieurs répétitions, on tient un compte du nombre moyen cumulé des juvéniles éclos, calculé par masse d'oeufs, et dont la représentation graphique en fonction du temps constitue la cinétique d'éclosion (fig. 21). A la date t , comptée en jours à partir du transfert depuis la solution testée jusqu'à l'eau déminéralisée, correspond un nombre d'éclosions cumulées E_t (en particulier à $t = 0$ jour correspond E_0 le nombre des éclosions ayant eu lieu dans la solution testée).

2.4.3. Résultats

2.4.3.1. Influence de la durée de l'inhibition

Au cours d'une première expérience a été testée l'influence des courtes durées d'inhibition. Après quatre, huit, douze et seize jours d'inhibition dans $\text{NaCl } 0,3 \text{ M}$, la cinétique d'éclosion est déterminée avec dix répétitions de 25 masses d'oeufs pour chaque durée. La vitesse d'éclosion augmente avec la durée de l'inhibition : après quatre jours d'inhibition il éclot en deux jours 45 % des juvéniles susceptibles d'éclorre, après seize jours d'inhibition ce chiffre est de 98 % (fig. 22).

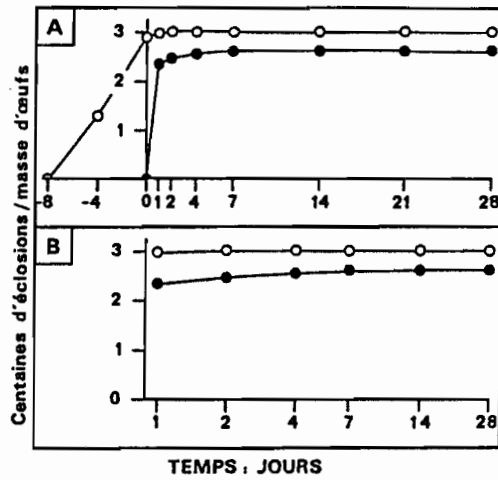


Fig. 21. - Cinétique d'éclosion des masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* dans l'eau déminéralisée, sans inhibition préalable (○) et après une inhibition de 8 jours dans NaCl 0,3 M (●). Représentation avec le temps en échelle arithmétique (A) et en échelle logarithmique (B). (Trois répétitions de 20 masses d'oeufs pour chaque traitement).

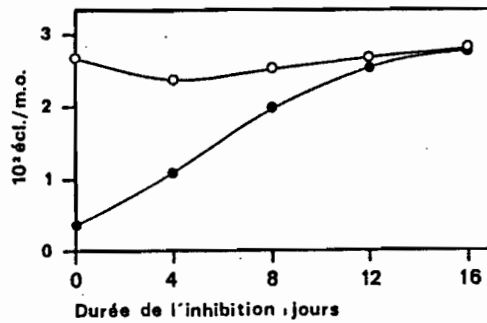


Fig. 22. - Influence de la durée d'une inhibition préalable dans NaCl 0,3 M sur l'éclosion dans l'eau déminéralisée de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* (centaines d'éclosions par masse d'oeufs après 2 jours, ●, et 30 jours, ○ ; 10 répétitions de 25 masses d'oeufs pour chaque durée d'inhibition).

Au cours d'une seconde expérience, vingt boîtes contenant chacune un tamis de dix masses d'oeufs sont garnies de 15 cm^3 de NaCl 0,3 M. Deux semaines après, une première boîte est mise à éclore, puis par la suite, chaque semaine une nouvelle boîte est mise à éclore et la solution inhibitrice des boîtes restantes renouvelée. La figure 23 donne pour chacune de ces boîtes les nombres d'éclosions cumulées à trois jours et à trois semaines. Pour ces derniers, le coefficient de corrélation, égal à 0,35, n'est pas significatif. Dans les limites de temps de cette expérience (21 semaines) la durée de l'inhibition n'altère donc pas la capacité d'éclosion des juvéniles.

2.4.3.2. Influence de la concentration de la substance employée

Au cours d'une première expérience sont testées les concentrations suivantes de NaCl : 0-0,05-0,10-0,15-0,20-0,25-0,30-0,60-1,20 et 2,40 M. Pour chaque concentration sont mises en oeuvre 5 répétitions de 20 masses d'oeufs. Les cinétiques d'éclosion sont déterminées après huit jours d'inhibition. Les nombres d'éclosions au temps zéro, puis après un et vingt huit jours sont reportés sur la figure 24 en fonction de la concentration de NaCl. Ces résultats appellent trois remarques. Tout d'abord l'inhibition, dont l'intensité est matérialisée par le nombre des éclosions survenues au temps zéro, intéresse un pourcentage de plus en plus élevé des oeufs au fur et à mesure que la concentration augmente (fig. 24 A). L'inhibition commence à 0,05 M et est totale à 0,25 M. Par ailleurs, aucune toxicité n'est sensible jusqu'à 0,3 M, puis la survie diminue proportionnellement au logarithme de la concentration de 0,3 à 2,4 M (fig. 24 B). Pour cette dernière concentration, il n'y a pratiquement plus d'éclosion. Enfin la cinétique est rapide jusqu'à 0,3 M : le nombre d'éclosions en vingt quatre heures représente toujours au moins 85 % du nombre des éclosions après vingt huit jours. Par contre pour 0,6 et 1,2 M, les éclosions ne reprennent qu'après un certain délai.

Une seconde expérience avait pour but de déterminer si l'augmentation progressive des concentrations pouvait se révéler moins toxique qu'une augmentation brutale. Cette expérience comprend deux témoins et un essai ; pour chacune de ces trois séries sont étudiées

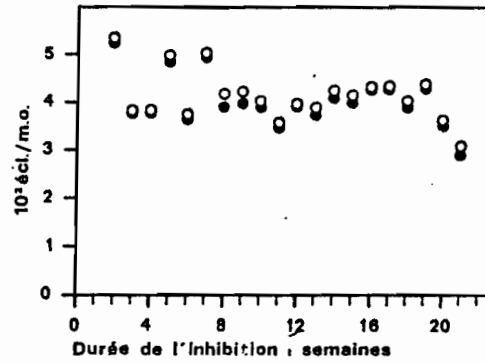


Fig. 23. - Influence de la durée d'une inhibition préalable dans NaCl 0,3 M sur l'éclosion dans l'eau déminéralisée de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* (centaines d'éclosions par masse d'oeufs après 3 jours, ●, et 3 semaines, ○ ; 1 répétition de 10 masses d'oeufs pour chaque durée d'inhibition).

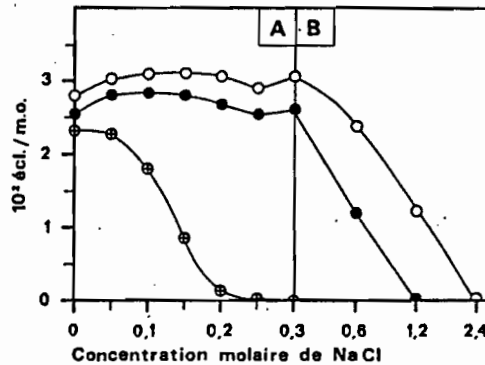


Fig. 24. - Influence de la concentration de la solution inhibitrice de NaCl sur l'éclosion dans l'eau déminéralisée de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après 8 jours d'inhibition préalable (centaines d'éclosions par masse d'oeufs au temps 0, ●; après 1 jour, ○, et 28 jours ○. Cinq répétitions de 20 masses d'oeufs pour chaque concentration. Concentration en échelle arithmétique, A, et logarithmique, B).

4 répétitions de dix masses d'oeufs. Pour l'essai les masses d'oeufs sont placées successivement pendant deux jours dans des solutions de NaCl dont les concentrations croissent selon une progression géométrique : 0,3-0,425-0,6-0,85-1,2 et 1,7 M puis pendant huit jours dans NaCl 2,4 M. Le premier témoin est placé dans NaCl 0,3 M pendant vingt jours et le second témoin dans NaCl 2,4 M pendant vingt jours. Puis les cinétiques d'éclosion dans l'eau déminéralisée sont déterminées pour les trois séries (fig. 25 A). Une expérience identique est menée avec du glycérol (fig. 25 B). Les solutions de concentrations progressives de glycérol sont de 0,71-1-1,71-2-2,83 et 4 M. Le premier témoin est identique à celui de l'expérience avec les concentrations croissantes de NaCl et le second témoin est immergé dans du glycerol 4 M. Ces résultats (fig. 25) comportent trois points intéressants. Tout d'abord, aussi bien pour le sel que pour le glycerol, l'augmentation progressive de la concentration se révèle moins toxique que l'application directe de la concentration la plus élevée. Ensuite il existe une certaine équivalence de la toxicité des deux substances à pression osmotique égale. En effet, l'application directe de glycérol 4 M donne à vingt et un jours 108 éclosions (fig. 25 B) tandis que l'application directe d'une solution 2 M de NaCl (osmotiquement équivalente au glycérol 4 M à cause de la dissociation) donnerait (par extrapolation, fig. 24 B) 42 éclosions à vingt huit jours. Compte tenu des différences expérimentales, ces chiffres sont comparables. Pour les deux substances (et les deux manières, progressive ou directe), les éclosions ne reprennent qu'après un certain délai.

2.4.3.3. Influence de la nature de la substance employée

Deux expériences ont été effectuées. Pour chacune, on été essayées plusieurs substances dont NaCl 0,3M. Chaque substance était employée à une concentration calculée, telle que la pression osmotique de la solution obtenue soit équivalente à NaCl 0,3M. Pour cela on admet une dissociation complète des sels et une activité égale à la concentration (Collis George et Sands, 1962). Par exemple à une solution 0,3M de NaCl sont équivalentes des solutions de 0,2M de Na_2SO_4 ou de MgCl_2 , de 0,3M de BeSO_4 et de 0,6 M de glucose ou d'urée. Pour chaque substance sont mises en oeuvre trois répétitions de vingt masses d'oeufs. Les cinétiques d'éclosion dans l'eau déminéralisée sont mesurées après huit jours d'inhibition.

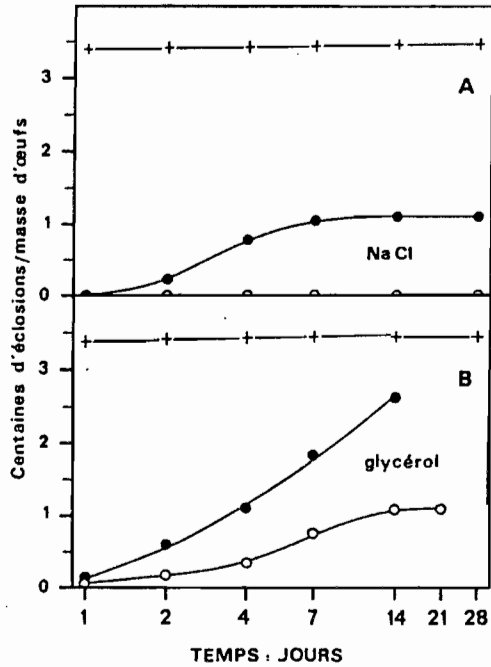


Fig. 25.

- Cinétiques d'éclosion dans l'eau déminéralisée de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après 20 jours d'inhibition dans différentes solutions (4 répétitions de 10 masses d'oeufs par traitement).

A : + : NaCl 0,3 M

○ : NaCl 2,4 M

● : NaCl successivement 2 jours dans 0,3 - 0,42 - 0,6 - 0,85 - 1,2 et 1,7 M puis 8 jours dans 2,4 M.

B : + : NaCl 0,3 M

○ : glycérol 4 M

● : glycérol 4 jours dans 0,71 M puis successivement 2 jours dans 1 - 1,41 - 2 et 2,83 M puis 8 jours dans 4 M.

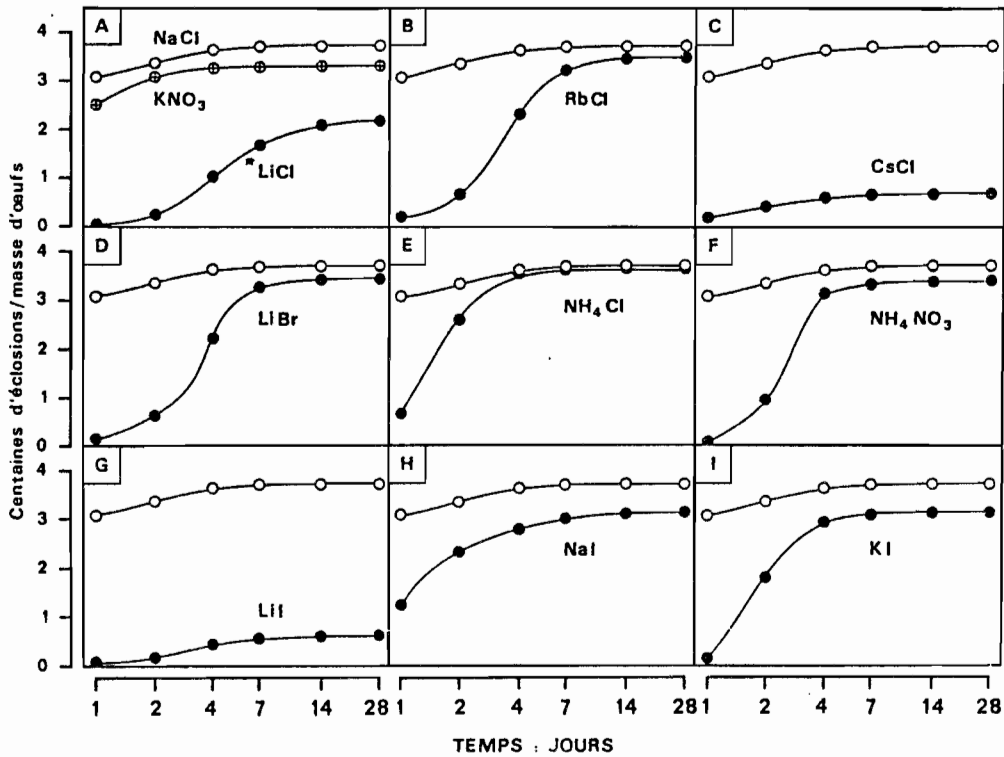


Fig. 26. - Cinétiques d'éclosion dans l'eau déminéralisée de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après une inhibition préalable de 8 jours dans différentes solutions de sel à la concentration de 0,3 M (3 répétitions de 20 masses d'oeufs pour chaque sel).

Au cours de la première expérience ont été testés des sels de métaux alcalins. Pour six d'entre eux (NaCl, NaBr, KCl, Na NO₃, KBr, KNO₃) les cinétiques d'éclosions sont d'allures très voisines. Les cinétiques obtenues avec NaCl et KNO₃ sont données par la fig. 26 A : elles encadrent les cinétiques des quatre autres sels. Les cinétiques obtenues avec les neuf autres sels sont représentées sur la figure 26. Ces cinétiques diffèrent essentiellement de la cinétique obtenue avec NaCl soit par le nombre total des éclosions, inférieur pour CsCl et LiI (fig. 26 C et G) soit par un retard à la reprise des éclosions pour Rb Cl, Li Br, NH₄ Cl, NH₄ NO₃ (fig. 26 B, D, E, F) soit par une combinaison des deux phénomènes pour les autres sels Li Cl, Na I et KI (fig. 26 A, H, I). Pour ce groupe de sels, dont l'effet est représenté dans la figure 26, l'inhibition a été totale (E₀ = 1) dans les solutions testées.

Au cours de la seconde expérience, conduite avec diverses substances minérales ou organiques, on obtient tout d'abord, comme dans la précédente expérience, un groupe de cinq substances pour lesquelles les cinétiques sont très voisines : NaCl, Sr Cl₂, Ca Cl₂, Na₂ SO₄ et saccharose. Les cinétiques obtenues avec NaCl et le saccharose sont données par la figure 27 A : elles encadrent les cinétiques des trois autres substances. Par ailleurs, on observe trois substances pour lesquelles la cinétique d'éclosion est anormale : NaF pour lequel le nombre d'éclosions est très réduit et BeSO₄ et le glycérol pour lesquels un nombre appréciable de juvéniles éclot au cours du séjour dans la solution. Enfin, les cinétiques d'éclosion des sept autres substances (fig. 27) présentent soit un nombre d'éclosions total inférieur, pour la thiourée et l'uréthane (fig. 27 A et B) soit un retard à la reprise des éclosions pour l'urée, le polyéthylène glycol de poids moléculaire 600 (PEG 600), le glucose, MgCl₂ (fig. 27 B, C, D, E) soit une combinaison des deux phénomènes pour BaCl₂ (fig. 27 F). Pour les substances dont les résultats sont donnés par la figure 27 l'inhibition dans les solutions testées a été totale (E₀ = 1), sauf pour l'urée (E₀ = 4).

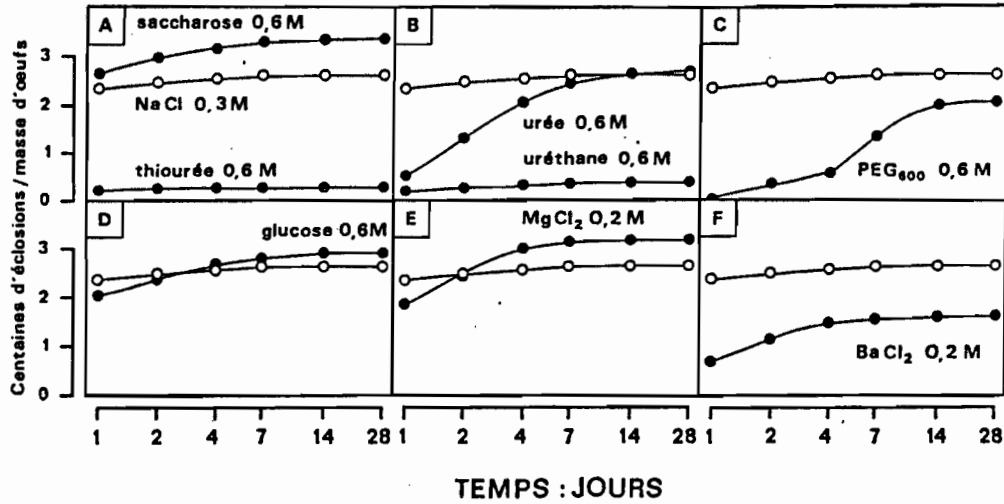


Fig. 27. - Cinétiques d'éclosions dans l'eau déminéralisée de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après une inhibition préalable de 8 jours dans différentes solutions de pressions osmotiques équivalentes à NaCl 0,3 M (3 répétitions de 20 masses d'oeufs pour chaque substance. Le PEG 600 est du polyéthylèneglycol de poids moléculaire égal à 600).

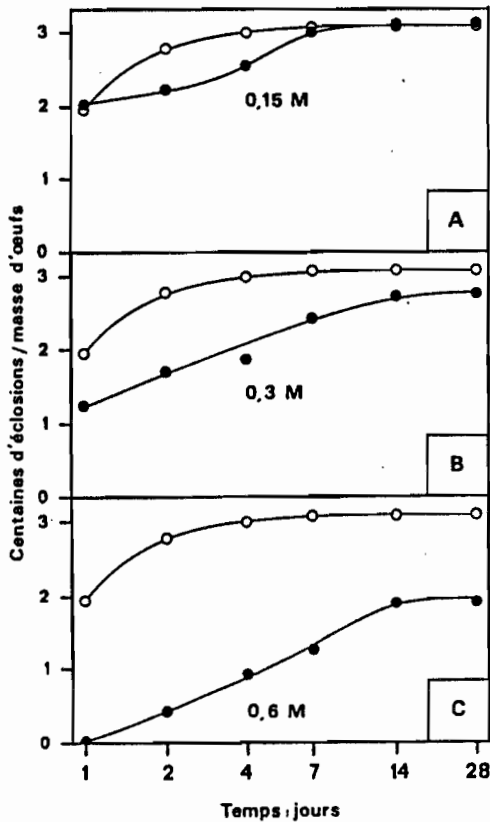


Fig. 28.

- Cinétiques d'éclosions dans l'eau déminéralisée de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après une inhibition préalable de 8 jours par la pression osmotique.

O : Témoin, inhibition par voie humide dans NaCl 0,3 M.

● : Inhibition par voie sèche
 A NaCl 0,15 M (HR = 99,5 %)
 B NaCl 0,3 M (HR = 99 %)
 C NaCl 0,6 M (HR = 98 %)
 (Humidités atmosphériques relatives, HR, calculées d'après Robinson & Stokes, 1949).

2.4.3.4. Influence du dessèchement en atmosphère contrôlée

L'expérience comprend un témoin inhibé dans NaCl 0,3M et trois essais inhibés par "voie sèche" (voir 2.4.2.) en présence respectivement des solutions de NaCl 0,15M - 0,30M et 0,60M. Chacun des quatre traitements comprend cinq répétitions de dix masses d'oeufs et la cinétique est déterminée après huit jours d'inhibition (fig. 28). Les masses d'oeufs traitées par voie sèche brunissent et se rétractent, ce que ne se produit pas par voie humide. L'augmentation de la concentration de 0,15M à 0,6M (fig. 28) diminue le nombre total d'éclosions. Par ailleurs la cinétique d'éclosion se ralentit d'autant plus que la concentration augmente.

2.4.4. Discussion

2.4.4.1. Influence de la durée de l'inhibition

Lorsque des masses d'oeufs sont mises à éclore dans l'eau déminéralisée immédiatement après leur récolte, les éclosions se produisent lentement : en deux jours, il éclot à peine 13 % du nombre maximal d'éclosions (fig. 22). Les oeufs qui n'ont pas éclos n'ont pas achevé leur développement. L'immersion des masses d'oeufs dans NaCl 0,3M inhibe l'éclosion mais non ce développement (Dropkin, et al., 1958 ; Banyer et Fischer, 1971). La fraction des oeufs non développés matérialisée par l'écart existant entre les deux courbes de la figure 22 diminue lorsque augmente la durée de l'inhibition, pour devenir nulle entre douze et seize jours d'inhibition. Cette durée qui peut donc être considérée comme celle nécessaire au développement de l'oeuf est supérieure à la valeur de neuf-onze jours trouvée par Berdon et Merny (1964).

Les longues durées d'inhibition posent le problème de la conservation de la viabilité. Après seize jours d'inhibition (fig. 22) on peut considérer que tous les oeufs, nous venons de le voir, contiennent des juvéniles du second stade prêts à éclore. A partir de cet état, la survie des oeufs d'Heterodera oryzae se poursuit sans dommage apparent

jusqu'à 21 semaines (fig. 23). De la même façon, dans du NaCl 0,3M, on a observé des survies de 51 jours chez les oeufs d'H. rostochiensis (Dropkin et al., 1958) et de 14 semaines chez les oeufs d'H. avenae (Banyer & Fischer, 1971). Comme, dans un milieu dilué, la longévité maximale des juvéniles d'H. oryzae après éclosion est inférieure à 6 semaines (fig. 13), il est évident que le séjour des oeufs dans une solution hyperosmotique ralentit considérablement les processus conduisant à la mort. Nous avons déjà vu (fig. 15) que l'osmobiose à elle seule peut expliquer en partie la prolongation de cette survie. Il serait à présent souhaitable de préciser si la coque de l'oeuf, à elle seule, est susceptible de jouer un rôle analogue.

2.4.4.2. Influence de la concentration de la substance employée

Les résultats concernant l'influence de la concentration de la substance employée permettent une première discussion du mécanisme de l'inhibition de l'éclosion. Chez Meloidogyne et Heterodera l'éclosion est un phénomène actif, en relation avec des mouvements spécifiques que le juvénile effectue à l'intérieur de la coque de l'oeuf (Dropkin, et al., 1958 ; Doncaster et Shepherd, 1967). Chez Meloidogyne, ces mouvements cessent lorsque l'oeuf est placé dans une solution de NaCl 0,3M. Cette inhibition de l'activité initiale du juvénile non éclos serait due à la déshydratation partielle provoquée par le caractère hyperosmotique de la solution (Dropkin, et al., 1958).

Les oeufs d'H. oryzae éclosent dans des solutions de NaCl de concentration inférieure à 0,25M et le nombre d'éclosions cumulées n'a pas atteint un maximum lorsque les masses d'oeufs sont transférées dans l'eau déminéralisée. D'après la quasi linéarité des cinétiques obtenues, il paraît assuré que les éclosions dans ces solutions continueraient au-delà des huit jours. Ces solutions diminuent simplement la vitesse d'éclosion, d'autant plus que la concentration est plus élevée. Wallace (1966a) obtient le même résultat avec les oeufs de Meloidogyne javanica. Ces résultats suggèrent que l'intensité de l'activité des juvéniles non éclos serait modulable de façon continue depuis l'activité normale jusqu'à l'inactivité totale par le jeu de l'état d'hydratation : il n'existerait pas de seuil.

L'application de fortes concentrations de NaCl aux oeufs d'H. oryzae est toxique lorsqu'elle est directe (fig. 24 B) mais cette toxicité est diminuée lorsque la pression osmotique est augmentée progressivement jusqu'aux mêmes valeurs (fig. 25). L'attribution d'un rôle purement osmotique à la solution de NaCl (ou de glycérol) permet d'interpréter ce résultat. La résistance des animaux à l'effet déshydratant de la solution testée impliquerait un mécanisme exigeant un certain délai d'intervention. Celui-ci ne serait assuré que par une augmentation progressive de la concentration. Au titre d'hypothèse de mécanismes possibles, on peut citer la synthèse d'un composé protecteur (Crowe, 1971) ou l'augmentation de la concentration d'acides aminés libres internes (Stoner et Dunham, 1970 ; Weber & Van Marrewijk, 1972). Cette augmentation de la concentration de solutés de faibles poids moléculaires augmente la pression osmotique interne et augmente la rétention d'eau.

Le retard à la reprise des éclosions, manifesté par les masses d'oeufs après leur exposition à de fortes pressions osmotiques, est passible de deux interprétations. La première admet qu'un délai est nécessaire pour permettre la réhydratation des animaux avant que leur activité ne puisse reprendre. La seconde suppose que ces solutions concentrées inhibent non seulement l'éclosion, mais également le développement embryonnaire. L'inhibition levée, le délai permettrait au développement de s'achever, Wallace (1966a) a observé que les concentrations élevées de glycérine inhibent le développement embryonnaire chez Meloidogyne.

Au point de vue théorique il ne devrait pas exister de différence entre les effets de la "voie humide" et ceux de la "voie sèche" pour une même solution testée. Dans les deux cas, l'animal perd de l'eau au profit de la solution testée, directement par voie humide et par l'intermédiaire de la vapeur d'eau atmosphérique par voie sèche. Mais dans les deux cas cette déshydratation se poursuit jusqu'à ce que la pression osmotique du milieu interne de l'animal soit équivalente à celle de la solution testée. La comparaison des résultats obtenus pour les mêmes solutions de NaCl par les deux voies (fig. 28) montre que les

résultats ne sont pas identiques. Pour chacune des concentrations, la voie sèche exerce une contrainte plus forte que la voie humide : l'inhibition est plus forte, le retard à la reprise des éclosions plus prononcé et la toxicité plus élevée. Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence. La première hypothèse suppose que la membrane biologique impliquée dans ce phénomène n'est pas rigoureusement imperméable vis à vis de NaCl. Dans ces conditions, par voie humide, une absorption même faible de NaCl contribuerait à compenser l'effet déshydratant de la solution testée. L'autre hypothèse repose sur la différence de comportement de la masse mucilagineuse de la masse d'oeufs suivant la voie employée, sèche ou humide. Par voie sèche la masse d'oeufs se rétracte et brunit, ce qui ne se produit pas par voie humide. Des transformations identiques lors du dessèchement à l'air de masses d'oeufs de Meloidogyne s'accompagnent de la disparition de pores, d'un diamètre maximum de 500 à 1 000 Å, caractéristiques de la masse mucilagineuse hydratée (Bird et Soeffky, 1972). La masse mucilagineuse ainsi transformée par voie sèche pourrait exercer une contrainte mécanique empêchant la sortie des juvéniles, indépendamment de la contrainte de déshydratation. Lors du retour de la masse d'oeufs dans l'eau déminéralisée, cette contrainte supplémentaire ne cesserait qu'après réhydratation de la masse mucilagineuse, ce qui expliquerait le retard observé lors de la reprise des éclosions (fig. 25). Il convient d'ajouter que l'exercice de cette contrainte ne semble pas s'accompagner d'un isolement complet des oeufs par la masse mucilagineuse. En effet lorsqu'une masse d'oeufs est séparée de la femelle qui l'a émise, la couche de masse mucilagineuse apparaît inexistante au niveau de l'ancien contact avec la femelle, révélant distinctement les oeufs. Les relations chimiques entre les oeufs et le milieu extérieur peuvent donc se faire aussi bien sans intermédiaire qu'à travers la masse mucilagineuse. En négligeant la faible différence des toxicités entre les deux voies on peut conclure que les deux voies ont des effets déshydratants semblables au niveau des oeufs, mais que des transformations de la masse mucilagineuse, propres à la voie sèche, compliquent la reprise des éclosions, lors du retour des masses d'oeufs dans l'eau déminéralisée.

En acceptant le bien fondé de cette équivalence entre la "voie sèche" et la "voie humide" il est intéressant de comparer certains de nos résultats avec ceux de Demeure (1975). Cet auteur, utilisant

exclusivement la "voie sèche" pour étudier la résistance à la sécheresse de Scutellonema cavenessi a en effet établi que la survie à une certaine humidité est meilleure si la déshydratation est graduelle au lieu d'être brutale. D'autre part, un certain retard à la reviviscence se manifeste, d'autant plus marqué que l'intensité du dessèchement a été plus prononcée. Ces résultats sont très semblables à ceux qui ont été obtenus avec H. oryzae et qui ont été discutés précédemment (fig. 24 et fig. 25 - 0,6 et 1,21).

2.4.4.3. Influence de la nature de la substance employée

Les résultats concernant l'influence de la nature de la substance employée autorisent une discussion plus approfondie du mécanisme de l'inhibition, pour lequel un modèle simple peut tout d'abord être défini. Lorsque la masse d'oeufs est plongée dans la solution testée, le soluté diffuse dans les oeufs jusqu'au contact d'une membrane semi perméable au niveau de laquelle la pression osmotique développée par la solution testée crée un appel d'eau aux dépens de la phase aqueuse située au-delà de la membrane. La sortie d'eau continue jusqu'à ce que les pressions osmotiques soient équivalentes de chaque côté de la membrane. La déshydratation partielle ainsi réalisée entraîne l'inhibition de l'éclosion. Après le traitement, lorsque la masse d'oeufs est placée dans l'eau déminéralisée, le soluté s'élimine par diffusion du contact de la membrane. La phase aqueuse située au-delà de la membrane se réhydrate permettant l'activité puis l'éclosion du juvénile. Si ce modèle était conforme à la réalité il ne devrait pas exister de différences entre les formes de cinétiques d'éclosions observées après des traitements par des solutions de substances différentes mais de pressions osmotiques équivalentes. Or ce n'est pas le cas (fig. 26 et 27).

L'origine des différences observées entre les différentes substances peut relever de deux hypothèses, basées sur deux groupes de propriétés : les dimensions de la molécule et ses affinités chimiques avec la membrane.

Aux dimensions de la molécule se rattachent deux paramètres, le coefficient de diffusion pour les substances non ionisées et le rayon ionique pour les substances ionisées. Pour chacune des substances

considérées on peut tenter de mettre en relation l'un de ces paramètres et les données caractéristiques de la courbe d'éclosion. Le coefficient de diffusion, calculé selon Davson et Danielli (1952), n'est pas corrélé avec les caractéristiques de l'éclosion. Par contre il existe une corrélation entre le rayon ionique du cation et les nombres d'éclosions (fig. 29) : on observe un optimum pour les rayons moyens et au minimum pour les rayons extrêmes. On peut en particulier souligner les comportements identiques du cation rubidium (Rb) et du cation ammonium (NH_4) qui ont le même rayon ionique. Cependant ce résultat, ne permet pas encore à lui seul, d'établir un modèle explicatif.

La mise en cause des affinités chimiques des substances testées vis à vis de la membrane impliquée dans ce mécanisme, nous paraît davantage fondée. L'étude de l'action des ions sur les membranes aboutit à l'établissement de séquences où les ions sont rangés dans l'ordre décroissant de leur activité vis-à-vis du phénomène étudié (Diamond et Wright, 1969). Si l'on envisage par exemple le cas des chlorures d'alcalins (fig. 26) la séquence obtenue, vis-à-vis du nombre d'éclosions à vingt huit jours, sera K Na Rb Li Cs. Pour ces cinq métaux, si le calcul prévoit 120 séquences possibles, l'expérience prouve que seules 11 séquences sont effectivement observées (Diamond et Wright, 1969), dont l'une, à l'inversion près de Na et K, est identique à celle obtenue avec H. oryzae. Cette inversion n'est pas conséquente car les chiffres obtenus pour Na et K ne diffèrent pas significativement. La signification chimique de toutes ces séquences n'est pas encore clairement établie. Cependant des séquences très voisines de la nôtre ont été obtenues par Bungeberg de Jong (1949) qui étudiait l'action de ces cinq métaux alcalins sur la floculation de certains phospholipides constituants ordinaires des membranes cellulaires (Davson et Danielli, 1952). Certains ions pourraient donc se fixer sur la membrane cellulaire. Des séquences préférentielles identiques existent également pour les métaux alcalino terreux et les halogènes (Diamond et Wright, 1969).

Les effets des substances non électrolytes vis-à-vis des membranes sont fréquemment en relation avec leur solubilité dans les lipides (Davson et Danielli, 1952). La figure 30 montre que plus une substance présente une valeur élevée de son coefficient de partage

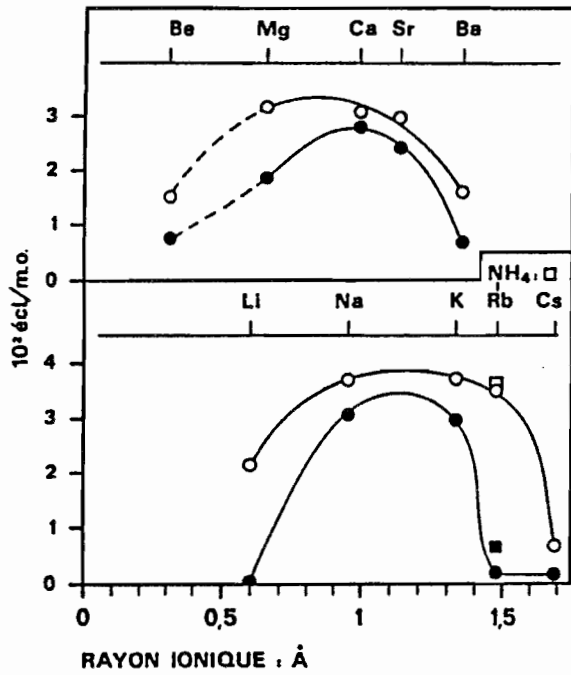


Fig. 29.

- Relation entre l'éclosion dans l'eau de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après 8 jours d'inhibition préalable dans la solution d'une substance organique et le coefficient de partage huile sur eau de cette substance (chiffres tirés en partie de la fig. 27 ; coefficients empruntés à Collander, 1954). Centaines d'éclosions par masse d'oeufs après 1 jour, ●, et 28 jours, ○.

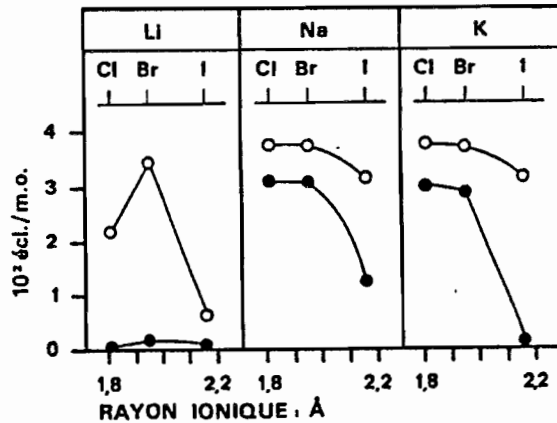
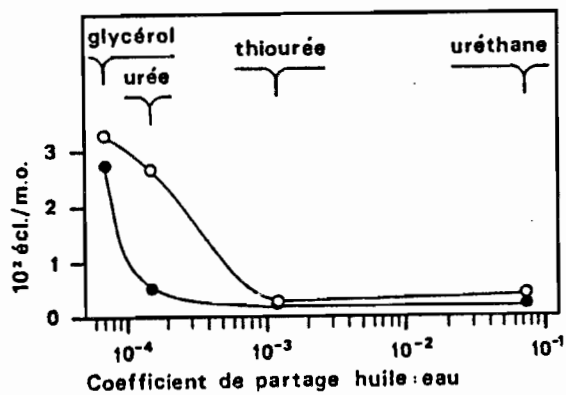


Fig. 30.



- Relation entre l'éclosion dans l'eau de masses d'oeufs d'*Heterodera oryzae* après 8 jours d'inhibition préalable dans la solution d'une substance organique et le coefficient de partage huile sur eau de cette substance (chiffres tirés en partie de la fig. 27 ; coefficients empruntés à Collander, 1954). Centaines d'éclosions par masse d'oeufs après 1 jour, ●, et 28 jours, ○.

huile : eau, plus le retard à la reprise des éclosions est prononcé. La substance se fixerait par dissolution dans la fraction liposoluble de la membrane.

La question se pose enfin de la situation anatomique de la membrane impliquée dans ce processus osmotique. Lorsque la masse d'oeufs est placée dans la solution testée, le premier obstacle rencontré par le soluté au cours de sa diffusion est la coque de l'oeuf dont nous avons vu précédemment la composition. Il est possible que la membrane vitelline soit le siège des phénomènes décrits au cours de cette étude (Dropkin, et al., 1958), mais cette question est actuellement controversée. Clarke et Shepherd (1964) d'après la structure chimique des substances qui stimulent l'éclosion des oeufs d'Heterodera estiment possible leur action directe sur les systèmes enzymatiques responsables de l'activité des juvéniles, elle-même à l'origine de l'éclosion (Doncaster et Shepherd, 1967). Certaines de ces substances ayant des poids moléculaires élevés et des structures différentes, cette hypothèse admet implicitement la perméabilité de toutes les membranes situées entre le milieu externe et le milieu cellulaire du juvénile, et en particulier la perméabilité de cette membrane vitelline. Wallace (1966a) émet l'hypothèse que la membrane vitelline disparaît à l'état précoce, aussitôt après la première mue, sous l'action d'enzymes sécrétés par le juvénile. Dans ces conditions les substances agirait directement sur le juvénile. Seuls des travaux poursuivis à l'aide d'éléments marqués et de molécules organiques marquées pourraient à présent nous permettre de progresser dans l'étude de ce mécanisme de l'inhibition.

2.5. LE POUVOIR INFESTANT DES JUVENILES d'HETERODERA ORYZAE ET DE MELOIDOGYNE JAVANICA

2.5.1. Principe de l'étude

Le pouvoir infestant d'un nématode endoparasite peut être défini comme l'aptitude pour l'animal à pénétrer dans une racine de la plante hôte. Rappelons que chez les nématodes endoparasites, cette pénétration est un préalable indispensable à la nutrition et au

développement. Réciproquement, la présence de ces nématodes dans les racines indique leur aptitude à poursuivre le cycle de développement. Au niveau d'un individu considéré isolément, cette aptitude se traduit qualitativement : mis en présence des racines de la plante hôte l'individu y pénètre ou n'y pénètre pas. A l'échelon d'un groupe d'individus, cette aptitude se traduit par un chiffre : mise en présence des racines de la plante hôte une fraction de ce groupe pénètre dans les racines tandis que la fraction complémentaire du groupe n'y pénètre pas. On définit le pouvoir infestant comme égal au pourcentage du nombre d'animaux ayant pénétré par rapport au nombre d'animaux mis en présence de la plante (inoculum).

Une fois une telle expérience réalisée, la détermination du nombre des animaux qui ont pénétré dans les racines est directe. Pour cela, sous la loupe binoculaire, chaque racine est examinée sur toute sa longueur pour y déceler et compter les nématodes présents. La technique de coloration qui rend les nématodes visibles dans les racines est au point mais l'ensemble des opérations ne permet d'obtenir des résultats reproductibles que si l'on simplifie considérablement les conditions expérimentales :

- Seules de jeunes plantules sont inoculées, ce qui limite le volume des racines à explorer pour les comptages.
- Le temps de contact entre l'inoculum et la plante hôte est limité afin de réduire le développement de la plante.
- La mise en contact entre la plante hôte et l'inoculum est réalisé dans des récipients de faible volume sur un substrat propre, de façon à ce que les racines restent favorables aux comptages.

Au cours de cette étude, nous verrons successivement tout d'abord la méthodologie utilisée, puis nous examinerons les effets de différents facteurs sur le pouvoir infestant. On distinguera l'influence des facteurs externes, celle du jeûne et de l'effet de la compétition.

2.5.2. Méthodologie

Substrat

Les contenants utilisés sont généralement des piluliers en verre de diamètre 30 mm dans lesquels on introduit la plante, un milieu liquide et un support solide constitué par du sable.

La plante peut être introduite soit sous forme de graine ce qui est commode pour le riz soit sous forme de plantule après quelques jours de germination en boîte de Petri, ce qui convient mieux au cas de la tomate ou du kénaf.

Le sable doit être lavé aux acides et fin : des précisions sur l'aspect quantitatif de cette question seront apportées par les résultats des premières expériences. Le milieu liquide est généralement constitué par de l'eau déminéralisée (ou distillée) mais un certain nombre d'expériences ont été réalisées avec des solutions nutritives minérales (Hoagland & Arnon, 1950 ; Yoshida et al., 1959). Le volume global du substrat varie de 1 à 50 ml. La balance à respecter entre le volume de milieu liquide et celui du sable dépend des espèces. Pour les juvéniles d'Heterodera oryzae qui peuvent pénétrer en milieu submergé, le milieu liquide est en excès : une lame d'eau de 5 mm recouvre le sable ; ceci facilite l'entretien au cours de l'expérience. Les juvéniles de Meloidogyne javanica par contre ne sont pas capables de pénétrer en milieu submergé : la pénétration est optimale lorsque le substrat se trouve à la capacité au champ (Wallace, 1966b). Cette condition est facile à réaliser lors de l'installation de l'expérience par des mesures ou des pesées ; par contre au cours de l'expérience, l'arrosage doit juste compenser les pertes, ce qui est plus délicat. On peut facilement venir à bout de ce problème en enfermant les plantes dans des enceintes étanches dont l'ambiance est saturée. On doit alors opérer en lumière artificielle à cause de l'effet de serre développé par de telles enceintes : elles sont en particulier inutilisables dans les serres où sont réalisées les élevages.

Nous verrons plus loin que l'on peut envisager de miniaturiser l'ensemble.

Inoculation

L'obtention des juvéniles infestants a été décrite précédemment pour Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica. L'inoculation se fait en déposant à la pipette un faible volume de suspension contenant le nombre requis de juvéniles, dans les contenants préparés précédemment. Lorsque l'inoculum est important (de 200 à 500 juvéniles) on opère par prélèvement à la pipette d'aliquots au sein d'une suspension maintenue homogène par un bullage d'air réalisé à l'aide d'une pompe à aquarium. Les faibles inoculums (de 25 à 100 juvéniles) sont réalisés par pipetage individuel sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une pipette Pasteur raccordée à un tuyau souple dans lequel on aspire avec la bouche. Une variante consiste à réaliser l'addition de la plante et du substrat solide dans le contenant où est déjà déposé l'inoculum en suspension dans le milieu liquide. Le sable est versé en pluie saturant peu à peu le milieu liquide ; de cette façon on obtient une répartition uniforme de l'inoculum au sein du substrat solide. Après l'inoculation les contenants sont gardés pendant le temps de contact requis en assurant aux plantes des conditions physiologiques les plus normales possibles (arrosage, température, lumière, etc...). La durée du contact entre l'inoculum et la plante dépend de l'étude réalisée, nous verrons lors de la description des expériences réalisées qu'elle varie de un à quinze jours.

Comptage des pénétrations

Au terme du temps de contact requis, on récupère la plante dans chaque contenant à l'aide d'un lavage soigneux par l'eau : il faut évidemment veiller à ne pas perdre la moindre fraction de racines à cette occasion. La fraction de l'inoculum qui n'a pas pénétré dans les racines est éliminée lors du lavage. Les grains de sable qui adhèrent aux racines sont détachés par un tamponnement délicat à l'aide d'un pinceau sur les racines étalées à plat dans une boîte de Petri pleine d'eau.

La fixation et la coloration sont réalisées à l'aide de la méthode de de Guiran (1966). Pour cela dans des tubes ou des piluliers en verre sont introduits, suivant le volume des racines de chaque plantule, de 5 à

25 ml de lactophénoL blanc (en volumes : phénoL : 1 ; acide lactique : 1 ; glycéroL : 2 ; eau : 1). Sur une plaque chauffante, le lactophénoL de chaque récipient est amené à la préébullition. La partie aérienne de chaque plantule récupérée précédemment est coupée en laissant subsister une longueur de tige qui permet la manipulation. L'excès d'eau présent sur les racines est éliminé en passant légèrement le système racinaire sur un papier filtre et l'ensemble est plongé dans le lactophénoL à la préébullition. A cette température (150°), les animaux sont tués instantanément à leur place. Les contenants sont replacés sur la plaque chauffante. On laisse l'ébullition se poursuivre pendant deux minutes et les contenants sont mis à refroidir. On note alors que ce traitement a rendu les racines transparentes. Après refroidissement complet on ajoute dans chaque contenant un volume de lactophénoL à 0,05 % de bleu coton de façon à ce que la concentration finale de colorant soit de 0,003 %. A la température ambiante, en une dizaine de jours, on observe une intense coloration bleue des nématodes présents dans les racines alors que les racines restent transparentes. Le système racinaire d'une plantule est alors étalé sur une plaque de verre épais (9 cm x 15 cm x 5 mm) et chaque racine est détachée du collet puis étalée soigneusement sur un lit de lactophénoL. Une seconde plaque de verre indentique est déposée sur la première et les deux plaques sont serrées ensemble par deux pinces. Le montage est placé sous la loupe binoculaire et chaque racine est explorée sur toute sa longueur. Il est commode de repérer chaque nématode trouvé à l'aide d'une marque de feutre et de ne réaliser le comptage qu'après. Ainsi on peut opérer des vérifications. Dans certains cas l'accumulation de nématodes en un même point de la racine rend le comptage difficile. On peut alors opérer une pression entre deux doigts des plaques de verre à cet endroit qui écrase la racine, étale les nématodes et parfois les chasse dans le film de lactophénoL qui existe entre les deux plaques de verre. En général cette intervention suffit à rendre le comptage possible. Sinon il faut défaire le montage et disséquer la racine sous la loupe binoculaire dans un bain au lactophénoL.

Les causes d'échec sont nombreuses et leurs symptômes assez caractéristiques. La plupart interviennent lors de la fixation. Des racines blanches opaques indiquent que le temps d'ébullition n'a pas été suffisant. Des racines brillantes révèlent la présence de bulles d'air emprisonnées : ceci se produit lorsque l'on attend trop longtemps entre

le moment où l'on sort les racines de l'eau et le moment où on les plonge dans le lactophénol. Des racines colorées en bleu foncé, rendant les nématodes indistincts, prouvent que l'addition de la solution concentrée de colorant a été effectué avant un refroidissement complet. Des nématodes très peu colorés indiquent dans le cas des stades renflés une ébullition trop longue : les cuticules se sont vidées de la substance colorable. D'autres causes d'échec dépendent d'infections fongiques et bactériennes qui se développent soit avant l'inoculation, soit au cours du temps de contact entre l'inoculum et la plante. Ces infections se traduisent par une opacification des racines (couleurs brune ou verte des zones subérisées ou sénescents, colorées par le bleu coton) ou un réseau dense de filaments colorés intensément en bleu (mycelium). Ce genre d'accident intervient en série dans un laboratoire : une source de contamination existe donc dans l'ensemble du matériel utilisé. Le mieux dans ce cas est de réaliser toutes les désinfections préalables possibles : les contenants après préparation (donc avec le sable et le milieu liquide), sont stérilisés à l'autoclave humide, les graines décortiquées sont trempées pendant une demi heure dans de l'hypochlorite de calcium à 1 %, la purification des nématodes se fait par centrifugation dans l'eau stérile, etc...

2.5.3. Résultats

2.5.3.1. Influence des facteurs externes sur le pouvoir infestant

Granulométrie du sable

Les nématodes se déplacent dans les interstices qui séparent les particules de sol. La taille de ces interstices augmente avec la taille des particules et le déplacement n'est optimal que dans un certain intervalle de taille de ces interstices (Wallace, 1963). Pour déterminer les conditions les plus favorables à la pénétration, le sable disponible a été fractionné, par passage à travers des tamis métalliques, garnis de toile d'acier inoxydable, en sept catégories granulométriques. Les dimensions des mailles de ces tamis croissent en progression géométrique de raison 1,6 : en microns ces mailles sont de 100, 160, 250, 400, 630, 1000, 1600. Du riz Moroberekan a été repiqué dans des tubes à

hémolyse garnis d'eau et de sable tamisé (20 répétitions pour chaque classe granulométrique). Deux expériences identiques ont été réalisées : l'une avec des juvéniles d'Heterodera oryzae (longueur moyenne : 450 µm), l'autre avec des juvéniles d'Hirschmanniella spinicaudata (longueur moyenne : 800 µm). Les résultats, observés après neuf jours de contact (fig. 31), montrent qu'il existe une classe granulométrique optimale pour chacun des deux types de juvéniles. Dans les deux cas, le rapport existant entre la longueur du juvénile et la dimension moyenne des particules de la classe granulométrique optimale est d'environ 3,5-3,8. Cette constante traduit probablement une relation géométrique, résultant de la nécessité pour le nématode, de disposer d'appuis multiples pour le déplacement, ou l'acte de pénétration lui-même.

De plus les classes granulométriques inférieures à la classe optimales permettent également une bonne pénétration. On peut donc rassembler ces résultats en disant qu'un sable fin, de granulométrie inférieure à 250 µm, donne une pénétration optimale. Une autre expérience a permis de montrer qu'il n'est pas indispensable d'employer du sable fin à l'état pur. Par tamisage, on prépare un lot de sable fin (inférieur à 250 µm), et un lot de sable grossier (supérieur à 250 µm). Puis on réalise des mélanges des deux lots, de richesse croissante en sable fin : 0 - 10 - 20 - 30 et 100 % en fraction pondérale. Une expérience de pénétration réalisée avec ces mélanges montre qu'à partir de 30 % de sable fin, le mélange donne une pénétration aussi bonne que le sable fin (fig. 32). Il est probable que le sable fin remplit les interstices entre les grains de dimension supérieure permettant ainsi la continuité du déplacement des nématodes.

Cinétique de pénétration des juvéniles d'*Heterodera oryzae*

On inocule des piluliers contenant une plantule de riz morobérékan avec 500 juvéniles par pilulier. Aux dates un, deux, cinq, onze et seize jours après l'inoculation, vingt piluliers sont prélevés et les racines sont fixées et colorées. Le nombre moyen des pénétrations observées par plant croît régulièrement (fig. 33). A la date de seize jours, le développement de certains animaux est très avancé : il s'agit pratiquement de femelles blanches et le risque existe désormais d'une

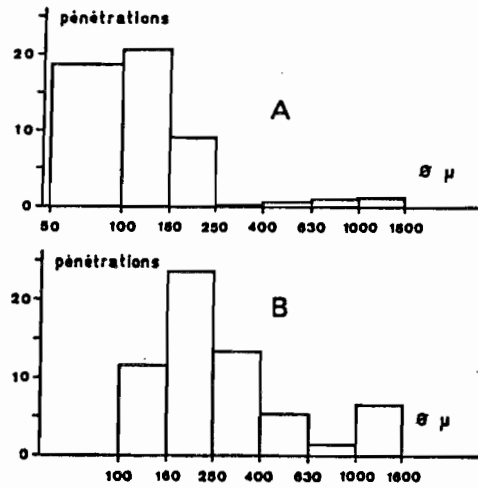


Fig. 31. - Influence de la granulométrie du substrat sur la pénétration des nématodes dans les racines du riz (Abscisses : diamètre des particules en μ m sur une échelle logarithmique ; ordonnées : nombre de juvéniles pénétrés par plant).
 A : Juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Inoculum : 300 ; 20 répétitions)
 B : Juvéniles d'*Hirschmanniella spicicaudata* (Inoculum : 300 ; 20 répétitions)

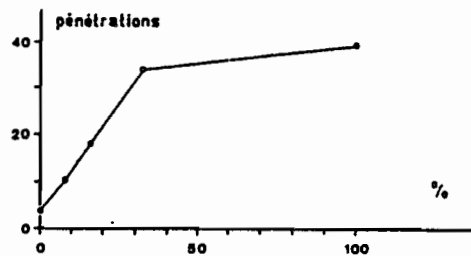


Fig. 32. - Influence de la granulométrie du substrat sur la pénétration des juvéniles d'*Heterodera oryzae* dans les racines du riz (Abscisses : pourcentage pondéral de la fraction fine de sable, inférieure à 250 μ m, présente dans le substrat ; ordonnées : nombre de juvéniles pénétrés par plant ; inoculum : 500 ; 25 répétitions par point).

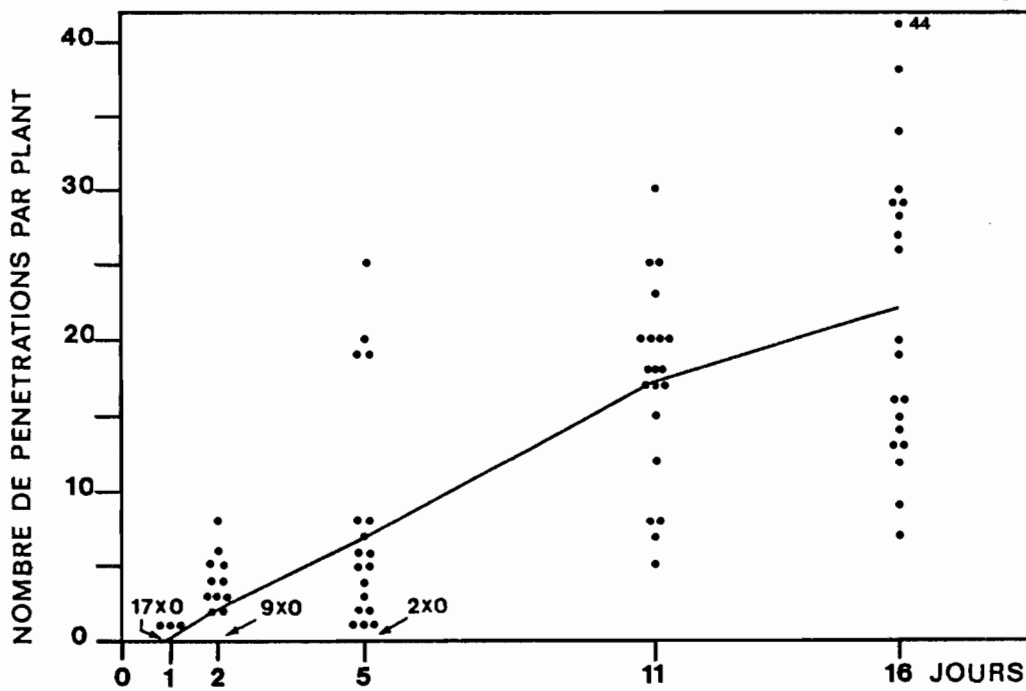


Fig. 33. - Cinétique de pénétration des juvéniles d'*Heterodera oryzae* dans les racines du riz Morobérékan (Inoculum : 500 ; 20 répétitions pour chaque date ; la ligne continue joint les moyennes).

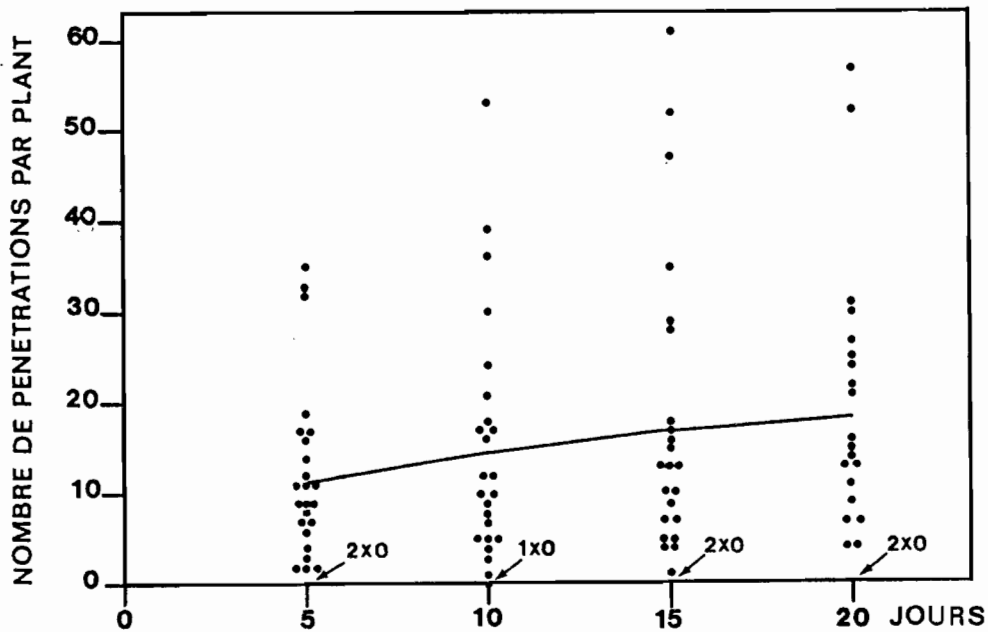


Fig. 34. - Effet de l'âge de la plante de riz (au moment de l'inoculation) sur la pénétration des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Inoculum : 300 ; 25 répétitions pour chaque âge ; la ligne continue joint les moyennes).

infestation secondaire par les descendants des premiers animaux pénétrés. On préfère donc limiter à deux semaines au maximum le temps de contact entre l'inoculum et la plante hôte. On prendra même pratiquement des périodes plus courtes, de l'ordre de neuf jours, mais il faut admettre que la pénétration,, chez cette espèce, est très étalée dans le temps.

Effet de l'âge de la plante hôte sur l'infestation

Quatre lots de graines de riz Morobérékan sont mis à germer à des intervalles de cinq jours. Cinq jours après la mise en germination, chaque lot est repiqué en pilulier. Lors du repiquage du dernier lot, chacun des piluliers est inoculé avec 300 juvéniles d'Heterodera oryzae (25 répétitions pour chaque âge de plante). Après neuf jours de temps de contact, les nombres de pénétrations croissent très lentement avec l'âge initial des plantes (fig. 34).

Pénétration en petits contenants

On peut penser que la distance moyenne qui sépare le lieu de dépôt de l'inoculum d'un site favorable à la pénétration est un facteur limitant. Cette distance peut être réduite en limitant le volume de substrat et en adoptant une disposition linéaire correspondant à la structure normale d'un système racinaire. Pour cela on utilise des nacelles en matière plastique à section semi circulaire (d'un diamètre de 8 mm) et d'environ dix centimètres de longueur (fig. 35). Le volume de substrat (sable et liquide) est réduit à deux ml, ce qui oblige, à cause de l'évaporation, à enfermer la nacelle dans une enceinte étanche transparente. Les plantules de tomates Roma, sont obtenues par le procédé de Mc Clure et Robertson (1973), qui consiste à placer les graines entre deux feuilles de papier filtre, à rouler ces feuilles et à placer ce rouleau verticalement dans un béccher contenant de l'eau. On obtient ainsi des plantules dont la racine séminale est dans le prolongement de la tige et que l'on peut coucher dans la nacelle, dans le milieu liquide, avant d'ajouter le sable en pluie. Avec ce dispositif, la cinétique de pénétration des juvéniles de Meloidogyne javanica se révèle rapide et le pourcentage de pénétration obtenu est très élevé, de l'ordre de 80 % en moyenne (fig. 36). Notons qu'entre six et huit jours, le nombre des

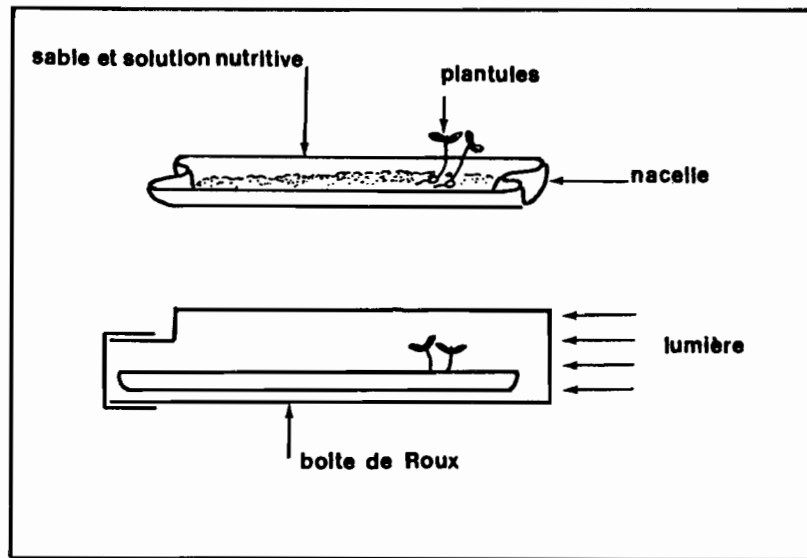


Fig. 35. - Représentation schématique du dispositif employé pour l'étude de la pénétration dans de faibles volumes de substrat, en nacelle.

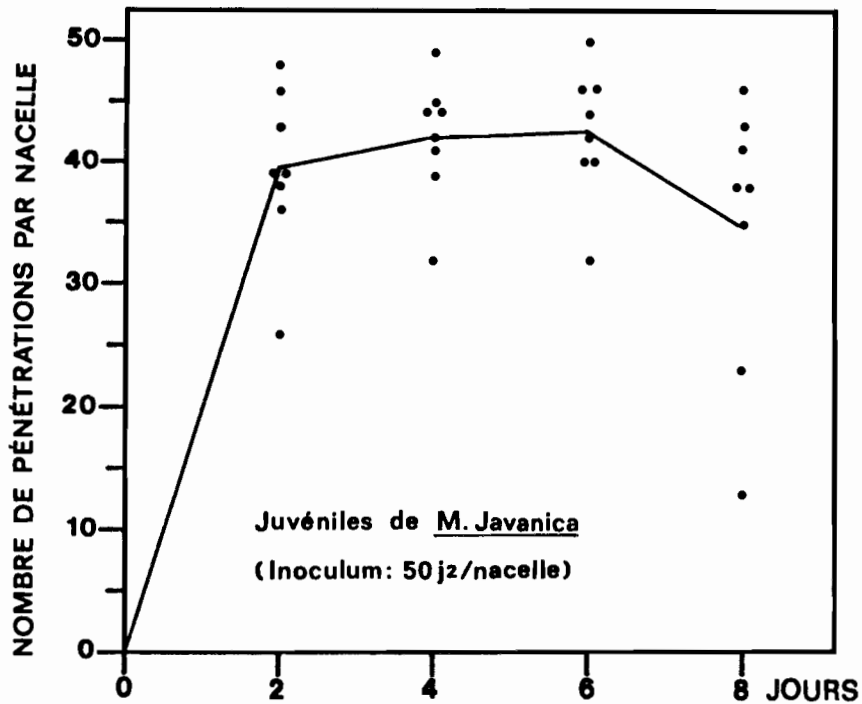


Fig. 36. - Cinétique de pénétration des juvéniles de *Meloidogyne javanica* dans les racines de la tomate Roma (2 plantules par nacelles ; 8 répétitions par date ; la ligne continue joint les moyennes).

animaux pénétrés diminue. Ce phénomène a déjà été observé par de Guiran (1960) lors de pénétrations dans des hôtes défavorables : les juvéniles qui n'ont pas réussi à établir un site nutritif quittent la racine. On peut admettre que les plantes cultivées dans ces conditions et qui subissent un certain étiolement, ne représentent pas, bien qu'elles soient de la variété Roma très sensible, un hôte très favorable. Cependant cette technique des nacelles, à condition de limiter le temps de contact à six jours, reste très utile pour tester le pouvoir infestant d'un inoculum. Notons enfin qu'en nacelle le substrat est submergé et que si l'on tente la même expérience en pilulier, on n'observe aucune pénétration. En fait, c'est l'extrême minceur du substrat en nacelle (2 ou 3 mm) qui permet l'aération dont ont besoin les racines de tomate et les juvéniles de Meloidogyne javanica.

2.5.3.2. Influence de la durée du jeûne sur le pouvoir infestant

Juvéniles d'*Heterodera oryzae*

Au cours de l'expérience qui a permis la détermination de la courbe de survie des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (fig. 13) a également été mesurée la variation du pouvoir infestant. Pour cela, chaque semaine, un lot de graines de riz Morobérékan est mis à germer pour être repiqué après cinq jours, le jour même de l'inoculation. On utilise des tubes à essai de 18 x 180 et on repique dans chaque tube cinq plantules. Ceci est destiné à favoriser la pénétration en augmentant la densité des racines. On inocule 100 juvéniles par tube et la coloration est effectuée neuf jours après l'inoculation. Le pouvoir infestant (fig. 37), d'une valeur initiale de 52 %, augmente tout d'abord pour atteindre 62 % à la fin de la première semaine, puis décroît ensuite régulièrement. A l'âge de cinq semaines, dernière date à laquelle on obtient encore des juvéniles vivants, il est encore égal à 1,5 %. Cette augmentation du pouvoir infestant au cours de la première semaine de survie a déjà été observée pour la même espèce par Cadet et al., (1975) et au cours d'autres expériences non publiées. Les résultats bruts de cette courbe peuvent être exploités en tenant compte de la considération suivante : on inocule chaque semaine que les juvéniles survivants, ceux

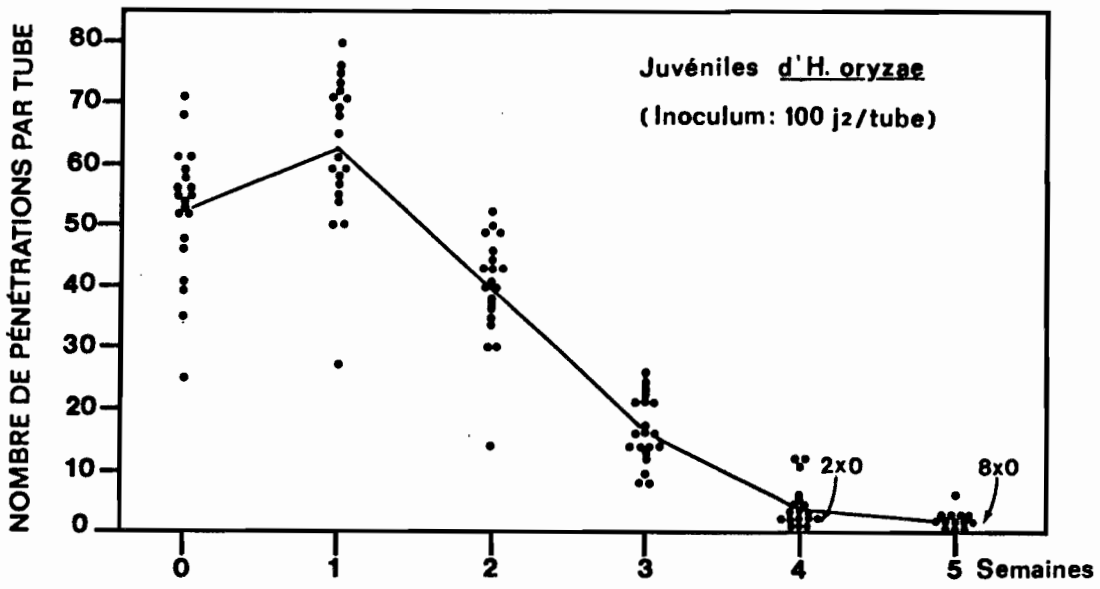


Fig. 37. - Effet de la durée du jeûne sur le pouvoir infestant des juvéniles survivants d'*Heterodera oryzae* (5 plantules de riz Morobérékan par tube ; 20 répétitions par âge ; la ligne continue joint les moyennes).

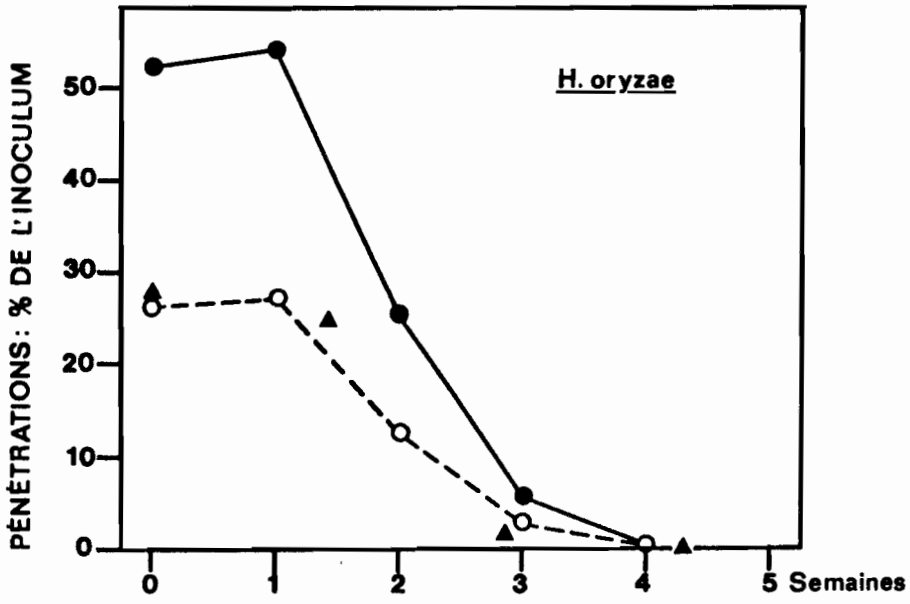


Fig. 38. - Effet de la durée du jeûne sur les juvéniles d'*Heterodera oryzae* : paramètres calculés.
 ● : pourcentage de juvéniles infestants dans une population ; obtenu en multipliant pour chaque âge, le taux de survivants (fig. 13) par le pouvoir infestant des juvéniles survivants (fig. 37).
 ○ : pourcentage théorique de femelles que l'on obtiendrait à partir des juvéniles précédents en admettant que tous se développent en adultes et que l'indice andrique soit égal à 1.
 ▲ : pourcentage de femelles obtenu au cours d'une expérience de survie des juvéniles dans du sol humide par Meryn (1972).

qui ont passé avec succès le test de survie. Si l'on veut obtenir l'évolution du pouvoir infestant d'une population, il faut, pour chaque date, effectuer le produit du pourcentage de survivants (fig. 13) par le pouvoir infestant (fig. 37). Le paramètre ainsi obtenu se maintient à plus de 50 % pendant la première semaine, pour décroître ensuite rapidement et devenir pratiquement nul à quatre semaines (fig. 38 : cercles noirs).

Juvéniles de *Meloidogyne javanica*

Deux expériences ont été réalisées.

Au cours de la première expérience a été employée la technique des nacelles (voir fig. 35). Dans 48 nacelles on dépose, à la micropipette, 50 juvéniles de *M. javanica* fraîchement éclos dans environ 0,25 ml d'eau. On rajoute 0,5 ml de sable fin lavé en étalant le dépôt de façon à ce que l'épaisseur du substrat soit faible, de l'ordre de deux mm, afin de favoriser l'aération. Quarante de ces nacelles sont placées dans un récipient étanche à l'ambiance saturée d'eau, à l'obscurité, à 28°.

Dans les huit nacelles restantes sont couchées deux plantules de tomate Roma, mises à germer depuis trois jours, selon la technique précédemment décrite. On rajoute alors concomitamment, d'une part 1,5 ml de sable fin, pour couvrir les racines et, d'autre part à l'aide d'un compte goutte, l'eau nécessaire pour amener le substrat à la capacité au champ. Puis chacune des huit nacelles est enfermée dans un récipient transparent étanche et placé horizontalement en salle de culture (28° ; 12 h d'obscurité/12 h d'éclairage). Six jours après, les racines sont fixées et colorées, puis les juvéniles qui ont pénétré sont dénombrés. Par la suite, chaque semaine, un nouveau lot de huit nacelles est prélevé parmi les nacelles restantes, et soumis au même traitement.

Les résultats des comptages sont portés sur la figure 39. Le pouvoir infestant, qui est de 89 % au temps zéro, décroît rapidement pour n'être plus que de 0,5 % à quatre semaines. A cinq semaines on n'observe plus aucune pénétration.

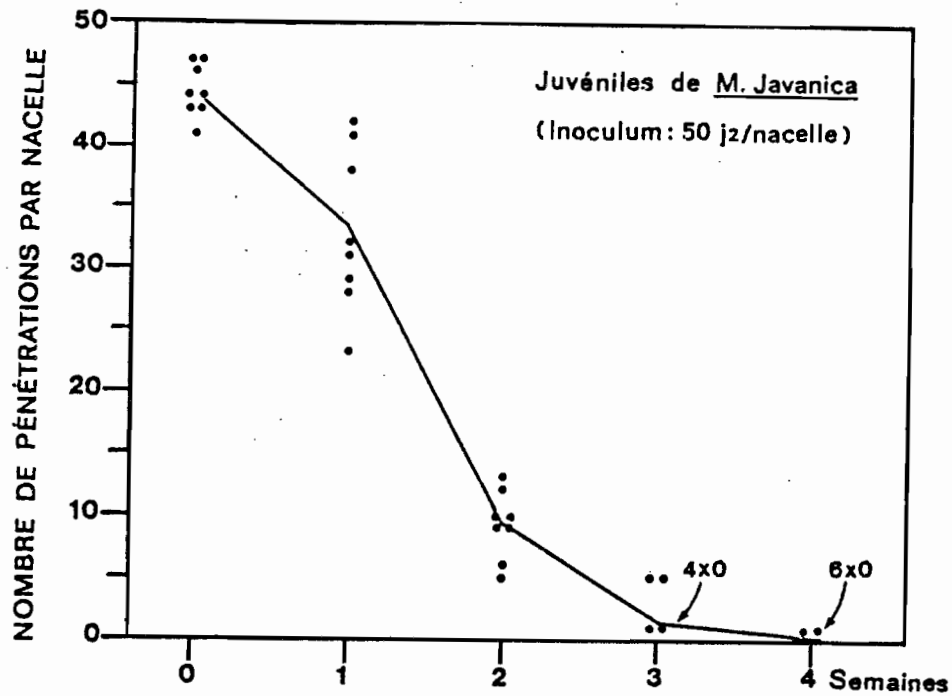


Fig. 39. - Effet de la durée du jeûne sur le pouvoir infestant d'une population de juvéniles de *Meloidogyne javanica* (2 plantules de tomate Roma par nacelle ; 6 jours de contact ; 8 répétitions par date ; la ligne continue joint les moyennes).

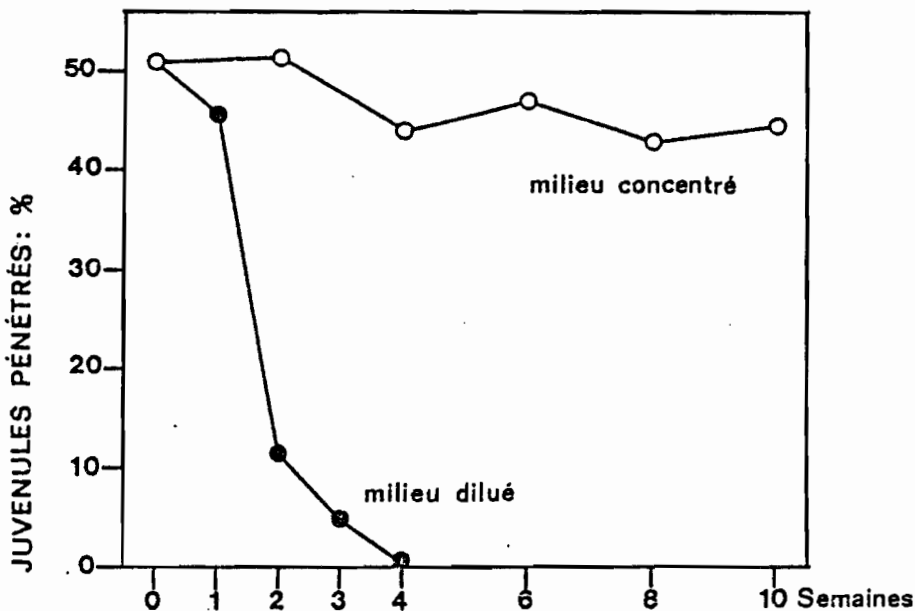


Fig. 40. - Effet de la durée du jeûne en milieu dilué (●) et en milieu concentré (○) sur le pouvoir infestant d'une population de juvéniles de *Meloidogyne javanica* (1 plantule de kénaf et 100 juvéniles par pilulier ; 6 jours de contact ; 16 répétitions par point).

Au cours de la seconde expérience, les juvéniles à inoculer sont prélevés parmi ceux qui ont passé avec succès le test de survie au cours de l'expérience comparative survie en milieu dilué/survie en milieu concentré (fig. 15). Comme substrat d'inoculation on utilise des plantules d'Hibiscus cannabinus repiquées sur sable fin, humidifié à la capacité au champ, en pilulier de 10 ml. Chaque pilulier reçoit 100 juvéniles, prélevés sous la loupe à l'aide d'une micropipette, et déposés dans un faible volume d'eau à la surface du sable. Pour chacune des deux séries, milieu dilué ou milieu concentré, il y avait cinq durées de conservations (0-1-2-3- et 4 semaines pour le milieu dilué et 2-4-6-8 et 10 semaines pour le milieu concentré). Pour chacun de ces dix points il y avait 16 répétitions. Après l'inoculation, les piluliers, étaient conservés dans la chambre de culture, et six jours après, les systèmes racinaires étaient extraits et colorés. Une fois effectué le décompte des juvéniles qui ont pénétré, le pouvoir infestant de l'inoculum a été obtenu en multipliant pour chaque durée, le pourcentage de pénétration par le pourcentage de survie (fig. 15). L'évolution du pouvoir infestant des juvéniles de M. javanica est donnée par la figure 40. D'une valeur initiale de 51 %, ce pouvoir infestant décroît brutalement en milieu dilué pour n'être plus que de 1 % à quatre semaines. Par contre le pouvoir infestant des juvéniles maintenus en milieu concentré se maintient à sa valeur initiale.

2.5.3.3. Compétition à l'infestation

Les études que nous venons de décrire, sur l'infestation des racines par les juvéniles, ont été réalisées avec un inoculum homogène (une seule espèce et des individus dans des conditions physiologiques identiques). Les résultats obtenus montrent que le pouvoir infestant d'un inoculum est toujours inférieur à 100 %. Ceci suggère, entre autres hypothèses, que les sites favorables à la pénétration sur les racines sont limités en nombre et que les différents individus de l'inoculum sont en compétition pour leur conquête. Dans ces conditions, il était intéressant de prévoir des expériences dans lesquelles l'inoculum serait composé de deux catégories de juvéniles qualitativement différentes, de façon à déterminer si l'une d'elles présentait un pouvoir infestant

différent de celui de l'autre. On se donnait ainsi la possibilité de déterminer plus facilement les caractéristiques physiologiques corrélatives d'un fort ou d'un faible pouvoir infestant. Les résultats d'une expérience réalisée avec un tel inoculum composite ne sont exploitables que si l'on dispose d'un critère qualitatif permettant d'identifier dans les racines, après coloration, les individus appartenant à l'une ou l'autre catégorie. Cette identification peut reposer sur l'apparence de la réponse histopathologique de l'hôte, comme dans le couple Meloidogyne hapla/Heterodera schachtii (Jatala & Jensen, 1976) ou sur l'aspect morphologique du stade infestant comme dans le couple Meloidogyne incognita/Pratylenchus penetrans (Turner & Chapman, 1972). Ces critères font défaut pour des espèces du même genre ou des races ou pathotypes de la même espèce : on doit alors envisager l'utilisation du marquage par isotope radioactif.

En collaboration avec J.F. Bois, nous avons mis au point une méthode de marquage des juvéniles d'Heterodera oryzae et d'H. sacchari par le soufre radioactif ^{35}S , ainsi qu'une méthode de détection par autoradiographie de ces juvéniles marqués, après leur pénétration dans les racines. Ces méthodes sont décrites en détail dans l'annexe 1. A partir du produit de ces élevages marqués ou non marqués, consistant en masses d'oeufs et en kystes, nous avons pu obtenir, après éclosion dans l'eau pendant quatre jours, six variétés de juvéniles.

HO M - juvéniles d'H. oryzae, issus de masses d'oeufs, non marqués
 HO M* - juvéniles d'H. oryzae, issus de masses d'oeufs, marqués
 HO K - juvéniles d'H. oryzae, issus de kystes, non marqués
 HO K* - juvéniles d'H. oryzae, issus de kystes, marqués
 HS - juvéniles d'H. sacchari (issus de kystes), non marqués
 HS* - juvéniles d'H. sacchari (issus de kystes), marqués.

Dans deux séries de dix tubes à essais contenant cinq plantules de riz Morobérékan âgées de quatre jours, on introduit par tube : 500 juvéniles HO M et 500 juvéniles HS* (série directe) et 500 juvéniles HO M* et 500 juvéniles HS (série réciproque). De la même façon, dans deux autres séries de 10 tubes identiques, on introduit par tube 300 juvéniles HO M et 300 juvéniles HO K* (série directe) et 300 juvéniles HO M* et 300 juvéniles HO K (série réciproque).

Neuf jours après l'inoculation, les systèmes racinaires de chacun des 40 tubes sont colorés par le lactophénol bleu coton (De Guiran, 1966). Pour chacune des quatre séries, on dissèque les racines, sous la loupe binoculaire, en récupérant tous les juvéniles, colorés en bleu, présents dans les racines. Leur marquage est ensuite déterminé par autoradiographie (voir Annexe 1).

Compétition à l'infestation entre les deux espèces (tableau 7)

Dans les deux expériences, directes et réciproque, les pourcentages sont équivalents pour chaque espèce : 68-73 % pour H. sacchari et 27-32 % pour H. oryzae, et ces deux pourcentages diffèrent significativement de 50 %.

Compétition à l'infestation entre les deux types de juvéniles d'Heterodera oryzae (tableau 8)

Dans les deux expériences, directes et réciproque, les pourcentages sont identiques pour les deux types de juvéniles et ne diffèrent pas significativement de 50 %.

2.5.4. Dicussion

2.5.4.1. L'analyse des chiffres obtenus

L'exploitation des premiers résultats d'expériences de pénétration obtenus avec H. oryzae (fig. 31, 32, 33 et 34) a rapidement mis en évidence l'existence d'une très forte variabilité. Ainsi, dans la courbe rapportée par la figure 32, le point relatif à une teneur de 32 % de fraction fine, présente une ordonnée de 34 pénétrations, moyenne correspondant aux 25 répétitions suivantes : 0, 1, 2, 3, 4, 4, 15, 22, 22, 26, 26, 29, 36, 36, 36, 37, 43, 44, 49, 52, 53, 74, 75, 79 et 84. La distribution de ces chiffres ne suit pas une loi normale. Par contre la transformation de la variable par la relation $(x + 0,5)^{1/2}$ normalise à peu près ces données. La variabilité observée dans les résultats de ces premiers travaux a toujours été du même ordre : dans les figures 33 et 34, on a fait figurer les valeurs de toutes les répétitions dont les zéros.

TABLEAU 7. Compétition à l'infestation entre les juvéniles d'Heterodera oryzae et les juvéniles d'Heterodera sacchari.

Expérience	Inoculum par tube	Juvéniles dans les racines des 10 tubes			
		Total	Marqués*	<u>H. oryzae</u>	<u>H. sacchari</u>
Directe (10 tubes)	500 <u>H. oryzae</u> 500 <u>H. sacchari</u> *	626	460	26,5 %	73,5 %
Réciproque (10 tubes)	500 <u>H. oryzae</u> * 500 <u>H. sacchari</u>	558	177	31,7 %	68,3 %

★ Juvéniles marqués

TABLEAU 8. Compétition à l'infestation entre les juvéniles d'Heterodera oryzae issus de masses d'oeufs et les juvéniles d'Heterodera oryzae issus de kystes

Expérience	Inoculum par tube	Juvéniles dans les racines des 10 tubes			
		Total	Marqués*	Juvéniles de kystes	Juvéniles de masses d'oeufs
Directe (10 tubes)	300 Juvéniles de kystes * 300 Juvéniles de masses d'oeufs	403	212	52,6 %	47,4 %
Réciproque (10 tubes)	300 Juvéniles de kystes 300 Juvéniles de masses d'oeufs *	423	223	47,3 %	52,7 %

★ Juvéniles marqués

Cette nécessité de transformer la variable avant de pouvoir procéder à des comparaisons de moyennes présente un inconvénient majeur. En effet, il faut pratiquement, pour que la différence soit significative, que les deux moyennes soient dans un rapport de 2/1. L'influence générale des facteurs testés dans le début de cette étude est donc statistiquement prouvée. Par contre, certains couples de points sur les courbes ne sont pas statistiquement distincts : l'allure de ces courbes n'est donc qu'indicative.

Cet inconvénient a conduit à rechercher l'origine de cette variabilité et à mettre au point des méthodes permettant de s'en affranchir. L'origine ne semble pas pouvoir être attribuée à l'inoculum. En effet, d'une part l'effectif de l'inoculum délivré dans chaque contenant est important (300 à 500 juvéniles) et d'autre part, cet inoculum est pris au hasard à la pipette dans une suspension constamment homogénéisée qui contient plusieurs dizaines de milliers de juvéniles. Néanmoins la variabilité due au pipetage lui même n'est pas à négliger : elle a été analysée au chapitre 3 : l'écart entre deux chiffres extrêmes peut atteindre 20 % de la moyenne. Mais un pareil écart ne peut expliquer la dispersion de la série de chiffres donnée plus haut. On est donc ainsi conduit à attribuer cette variabilité à la plante, en relation avec le nombre, la qualité, et la longueur des racines. Dans cette démarche, deux tentatives ont été faites, la première selon une hypothèse relevant de la génétique du riz utilisé, la seconde, pragmatique, tendant à réduire cette variabilité par des modifications des conditions expérimentales.

L'hypothèse génétique supposait que le nombre de pénétrations possibles dans une plantule de riz était déterminé par un caractère génétique et que le riz utilisé au laboratoire était hétérogène sous ce rapport. On a donc établi un certain nombre de lignées à partir d'autant de graines de riz Morobérékan, cultivées individuellement et amenées à la récolte, en les protégeant de tout risque d'hétérogamie (1°/∞, spontané chez le riz) par l'ensachage des panicules. Sur un certain nombre de ces lignées, une expérience de pénétration, avec 300 juvéniles par plantule et 25 répétitions par lignée a montré que la variabilité était aussi élevée .

Les modifications des conditions expérimentales qui ont conduit à la solution de ce problème ont consisté d'une part à introduire plusieurs plantes dans le contenant, et d'autre part à introduire un inoculum limité en nombre prélevé par pêche individuelle et non pas par pipetage d'un volume de suspension. On obtient ainsi une variabilité réduite (fig. 37) mais une manipulation plus longue. Les mécanismes qui sont supposés intervenir dans le phénomène de pénétration sont d'une part l'existence sur les racines de la plante de sites favorables à la pénétration, limités en nombre (Merny, 1972), et d'autre part l'existence d'un caractère attractif exercé par les racines sur les juvéniles, par le biais d'un médiateur chimique non identifié (Prot, 1975). Le succès de la méthode développée en dernier lieu laisse penser que ces deux caractères déterminants sont mal exprimés au niveau des plantules considérées individuellement et que ceci peut être compensé par la réunion de plusieurs plantules dans le même contenant.

A l'opposé des résultats obtenus avec H. oryzae, ceux obtenus avec M. javanica ont d'emblée montré une variabilité faible (fig. 36, 38, 40). Il faut dire que certaines de ces expériences bénéficiaient déjà de la généralisation des acquis précédents : deux plantules par contenant, inoculum prélevé et compté individu par individu. Il semblerait que dans les conditions expérimentales choisies, les caractères déterminants (sites, attraction) sont mieux exprimés pour le couple M. javanica/tomate ou kénaf que pour le couple H. oryzae/riz.

Les chiffres obtenus avec les adultes d'H. spinicaudata n'ont même pas été mentionnés dans les résultats car, en dehors du point relatif au temps zéro, ils sont inexploitablement. La pénétration au temps zéro présente des valeurs semblables à celles qui ont été obtenues par Merny (1972) pour une population composite (adultes et juvéniles de tous stades mélangés) soit un pouvoir infestant de l'ordre de 10 %. Cependant à des âges croissants aussi bien qu'à ce temps zéro, l'observation d'abondantes traces de pénétration était fréquente alors que les animaux qui les avaient provoquées ne pouvaient être retrouvés dans les racines, d'où une variabilité extrêmement forte et des chiffres aberrants. A notre avis pour l'étude des effets du jeûne sur le comportement des nématodes phytoparasites, il conviendrait de considérer deux cas : le groupe des

endoparasites sédentaires d'une part et d'autre part un groupe réunissant les endoparasites migrants et les ectoparasites. Pour les endoparasites sédentaires, les techniques développées dans cette étude conviennent. Par contre, pour le second groupe, une démonstration de la reprise du contact alimentaire, à l'aide d'un isotope radioactif absorbé par la plante et recherché chez le nématode, semblerait préférable.

2.5.4.2. Influence des facteurs externes sur l'infestation

Comme l'ensemble de cette étude est consacré à la physiologie des stades infestants, il s'agit donc de facteurs externes aux juvéniles : soit les facteurs physiques et chimiques du milieu, soit les facteurs relatifs à la plante cible, que nous avons commencé à voir au paragraphe précédent.

Granulométrie du substrat

La granulométrie du substrat a une influence déterminante sur le phénomène global de la pénétration chez H. oryzae et H. spinicaudata (fig.31). On observe l'existence d'une classe granulométrique optimale dont les limites sont en relation avec longueur du stade infestant considéré : 100-160 microns pour les juvéniles d'H. oryzae (longueur 450 microns) et 160-250 microns pour les juvéniles d'H. spinicaudata (longueur 800 microns).

A partir du dépôt de l'inoculum dans le contenant, la pénétration se décompose en deux phases successives : le déplacement depuis le lieu de dépôt jusqu'au contact de la racine ; puis la pénétration proprement dite. Dans une étude de l'influence exercée par la granulométrie, cette distinction est importante car les études de Wallace (1963) ont montré l'influence de ce facteur sur le déplacement.

A l'issue de son étude sur l'influence de la granulométrie sur la pénétration des juvéniles de Meloidogyne javanica, Wallace (1966b) admet qu'on ne peut s'affranchir complètement du facteur déplacement, mais qu'on peut en minimiser l'influence en employant un volume minimum de substrat pour un volume maximum de racines. Cette dernière condition

nous semblait être réalisée dans ces premières expériences (fig. 31) : en effet, le déplacement horizontal maximum était de 0,5 cm. Cependant nos résultats sont en contradiction avec ceux de Wallace (1966b) qui, dans ces conditions d'un faible déplacement, n'observe pas d'effet direct de la granulométrie sur la pénétration. Par contre, nos résultats présentent une certaine similitude avec ceux qui sont obtenus par le même auteur (Wallace, 1958) concernant la comparaison des déplacements d'Heterodera schachtii et de Ditylenchus dipsaci en fonction de la granulométrie. Pour chacune de ces deux espèces, était mise en évidence une classe granulométrique optimale pour le déplacement du nématode : la classe 150-250 microns pour Heterodera schachtii qui a une longueur moyenne de l'ordre de 500 microns et la classe 250-500 microns pour Ditylenchus dipsaci qui a une longueur moyenne de l'ordre de 1 mm. Wallace observe alors que le rapport de la taille optimale des particules à la longueur du nématode est de l'ordre de 1/3. En fait, en prenant pour taille optimale des particules la moyenne arithmétique des limites de la classe optimale, on trouve 1/2,5 pour Heterodera schachtii ($1/2,5 = (150 + 250)/2 \times 500$) et 1/2,7 pour Ditylenchus dipsaci ($1/2,7 = (250 + 500)/2 \times 1\ 000$). Par ailleurs, à partir de nos résultats, le même calcul donne 1/3,5 pour Heterodera oryzae ($1/3,5 = (100 + 160)/2 \times 450$) et 1/3,9 pour Hirschmanniella spinicaudata ($1/3,9 = 160 + 250)/2 \times 800$). Si cet écart entre les deux ordres de grandeur du rapport, 1/2,5 - 2,7 d'une part et 1/3,5 - 3,9 d'autre part était significatif, la granulométrie aurait une influence distincte sur la pénétration proprement dite d'une part et sur le déplacement d'autre part. Avant de pouvoir conclure, il serait évidemment nécessaire d'évaluer ce rapport concernant le déplacement pour nos deux espèces.

L'expérience dont le résultat est rapporté par la figure 32, n'a pas été effectuée avec un déplacement minimum, on peut donc considérer que le facteur déplacement est en cause. On peut donner l'interprétation suivante de la courbe obtenue. La fraction grossière seule présenterait des méats que le juvénile ne pourrait franchir en raison de la taille trop faible. L'addition de fraction fine comblerait ces méats avec des particules de granulométrie suffisamment faible pour permettre le déplacement horizontal du juvénile. Pour que le juvénile puisse se déplacer jusqu'à la racine, il serait nécessaire qu'il puisse

suivre une série de méats comblés contigus depuis son lieu de dépôt jusqu'à la racine. La probabilité pour cette série existe augmenterait avec la proportion de méats comblés, donc avec la proportion de fraction fine. Cette augmentation de la proportion des méats comblés se ferait de 0 à 32 % de fraction fine. A partir de 32 % de fraction fine, la totalité des méats serait comblée et le déplacement de tous les juvéniles vers les racines serait possible.

Il n'est donc pas prouvé que la granulométrie ait une influence sur la pénétration proprement dite. Ce point ne pourra être éventuellement éclairci qu'à la suite d'expériences complémentaires. Par contre, ces expériences ont prouvé que la granulométrie avait une influence sur le phénomène de pénétration global. Pour obtenir une pénétration maximale on utilisera au mieux du sable de granulométrie comprise entre 100 et 160 microns, sinon de la fraction fine (de granulométrie inférieure à 250 microns), et à défaut du sable enrichi en fraction fine (de composition finale comprenant de 40 à 50 % de fraction fine).

Age de la plante

L'importance de la pénétration croit avec l'âge de la plante (fig. 34). Ce vieillissement de la plante est surtout caractérisé par une augmentation du nombre et de la longueur des racines. Sur la nature de l'influence de ce facteur, deux hypothèses, d'ailleurs compatibles, peuvent être émises. La première hypothèse considère l'existence de sites privilégiés, favorables à la pénétration, sur les racines. Le nombre de ces sites constituerait un facteur limitant de la pénétration et augmenterait avec l'accroissement du système racinaire. La seconde hypothèse considère le déplacement qu'ont à effectuer les juvéniles depuis leur lieu de dépôt jusqu'au contact des racines. La proportion des juvéniles de l'inoculum capables de franchir cette distance constituerait un facteur limitant de la pénétration, et augmenterait lorsque cette distance à franchir diminuerait. Cette distance diminue lorsque la densité linéaire de racines par unité de volume de substrat augmente, lors de l'accroissement du système racinaire.

Temps de contact

Les résultats rapportés par la figure 33 apportent deux informations sur le phénomène de pénétration. Tout d'abord la capacité de pénétration de l'inoculum se manifeste encore 16 jours au moins après l'inoculation. Ensuite, la pénétration dans une plante présente une cinétique progressive. Ce caractère peut être attribué à deux causes. La première cause est la croissance de la plante au cours du temps de contact. Cependant, la pente de la cinétique (fig. 33) est beaucoup plus importante que celle de l'augmentation de pénétration en fonction de l'âge du plant (fig. 34). Il semble donc que l'âge de la plante ne soit pas le seul facteur en cause. On ne peut actuellement que proposer une hypothèse sur la nature du second facteur impliqué dans l'allure de cette cinétique. Cette hypothèse considère la durée du déplacement des juvéniles depuis leur lieu de dépôt jusqu'au contact de la racine. Cette durée serait variable en raison des deux paramètres qui la déterminent et qui peuvent varier d'un juvénile à l'autre : la distance à franchir d'une part et la vitesse de déplacement du juvénile d'autre part. Ainsi l'arrivée des juvéniles au contact de la racine, puis leur pénétration se feraient d'une façon étalée dans le temps.

2.5.4.3. Influence des facteurs internes sur l'infestation

Le pouvoir infestant initial

Nous allons établir au paragraphe suivant que la durée du jeûne est le facteur essentiel de la baisse du pouvoir infestant et nous verrons ensuite au chapitre suivant qu'à la durée du jeûne correspondent des altérations irréversibles de la physiologie des juvéniles. Or chez les juvéniles fraîchement éclos, qui n'ont encore subi en apparence aucune de ces altérations, le pouvoir infestant initial est toujours significativement inférieur à 100 %. Pour s'en tenir aux expériences qui ont été réalisées dans les conditions les plus favorables (contenants de faible capacité, plusieurs plantules par contenant, inoculum faible et parfaitement compté), le pouvoir infestant initial est de 52 % chez

H. oryzae (fig. 37) et de 51 % à 88 % chez M. javanica (fig. 40 et 39). Il paraît difficile de justifier la raison pour laquelle une partie de ces inoculums frais et homogènes ne pénètrent pas.

La première explication consiste à créditer la plante cible d'une réaction de défense générale en réponse aux premières pénétrations. Cette réaction pourrait comporter soit l'arrêt de la sécrétion des substances attractives ou activatrices des juvéniles, impliquées dans une pénétration normale, soit au contraire la sécrétion de substances neutralisant les récepteurs sensoriels des juvéniles. Or il suffit de réaliser des expériences de pénétration monojuvénile (un seul juvénile par contenant) pour s'apercevoir que le pouvoir infestant de l'inoculum ainsi dispersé n'est pas supérieur à celui qui a été mentionné. Ce genre d'expérience a été réalisé par plusieurs membres du laboratoire chez H. oryzae, et chez M. javanica et chaque fois dans des conditions optimales (de plusieurs dizaines à une centaine de répétitions).

Un second groupe d'explications attribue des effets néfastes aux manipulations des animaux qui précèdent leur mise en contact avec la plante. Cette hypothèse est basée sur la constatation qu'en élevage, les attaques de seconde génération, donc provenant d'un inoculum qui n'a subi aucune de ces manipulations, sont plus vigoureuses. Ces manipulations préalables sont de deux sortes. La première sorte est la mise en contact des juvéniles avec des agents chimiques et physiques agressifs qui entraîneraient l'annulation de leur aptitude à pénétrer. Comme la sensibilité des individus d'un groupe aux toxiques est variable on peut admettre que la fraction du groupe ainsi neutralisée sera plus ou moins importante selon l'intensité de l'agent. La nature de ce dernier peut concerner la qualité de l'eau (dioxyde de chlore dans l'eau courante de Dakar, fer ou calcium dans celle d'Abidjan), l'intervention de la lumière, l'effet des vibrations (lorsque l'on homogénéise les suspensions par bullage d'air). La seconde sorte de manipulation préalable concerne les circonstances de l'éclosion des oeufs. Les traitements mécaniques (aspersions au jet d'eau, prise à la pince) et chimiques (chocs osmotiques, traitement au permanganate) induisent peut être l'éclosion d'oeufs qui n'auraient pas éclos spontanément dans le sol. Ces juvéniles éclos prématurément ne pénétreraient pas. Par ailleurs, dans le sol, lors

de l'éclosion de la seconde génération, les animaux baignent instantanément dans la solution de sol qui contient des éléments minéraux et d'autres, organiques, provenant de la plante en place (exsudats). Ce premier contact est peut être déterminant, en particulier au niveau du bon fonctionnement des structures sensorielles. On voit donc que l'examen attentif des circonstances dans lesquelles sont manipulés les juvéniles laisse du champ à l'amélioration des techniques employées.

Nous gardons donc, comme explication la plus probable de cette hétérogénéité de l'inoculum initial, certains effets des manipulations préalables. Notons cependant que certaines sources d'hétérogénéité nous sont déjà connues. Ainsi chez *H. oryzae* le sexe est génétiquement prédéterminé (Cadet, et al., 1975) : il existe donc des juvéniles femelles et des juvéniles mâles dans un inoculum. Chez la même espèce, la technique qui a été employée au cours de ce travail, conduit à obtenir un inoculum initial constitué par un mélange de juvéniles provenant de l'éclosion d'oeufs de masses d'oeufs d'une part et de kystes d'autre part. La proportion exacte n'est pas connue, mais si l'on considère les cinétiques d'éclosion des oeufs des kystes et des masses d'oeufs chez cette espèce (Merny, 1966, 1972), il est évident que les juvéniles issus de masses d'oeufs sont les plus nombreux. De toutes façons, l'étude qui a été réalisée au cours de ce travail à l'aide du marquage au ³⁵S a montré que ces deux sortes de juvéniles, issus d'oeufs de kystes ou issus d'oeufs de masses d'oeufs, ont le même pouvoir infestant (tableau 8). Il n'en reste pas moins qu'il serait du plus haut intérêt de mettre au point un critère de sélection dichotomique qui permette de séparer dans un inoculum in vitro les juvéniles qui vont pénétrer de ceux qui ne pénétreront pas. Ce critère est à rechercher au niveau du comportement individuel des juvéniles tel qu'il peut être examiné sous la loupe binoculaire (mouvement, habitus) en présence d'un stimulant judicieux (éclairage, produit chimique, exsudat racinaire de l'hôte, vibrations, etc...) ou apprécié par un moyen d'analyse quelconque (gradient de densité, migrations spontanés dans des gradients de différents facteurs).

Effet de la durée du jeûne sur le pouvoir infestant

Tout au long de cette partie du travail, on a parlé de durée du jeûne (légendes des fig. 37, 38, 49 et 40). Mais il s'agit là d'une expression simplificatrice : en fait, au cours de ces expériences, il n'est pas possible de dissocier l'effet du jeûne de celui du vieillissement. Cet inconvénient est sans remède pour les juvéniles d'H. oryzae et de M. javanica, puisque, pour nourrir ces animaux, il faut les inoculer sur la plante hôte et qu'une fois inoculés, ils perdent en quelques jours leur aptitude à se déplacer en se transformant en juvéniles du troisième stade. Il existe par contre une possibilité de nourrir à nouveau des adultes d'H. spinicaudata après une période de jeûne, mais nous avons vu qu'au niveau des études sur la pénétration nos techniques n'étaient pas adaptées aux caractéristiques de cette espèce. Si l'on envisage d'étudier ces deux facteurs dissociés (jeûne d'une part et vieillissement d'autre part), il faudra développer l'utilisation d'autres modèles (espèces).

Rappelons que l'on obtient deux sortes de courbes pour l'évolution du pouvoir infestant en fonction de la durée du jeûne selon l'inoculum utilisé.

- Courbe directe : L'inoculum de juvéniles fraîchement éclos est déposé dans les contenants où aura lieu la pénétration. Puis chaque semaine on ajoute les plantes cibles dans un certain nombre de ces contenants. C'est par ce procédé qu'a été obtenue la courbe de la figure 39. On intègre ici directement les effets de la mortalité et ceux de la perte du pouvoir infestant.

- Courbe indirecte : A partir d'un stock de juvéniles fraîchement éclos maintenu à vieillir in vitro, on sélectionne chaque semaine par un test de survie les juvéniles survivants qui constitueront l'inoculum. C'est par ce procédé qu'a été obtenu la courbe de la figure 37. On ne rend compte ici que de la perte du pouvoir infestant chez les survivants, l'effet mortalité n'étant pas comptabilisé.

On passe en principe de la seconde courbe à la première en tenant compte des résultats quantitatifs du test de survie : pour chaque date on multiplie le pouvoir infestant de la courbe indirecte par le pourcentage de survie correspondant. C'est ainsi qu'a été obtenue la courbe de la figure 38 (cercles noirs). On peut montrer en cette occasion que les résultats obtenus sont reproductibles pour cette espèce malgré des techniques différentes. Pour cela à partir de cette courbe de la figure 38, on opère une transformation de variable en faisant l'hypothèse que tous les juvéniles qui ont pénétré se transforment en adultes et que chez ces adultes le rapport femelles/mâles est égal à l'unité (Cadet, et al., 1975). On obtient ainsi le nombre théorique de femelles (fig. 38, cercles blancs). Sur ce graphique il est maintenant possible de porter les résultats d'une expérience réalisée antérieurement par Merny (1970) en utilisant le procédé direct. Des pots de 200 ml reçoivent chacun 200 juvéniles d'H. oryzae, puis après 0, 10, 20 et 30 jours, chaque pot est repiqué avec 4 plantules de riz âgées de 3 à 5 jours. Quatre semaines après la plantation, les femelles blanches présentes sur les racines étaient comptées (20 répétitions par date). Les résultats (triangles noirs sur la fig. 40) coïncident remarquablement avec la courbe théorique. Les propriétés physiologiques des juvéniles d'H. oryzae sont donc stables.

Si la courbe directe seule rend compte de l'évolution du pouvoir infestant pour une population donnée, la courbe indirecte est néanmoins intéressante car elle nous renseigne sur les mécanismes impliqués (fig. 37). Il est évident que la perte de l'aptitude à pénétrer chez les juvéniles précède de longtemps la mort. Or c'est au cours de cette période qu'ont lieu chez ces juvéniles toutes ces altérations physiologiques importantes, comme la consommation des réserves et la baisse de l'intensité respiratoire. On pourrait concevoir que le franchissement d'un seuil, pour l'un ou l'autre de ces deux paramètres, corresponde à la perte de l'aptitude à pénétrer. L'accroissement du pouvoir infestant au cours de la première semaine de jeûne chez H. oryzae (fig. 37) pourrait suggérer la nécessité d'une maturation. En fait sur la courbe directe (fig. 38), il est visible que ceci peut s'expliquer par une mortalité préférentielle chez les juvéniles incapables de pénétrer.

2.5.4.4. Compétition à la pénétration

Compétition à l'infestation

Un nombre limité d'espèces d'Heterodera possèdent à la fois kystes et masses d'oeufs. D'après les travaux effectués sur deux de ces espèces, Heterodera oryzae (Merny, 1966) et Heterodera glycines Ichinche (Ishibashi et al., 1973), il apparaît que la différence essentielle entre les juvéniles issus de masses d'oeufs et ceux issus de kystes réside dans leur cinétique d'éclosion. Les juvéniles issus des masses d'oeufs éclosent rapidement et participent à la réinfestation immédiate, permettant ainsi la succession de plusieurs générations du parasite au cours du cycle de la plante. Les juvéniles issus de kystes éclosent lentement et permettent la survie du parasite en l'absence d'hôtes. Les résultats du présent travail montrent, en revanche, que le pouvoir infestant des juvéniles des deux origines, kystes ou masses d'oeufs, est identique chez Heterodera oryzae.

Le pouvoir infestant des juvéniles d'Heterodera sacchari est supérieur à celui des juvéniles d'Heterodera oryzae. Il reste à préciser si ce résultat est dû à une différence dans la cinétique d'infestation, plus rapide chez H. sacchari que chez H. oryzae, ou dans le choix des sites d'infestation plus exclusif chez H. oryzae que chez H. sacchari. Dans les rizières où subsistent les deux espèces (Merny, 1970), l'avantage procuré par ce pouvoir infestant plus important n'est pas évident puisque H. sacchari est dépourvu des masses d'oeufs qui permettent à H. oryzae des réinfestations immédiates.

2.6. LA REPRODUCTION CHEZ MELOIDOGYNE JAVANICA

2.6.1. Principe de l'étude

Les effets de la durée du jeûne et du vieillissement sur la physiologie des nématodes étudiés ont déjà pu être appréciés au niveau de la survie et du pouvoir infestant. Nous verrons ultérieurement d'autres effets concernant les fonctions métaboliques : consommation des réserves

et consommation d'oxygène (chapitre 3). Cependant, dans le domaine biologique, la limitation de l'étude de ces effets au pouvoir infestant peut paraître insuffisante. Il est en effet possible, qu'au cours des quelques semaines de jeûne, les effets du vieillissement se fassent sentir sur les primordiums génitaux des juvéniles, ce qui pourrait entraîner une modification de la fécondité. L'effet de l'âge des parents sur la fécondité est bien connu chez les nématodes libres (Brun, 1966 ; Beguet, 1976) ainsi que chez les nématodes zooparasites (Kerboeuf, 1978).

Nous avons donc entrepris l'étude des effets de la durée du jeûne sur la fécondité. Pour H. oryzae, comme les juvéniles sont sexués (femelles/mâles = 1/1), et que l'on ne dispose pas de critères pour les séparer a priori, l'étude était impossible. Pour H. spinicaudata, la séparation des sexes offrait les conditions les plus favorables pour cette expérience et les mises au point préliminaires avaient été réalisées (fig. 16). Néanmoins, pour diverses raisons notamment celles évoquées précédemment à propos de la pénétration, cette expérience n'a pu aboutir à des résultats cohérents. L'expérience a donc été conduite chez M. javanica, l'existence chez cette espèce d'un inoculum homogène de juvéniles parthénogénétiques simplifie considérablement la manipulation.

Pour cela il suffit d'inoculer des plantes hôtes avec des juvéniles de M. javanica d'âge croissant, puis, au moment opportun, de prélever les masses d'oeufs produites, et d'en évaluer le contenu. Quelques expériences préliminaires, réalisées avec une méthode de collecte analogue à celle qui avait été employée pour évaluer la fécondité chez H. oryzae (fig. 8), ont montré que le cas de M. javanica nécessitait la mise au point d'une technique plus élaborée. En effet, chez cette espèce, l'éclosion des oeufs de la masse d'oeufs commence bien avant la fin de la ponte, ce qui entraîne des pertes de juvéniles, quelle que soit la date de la récolte. Cela a conduit à utiliser la culture hydroponique des plantes infestées, au cours de laquelle les juvéniles libérés sont recueillis dans la solution nutritive (et comptés), alors que l'on laisse la ponte se poursuivre.

2.6.2. Méthodologie.

Inoculation

On utilise une des méthodes d'inoculation décrite précédemment. Pour la mise au point de la technique, la liste des plantes utilisées et des inoculums employés est donnée dans le tableau 9.

Culture hydroponique

Le dispositif utilisé est représenté et décrit par le schéma de la figure 41. La plante inoculée est insérée dans le couvercle percé d'un bocal en verre d'une capacité de deux litres rempli de solution nutritive minérale d'Hoagland et Arnon (1930) diluée au 1/4. Cette solution nutritive est aérée par bullage d'air à l'aide d'un tube en verre plongeant raccordé à une pompe à aquarium. L'évapotranspiration est compensée par un siphon qui amène de l'eau courante à partir d'un récipient à niveau constant (chasse d'eau). Les bocaux sont maintenus dans un bain thermostaté à 28°.

Renouvellement du milieu et comptage des juvéniles

Les plantes inoculées sont placées en culture hydroponique dès la fin de leur contact avec l'inoculum (le contact qui dure au maximum une semaine a été réalisé en pot sur sol ou sable). Chaque semaine, le couvercle numéroté supportant la plante est transféré sur un bocal propre contenant de la solution nutritive neuve. A partir de la quatrième semaine, les juvéniles présents dans la solution du bocal que la plante vient de quitter sont comptés. Pour cela le liquide est laissé à décanter dans son bocal pendant 24 heures puis le surnageant est éliminé pour ne laisser que 250 ml dans lesquels sont prélevés des aliquots (1 ml à 5 ml) pour le comptage. Pour chacune des plantes, on procède ainsi au relevé hebdomadaire de la production en juvéniles.

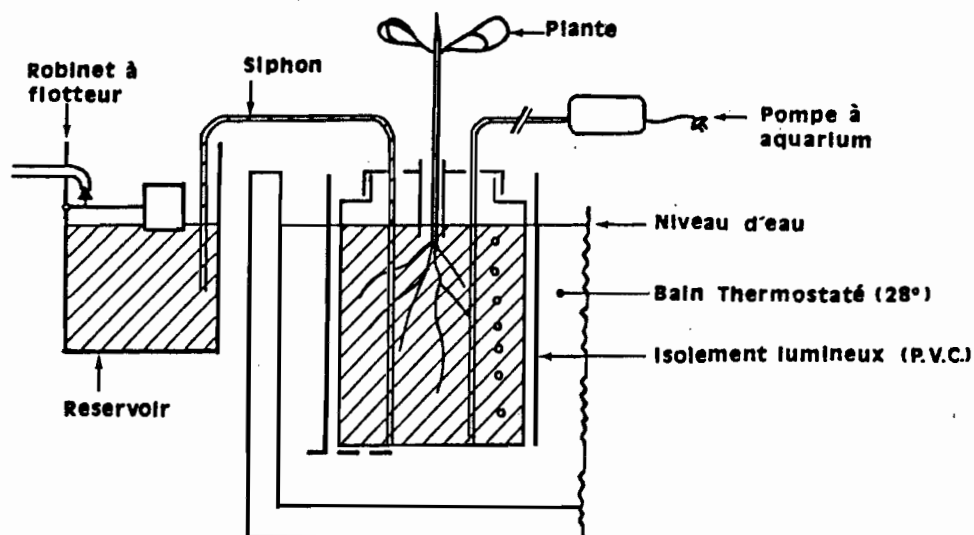


Fig. 41. - Représentation schématique du dispositif employé pour la culture hydroponique des plantes.

TABLEAU 9. Nombre total de juvéniles de *Meloidogyne javanica* et *M. Incognita* libérés par des plantes infestées se développant en culture hydroponique (Chacune des séries A, B, ...F, correspond à une courbe de la fig. 46)

Série	Plante	Inoculum	Nb rep.	Log nombre total moyenne \pm écart type	Durée sem.
A	tomate Roma	50 <i>M. javanica</i>	5	4,98 \pm 0,2	13
B	patate douce	2 500 <i>M. incognita</i>	6	5,36 \pm 0,2	13
C	aubergine	540 <i>M. javanica</i>	8	5,12 \pm 0,2	10
D	aubergine	2 000 <i>M. incognita</i>	8	5,12 \pm 0,2	13
E	kénaf	500 <i>M. javanica</i>	8	4,90 \pm 0,4	13
F	kénaf	482 <i>M. javanica</i>	6	5,52 \pm 0,24	12
	kénaf carencé N	482 <i>M. javanica</i>	6	5,38 \pm 0,18	12

Procédure particulière pour l'étude des effets du vieillissement

En plus des piluliers de kénaf préparés pour la mesure du pouvoir infestant on a ajouté pour chaque date 25 piluliers supplémentaires traités d'une façon identique. Les prélèvements des piluliers destinés d'une part à la mesure du pouvoir infestant et de ceux destinés à la présente manipulation ont été faits au hasard. Les chiffres obtenus pour la pénétration représentent donc bien les populations initiales (P_i) présentes dans les plantes. Après lavage des racines, ces 25 plantes sont distribuées en cinq paquets de cinq et chacun de ces paquets est introduit dans le couvercle d'un bocal de culture. Ainsi pour chacun des cinq âges des juvéniles de M. javanica (0, 1, 2, 3 et 4 semaines), on a conduit la culture de cinq bocaux.

2.6.3. Résultats

Validité générale de la méthode d'étude

Compte tenu de l'accroissement important des systèmes racinaires en culture hydroponique, les expériences ne peuvent être menées au maximum que dix à treize semaines après l'inoculation. A cette date le nombre cumulé de juvéniles produits par bocal varie de 10^5 à 7.10^5 . Pour réduire la variabilité, lors de la présentation de ces résultats dans le tableau 9, on a procédé à la transformation de la variable en logarithme (décimal). Afin d'obtenir les données nécessaires au traçage de la cinétique de libération des juvéniles, on ne procède pas avec les chiffres bruts. Pour chacune des répétitions (ou bocaux) de la même expérience, on considère, comme chiffre de base, le nombre cumulé maximum atteint à la fin de l'expérience et on pose ce chiffre équivalent à 100 %. On calcule ensuite pour cette répétition les points de la cinétique en pourcentage par rapport à cette valeur. Puis pour chaque date, on réalise alors la moyenne des différentes répétitions. Les courbes ainsi obtenues sont données par la figure 42.

L'examen des racines en fin d'expériences révèle la présence de très grosses galles dont l'importance est sans rapport avec la faiblesse des inoculums initiaux (tableau 9). Il est donc certain qu'il y

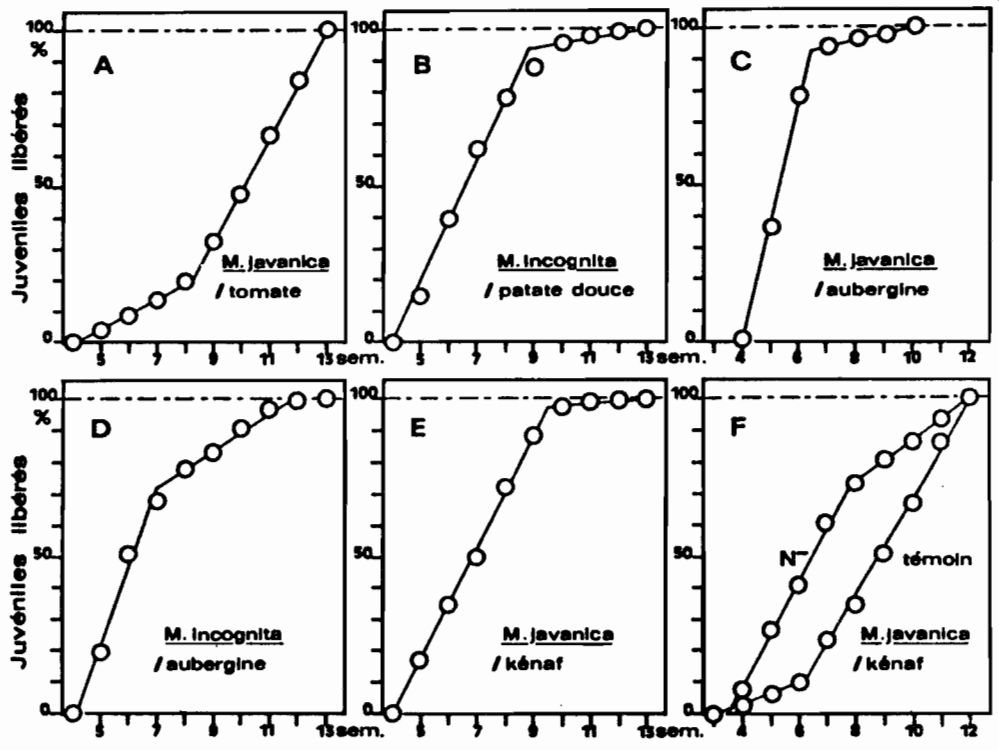


Fig. 42. - Cinétiques de libération des juvéniles par les racines des plantes infestées, en culture hydroponique (correspondent à l'expérimentation décrite dans le texte et par le tableau 11).

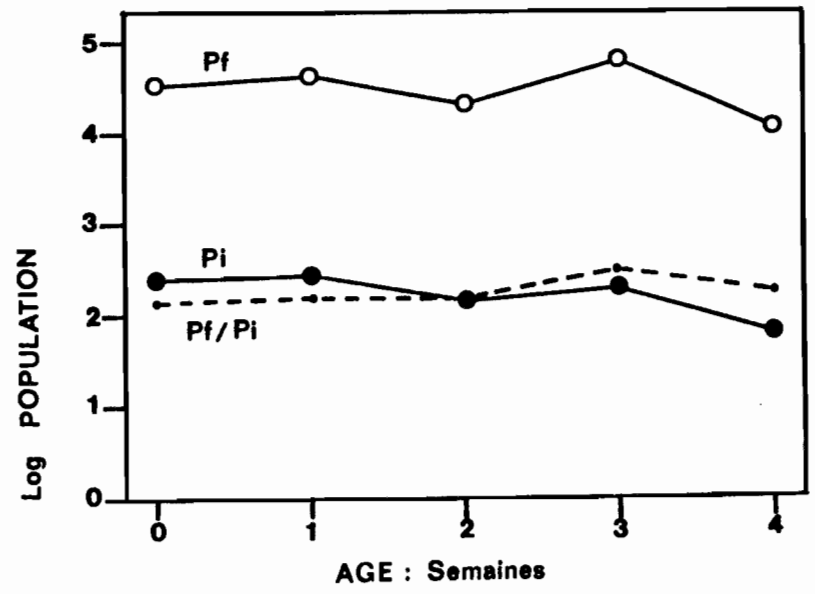


Fig. 43. - Effet de la durée du jeûne sur le taux de multiplication des juvéniles de *Meloidogyne javanica*. (Pi : nombre de juvéniles pénétrés ; Pf : nombre de juvéniles libérés en culture hydroponique ; Pf/Pi : taux de multiplication).

a des réinfestations bien que par sa nature, le substrat liquide, qui baigne les racines, empêche le déplacement et l'appui des nématodes. Les réinfestations doivent donc se faire directement des masses d'oeufs vers les tissus végétaux adjacents. Dans ces conditions il est impératif que la descendance des juvéniles vieillissants soit mesurée pendant une période plus courte, de façon à ne pas enregistrer de descendants de la seconde génération. On a pris pratiquement une durée de huit semaines.

Effet du vieillissement sur la fécondité de *M. Javanica*

Les résultats de cette expérience sont donnés par la figure 43. Comme l'ordonnée est exprimée en logarithme, le taux de multiplication P_f/P_t est donné pour chaque date par la distance qui sépare les deux points. On voit que ce taux est remarquablement constant de l'ordre de 100 quel que soit l'âge auquel ont été inoculés les juvéniles de *M. javanica*.

2.6.4. Discussion

Il n'y donc pas d'effet global d'un vieillissement préalable des juvéniles de *M. javanica* sur les possibilités de reproduction des femelles qu'ils deviennent lors de leur développement. Le vieillissement in vitro n'altère donc pas les potentialités du primordium génital chez cette espèce. Cependant, dans la mesure où il s'agit, au cours de cette expérience, de la mesure d'un taux de reproduction moyen, un doute subsiste quant à la validité de notre conclusion. On pouvait en effet imaginer que tous les juvéniles qui avaient pénétré dans les racines du kénaf (et qui constituaient donc la population initiale P_i) ne se sont pas tous transformés en femelles parthenogénétiques. Par contre ce taux de transformation faible de juvéniles en adultes serait compensé par une fécondité plus élevée des adultes obtenus. Ce genre de phénomène a déjà été observé chez les nématodes zooparasites : on estime alors que la fécondité des parasites est bridée par une réaction chimique de l'hôte mais que cette réaction n'est plus provoquée par des juvéniles altérés par l'âge (Kerboeuf, 1978). Il faut donc garder ces deux possibilités comme solution à ce problème : soit aucune action, soit une action sur le taux de transformation de juvéniles en adultes accompagnée d'une

augmentation de la fécondité individuelle. L'approfondissement de cette question passe par la maîtrise d'une technique permettant de mesurer la fécondité individuelle chez M. javanica comme cela a été mise au point chez les nématodes libres (Brun, 1966). Pour cela il suffirait de trouver un modèle de plante hôte qui ne connaisse pas un développement aussi rapide que celui des plantes qui ont été utilisées ici. Pour une expérience équivalente il faudrait en effet manipuler plusieurs centaines de plantes.

2.7. CONCLUSION

2.7.1. Le pouvoir infestant initial

Le pouvoir infestant initial, évalué sur les juvéniles fraîchement éclos d'Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica, dépend de l'espèce considérée et reste, au cours d'expériences distinctes, toujours inférieur à 100 % (Temps zéro sur les figures 31, 32, 33, 34, 36, 37, 39 et 40). Dans l'état actuel de l'analyse, il n'est pas possible de lever la contradiction entre l'apparente homogénéité physiologique d'un inoculum de juvéniles fraîchement éclos et l'existence, au sein du même inoculum, de deux classes d'importances équivalentes : ceux qui pénètrent et ceux qui ne pénètrent pas. On note cependant que le pouvoir infestant augmente avec la densité des racines de la plante hôte dans le substrat solide d'inoculation soit, pour H. oryzae, en portant le nombre des plantules de un (fig. 31, 32, 33 et 34) à cinq (fig. 37), soit pour M. javanica, en réduisant le volume de substrat solide de 20 ml (fig. 40) à 2 ml (fig. 36 et 39). La pénétration ne serait donc optimale que pour les distances de déplacement courtes, inférieures au centimètre. Ceci contraste avec les performances de déplacement, de l'ordre de plusieurs

dizaines de centimètres, dont font preuve les juvéniles de M. javanica (Prot, 1975). Nous sommes conduits à admettre que les conditions expérimentales adoptées au cours de ce travail, ainsi d'ailleurs qu'au cours des travaux des auteurs qui nous ont précédé en obtenant des pouvoirs infestants équivalents, ne sont pas optimales.

2.7.2. La survie en conditions standard

Les formes des quatre courbes de survie obtenues pour les trois espèces en conditions standard (air ambiant, pression osmotique négligeable, 28°) sont très concordantes (fig. 13, 15 et 16). De plus, ces résultats supportent une analyse mathématique qui les rendent très comparables à ceux relevés chez d'autres organismes, invertébrés au vertébrés (Teissier, 1934 ; Inagaki, 1977 ; Pressat, 1973). Dans cette perspective nos résultats s'ajoutent, pour trois espèces aux courbes de survie des nématodes déjà conformes à ce modèle sigmoïdal (Golden & Shafer, 1960 ; Bolla & Brot, 1975 ; Anderson, 1978 ; Khan & Enesco, 1981). Par contre, des résultats différents, comme ceux obtenus par Thomason et al., (1964), peuvent être vraisemblablement attribués à une méthodologie défectueuse. On peut donc conclure que les courbes de survie de ce type constituent la norme pour les nématodes. La possibilité de réduire ces courbes à deux paramètres, E_0 , espérance de vie initiale, et o , constante de décroissance, ouvre le champ à une investigation plus large. On peut en effet étudier les effets sur ces deux paramètres, soit de différents traitements sur des parties d'un lot homogène d'animaux, soit de l'origine de lots d'animaux différents dans des conditions identiques.

Au cours de la survie in vitro, les juvéniles d'Heterodera oryzae et de Meloidogyne javanica sont soumis aux contraintes du jeûne et du vieillissement. Au cours de cette période, le pouvoir infestant des juvéniles survivants décroît par rapport au pouvoir infestant initial. Cette modification comportementale est elle due aux effets du jeûne, du vieillissement, ou des deux ?

Compte tenu des particularités biologiques des deux espèces étudiées, l'éventualité des effets du jeûne ne peut directement être appréciée. En effet, la seule façon de nourrir ces juvéniles consiste à les faire pénétrer dans la plante hôte, où ils se transforment rapidement en un stade sédentaire (stade 3), échappant ainsi à toute investigation sur le pouvoir infestant. Par contre, d'éventuels effets du vieillissement auraient pu se traduire, non seulement sur le comportement de pénétration, mais également sur la reproduction. Or nous avons vu qu'il n'en est rien pour M. javanica (fig. 43). Donc ou bien les effets du vieillissement n'altèrent que les structures nécessaires au comportement de pénétration, en laissant intactes les potentialités de développement ou bien le comportement est modifié par le jeûne. En faveur du premier terme de l'alternative, notons que chez les rhabditides, la sensibilité des nématodes à la perception des proies (bactéries) décroît avec l'âge (Hosono, 1978).

2.7.3. La survie en conditions particulières

Dans des conditions particulières de survie, telles que l'absence d'oxygène, ou la présence de pressions osmotiques élevées, la mort et la diminution du pouvoir infestant sont suspendues, au moins dans les limites de temps des expériences réalisées (fig. 14, 15 et 40). Afin de lever l'alternative introduite précédemment, effets du jeûne ou effets du vieillissement, il conviendrait d'apprécier les effets de ces contraintes sur les paramètres du jeûne. Ceci sera fait au chapitre suivant.

En ce qui concerne la survie des oeufs, qui contiennent un juvénile infestant, il est évident que notre étude ne représente qu'une étape très préliminaire. La pression osmotique ne constitue en effet que l'un des facteurs auxquels sont soumis les oeufs dans les kystes et les masses d'oeufs, les autres facteurs étant la faible tension d'oxygène ou la forte tension de gaz carbonique (Shepherd, 1962b). Cependant, il apparaît déjà que cette contrainte osmotique implique des interactions

complexes concernant les effets des concentrations et la nature chimique des substances utilisées. La localisation de ces interactions (coque de l'oeuf ou juvénile) ne pourrait être déterminée que par une investigation comparative, en soumettant cette fois des juvéniles déjà éclos à l'action de ces substances.

CHAPITRE 3

RECHERCHES SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE DES STADES INFESTANTS

3.1. INTRODUCTION

Dans son ouvrage consacré aux effets physiologiques du jeûne, Kleiber (1975) a défini les paramètres à considérer lorsqu'un animal est soumis à cette contrainte. Le phénomène principal est constitué par une perte de substance qui se traduit par une diminution, en fonction du temps, du poids de l'animal. Ce paramètre sera mesuré soit sous forme de poids frais, soit sous forme de poids sec. Cette perte est la résultante de deux composantes : d'une part une perte qualifiée d'insensible à cause de son caractère progressif, due à l'élimination des termes ultimes du catabolisme : gaz carbonique et eau ; et d'autre part une perte sensible due aux éliminations du tube digestif et du système excréteur. A l'intérieur de cette variation globale, une étude plus

approfondie, utilisant l'analyse des carcasses, permet de mettre en évidence la consommation différentielle des trois grands groupes de substances caractéristiques : lipides, glucides et protides.

La perte insensible correspond donc à l'utilisation des substances de réserve par les voies du métabolisme énergétique dont les manifestations les plus immédiates, chez un animal poïkilotherme, sont constituées par les échanges respiratoires gazeux qu'il entretient avec le milieu ambiant : consommation d'oxygène et dégagement de gaz carbonique. Dans le cas des nématodes, l'examen des revues bibliographiques récentes (Von Brand, 1966 ; Rohde, 1971 ; Atkinson, 1976 ; Kämpfe, 1978) montre que c'est essentiellement le premier paramètre qui a été considéré.

Au cours de ce chapitre nous verrons tout d'abord les données bibliographiques disponibles sur le métabolisme énergétique des nématodes. Ensuite seront présentés les résultats des recherches conduites sur les effets du jeûne sur la consommation des réserves d'une part et sur la consommation d'oxygène d'autre part.

3.2. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

3.2.1. La composition chimique des nématodes

La composition chimique des nématodes a déjà fait l'objet d'un certain nombre de revues : Fairbairn (1960), Von Brand (1966), Krusberg (1971), Nicholas (1975), Lee & Atkinson (1975) et Barrett (1976). Nous suivrons le plan généralement adopté par ces auteurs : eau et substances minérales, lipides, glucides et protides.

- Eau et substances minérales : L'eau représente le constituant principal des nématodes. Le nématode Panagrellus redivivus (stades mélangés) contient 79 % d'eau (Sivapalan & Jenkins, 1966) les juvéniles fraîchement éclos d'Heterodera schachtii contiennent 76 % d'eau (Perry, 1977) tandis que cette proportion est de 63 % chez les stades mélangés d'Anguina tritici (Bird & Buttrose, 1974). Chez les nématodes zooparasites, les

substances minérales n'excèdent jamais 5 % du poids sec (Von Brand, 1966). C'est également à 5 % du poids sec que Nicholas et Stewart (1978) estiment la proportion des substances minérales chez les nématodes libres.

- Lipides : Les lipides constituent le groupe de substances le plus étudié chez les nématodes. Dans un premier temps, la présence de lipides chez les nématodes a été mise en évidence par des colorations histochimiques spécifiques. C'est ainsi que des quantités importantes de lipides ont été découvertes dans le tractus digestif des juvéniles infestants des nématodes zooparasites (Goodey, 1930 ; Giovannola, 1936). Depuis, la même technique, et surtout la microscopie électronique, ont également permis de découvrir la présence de lipides dans les cellules intestinales des nématodes libres (Zmoray, 1971 ; Zuckerman et al., 1971) et phytoparasites (Chitwood, 1951 ; Wallace, 1966b ; Van Gundy et al., 1967 ; Wisse & Daems, 1968 ; Dropkin & Acedo, 1974 ; Kondo & Ishibashi, 1976 ; Bird, 1979 ; Mc Lure & Bird, 1976 ; Byers & Anderson, 1973).

A ces données qualitatives devaient bientôt s'ajouter les résultats de dosages gravimétriques et colorimétriques. On a pu ainsi déterminer, en fonction du poids sec, que les lipides totaux représentaient 24 % chez Turbatrix aceti (Krusberg, 1972), 24 % chez Panagrellus redivivus (Sivapalan & Jenkins, 1966), 30 % chez les juvéniles fraîchement éclos de Meloidogyne javanica et Tylenchulus semipenetrans (Van Gundy et al., 1967), 33 % pour trois espèces du genre Ditylenchus (Tracey, 1958), respectivement 46 % et 40 % chez les femelles de Meloidogyne incognita et M. arenaria (Krusberg et al., 1973), 26 % chez Pratylenchus penetrans et 37 % chez Tylenchorhynchus claytoni (Krusberg, 1967). Ces teneurs élevées, observées chez des nématodes libres et phytoparasites, contrastent avec les faibles teneurs (au maximum 10 %) en lipides des nématodes zooparasites (Von Brand, 1966).

Ces lipides totaux sont constitués par différentes classes de substances : lipides neutres (triglycerides), phospholipides et stérols. Chez Panagrellus redivivus par exemple les phospho-lipides représentent 33 % des lipides totaux (Sivapalan & Jenkins, 1966).

Les condensations en carbone des principaux acides gras trouvés chez les nématodes sont de 18 ou 20 (Sivapalan & Jenkins, 1966 ; Krusberg et al., 1973 ; Fletcher & Krusberg, 1973). Beaucoup d'entre eux sont insaturés : 90 % chez Panagrellus redivivus (Sivapalan & Jenkins, 1966), 80 % chez les femelles de Meloidogyne incognita et M. arenaria (Krusberg et al., 1973) et 66 % chez Turbatrix aceti (Fletcher & Krusberg, 1973). Chez Meloidogyne incognita et M. arenaria l'acide vaccénique ($18 : 1^{w7}$) constitue à lui seul 25-30 % du poids sec des femelles et plus de 40 % du poids sec des oeufs (Krusberg et al., 1973). L'analyse comparée du milieu de culture et des nématodes qui en sont issus permet de montrer que les nématodes synthétisent eux mêmes leurs acides gras (Krusberg, 1972 ; Rothstein & Götz, 1968 ; Krusberg, 1967).

Glucides : Les glucides ont été étudiés principalement chez les nématodes zooparasites, chez qui ils représentent la réserve énergétique principale (Barrett, 1976). Chez les nématodes libres et phytoparasites, ce rôle des glucides semble être beaucoup plus réduit. L'essentiel des connaissances concernant les glucides des nématodes phytoparasites a été obtenu par des colorations histochimiques. Ainsi les cellules intestinales de Meloidogyne incognita contiennent des inclusions de glycogène (Dropkin et Acedo, 1974 ; Wisse et Daems, 1968 ; Byers & Anderson, 1973). Une espèce non identifiée du genre Aphelenchoides contient 2-9 % de glucides totaux dont 85 % de glycogène (Krusberg, 1971). Le tréhalose et le glycérol semblent impliqués dans la synthèse du glycogène au cours de la réhydratation des nématodes anhydrobiotiques (Crowe et al., 1977).

Protides : Comme chez les autres métazoaires, les protides, chez les nématodes, possèdent d'une part un rôle structural et d'autre part un rôle enzymatique (Krusberg, 1971). Cependant l'histochimie a pu mettre en évidence dans les cellules intestinales des juvéniles de Meloidogyne javanica des granules protéiques qui sont dégradés au cours du jeûne (Chitwood, 1951 ; Van Gundy et al., 1967). Ces inclusions auraient donc un rôle de réserve.

3.2.2. La consommation des réserves

L'étude de la consommation des réserves chez les nématodes a donné lieu à trois types de travaux.

Etudes semi quantitatives : Elles consistent à colorer par une réaction histochimique les lipides présents dans le tractus digestif des nématodes. Une observation microscopique permet alors de mesurer la surface occupée par la zone colorée. Ce procédé répété à des intervalles de temps successifs permet d'observer une réduction progressive de la surface colorée, donc met en évidence la disparition des lipides (Elliot, 1954 ; Van Gundy et al., 1967).

Etudes quantitatives partielles : On procède à un véritable dosage, après extraction, par pesée ou par réaction colorimétrique sur une ou deux espèces chimiques seulement (en général lipides et glucides). Cependant cette consommation n'est pas confrontée à la variation du poids sec : on ne recueille donc aucune donnée sur l'évolution des espèces chimiques non dosées. Cette procédure a permis d'observer la consommation de lipides et de glucides chez de nombreux nématodes (Van Gundy et al., 1967 ; Cooper & Van Gundy, 1970 ; Croll, 1972 ; Croll & Matthews, 1973 ; Wilson, 1976 ; Barrett, 1969a ; Castro & Fairbairn, 1969b).

Etudes globales : Les dosages portent sur au moins deux des espèces chimiques principales (lipides, glucides et protides) et leur variation globale est comparée à la variation du poids sec. De cette façon on peut vérifier que les espèces chimiques consommées sont bien appréhendées par les méthodes de dosage employées. De telles études globales ont été réalisées chez les nématodes zooparasites par Clark (1969), Wilson (1965a), Magat et al., (1972) et montrent en général une consommation concomitante des trois espèces avec cependant des vitesses différentes : les lipides sont consommés plus rapidement que les glucides et les glucides plus rapidement que les protides.

La disparition d'une espèce chimique au cours du jeûne n'implique pas son catabolisme jusqu'au terme ultime. On a pu ainsi montrer chez certains nématodes la conversion de lipides en glucides (Passey & Fairbairn, 1957 ; Barrett et al., 1970 ; Rubin & Trelease, 1975 ; Barrett et al., 1971) et des transformations réciproques entre lipides, glycogène, tréhalose et glycérol lors des cycles deshydratation-réviviscence chez certains nématodes (Crowe et al., 1977 ; Madin & Crowe, 1975).

La dégradation de ces réserves nécessite un équipement enzymatique dont la détection, chez les nématodes, a déjà fait l'objet de travaux importants, mentionnés dans une récente revue de Barrett (1976). Les lipides sont dégradés par la B oxydation (Ward & Fairbairn, 1970 ; Barrett *et al.*, 1971) et les glucides par la glycolyse (Krusberg, 1960 ; Ells, 1969). L'ensemble des unités tricarbonées provenant des deux voies précédentes est alors repris par le cycle tricarboxylique (Krusberg, 1960 ; Hussey *et al.*, 1972) secondé par les chaînes d'oxydation terminales à cytochromes (Cooman, 1950 ; Krusberg, 1960). Les séquences enzymatiques impliquées dans la conversion des lipides en glucides (cycle glyoxylique) ont été retrouvées chez les nématodes (Patel & Mc Fadden, 1978b).

3.2.3. Les échanges non gazeux avec le milieu externe

A l'exclusion du catabolisme normal, qui correspond à la perte insensible, et dont nous avons vu, au paragraphe précédent, les caractéristiques principales, trois autres mécanismes sont a priori susceptibles de modifier la composition chimique des nématodes.

Perte et absorption d'eau : Un certain nombre d'espèces de nématodes sont capable de perdre leur eau et de passer à l'état anhydrobiotique, dans lequel leur métabolisme est pratiquement suspendu (Demeure, 1975 ; Madin & Crowe, 1975).

Excrétion : In vitro, les nématodes libres et phytoparasites excrètent dans la solution qui les baigne aminoacides, protides, sucres, etc... (Aist & Riggs, 1969 ; Myers & Krusberg, 1965 ; Rothstein, 1963 ; Wang & Bergeson, 1978). Ceci semblerait indiquer, qu'au moins en partie, le catabolisme des réserves n'est pas complet mais aboutit à l'excrétion de métabolites encore pourvus d'énergie.

Absorption et utilisation des substrats exogènes : Il s'agit là d'une question que les physiologistes se posent à propos de l'ensemble des invertébrés aquatiques. Deux méthodes permettent de se rendre compte de l'absorption et de l'utilisation d'un substrat exogène par un invertébré aquatique : son action sur la respiration, que nous verrons plus loin, et

l'utilisation de molécules marquées. Dans le cas des nématodes, le nombre limité des expérimentations réalisées ne permet pour l'instant que d'indiquer deux tendances : une sélectivité vis à vis de la substance et des dispositions plus grandes chez certains groupes (zooparasites, dorylaimides) que chez d'autres (nématodes libres, mycophages et bactériophages, et phytoparasites)(Marks et al., 1968 ; Mayo & Thomas, 1971 ; Castro & Fairbairn, 1969a ; Rutherford & Webster, 1974).

3.2.4. La fonction respiratoire chez les nématodes

L'organisation des nématodes est caractérisée par l'absence d'un appareil respiratoire différencié. L'absorption d'oxygène et l'élimination du gaz carbonique formé s'effectuent donc uniquement par diffusion à travers les cellules. Rogers (1962) a établi un modèle mathématique permettant de prévoir l'incidence de ce mécanisme de diffusion de l'oxygène dans un organisme cylindrique sur la consommation d'oxygène de cet organisme. On constate que le long d'un rayon, s'établit un gradient de concentration d'oxygène décroissant de l'extérieur vers le centre. Dans l'air ambiant, la concentration devient nulle au centre pour un rayon supérieur à 50 microns. Dans le cas d'Ascaris sp., dont le rayon excède plusieurs millimètres, on peut donc observer la concomitance de deux sortes de métabolismes : aérobie pour les tissus superficiels et anaérobie pour les tissus profonds (Von Brand, 1966). Réciproquement, pour des nématodes d'un rayon inférieur à 50 microns, il existe une valeur de la tension d'oxygène du milieu ambiant pour laquelle la concentration au centre devient nulle.

Deux mécanismes seraient capables de modifier cette conception initiale. D'une part, Klingler et Kunz (1974) ont observé que des nématodes libres avalent des bulles d'air par l'oesophage et suggèrent un rôle d'appoint respiratoire à cette fonction. D'autre part, Atkinson (1976) invoque des mouvements du liquide pseudocoelomique, qui seraient capables de modifier le gradient de diffusion. Cependant l'examen des coupes transversales de nématodes (Zuckerman et al., 1971 ; Bird, 1979) révèle que les organes internes (tractus digestif et appareil génital) sont étroitement appliqués contre la face interne du fourreau épidermo-musculaire, rendant ainsi virtuel l'espace pseudocoelomique.

Les cellules des nématodes libres et phytoparasites sont pourvues de mitochondries (Wisse & Daems, 1968 ; Zuckerman et al., 1971 ; Zmoray et al., 1972 ; Dropkin & Acedo, 1974 ; Kondo & Ishibashi, 1976 ; Murfitt et al., 1976). Les enzymes à cytochromes de la chaîne terminale d'oxydation sont présents chez de nombreuses espèces libres et phytoparasites (Cooman, 1950 ; Krusberg, 1960 ; Bryant et al., 1967 ; Deubert & Zuckerman, 1968 ; Baxter & Blake, 1969).

Certains nématodes sont capables de supporter l'absence totale d'oxygène pendant des périodes plus ou moins longues. Au cours de ces périodes d'anaérobiose, l'activité des nématodes est suspendue ainsi que la reproduction. Le retour à une tension d'oxygène normale (21 %) restaure, après un délai, l'ensemble des fonctions physiologiques interrompues (Banage, 1966 ; Feldmesser & Feder, 1954 ; Feder & Feldmesser, 1955 ; Cooper & Van Gundy, 1970 ; Costello & Grollman, 1958).

Chez un certain nombre d'autres espèces, au contraire, le séjour en anaérobiose conduit à la mort, dès qu'il excède une durée de quelques heures (Bryant et al., 1967 ; Nicholas & Jantunen, 1964 ; Nicholas & Jantunen, 1966).

La discussion des mécanismes biochimiques qu'impliquent ces divers résultats a fait l'objet d'un certain nombre de revues (Hochachka et al., 1975 ; Von Brand, 1960b, 1966 ; Nicholas, 1975 ; Lee & Atkinson, 1976).

La faible masse individuelle des nématodes ainsi que la difficulté à réunir de grands nombres d'individus synchronisés ont déterminé le choix des méthodes utilisées pour mesurer leur consommation d'oxygène : on procède par confinement des animaux dans une enceinte étanche aux échanges gazeux. La disparition de l'oxygène consommée à l'intérieur de cette enceinte est alors mesurée en fonction du temps par différents procédés :

Gasométrie : L'enceinte contient un volume d'air gazeux et, isolé du contact des animaux, une certaine quantité d'une solution d'une base (soude ou potasse), qui fixe le gaz carbonique dégagé. La mesure consiste

à noter la variation de pression à appliquer au volume d'air gazeux résiduel afin de lui conserver un volume constant à température constante. Ce principe a reçu plusieurs applications, dont la plus connue est le respiromètre de Warburg (Umbreit et al., 1966) et dont le plus sensible, le respiromètre à ludion (Linderstrom-Lang, 1937), sera utilisé au cours de cette étude. La plus grande partie des études respirométriques réalisées jusqu'à ce jour avec les nématodes ont utilisé l'une ou l'autre de ces deux techniques.

Polarographique : L'enceinte ne contient pas d'air à l'état gazeux mais seulement de l'air à l'état dissout dans la solution aqueuse, au sein de laquelle baignent les animaux. Le gaz carbonique, au fur et à mesure de son dégagement, se dissout également dans la même solution. La disparition de l'oxygène dans cette solution est mesurée, par polarographie, à l'aide d'une électrode de Clarke, spécifique de l'oxygène dissout. Ce procédé a été appliqué au cas des nématodes par Atkinson (1973), Atkinson et Smith (1973), Atkinson et Ballantyne (1977) et Anderson et Dusenbery (1977).

Chimique : Le dispositif employé est identique à celui de la mesure polarographique, mais la disparition de l'oxygène est mesurée par le dosage chimique de l'oxygène dissout par la méthode de Winkler. Ce procédé a été appliqué par Bair (1955) au cas des nématodes, mais Anderson et Dusenbery (1977) ont montré qu'il pouvait conduire à des résultats erronés.

Il importe par ailleurs que les nématodes introduits dans l'enceinte de mesure soient dépourvus de microorganismes contaminants (bactéries, champignons, etc...) dont la respiration propre fausserait les résultats. Le souci que les expérimentateurs manifestent à propos de cette question est extrêmement variable. Rappelons tout d'abord qu'il y a lieu de distinguer une contamination externe, adhérente à la cuticule de l'animal et une contamination interne, constituée par l'éventuel contenu microbien du tractus digestif. Dans l'ordre des Tylenchida, qui comprend la plupart des nématodes phytoparasites importants, la partie antérieure du tractus digestif est constituée par un stylet dont la lumière, d'un diamètre inférieur à 0,25 μ m, fait office de filtre bactérien (Bird, 1971). On ne doit donc se préoccuper, pour ce groupe, que de la

contamination externe. La stérilisation superficielle peut être obtenue soit par des lavages à l'eau stérile ou mieux par des séjours dans des solutions d'antibiotiques (Zuckerman, 1971). D'autres solutions consistent à utiliser des animaux provenant d'élevages axéniques (pour les espèces libres) ou monoxéniques (pour les espèces phytoparasites) ou d'effectuer les mesures en présence d'antibiotiques. Dans ce dernier cas, on s'impose une incertitude à propos d'une éventuelle action du produit utilisé sur la respiration des animaux.

Enfin, la consommation d'oxygène doit être rapportée à une grandeur quantitativement représentative du lot d'animaux enfermés dans l'enceinte de mesure. En respirométrie, on utilise habituellement le poids sec (Umbreit et al., 1966) mais peu d'expérimentateurs l'ont employé pour les nématodes. Par contre la respiration a souvent été rapportée soit au poids frais, calculé à partir des mensurations morphométriques déterminées au microscope et de la densité (Andrassy, 1956) soit à l'individu. Cette diversité des modalités d'expression des résultats ne favorise évidemment pas la comparaison des différents travaux.

3.2.5. Variations de la consommation d'oxygène chez les nématodes

L'intensité respiratoire des nématodes peut varier sous l'influence de facteurs externes et de facteurs internes.

Facteurs externes : Les principaux facteurs externes à considérer sont la pression osmotique, le pH, les pressions partielles d'oxygène et de gaz carbonique, une anacrobiose préalable, la température et la présence de produits chimiques en solution dans le liquide de suspension.

L'influence qu'exerce la pression osmotique sur la consommation d'oxygène des nématodes dépend de la nature de la substance utilisée : électrolyte ou non électrolyte. Des concentrations croissantes de sels minéraux dépriment l'intensité respiratoire (Schwabe, 1957 ; Fernando, 1963 ; von Brand, 1942 ; Bhatt et Rohde, 1970 ; Barret, 1969c). Des concentrations croissantes d'urée stimulent l'intensité respiratoire jusqu'à une valeur optimale au delà de laquelle est observée une diminution (Wallace & Greet, 1964 ; Bhatt & Rohde, 1970).

Le pH dans des limites de 3 à 8, qui correspondent aux pH rencontrés par les trois groupes de nématodes dans leurs milieux naturels respectifs, affecte peu leur intensité respiratoire (von Brand, 1943 ; Cooman, 1950 ; Schwabe, 1957 ; Barrett, 1969c ; Von Brand, 1960a).

Zeuthen (1955) et von Brand (1960b) distinguent les animaux à respiration dépendante, dont l'intensité respiratoire diminue avec la pression partielle d'oxygène, et les animaux à respiration indépendante, dont l'intensité ne varie pas en fonction de ce paramètre, du moins jusqu'à un certain seuil critique. Chez les nématodes, la respiration indépendante semble être la règle (Nielsen, 1949 ; Bair, 1955 ; Bryant et al., 1967) et la respiration dépendante l'exception (Atkinson, 1973, 1976 ; von Brand, 1960b).

L'ambiance gazeuse des respiromètres gazométriques (warburg, ludion), qui sont les plus utilisés, présente normalement, à cause de la base placée dans l'enceinte de mesure, une tension nulle de gaz carbonique. En utilisant, à la place de la soude, des tampons spéciaux, qui maintiennent constante mais non nulle la tension de gaz carbonique, Rohde (1960) puis Bhatt et Rohde (1970) ont montré que la présence du gaz carbonique stimule l'intensité respiratoire de certains nématodes.

Certains organismes, après avoir été maintenus pendant quelques temps dans une ambiance privée d'oxygène, manifestent, lorsqu'ils sont replacés dans l'air ambiant, une intensité respiratoire temporairement accrue. Cette hyperconsommation postanaérobie, encore appelée paiement de la dette d'oxygène, est attribuée à l'oxydation métabolique des produits accumulés au cours de l'anaérobiose (von Brand, 1960b). Chez les nématodes, on rencontre des animaux qui présentent ce phénomène (Barrett, 1960c ; Cooper & Van Gundy, 1970), et d'autres pour lesquels ce phénomène n'est pas sensible (Atkinson, 1973).

L'intensité respiratoire des nématodes augmente lorsque la température croît dans certaines limites (von Brand, 1943 ; Nielsen, 1949 ; Santmyer, 1956 ; Fernando, 1963 ; Barrett, 1969c ; Bhatt & Rohde, 1970 ; Anderson, 1978 . Dusenbery et al., 1978 ; Burman & Pye, 1980).

Cette stimulation est attribuée à deux mécanismes chez les animaux : une action sur la rapidité des processus métaboliques qui s'effectuent dans les tissus et une action directe sur le système nerveux central qui affecterait ensuite le fonctionnement des organes (Krogh, 1916). Chez les nématodes, on avait jusqu'à présent tendance à estimer que le premier mécanisme seul était essentiel (von Brand, 1960c ; Rohde, 1971). Cependant l'examen de résultats plus récents (Wilson, 1965b ; Cooper & Ferguson, 1973 ; Atkinson, 1976) laisse supposer que les phénomènes de compensation métabolique d'origine nerveuse (Bullock, 1955) seraient, chez les nématodes, plus importants que ne le faisait prévoir le caractère simplifié de leur organisation. Par ailleurs, au delà d'une certaine température, l'intensité respiratoire décroît, indiquant vraisemblablement une altération des processus respiratoires (Santmyer, 1956 ; Bhatt & Rohde, 1970).

Certaines espèces de nématodes voient leur intensité respiratoire modifiée par des substances chimiques dissoutes dans leur milieu de suspension. Ainsi la respiration peut être stimulée par le glucose (Sembdner et al., 1961) ou de faibles doses de nématocides (Marks, 1971 ; Ritzrow & Kämpfe, 1971) ; elle peut être par contre déprimée par certains acides organiques (Karpiak et al., 1965). Chez d'autres espèces au contraire ces mêmes substances sont sans effet (Stannard et al., 1938 ; Cooman, 1959 ; Ells & Read, 1961 ; Barrett, 1969b).

Facteurs internes : Les principaux facteurs internes à considérer sont la taille, l'activité, l'âge et le jeûne.

L'intensité respiratoire, rapporté à l'unité de poids (ou de volume) est une fonction décroissante du poids individuel chez les nématodes (von Brand 1960c ; Atkinson, 1976). On observe une bonne continuité de ce paramètre entre les différents stades d'une même espèce et même entre différentes espèces d'une taille croissante.

L'inhibition de l'activité par une substance chimique comme l'uréthane n'affecte pas l'intensité respiratoire chez plusieurs espèces de nématodes libres (Nielsen, 1949). Par ailleurs, l'activité spontanée chez certains nématodes ne justifie qu'une très faible part de la

consommation d'oxygène (Santmyer, 1956).

Chez un certain nombre de nématodes, le maintien in vitro, en l'absence de nourriture, qui intègre à la fois les effets du jeûne et ceux du vieillissement, provoque une diminution notable de l'intensité respiratoire (Van Gundy et al., 1967 ; Santmyer, 1956 ; Mercer & Cairns, 1973). Chez d'autres espèces au contraire aucun effet n'est observé (Nielsen, 1949 ; Atkinson, 1976 ; Cooper & Van Gundy, 1970).

3.3. LA CONSOMMATION DES RESERVES

3.3.1. Principe de l'étude

Les quantités de matériel biologique produites par les élevages d'Heterodera oryzae et de Meloidogyne javanica rendaient a priori possible une étude globale des variations concomitantes du poids sec et des quantités de lipides, glucides et protides au cours du jeûne. Il convenait alors de définir la méthodologie à suivre pour les déterminations des différents paramètres et de choisir le mode d'expression des résultats.

Déterminations : L'extraction successive, à partir d'un même lot d'animaux, des lipides, puis des glucides puis des protides, s'est révélée à l'expérience, compte tenu du matériel disponible, complètement irréalisable, à cause des pertes inhérentes à chaque étape. On a donc préféré recourir à la méthodologie employée par Magat et al., (1972) qui consiste à réaliser un certain nombre d'échantillons, contenant des nombres identiques de juvéniles, sur chacun desquels est effectuée une seule détermination : poids sec, lipides, glucides ou protides. De plus, pour simplifier encore, on a choisi d'effectuer la détermination sans extraction préalable de la substance à doser. Pour cela, les animaux constituant l'échantillon sont tout d'abord solubilisés dans un réactif approprié, puis la substance est dosée dans cette solution par une réaction colorimétrique. Il est donc évident que le succès de cette méthodologie, décrite plus loin (3.3.2.), repose sur deux exigences : la

réalisation d'échantillons contenant le même nombre d'animaux, c'est le rôle de l'échantillonnage (3.3.2.1.) et l'utilisation de réactions colorimétriques sur lesquelles les substances étrangères, présentes dans la solution, n'exercent aucune interférence, ce sont les réactions spécifiques (du 3.3.2.2. au 3.3.2.5.).

Expression des résultats : L'usage, dans cette catégorie d'études, est d'exprimer les résultats en pourcentage du poids sec. Dans la mesure où le poids sec lui-même diminue avec la durée du jeûne, cette pratique affaiblit l'amplitude des variations observées, ce qui peut nuire à la netteté de certains travaux comparatifs. Par ailleurs, ce choix rend difficile la confrontation des résultats concernant la consommation des réserves avec ceux concernant la respirométrie, qui sont eux-mêmes plus facilement exprimés par rapport au nombre d'individus. On a donc choisi d'exprimer la consommation des réserves par rapport à l'individu. Quelques calculs par rapport au poids sec seront effectués aux fins de comparaison avec les résultats des autres auteurs.

L'étude des variations du poids sec et des réserves au cours du jeûne in vitro a été conduite chez les juvéniles d'Heterodera oryzae, les juvéniles de Meloidogyne javanica et les adultes d'Hirschmanniella spinicaudata.

3.3.2. Méthodologie

3.3.2.1. Echantillonnage

Les nématodes soumis à l'échantillonnage doivent être vivants et propres. Pour le premier caractère, comme l'étude est limitée aux formes actives, on procède au test de passage actif à travers un tissu de cellulose, que nous avons déjà employé lors de la purification initiale des nématodes après leur récolte (fig. 7). Cependant ce procédé exige deux délais : celui nécessaire au passage à travers le tissu qui est fixé à 24 heures et celui qui permet de concentrer les animaux par sédimentation avant leur dépôt sur le tissu, qui est de l'ordre de 4 à 8 heures selon les espèces. Le dispositif représenté par la fig. 44 combine sédimentation et passage actif : il est particulièrement indiqué dans le

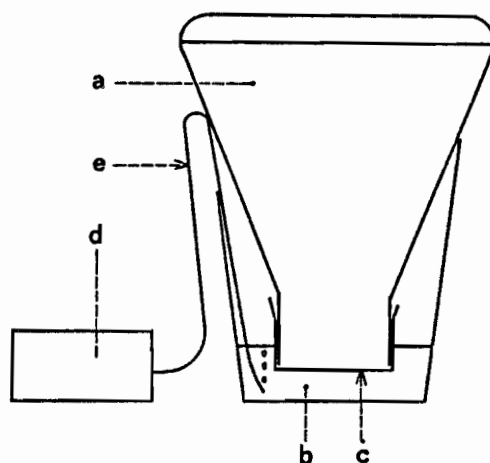


Fig. 44. - Représentation schématique du dispositif employé pour la purification des juvéniles, combinant la sédimentation et le passage actif à travers un filtre en tissu de cellulose (a : 1 litre de suspension contenant de $5 \cdot 10^5$ à 10^6 juvéniles ; b : 60 ml d'eau déminéralisée ; c : kleenex plié en quatre ; d : pompe à aquarium ; e : aération par bullage d'air).

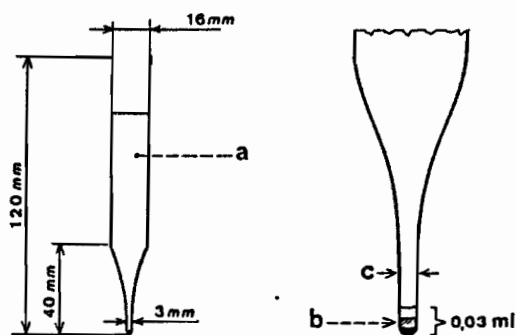


Fig. 45. - Représentation schématique des tubes à échantillon à centrifuger, obtenus par étirage d'un tube à essai de 16 x 160 (a : suspension contenant $3 \cdot 10^4$ juvéniles purifiés ; b : culot de nématodes après centrifugation ; c : coupure du tube pour le dosage de l'azote total, voir 3.3.2.5.).

cas des juvéniles de Meloidogyne javanica, qui sédimentent lentement, qui sont très actifs et dont la longévité plus faible exige que ces manipulations préliminaires soient réduites au minimum (dans ce cas 24 heures).

Lors du passage actif, les animaux en s'insinuant par force entre les fibres de cellulose se débarrassent de leurs contaminants superficiels. Il existe un antagonisme entre la rapidité du passage actif et l'efficacité de ce nettoyage, lié à l'épaisseur du tissu de cellulose employé. Le Kleenex ménager (constitué lui même de deux feuillets) en quatre épaisseurs permet une excellente purification et un passage maximum en 24 heures. La propreté obtenue est quantitative, c'est à dire que la quantité d'impuretés qui pourraient interférer dans les dosages présente de visu un volume nul par rapport à celui des animaux. Cette propreté n'est pas qualitative : les animaux peuvent être contaminés extérieurement par des microorganismes, ce dont il faudra tenir compte pour des mesures respirométriques.

Tubes à échantillons : Les nombres requis d'animaux sont rassemblés dans des tubes à échantillons centrifugeables (fig. 45). La forme de ces tubes permet, après centrifugation et élimination du surnageant, que le volume résiduel total, comprenant le culot d'animaux et l'eau en excès, soit de l'ordre de 30 µl. Ce faible volume autorise, sans risque de casse, un stockage du tube au congélateur à - 20° et représente une source d'erreur minime en regard des volumes de réactifs qui seront utilisés par la suite. Le seul problème important est celui de la propreté de l'intérieur de ces tubes ; on l'obtient par une immersion d'une semaine dans un détergent minéral (type mucasol) suivi d'un stockage dans l'acide sulfurique à 1 % jusqu'au moment de l'emploi ou les tubes sont simplement rincés à l'eau déminéralisée ou distillée.

L'échantillonnage individuel : Pour l'ensemble des techniques de dosage employées, l'échantillon minimum requis est de 200 ug de poids sec. Cela représente de l'ordre de 8 000 à 10 000 juvéniles d'Heterodera ou de Meloidogyne : on ne peut donc pas procéder à l'échantillonnage par collecte individuelle. Par contre, cette quantité minimale ne représente que 75 femelles ou 100 mâles d'Hirschmanniella spinicaudata. Les

échantillons pour cette espèce peuvent donc être réalisés par pêche individuelle. Pour cela on délivre un volume de suspension dans une lame de comptage en plexiglass quadrillée (Merny & Luc, 1969). En suivant les rangées de la lame on prélève chaque adulte actif sans exception (de l'un ou de l'autre sexe) et on le dépose dans un tube à échantillon différent. Cette procédure est poursuivie jusqu'à ce que chaque tube ait reçu le nombre requis d'individus : 100 mâles ou 75 femelles. Ce remplissage simultané de l'ensemble des tubes à échantillon d'un même sexe est nécessaire pour répartir au hasard ces animaux dont la taille est variable.

L'échantillonnage d'une suspension : La réalisation d'échantillons de nématodes de petite taille (comme les juvéniles d'Heterodera ou de Meloidogyne) contenant des nombres équivalents d'individus doit donc être faite par distribution d'une suspension homogène. Lorsque l'on procède à cette répartition de la suspension par pipetage de volumes égaux, la variance entre les nombres distribués devrait être en principe égale à leur moyenne en suivant une distribution de Poisson (Peters, 1941). En pratique cependant, les variances observées sont beaucoup plus élevées que les moyennes (Moriarty, 1963) et dans diverses publications récentes a été proposé un fractionnement de la distribution, de façon à diminuer cette variance. Wilson (1976) procède à deux pipetages partiels en expliquant que "la tendance du pipetage de prélever de l'eau plutôt que des animaux est ainsi répartie au hasard". En effectuant dix pipetages partiels, Castro et Fairbairn (1969b) réduisent à 2 % leur coefficient de variation.

Dans cette perspective, nous avons mis au point une distribution au goutte à goutte de la suspension de juvéniles. Dans l'appareil utilisé (fig. 46), la suspension de nématodes, maintenue homogène soit par bullage d'air (A) soit par agitation mécanique (B), coule par gravité à travers un étroit tube en plastique et est délivrée au goutte à goutte à son extrémité (100 gouttes = 3,25 ml).

Les performances de ce dispositif sont à juger à deux niveaux : variance du contenu des gouttes et homogénéité de la suspension.

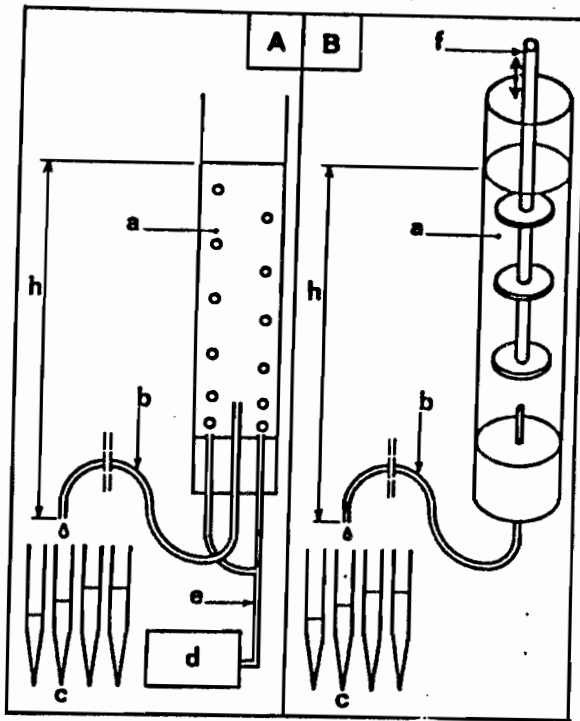


Fig. 46.

- Représentation schématique du dispositif employé pour l'échantillonnage au goutte à goutte de la suspension de juvéniles purifiés.

A - Homogénéisation par bullage d'air.

B - Homogénéisation par un agitateur à mouvement vertical alternatif.

(a : 250 ml de suspension de juvéniles purifiés ; b : capillaire en plastique souple, diamètre : 1 mm, longueur : 60 cm ; c : tubes à échantillon ; d : pompe à aquarium ; e : tubulures pour bullage d'air ; f : agitateur ; h : hauteur constante).

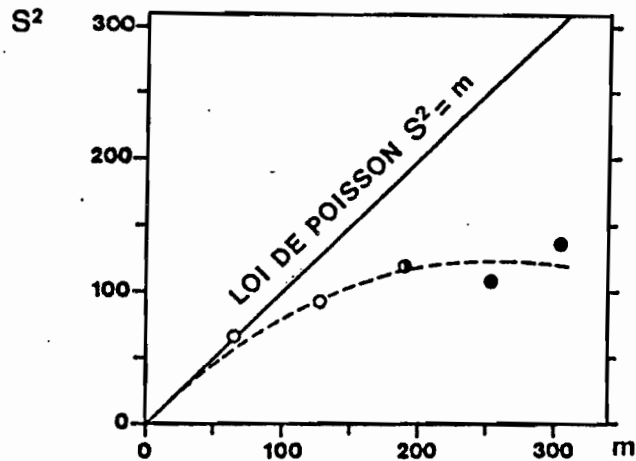


Fig. 47. - Distribution au goutte à goutte de suspensions de juvéniles purifiés d'*Heterodera oryzae* fraîchement éclos : relation entre la moyenne (m) et la variance (S^2) du nombre de juvéniles dans une goutte pour cinq densités différentes (24 gouttes comptées pour chaque densité).

Les points expérimentaux (cercles) et la courbe théorique de Poisson (droite) sont comparés par le test de χ^2 selon Peters (1952) et Lellouch (1964) : significativement différents au seuil de 0,01 (cercles noirs) et au seuil de 0,025 (cercles demi noirs) ; non significativement différents (cercles blancs).

Variance : La figure 47 donne la relation entre variance et moyenne du nombre de nématodes par goutte pour cinq densités différentes de suspension. On observe donc que l'augmentation de la densité de la suspension ($m = 300$ correspond à 9 230 animaux/ml) diminue considérablement la variance par rapport à celle qui est prévue par la distribution de Poisson. On s'approche donc du cas d'une distribution uniforme (Balaam, 1972).

Homogénéité : Le tableau 10 donne moyenne et variance du nombre de nématodes par goutte observé au cours de l'écoulement d'une suspension de 250 ml de juvéniles d'Heterodera oryzae. L'analyse de variance révèle que le contenu des gouttes reste constant au cours des différentes phases de l'écoulement de la suspension : ceci montre que l'homogénéisation par bullage employée dans ce cas, convient à cette espèce. La même expérience conduite avec des juvéniles de Meloidogyne javanica conduit à un résultat différent : le nombre de juvéniles par goutte augmente progressivement avec le volume écoulé. L'observation montre qu'une partie des juvéniles flotte au contact air eau et est entraînée vers le haut par les bulles. L'homogénéisation par bullage d'air ne convient donc pas à cette espèce : on utilisera dans ce cas un agitateur à disques (fig. 46 B) entraîné par un moteur électrique à mouvement vertical alternatif.

Réalisation des échantillons : Un échantillonnage type de juvéniles d'Heterodera oryzae comprend la réalisation de 30 échantillons de 30 000 juvéniles à partir de 250 ml de suspension contenant 7 500 juvéniles/ml : il faut donc délivrer 120 gouttes par tube à échantillon. De façon à répartir les anomalies, comme dans le cas de l'échantillonnage individuel, on délivre 30 gouttes dans chacun des 30 tubes, puis à nouveau 30 gouttes dans chacun des 30 tubes, etc... Trois tubes également répartis dans la série (par exemple de rangs 1, 11 et 21) sont utilisés en vue d'un dénombrement précis de l'échantillon comme nous le verrons plus loin. De trois à six tubes sont également mis de côté pour la détermination du poids sec. Tous les autres tubes sont centrifugés, leur surnageant enlevé, puis placés au congélateur après bouchage.

Pour le dénombrement, chacun des trois tubes retenus est dilué à 250 ml, puis, à l'aide du dispositif de goutte à goutte, on réalise 2 échantillons pour chaque tube. Les résultats d'un comotage type (tableau 11) montrent le niveau de précision obtenue.

TABLEAU 10 Distribution au goutte à goutte d'une suspension de juvéniles d'Heterodera oryzae : effet du volume écoulé sur le nombre de juvéniles par goutte.

Volume écoulé (ml)	Comptage de 24 gouttes pour chaque volume écoulé	
	Moyenne	Variance
0	88,3	98
50	90,2	90
100	85,9	121
150	86,2	71

Analyse de variance : $F = 1$ avec un F limite de 4.

TABLEAU 11 Distribution au goutte à goutte d'une suspension de juvéniles d'Heterodera oryzae : comptage de trois tubes à échantillons

Tube de rang n°		1	5	8
Nombre de juvéniles par aliquot (1)	1er comptage	290	301	299
	2ème comptage	292	289	277
Moyenne :		291	Variance : 73	

(1) Aliquots obtenus à l'aide de la technique du goutte à goutte à partir de chacun des trois tubes à échantillon dilué à 250 ml : aliquots de 75 gouttes (2,55 ml)

3.3.2.2. Détermination du poids sec

On a utilisé successivement deux méthodes : la première par filtration, la seconde par centrifugation.

La méthode par filtration a été employée avant la mise au point de l'échantillonnage au goutte à goutte. L'échantillon de 100 000 juvéniles est alors réalisé par pipetage à partir d'une suspension homogénéisée par bullage d'air (Cette méthode n'a été employée qu'avec Heterodera oryzae). Dans ces conditions, la variabilité due au pipetage oblige à compter les juvéniles présents dans l'échantillon avant de les soumettre à la pesée. Pour cela l'échantillon est complété à un litre avec de l'eau déminéralisée filtrée sur filtre à bougie. Puis à partir de cette suspension homogénéisée par bullage d'air, trois échantillons de 5 ml sont prélevés et leur contenu en juvéniles compté. Les échantillons sont restitués à la suspension qui est alors placée pendant une nuit au réfrigérateur à 4°. Les juvéniles ayant alors sédimenté, les 900 ml de surnageant sont mis de côté et les 100 ml restants, contenant les juvéniles sont filtrés sur un filtre Millipore (diamètre 25 mm, diamètre des pores 8 microns) préalablement séché et taré. Le filtre supportant les nématodes est repesé après 48 heures de dessèchement sur silicagel à la température ambiante. Toutes les pesées sont faites sur une balance Mettler MSA d'une précision pratique de 0,01 mg. La rehydratation progressive du filtre et des nématodes au contact de l'ambiance oblige à effectuer une pesée cinétique avec extrapolation au temps zéro, qui correspond à l'instant où le filtre est sorti du dessiccateur. Aux 900 ml de surnageant mis précédemment de côté, sont ajoutées les eaux de rinçage du matériel de filtration. On peut ainsi par le comptage d'aliquots déterminer le nombre de juvéniles qui n'ont pas été recueillis sur le filtre.

La méthode par centrifugation utilise une balance à torsion Sauter d'une portée de 1 mg et d'une précision pratique de 0,005 mg. 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° pendant une heure. Après refroidissement chaque coupelle est pesée individuellement sur la balance. Les trois ou six tubes retenus précédemment pour détermination du poids sec sont centrifugés puis trempés dans l'eau bouillante pendant trois minutes de façon à tuer les juvéniles. Le culot de chaque tube est alors prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur puis déposé dans une coupelle avec un volume d'eau minimum. La dessiccation est alors conduite au four en deux temps : une heure à 80° pour éliminer l'eau sans risque de projection puis deux heures à 110°. Les coupelles sont ensuite stockées dans la boîte à gants, contenant la balance en ambiance desséchée par le silicagel, pendant au moins 48 heures avant la pesée. De même que dans la méthode précédente, le matériel qui a contenu l'échantillon (tube à échantillon, pipette Pasteur) est rincé 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.

Dans les deux méthodes le poids sec est exprimé en nanogramme (10^{-9} g) par individu.

3.3.2.3. Dosage des lipides totaux

Principe : Les nématodes 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°.
- 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 trois mois à 4°.

Digestion sulfurique : A chacun des tubes à échantillon sont ajoutés, dès la sortie du congélateur, 5 ml d'acide sulfurique. Les tubes fermés par une bille de verre sont alors portés au bain-marie à 100° pendant dix 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 12. Après leur addition dans le tube, les deux premiers réactifs (acide phosphorique et solutions 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° pendant une heure : la coloration prend son maximum d'intensité. Les tubes sont sortis de l'étude et placés à refroidir pendant 1/4 heure à la température ambiante.

Les colorations sont alors lues au spectrophotomètre à 550 nm 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 ug et présente une valeur de 0,83 pour 100 ug d'huile.

TABLEAU 12 Addition des réactifs pour le dosage des lipides totaux par la vanilline

Réactifs dans l'ordre d'addition	Témoin	Gamme étalon	Essai nématodes (1)
1 Acide phosphorique	2 ml	2 ml	2 ml
2 { Acide sulfurique Solution étalon d'huile dans l'acide sulfurique Digestat sulfurique	2 ml	0	0
	0	2 ml	0
	0	0	2 ml
3 Solution de vanilline	1 ml	1 ml	1 ml

(1) 2 répétitions pour chacun des tubes à échantillons.

TABLEAU 13 Addition des réactifs pour le dosage des glucides totaux par l'anthrone

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

(1) 1 répétition pour chacun des tubes à échantillons.

TABLEAU 14 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)
1 { Soude normale Eau Solution étalon de sérum albumine Digestat sodique dilué	1 ml	1 ml	0
	1 ml	0	0
	0	1 ml	0
	0	0	2 ml
2 Solution cuivrique alcaline	5 ml	5 ml	5 ml
3 Réactif de Folin dilué au 1/2	1 ml	1 ml	1 ml

(1) 2 répétitions pour chacun des 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 (1973). 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'un 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. Le chloroforme est évaporé à l'étuve à 40°. Les coupelles sont placées pendant 24 heures en dessiccateur avec du silicagel avant la pesée. Les tubes sont dosés par la méthode décrite précédemment.

3.3.2.4. Dosage des glucides totaux

Principe : Les nématodes 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'antrone 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'antrone : solution d'antrone à 0,2 % dans l'acide sulfurique à 95 %. Ce réactif est gardé au maximum une semaine à 4°.

- Solutions étalons de glucose : la gamme comprend quatre solutions à 25, 50, 75 et 100 ug/2ml. Ces solutions sont gardées au maximum 24 h à 4°.

Digestion potassique : A chacun des tubes à échantillon est ajouté 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° 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 (tableau 13) 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° pour dix 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 nm 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 ug et présente une valeur de 0,62 pour 100 ug de glucose.

3.3.2.5. Dosage des protéines totales et de l'azote total

Principe : Les nématodes sont digérés à chaud en milieu sodique et leurs protides sont solubilisés. 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 Na_2CO_3 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 SO_4 .

- 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 séralbumine bovine à 100 mg/ml (Sigma) gardée à 4°. Quatre dilutions sont préparées : à 50, 100, 150 et 200 ug/1 ml.

Digestion sodique : A chacun des tubes à échantillon 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° jusqu'à digestion complète des juvéniles : 5 minutes pour M. javanica et 1/4 heures 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 14. Les tubes de la gamme étalon sont soumis au même traitement thermique que les juvéniles : un séjour de cinq minutes au bain-marie à 100° 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° 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°.

L'intensité de la coloration bleue développée est lue aussitôt après au spectrophotomètre à 750 m μ m 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 ug de séralbumine, la densité optique est sensiblement proportionnelle à la quantité de protéines. La densité optique présente une valeur de 0,220 pour 100 ug de séralbumine.

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 (Umbreit et al., 1966). L'extrémité d'un tube à échantillon est soigneusement lavée à l'alcool puis coupée (flèche C sur

la fig. 45) 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 dix 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 vingt minutes environ. Le volume est complété à 20 ml avec de l'eau déminéralisée.

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 ug et 10 ug 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 nm. 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 ug d'azote.

3.3.2.6. Détermination de la demande chimique d'oxygène

Principe : Cette détermination consiste à mesurer, par voie chimique, à l'aide d'un oxydant énergétique, la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation totale du matériel biologique étudié. Cette technique, qui utilise le bichromate de potassium en solution sulfurique à chaud, a été mise au point pour le dosage du carbone des sols (Allison, 1965), mais permet également, avec une manipulation plus soignée, la détermination d'espèces chimiques définies (Ivlev, 1934 ; Dobbs & Williams, 1963). Nous appliquerons dans ce travail une adaptation de la technique de Ryding et Forsberg (1977).

Echantillons : Les échantillons sont identiques à ceux qui ont été préparés pour le dosage des réserves (3.3.1.) contenant environ 30 000 juvéniles. Toutefois pour des raisons de sécurité du stockage ces échantillons ont été lyophilisés puis stockés à nouveau au congélateur.

Réactifs : Tous les réactifs sont de la qualité pur pour analyse et les solutions sont préparées dans de l'eau déminéralisée.

- Bichromate de potassium : $K_2Cr_2O_7$ 0,5 N. Du bichromate est séché à 105° pendant deux heures ; 24,52 g sont dissous dans de l'eau et le volume est complété à un litre.

- Acide sulfurique au sulfate d'argent : H_2SO_4 90-95 %. Dans un litre d'acide sont dissout 13,3 g de sulfate d'argent Ag_2SO_4 .

- Sulfate de fer (ferreux) et d'ammonium (sel de Mohr) : $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0,06 N. Dans environ 500 ml d'eau sont dissous 23,53 g du sel hexahydraté puis 50 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés et après refroidissement, la solution est complétée à un litre.

- Permanganate de potassium : $KMnO_4$ 0,01 N. Une solution mère à 0,25 N est obtenue en dissolvant 7,902 g de permanganate par litre. La solution de titration à 0,01 N est préparée juste avant usage et titrée de la façon suivante : m mg du sel de Mohr hexahydraté (de l'ordre de 180 mg) sont placés dans un bécher avec 100 ml d'eau et 2 ml d'acide sulfurique concentré. Puis on titre avec le permanganate jusqu'à coloration rose persistante (Vt ml). Le titre du permanganate est alors donné par la relation $t = m/392 Vt$.

Procédure : Dans un tube à échantillon contenant les juvéniles lyophilisés sont ajoutés 1 ml de bichromate et 3 ml d'acide sulfurique au sulfate d'argent, puis le contenu du tube est mélangé vigoureusement. Un tube témoin, sans nématodes est préparé de la même façon. les tubes fermés par une bille de verre sont placés pendant deux heures dans un bain marie bouillant : les juvéniles sont complètement dissous. Le contenu de chaque tube est entraîné dans un erlen de 500 ml avec 100 ml d'eau et 10 ml de sel de Mohr à 0,06 N sont ajoutés : la couleur passe de l'orange au bleu vert. On titre avec le permanganate 0,01 N jusqu'à une coloration rose persistante.

Calcul : La demande chimique d'oxygène, exprimée en nanolitre (10^{-9} l) d'oxygène par juvénile (nlO_2 /juvénile) est calculée par la relation :

$$DCO = (V_e - V_b) \times t \times 56,035 \times 10^5 \times N^{-1}$$

où V_e est le volume de permanganate utilisé pour l'échantillon, V_b le volume de permanganate utilisé pour le témoin, t le titre exact du permanganate et N le nombre de juvéniles contenu dans l'échantillon (La constante $56,035 \times 10^5$ est, en nl , le volume d'oxygène libéré en théorie par 1 ml de permanganate normal lors de sa décomposition par l'acide sulfurique).

3.3.2.7. Détermination de l'opacité

Principe : Chez des nématodes phytoparasites fraîchement éclos ou qui viennent de quitter le contact alimentaire de la plante hôte, le tractus digestif est opaque. Au cours du jeûne, on observe un éclaircissement progressif de cet organe (Wallace, 1966b ; Van Gundy et al., 1967 ; Davies & Fisher, 1976b ; Mc Namara, 1980). D'après ces études, cet éclaircissement est d'autant plus accentué que l'on procède à une coloration des lipides qui constituent les réserves majeures des nématodes phytoparasites, soit par le tetroxyde d'osmium (Van Gundy et al., 1967), soit par le rouge huileux O (Ogunfowora, 1979 ; Storey, 1983). On procède alors à une évaluation des surfaces colorées soit après dessin à la chambre claire par découpage et pesée (Van Gundy et al., 1967) soit par intégration par une mesure à l'aide d'un microdensitomètre (Ogunfowora, 1979 ; Storey, 1983). Il s'agit de ces techniques que nous avons qualifiées de semi-quantitatives dans l'étude bibliographique car elles ramènent dans le plan des données originalement en volume.

La technique photographique employée ici évite l'usage de l'appareil rare qu'est un microdensitomètre et, par rapport à la méthode de la chambre claire, compense les erreurs de dessin et de découpage, tout en fournissant une analyse plus précise de la densité des zones colorées. Sur une épreuve photographique positive représentant un nématode coloré l'opacité des zones colorées est traduite par un

noircissement du papier qui correspond à l'immobilisation d'argent métallique. Ainsi, cette opacité va pouvoir être mesurée en déterminant la quantité d'argent métallique fixée sur l'épreuve.

Au cours de cette étude nous avons comparé les résultats donnés par cette technique aux résultats donnés par le dosage des réserves : lipides, glucides et protides.

Echantillons : Des juvéniles de Meloidogyne javanica fraîchement éclos sont stockés dans les conditions déjà décrites. Aux temps un, huit et quinze jours un échantillon de juvéniles actifs est divisé en deux parties :

- l'une de plusieurs centaines de milliers pour le dosage des lipides, des glucides et des protides et la détermination du poids sec à raison de deux échantillons de 30 000 juvéniles par mesure.
- l'autre de quelques centaines d'individus pour la technique photographique.

Technique photographique : Les juvéniles sont fixés (Netscher & Seinhorst, 1969) puis stockés dans le formol à 4 %. Ils sont alors transférés dans la solution de coloration contenant du noir soudan à saturation dans de l'alcool à 60 % pour 72 heures à 28° (Gabe, 1968). Les nématodes colorés sont montés sur lames dans de la glycérine (Seinhorst, 1959). Pour chaque âge, dix juvéniles sont photographiés individuellement avec un microscope Leitz Orthoplan, équipé d'un appareil photographique automatique Orthomat, sur du film Kodak Panatomic d'une sensibilité de 16 DIN. A partir de ce film trois épreuves positives sur papier Kodabrom G5 sont tirées pour chacun des 30 juvéniles. Le grandissement adopté est de 600 et l'on a soin pour les 90 épreuves d'utiliser le même temps d'exposition, le même temps de développement et la même température. Chacune des 90 épreuves est découpée au plus près du contour des nématodes, coupée en morceaux d'environ 1 cm de long, puis placée dans un erlen de 250 ml. On ajoute alors dans chaque erlen 25 ml d'acide nitrique à 6,5 %, puis les erlens sont chauffés jusqu'à complète disparition de l'image par dissolution chimique de l'argent métallique. Chacune des 90 solutions est ajustée à 250 ml par pesée puis débarrassée des résidus de papier photographique par filtration. La concentration en argent est

mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique (Instrumentation Laboratory IL 151) avec des solutions de référence de nitrate d'argent dans l'acide nitrique à 0,65 %.

3.3.3. Résultats

3.3.3.1. Variations de la composition chimique au cours du jeûne

Composition initiale

La composition chimique des juvéniles fraîchement éclos de Meloidogyne javanica et d'Heterodera oryzae est donnée au tableau 15. L'ordre d'importance pondérale décroissante est le même chez les deux espèces : protides, lipides et glucides. Le poids sec est en relation avec le volume de l'animal : 23 mg pour 60 974 micron³ chez M. javanica et 29,5 mg pour 109 930 micron³ chez H. oryzae.

Variations chez H. oryzae

Au cours d'une expérience d'une durée de cinq semaines, les juvéniles étant stockés à 28° dans du tampon phosphate 4mM pH7, la composition a été établie toutes les semaines chez les juvéniles survivants : lipides, glucides, protides et poids sec.

Le contenu en lipides totaux décroît de 8,5 ng/juvénile au temps zéro à 2,5 ng/juvénile après 5 semaines, ce qui représente une perte totale de 70 % (fig. 48). Le contenu en glucides totaux augmente, au cours de la première semaine de jeûne de 3,9 à 4,4 ng/juvénile, puis reste constant jusqu'à la troisième semaine. Par la suite ce contenu décroît pour atteindre 2,9 ng/juvénile à la fin de la cinquième semaine (fig. 49). Les contenus en protéines et en azote total restent constants dans l'intervalle 0-3 semaines puis décroissent avec le même taux relatif (fig. 50). Le rapport protéines/azote varie entre 5,1 et 5,4 au cours de l'expérience.

TABLEAU 15 Composition biochimique globale des juvéniles fraîchement éclos de *Meloidogyne javanica* et d'*Heterodera oryzae* (1)

Paramètres	M. javanica		H. oryzae	
	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 %

(1) Moyenne de 3 échantillonnages pour *M. javanica* et de 2 échantillonnages pour *H. oryzae* : 2 tubes par échantillonnage pour chacun des paramètres mesurés.

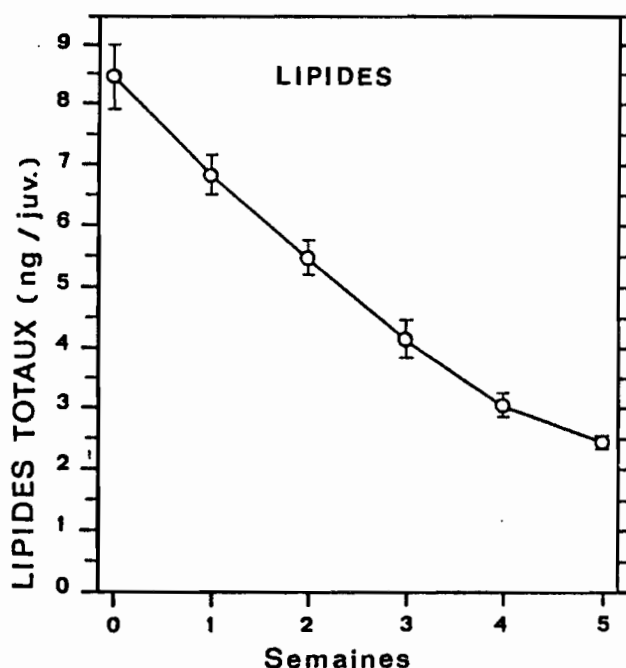


Fig. 48. - Effet de la durée du jeûne sur la quantité de lipides totaux contenue dans les juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Chaque point est la moyenne de 4 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

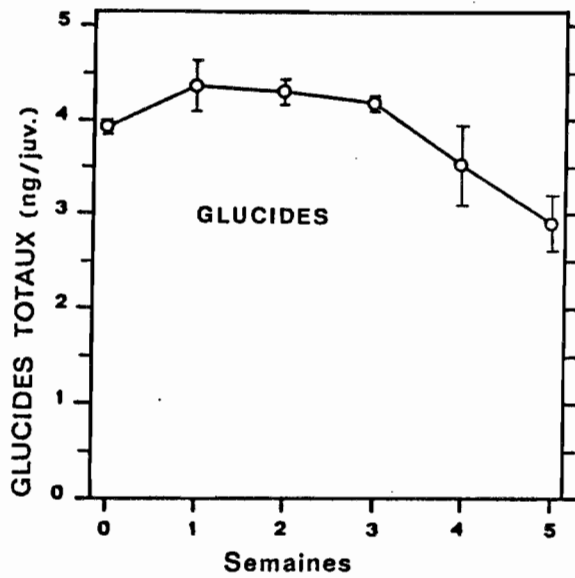


Fig. 49. - Effet de la durée du jeûne sur la quantité de glucides totaux contenue dans les juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Chaque point est la moyenne de 4 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

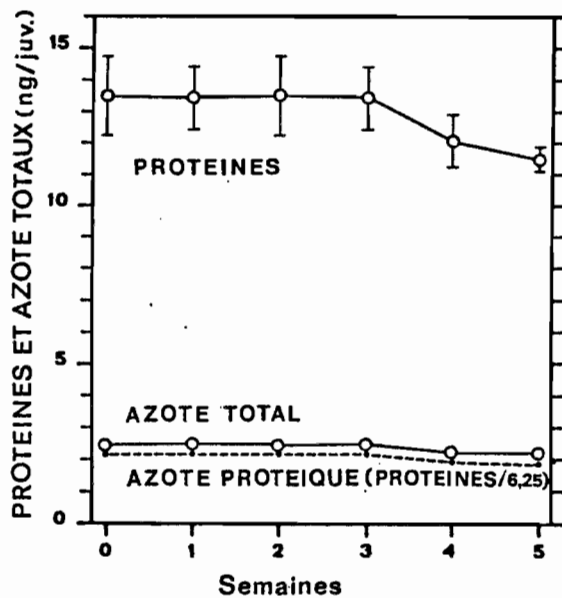


Fig. 50. - Effet de la durée du jeûne sur les quantités de protéines totales et d'azote total contenues dans les juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Chaque point est la moyenne de 4 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque ; pour l'azote total, cet intervalle, inférieur à 3 % de la moyenne n'a pas été représenté).

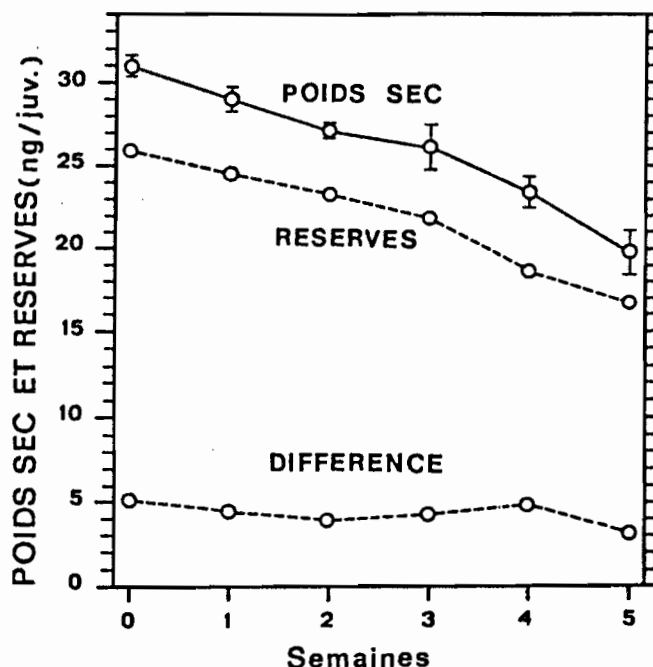


Fig. 51. - Effet de la durée du jeûne sur le poids sec des juvéniles d'Heterodera oryzae (Chaque point est la moyenne de 6 répétitions et la ligne verticale indique l'intervalle de confiance à 5 % de risque). Paramètres calculés : Réserves (Somme des lipides, fig. 48, des glucides, fig. 49 et des protéines, fig. 50) et différence entre poids sec et réserves.

TABLEAU 16 Effet de la durée du jeûne sur le poids sec des juvéniles d'Heterodera oryzae (Seconde expérience effectuée sur la population utilisée pour mesurer l'effet du jeûne sur la consommation d'oxygène, fig. 87)

Temps (semaines)	0	1	2	3	4
Poids sec (ng/Juvénile)(1)	31,9	28,6	23,5	21,3	19,4
Ecart type	0,3	1,2	1,3	1,2	0,4

(1) moyenne de 2 répétitions

TABLEAU 17 Effet de la durée du jeûne sur le poids sec des juvéniles d'Heterodera oryzae : effet de l'anaérobiose.

Temps (semaines)	0			2		
	Aérobiose		Aérobiose	Anaérobiose		
Poids sec (ng/Juvénile)(1)	31,8		24,4	30,2		

(1) moyenne de 3 répétitions

Chez les juvéniles fraîchement éclos la somme des contenus en lipides, glucides et protides est de 26 ng/juvénile pour un poids sec de 31 ng/juvénile. L'importance de la fraction non dosée (15 % du poids sec) est plus faible que celle qui a été précédemment déterminée (21 % sur le tableau 15). Cependant cette différence entre poids sec et somme des réserves reste constante au cours de l'expérience (fig. 51).

Deux autres expériences de portée plus réduite ont été effectuées. La première expérience (tableau 16) a consisté en une mesure de la décroissance du poids sec dans des conditions apparemment identiques. En fait, au cours de cette seconde expérience, le taux moyen de décroissance hebdomadaire du poids sec est de 3,2 ng/juvénile alors qu'il n'était que de 2,1 dans l'autre expérience (fig. 51). Au cours de la seconde expérience (tableau 17), on a mesuré la décroissance du poids pendant deux semaines chez des juvéniles maintenus en conditions standard (aérobiose) et des juvéniles maintenues en anaérobiose par la méthode au sulfite (voir 2.3.2.5.). L'anaérobiose ralentit considérablement la consommation des réserves : 0,8 ng poids sec/semaine contre 3,7 ng.

Variations chez *Meloidogyne javanica*

A partir d'un lot de juvéniles fraîchement éclos ont été effectuées deux expériences en parallèle : l'une en conditions standard les animaux étant placés dans du tampon, l'autre en conditions hyperosmotiques, les animaux étant placés dans du NaCl 0,3 M. Ce dernier milieu est obtenu en ajoutant, en six étapes successives, séparées d'une heure, du NaCl 3 M à une suspension de juvéniles dans du tampon. Aux temps 0, 1, 2, 3 et 4 semaines pour le milieu dilué et 2, 4, 6, 8 et 10 semaines pour le milieu concentré, un échantillon de juvéniles vivants est sélectionné. Douze échantillons de 30 000 juvéniles sont alors préparés : trois pour le comptage, trois pour les lipides, trois pour les glucides et trois pour les protides (déterminées par l'intermédiaire de l'azote total). De plus trois échantillons supplémentaires pour le milieu dilué permettent la détermination du poids sec.

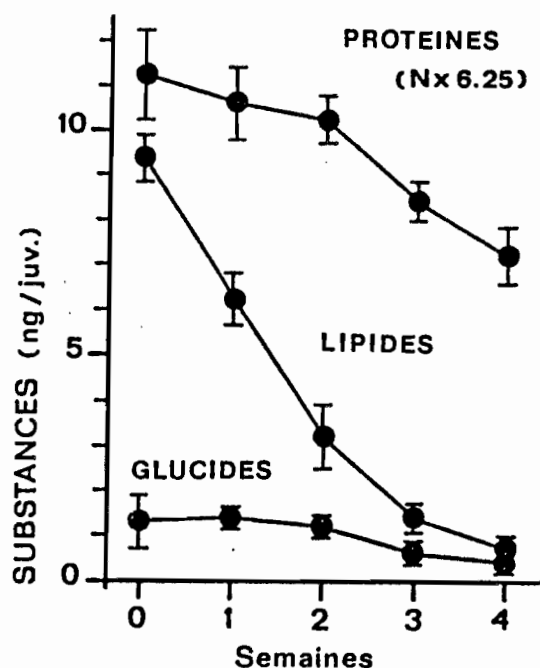


Fig. 52. - Effet de la durée du jeûne sur les quantités de glucides totaux, de lipides totaux et de protéines totales contenues dans les juvéniles de *Meloidogyne javanica* (Chaque point est la moyenne de 3 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

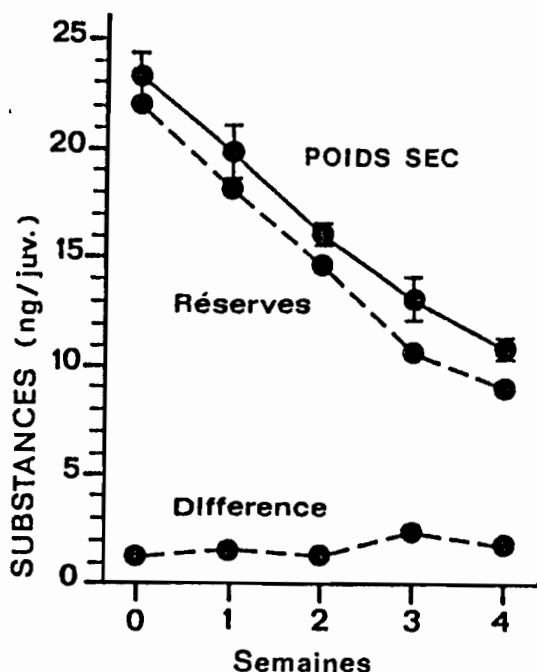


Fig. 53. - Effet de la durée du jeûne sur le poids sec des juvéniles de *Meloidogyne javanica* (Chaque point est la moyenne de 3 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

Paramètres calculés : Réserves (somme des lipides, glucides et protéines, fig. 52) et différence entre poids sec et réserves.

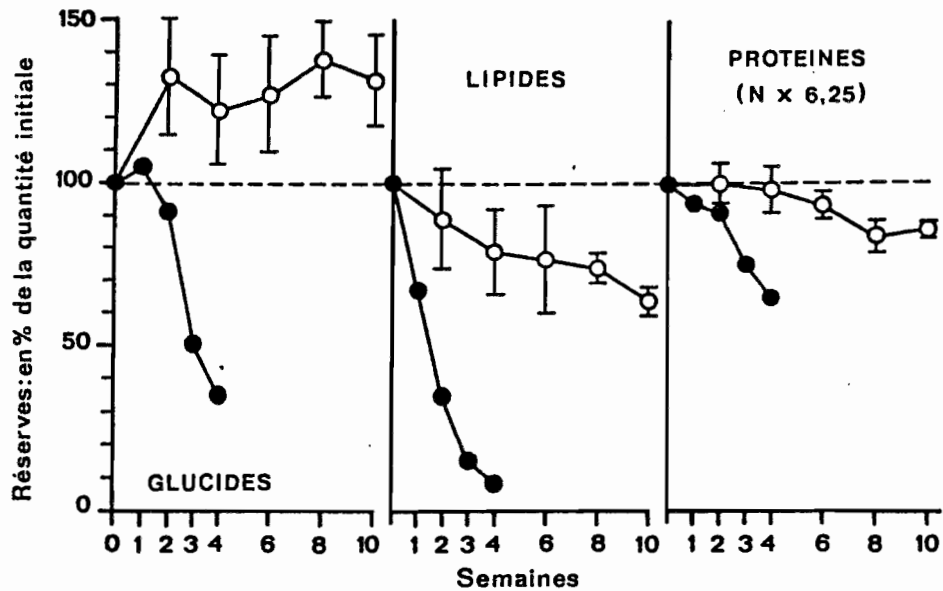


Fig. 54. - Effet de la durée du jeûne en milieu dilué (●) et en milieu concentré (○) sur les quantités de réserves contenues dans les juvéniles de *Meloidogyne javanica* (Chaque point est la moyenne de 3 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque ; pour le milieu dilué cet intervalle a été donné dans la fig. 52).

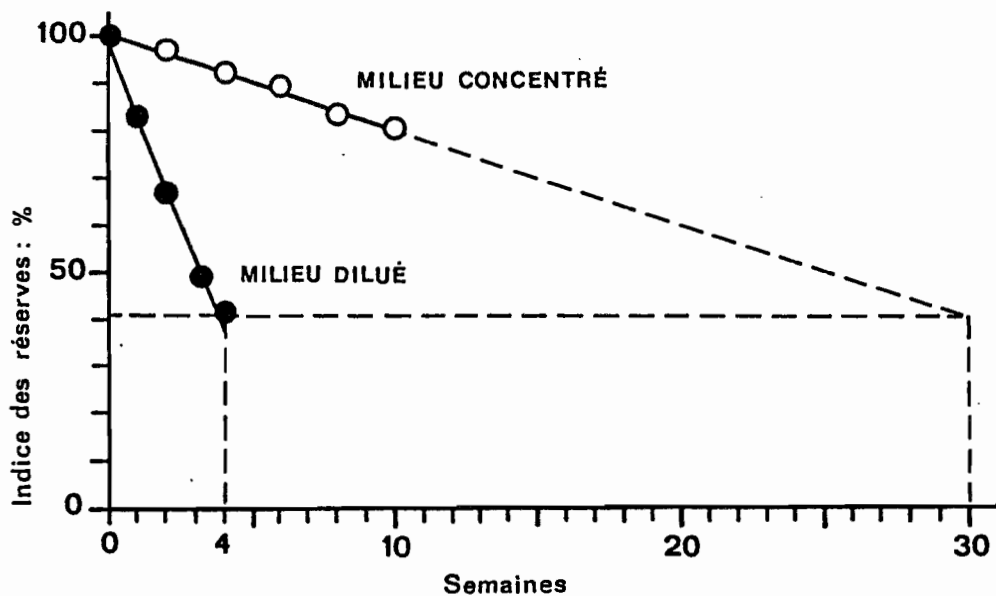


Fig. 55 - Effet de la durée du jeûne sur l'indice des réserves (Somme des lipides, glucides et protéides en % de sa valeur initiale calculée à partir de la fig. 52) des juvéniles de *Meloidogyne javanica* (La ligne interrompue horizontale représente l'indice le plus faible, observé après 4 semaines de jeûne en milieu dilué ; la droite de regression de l'indice observé en milieu concentré, extrapolée, coupe cette horizontale à 30 semaines).

Comme dans le cas précédent les lipides, glucides et protéines décroissent au cours du jeûne en milieu dilué, 92 % des lipides étant consommés (fig. 52). Le poids sec et la somme des réserves (lipides + glucides + protides) décroissent parallèlement au cours du jeûne (fig. 53). Ainsi la différence non dosée qui représente 5 % du poids sec, proportion plus faible que celle qui avait été déterminée précédemment (tableau 15) reste constante tout au long des quatre semaines.

En milieu concentré (fig. 54), les lipides et les glucides décroissent mais avec un taux beaucoup plus faible qu'en milieu dilué. Par contre les glucides augmentent significativement au cours des deux premières semaines de jeûne et se maintiennent à ce niveau durant toute la manipulation.

Variations chez *Hirschmanniella spinicaudata*

Un lot d'animaux fraîchement extraits des racines de riz est conservé dans de l'Agallol à 125 ppm dans du tampon phosphate 4mM pH7. Au temps zéro puis à des intervalles de temps de trois semaines jusqu'à neuf semaines des lots de 75 femelles ou de 100 mâles vivants sont constitués par prélèvement individuel. On n'a dosé que les lipides et les glucides, le dosage de l'azote total ayant échoué à deux reprises.

Chez les animaux fraîchement extraits les quantités de lipides et de glucides sont plus importantes chez les femelles que chez les mâles (fig. 56 et 57). Cette différence correspond assez bien au dimorphisme sexuel des dimensions morphométriques générales (tableau 1).

Au cours du jeûne, les lipides décroissent selon une allure hyperbolique (fig. 56) chez les deux sexes, tandis que les glucides restent constants jusqu'à la troisième semaine puis décroissent (fig. 57).

3.3.3.2. Variations de la demande chimique d'oxygène au cours du jeûne

L'oxydation d'une substance organique

La littérature concernant l'oxydation sulfochromique de la matière organique laisse apparaître une incertitude : certains prétendent que seul le carbone est oxydé (Allison, 1965) et d'autres pensent que

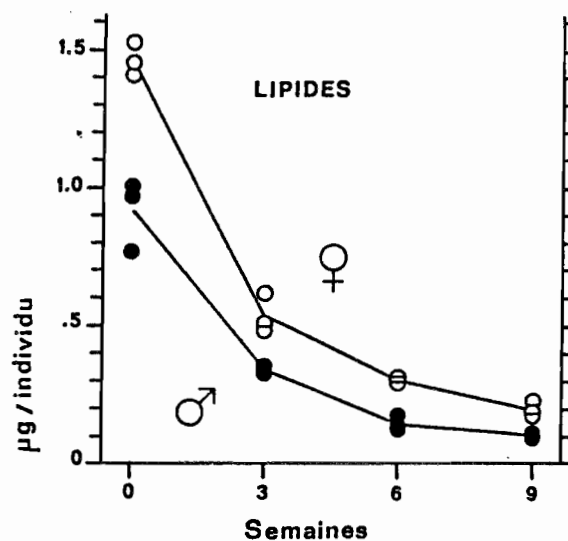


Fig. 56. - Effet de la durée du jeûne sur les quantités de lipides totaux contenues dans les femelles et dans les mâles d'*Hirschmanniella spinicaudata* (Pour chaque temps et chaque sexe, trois déterminations ont été réalisées ; le trait plein joint les moyennes).

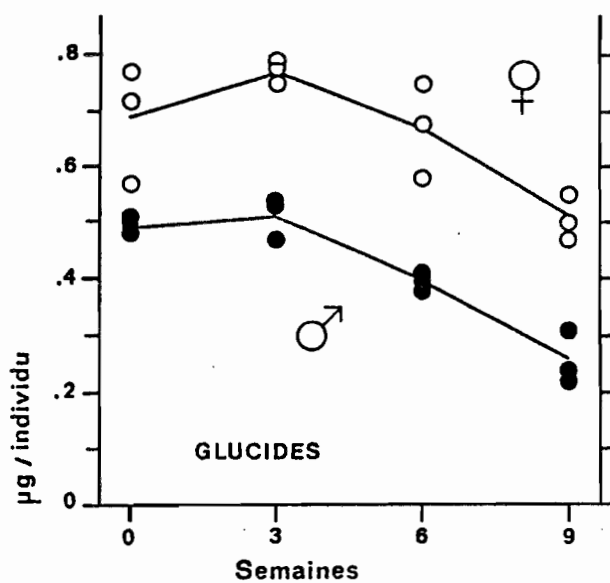


Fig. 57. - Effet de la durée du jeûne sur les quantités de glucides totaux contenues dans les femelles et dans les mâles d'*Hirschmanniella spinicaudata* (Pour chaque temps et chaque sexe, trois répétitions ont été réalisées ; le trait plein joint les moyennes).

l'ensemble des éléments de la matière organique subit l'oxydation (Ivlev, 1934 ; Dobbs & Williams, 1963). Il est important d'éclaircir ce point.

Dans ce but, a tout d'abord été établie la réaction stoechiométrique de l'oxydation d'une substance organique simple (contenant uniquement du carbone, de l'oxygène et de l'hydrogène) par le bichromate en milieu sulfurique. A partir de cette réaction est déduite une relation permettant le calcul de la demande chimique d'oxygène de cette substance (tableau 18).

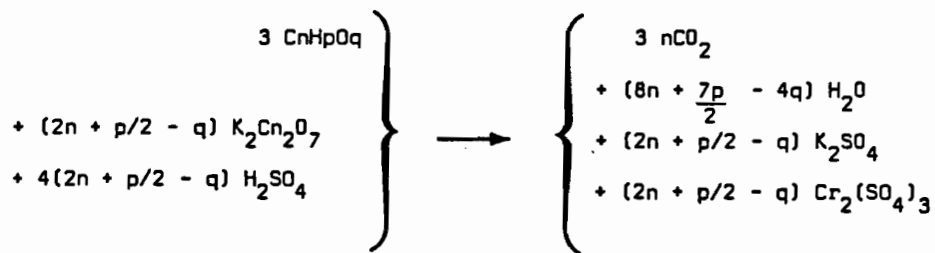
Puis ont été déterminées les demandes chimiques d'oxygène de trois substances simples : glucose, lauryl-sulfate de sodium et pentanol. Pour cela des solutions des trois substances aux concentrations respectives de 2 mg/ml, 1,4 mg/ml et 1 mg/ml ont été distribuées dans des tubes à essai à raison de 0,5 ml par tube. On ajoute alors dans chaque tube 0,5 ml de bichromate N et le reste de la procédure est poursuivi normalement. Le tableau 19 indique les résultats de ces mesures ainsi que les demandes chimiques d'oxygène calculées selon deux modalités : oxydation du carbone seul et réaction stoechiométrique.

Il est donc bien établi, pour les substances simples, que la réaction stoechiométrique, faisant intervenir les trois éléments est valable. Il resterait à préciser expérimentalement et théoriquement le comportement des substances organiques contenant de l'azote et du soufre.

Relation entre demande chimique d'oxygène et échantillon

Il importait également de s'assurer de la relation entre la demande chimique d'oxygène d'un échantillon et la taille de cet échantillon. Pour cela, six séries de trois échantillons ont été préparées contenant, d'une série à l'autre, des nombres croissants de juvéniles fraîchement éclos d'Heterodera oryzae : de 4 900 juvéniles/échantillon à 27 000 juvéniles/échantillon. Les résultats de ces mesures sont données par la fig. 58 : la pente de la droite est de 32,1 nl/juvenile et le coefficient de corrélation est de 0,99. Il existe donc une parfaite proportionnalité entre la taille de l'échantillon et la mesure chimique correspondante.

TABEAU 18 Réaction d'oxydation d'une substance organique par le bichromate de potassium en milieu sulfurique et calcul de la demande chimique d'oxygène de cette substance



Demande chimique
d'Oxygène en ml/g =
$$\frac{(2n + p/2 - q) \times 11.207}{(12n + p + 16q)}$$

TABEAU 19 Mesure de la demande chimique d'oxygène de quelques substances organiques (ml O₂/g substance)

Substance	Formule	DCO mesurée (1)	DCO calculée C seul	DCO calculée C, H et O
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	750	748	748
Sodium lauryl sulfate	C ₁₂ H ₂₅ -SO ₄ Na	1.410	933	1.420
Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	1.880	1.273	1.910

(1) Moyenne de trois répétitions ; écart type < 1 % de la moyenne.
N.B. Les valeurs des deux dernières colonnes ont été calculées à partir des formules (2ème colonne) et de la formule du tableau 20. Le radical SO₄Na est supposé non changé par l'oxydation.

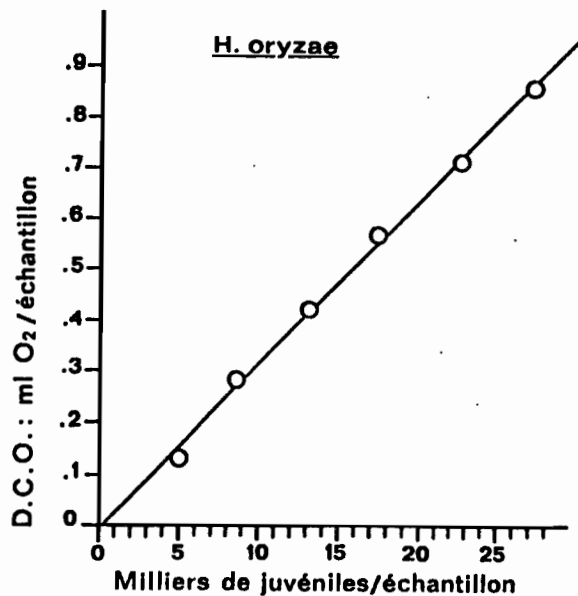


Fig. 58. - Relation entre la Demande Chimique d'Oxygène par échantillon et le nombre de juvéniles fraîchement éclos d'*Heterodera oryzae* par échantillon (Chaque point est la moyenne de 3 répétitions et l'écart type est inférieur à 3 % de la moyenne).

TABLEAU 20 Coefficients à appliquer aux quantités de réserves (lipides, glucides et protéines) pour les calculs théoriques de la demande chimique d'oxygène et de la valeur calorifique (Chiffres extraits de Polonowski *et al.*, 1969 ; entre parenthèses sont données les valeurs relatives de ces coefficients en prenant celui des glucides égal à 1)

Réserves	Lipides	Glucides	Protéines
Demande chimique d'oxygène ml/g	2 019 (2,44)	829 (1,00)	966 (1,16)
Valeur calorifique Kcal/g	9,46 (2,26)	4,18 (1,00)	4,44 (1,06)
Valeur calorifique de l'oxygène Kcal/litre	4,686	5,047	4,600

Variations de la demande chimique d'oxygène au cours du jeûne

Les mesures n'ont été pratiquées que pour les juvéniles d'Heterodera oryzae et les juvéniles de Meloidogyne javanica. Les échantillons utilisés ont été prélevés dans les séries préparées pour les dosages des réserves (3.3.3.2. et 3.3.3.3.).

La demande chimique d'oxygène des juvéniles d'Heterodera oryzae diminue de 33,8 nl/juvenile au temps zéro à 18,9 nl/juvenile après cinq semaines à 28°. La décroissance est de 45 % et elle affecte une allure linéaire (fig. 59.)

La demande chimique d'oxygène des juvéniles de Meloidogyne javanica diminue de 35,3 nl/juvenile au temps zéro à 10,0 nl/juvenile après quatre semaines à 28°. La décroissance est de 72,5 % et elle affecte plutôt une allure hyperbolique (fig. 60.).

La DCO mesurée peut être comparée à la DCO calculée à partir de deux éléments :

- a) La composition chimique des nématodes donnée par les fig. 48, 49 et 50 pour Heterodera oryzae et la fig. 52 pour Meloidogyne javanica,
- b) Les coefficients à appliquer aux quantités de lipides, glucides et protides pour calculer le volume d'oxygène nécessaire à leur combustion complète (tableau 20).

Sur les figures 59 et 60, le trait pointillé indique les valeurs de la DCO pour les lipides (L), les glucides (C) et les protides (P). Le trait interrompu donne la somme de ces trois données : on voit que ce paramètre calculé est très voisin du paramètre mesuré.

3.3.3.3. Variation de l'opacité au cours du jeûne

Les juvéniles colorés après un jour de stockage apparaissent entièrement opaques. Puis à huit jours et à quinze jours apparaissent des zones d'éclaircissement dont l'importance augmente avec l'âge (fig. 61).

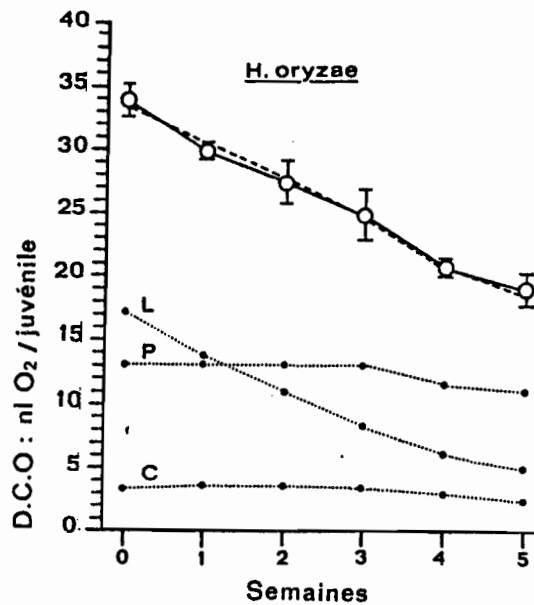


Fig. 59. - Effet de la durée du jeûne sur la demande chimique d'oxygène des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Chaque point est la moyenne de 3 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance au risque de 5 %).

Paramètres calculés : Lignes en pointillés, DCO calculées à partir des résultats des dosages (L, lipides, fig. 48 ; P, protéines, fig. 49 ; C, glucides, fig. 50) et du tableau 20. Ligne interrompue : somme des DCO calculées pour les lipides, protéines et glucides.

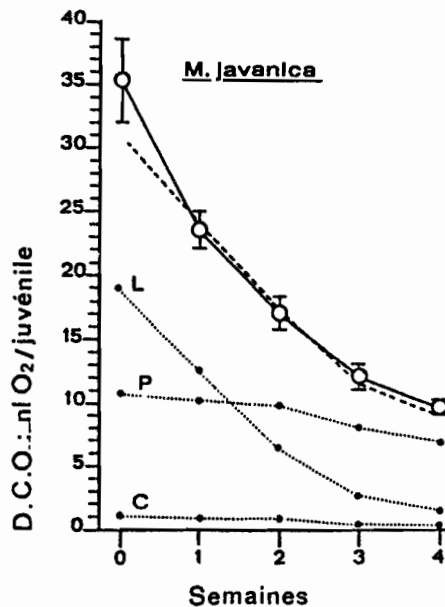


Fig. 60. - Effet de la durée du jeûne sur la demande chimique d'oxygène des juvéniles de *Meloidogyne javanica* (Chaque point est la moyenne de 3 répétitions et la ligne verticale égale l'intervalle de confiance au risque de 5 %)

Paramètres calculés : Lignes en pointillés, DCO calculées à partir des résultats des dosages (L, lipides, P, protéines, C, glucides, fig. 52) et du tableau 20. Ligne interrompue : somme des DCO calculées pour les lipides protéines et glucides.

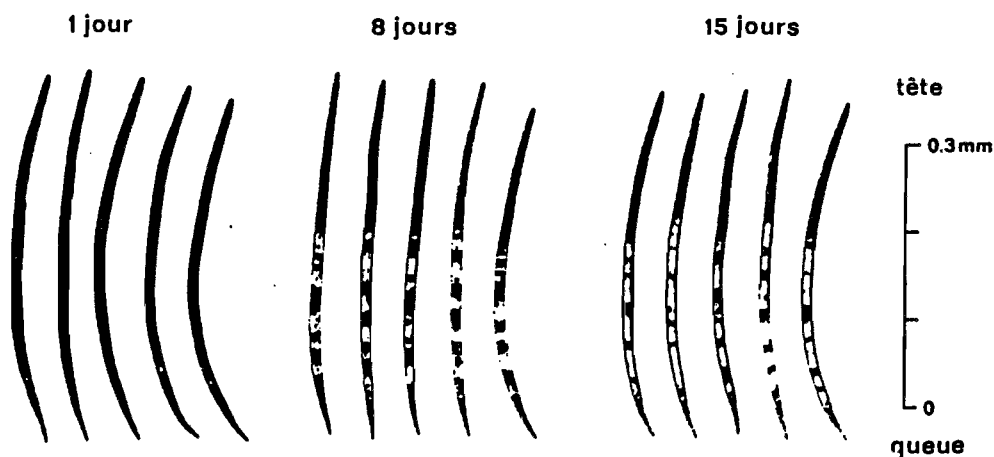


Fig. 61. - Reproductions photographiques de juvéniles de Meloidogyne javanica, tués, fixés et colorés au noir Soudan après trois durées de jeûne (1, 8 et 15 jours). Seuls, 5 des 10 juvéniles utilisés pour chaque durée dans l'étude sont représentés.

TABLEAU 21 Evaluation de la consommation des réserves endogènes par les juvéniles de Meloidogyne javanica au cours du jeûne 1) Par la méthode à l'argent
2) Par dosages chimiques

Age (jours)	J = 1		J = 8		J = 15	
1 Méthode à l'argent (10 juvéniles)	847 ± 14	876 ± 34	581 ± 16	452 ± 14	282 ± 8	169 ± 12
	860 ± 28	858 ± 76	524 ± 9	626 ± 34	307 ± 2	132 ± 15
	904 ± 18	977 ± 35	473 ± 30	538 ± 55	283 ± 7	244 ± 12
	741 ± 52	802 ± 18	572 ± 20	498 ± 45	368 ± 11	160 ± 9
	740 ± 50	669 ± 49	553 ± 26	308 ± 20	359 ± 29	134 ± 32
Moyenne	827 ± 90		512 ± 89		244 ± 90	
2 Poids sec	23.9 ± 0.2		16.7 ± 0.6		14.3 ± 0.2	
Glucides	1.7 ± 0.2		1.5 ± 0		1.1 ± 0	
Lipides	9.2 ± 0.2		3.4 ± 0.2		1.4 ± 0.2	
Protéines	9.0 ± 0.2		7.3 ± 0.4		7.5 ± 0.3	

1) µg d'argent par épreuve

2) ng de substance par individu

Les quantités d'argent fixé correspondant à ces trois groupes de photographies sont données par le tableau 21 : elles décroissent significativement avec l'âge. Corrélativement on observe une diminution du poids sec et des quantités de lipides, glucides et protides, la quantité de lipides diminuant le plus (tableau 21).

Deux faits importants sont à remarquer concernant la valeur de la méthode :

a) L'analyse statistique à l'intérieur des dix résultats de chaque âge (tableau 21) montre que la variance des trois épreuves pour un même juvénile est très faible en regard de la variance des dix juvéniles. De plus la valeur croissante du F avec l'âge montre que la vitesse individuelle de consommation des réserves est très variable ainsi que l'ont déjà observé Van Gundy et al., (1967).

b) Les épreuves des nématodes colorés après un jour ne sont pas saturées. En effet le papier photographique exposé à la lumière du jour titre 156 ug d'argent/cm² (100 % de saturation) tandis que les épreuves des nématodes colorés après un jour n'en contiennent que 37,6 ug /cm² (24 % de saturation). Le fond des épreuves titre 1,6 ug /cm² (1 % de saturation) et le papier non exposé 1,2 ug /cm² (0,8 % de saturation).

3.3.4. Discussion

3.3.4.1. La composition chimique des nématodes

Lipides : Les teneurs en lipides totaux sont respectivement de 40,4 % et 24,4 % du poids sec chez M. javanica et H. oryzae (tableau 15 : c). Ces teneurs sont très voisines de celles qui ont été rapportées pour d'autres nématodes phytoparasites (voir 3.2.1.), de l'ordre de 24 à 40 % du poids sec.

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 (huile d'olive) et les nématodes n'est pas évidente a priori. La comparaison des pouvoirs chromogènes des lipides des deux origines (voir 3.3.2.3.) a donné les résultats suivants. Un aliquot de la solution de lipides de M. javanica contient, mesuré par la méthode pondérale, 343 ug de lipides (répétitions : 340-350-340). Le même aliquot, d'après la réaction colorée, basée sur l'étalon d'huile d'olive, contient 348 ug 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 Meloidogne 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 protides.

Glucides : Les teneurs en glucides totaux sont respectivement égales 6,9 % et 13,9 % du poids sec des juvéniles de M. javanica et d'H. oryzae (tableau 15 : b).

Les causes d'erreurs lors de la détermination des glucides totaux par l'antrone 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'antrone 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 cette 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 en glucides des deux sortes, glycogène ou glucose : 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'antrone, équivalente à 5 ug de glycogène pour 1 mg d'azote total. D'après la teneur en azote observée chez les juvéniles des deux espèces (tableau 15 : e), cette interférence peut être tenue pour négligeable.

Protides et azote total : Les protéines 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 (tableau 15 : d).

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. 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 protides de l'ordre de 3 à 6 %.

L'azote total (tableau 15 : 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.

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 protides au poids sec (tableau 15 : 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 (tableau 15 : 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 nématodes (von Brand, 1966 ; Rahemtulla & Lovtrup, 1974).

3.3.4.2. La notion de réserves chez les nématodes

Dans les deux cas où l'étude a pu être poussée assez loin, Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica, on s'aperçoit qu'une fraction notable (de 5 à 20 %) du poids sec n'est pas appréhendée par les méthodes de dosage des espèces chimiques majeures : lipides, glucides et protides. On observe par ailleurs, qu'au cours du jeûne, cette fraction non dosée reste constante (fig. 51 et 53). Elle n'entre donc pas dans le domaine des réserves métabolisables au cours du jeûne. Sa composition comporte vraisemblablement une partie minérale et une partie organique que l'on peut associer aux éléments des structures qui restent stables au cours du jeûne (cuticule, stylet, etc...). Réciproquement une partie des constituants dosés par les méthodes employées n'est pas métabolisée. Pour les lipides cette partie s'élève à 8 % chez M. javanica et 30 % chez H. oryzae, nous suggérons qu'il peut s'agir des lipides polaires (phospholipides) entrant dans la composition des membranes des cellules et des organites cellulaires. Il semblerait intéressant d'approfondir ce point par l'analyse détaillée des lipides au cours du jeûne. De la même façon, seule une partie des glucides et de protides est consommée au cours du jeûne.

3.3.4.3. Le sort des réserves consommées

L'ensemble des techniques utilisées dans ce chapitre a seulement permis de montrer que les réserves quittent effectivement le corps des individus ou subissent une interconversion (lipides glucides : fig. 48, 49 et 50 pour H. oryzae ; fig. 52 pour M. javanica). Par contre ces techniques n'ont donné aucune indication sur la forme qu'avaient atteinte ces réserves lorsqu'elles ont quitté le corps des individus. En effet ces réserves consommées ont pu faire l'objet soit d'une dégradation complète, conduisant à l'excrétion d'eau et de gaz carbonique, soit d'une dégradation partielle conduisant à l'excrétion de métabolites intermédiaires contenant encore de l'énergie. Pour trancher entre ces deux possibilités il faut avoir recours à des expériences de respirométrie : directe (voir 3.4.), ou indirecte (demande chimique d'oxygène). On pourrait également avoir recours au dosage des excréta

dans le milieu de suspension des animaux. Cette méthode a permis à plusieurs auteurs (voir 3.2.3.) d'annoncer l'éventualité d'une excrétion de protéines d'acides aminés, de sucres, etc... par les nématodes. Il convient de souligner que, d'après leur description, ces expériences sont critiquables. En effet, elles ne tiennent pas suffisamment compte des problèmes de mortalité. Celle-ci commence dès le début du stockage (fig. 15 et 18) et les animaux morts pourraient subir une autolyse des tissus conduisant à la libération dans le milieu de substances chimiques diverses. Il paraît vraisemblable que cette question ne pourra être définitivement résolue que par des expériences fines utilisant un marquage au carbone ^{14}C selon une procédure analogue à celle que nous avons utilisée pour le ^{35}S (voir 2.5.5.).

3.3.4.4. Variations de la vitesse de consommation des réserves

La vitesse de consommation des lipides, qui constitue la réserve principale, diminue avec l'âge (fig. 48, 52 et 56). Cet apparent ralentissement du métabolisme avec l'âge pourrait être attribué à trois mécanismes :

- Loi d'action de masse au niveau de l'exploitation des réserves figurées. D'après Palade (1956), dans les tissus des mammifères soumis au jeûne les mitochondries sont au contact des globules graisseux. La surface du globule diminue avec son volume.
- Intoxication hydrique. Comme le volume externe des nématodes ne semble pas varier au cours du jeûne (Davide, 1960), les substances consommées sont remplacées par de l'eau. Cette dilution du contenu cellulaire serait peut-être toxique. Une telle intoxication hydrique a été observée au cours du jeûne chez le vers à soie (Baud et al., 1965).
- Phénomène de vieillissement. Un des phénomènes caractéristiques du vieillissement consiste en l'altération fonctionnelle des enzymes. Cela a été observé chez les nématodes en particulier pour les enzymes des catabolismes glucidique et lipidique (Rothstein, 1975).

3.3.4.5. Les quiescences

L'un des résultats notables de cette étude a consisté à montrer que la vitesse d'utilisation des réserves est étroitement subordonnée aux conditions externes. Dans des conditions extrêmes, comme une pression osmotique élevée ou en l'absence d'oxygène, cette vitesse de consommation devient si faible que l'on peut alors parler de quiescence. Au point de vue pratique l'existence de ces quiescences montre que l'intérêt de la jachère, comme moyen de lutte contre les nématodes, n'est pas toujours évident. Il paraît en effet essentiel, d'après ces résultats, que les conditions de sol, qui prévalent dans une jachère, ne soient pas susceptibles de déclencher une quiescence, prolongeant la vie de ces animaux, ce qui serait contraire au but poursuivi. Au point de vue expérimental, la quiescence par osmobiologie chez M. javanica semble pouvoir permettre l'étude d'un mécanisme trop fugace à l'état normal : celui de la transformation des lipides en glucides (fig. 54).

3.3.4.6. La demande chimique d'oxygène

Relation entre la DCO mesurée et DCO calculée. L'accord entre la DCO mesurée et la DCO calculée tient tout d'abord à l'efficacité de l'oxydation. D'après les essais préalables qui ont conduit à la procédure employée et l'examen des différentes publications sur ce sujet, l'efficacité dépend de quatre points :

- a) Présence de sulfate d'argent comme catalyseur : le sulfate d'argent intervient non seulement en éliminant les halogènes (Cl^- , Br^-) qui pourraient réduire le bichromate, mais également comme catalyseur (Dobbs & Williams, 1963).
- b) Excès de l'acide sur l'eau : dans la procédure suivie, le rapport acide/eau est de 3/1, tandis qu'il n'était que de 1/1 dans la procédure originale de Ryding et Forsberg (1977).
- c) Maintien à une température de 100° pendant deux heures.

d) Un large excès de bichromate : l'échantillon présente au maximum une DCO de 1 ml d'O₂ alors que la capacité d'oxydation de 1 ml de bichromate 0,5 N est de 2,8 ml d'O₂.

Dans ces conditions l'accord trouvé entre la DCO mesurée et la DCO calculée est presque trop satisfaisant. En effet le calcul n'a intégré que les espèces chimiques définies (lipides, glucides et protides, fig. 59 et 60) mais n'a pas tenu compte de la fraction non dosée du poids sec (appelée différence sur les fig. 51 et 53) et que dans la discussion (3.3.4) nous avons supposée de nature en partie organique. Cette contradiction peut s'expliquer soit parce que cette fraction non dosée est en grande partie minérale et n'intervient pas dans la DCO, soit parce que l'oxydation des protéines par le bichromate est moins achevée que dans le métabolisme du nématode. Dans ce cas, le déficit de DCO serait compensé par la DCO de la partie organique de la fraction non dosée.

Relation entre la DCO et la valeur calorifique. A partir des résultats des dosages (fig. 48, 49, 50 et 52) et des données du tableau 20, on peut calculer les variations relatives, en fonction du temps, de la demande chimique d'oxygène et de la valeur calorifique (fig. 62 et 63). La variation donnée par le premier paramètre est toujours supérieure à celle donnée par le second. Ce résultat est lié au fait que le coefficient pour les lipides est, en valeur relative, supérieur dans le cas de la DCO par rapport au cas de la valeur calorifique (2,44 contre 2,26).

On peut se demander s'il est possible de déduire la valeur calorifique à partir de la DCO. Pour cela, en partant à nouveau des valeurs des dosages et d'un autre coefficient, la valeur calorifique de l'oxygène (tableau 20), on peut calculer pour chaque âge, la valeur calorifique de l'oxygène nécessaire pour oxyder les juvéniles. Chez les juvéniles d'Heterodera oryzae cette valeur calorifique de l'oxygène varie de 4,69 cal/l au temps zéro à 4,68 cal/l après cinq semaines, tandis qu'elle varie, chez les juvéniles de Meloidogyne javanica, de 4,67 cal/l au temps zéro à 4,63 cal/l après quatre semaines. L'écart maximum entre les extrêmes de ces valeurs et une valeur moyenne de 4,66 Kcal/l serait inférieur à 1 %, ce qui reste faible dans un travail d'écologie. On peut donc passer de la DCO mesurée à la valeur calorifique par un facteur de multiplication de 4,66 Kcal/l.

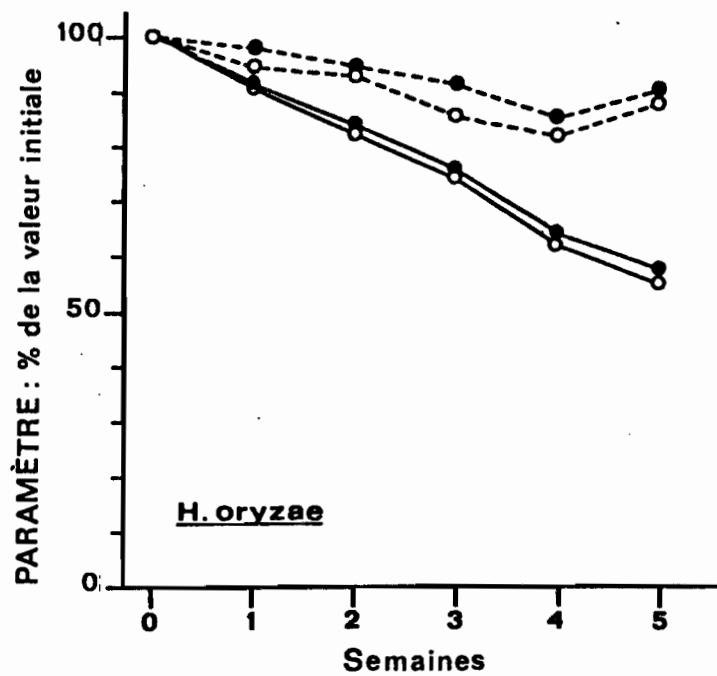


Fig. 62. - Effet de la durée du jeûne sur les variations relatives de la demande chimique d'oxygène (O) et de la valeur calorifique (●) des juvéniles d'*Heterodera oryzae*, exprimées par individu (—) et par rapport au poids sec (-----). Les deux paramètres ont été calculés à partir des résultats des dosages (fig. 48, 49 et 50) et du tableau 20.

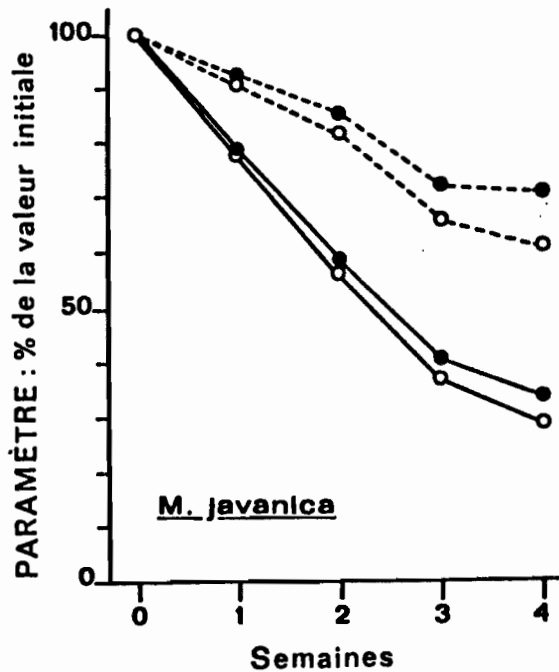


Fig. 63. - Effet de la durée du jeûne sur les variations relatives de la demande chimique d'oxygène (O) et de la valeur calorifique (●) des juvéniles de *Meloidogyne javanica*, exprimées par individu (—) et par rapport au poids sec (-----). Les deux paramètres ont été calculés à partir des résultats des dosages (fig. 52) et du tableau 20.

Perspectives. La DCO est donc capable de remplacer le poids sec dans toutes les études de métabolisme où un tel indice général est requis. Il peut s'agir de catabolisme, comme dans notre travail, mais également d'anabolisme si l'on envisage d'étudier les phénomènes de croissance ou de réalimentation après une période de jeûne.

Une amélioration intéressante, qui est actuellement en cours de mise au point, remplace le dosage chimique du bichromate non consommé par un dosage colorimétrique. On ajoute dans le tube à échantillon 50 μ l de bichromate 0,25 N et 0,5 ml d'acide au sulfate d'argent. Après oxydation, le contenu du tube est dilué à 5 ml et la densité optique est lue à 350 μ m avec un trajet optique de 1 cm. Pour les témoins on obtient une DCO de 0,89 qui correspond à 70,043 μ l d'oxygène, soit environ une capacité d'oxydation de 2 000 juvéniles de Meloidogyne javanica fraîchement éclos. Si l'on travaille au tiers de la capacité d'oxydation, comme précédemment, l'échantillon requis ne sera que d'environ 600 juvéniles, échantillon que l'on peut prélever par pêche individuelle à la pipette.

3.3.4.7. L'opacité

Lorsque l'on porte, en pourcentage de la valeur initiale, sur le même graphique, les valeurs des quantités de lipides et d'argent et la valeur du poids sec, on s'aperçoit que ces paramètres décroissent corrélativement, la courbe de l'argent étant encadrée par les deux autres. Donc l'argent ne reflète pas seulement le comportement des lipides (fig. 64). Cette corrélation permet néanmoins de considérer cette technique photographique comme une bonne évaluation de la consommation des réserves.

L'éclaircissement du tractus digestif avec l'âge est nettement visible sur les juvéniles vivants de Meloidogyne javanica. Ainsi un dessin caractéristique de bandes alternées blanches et noires s'établit dès la fin de la première semaine de jeûne. Par la suite la longueur des bandes noires ne fait que se réduire. Cependant après fixation et photographie le contraste entre bandes blanches et bandes

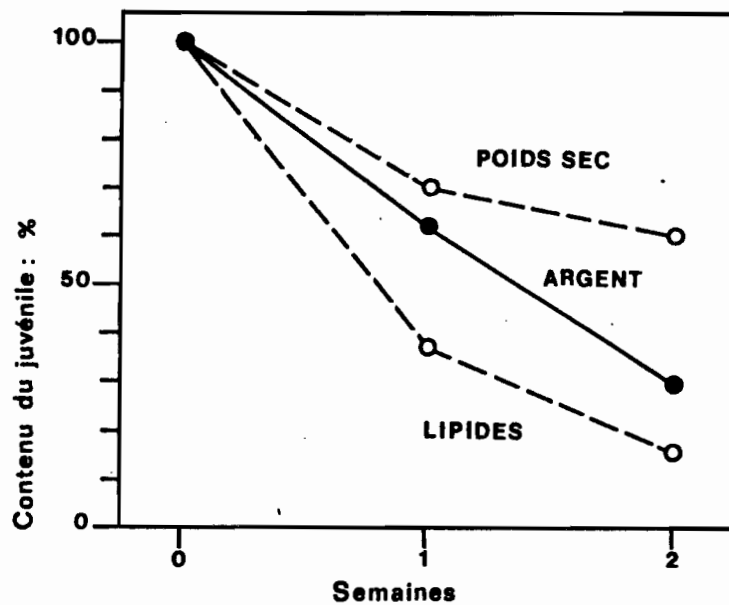


Fig. 64. - Effet de la durée du jeûne sur les variations relatives du poids sec, de la quantité de lipides par individu, et de la quantité d'argent fixée sur une épreuve photographique des juvéniles de Meloidogyne javanica (calculé à partir des résultats du tableau 21).

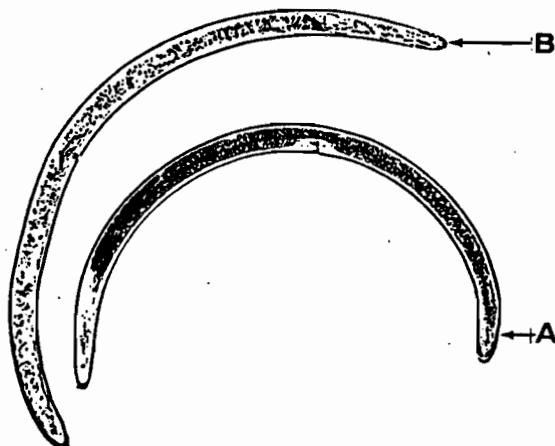


Fig. 65. - Reproduction photographique de deux femelles de Scutellonema cavenessi, tuées et fixées, l'une, juste après l'extraction (A) et l'autre après 4 semaines de jeûne (B).

noires apparait très faible et n'est pas exploitable par cette technique photographique. C'est la raison pour laquelle on doit avoir recours à un colorant des lipides. Chez d'autres espèces, comme Scutellonema cavenessi, le contraste persiste après fixation et est exploitable par cette technique sans coloration (fig. 69).

Chez certains nématodes libres le vieillissement est caractérisé par le développement progressif de granules noirs de lipofuchsine localisés dans l'épithélium intestinal (Epstein et al., 1972). Il n'est pas apparent que le même phénomène se produise chez les nématodes phytoparasites que nous avons étudié. En tous cas ce noircissement rendrait problématique l'efficacité de la technique photographique dans le cas des nématodes libres.

La méthode est donc applicable aux nématodes posant des problèmes d'échantillonnages mais nous suggérons qu'elle pourrait être également appliquée au cas d'autres invertébrés présentant, comme les nématodes, des téguments transparents comme les rotifères et les enchytréides.

3.4. LA CONSOMMATION D'OXYGENE

3.4.1. Principe de l'étude

L'intensité du métabolisme, reflet de la vitesse à laquelle sont consommées les réserves endogènes étudiées dans la partie précédente (3.3.) peut être appréciée par la mesure de l'intensité respiratoire. Un des moyens les plus commodes, pour appréhender ce paramètre consiste à mesurer la consommation d'oxygène à l'aide d'un respiromètre volumétrique. Parmi les appareils de ce type, nous avons choisi le ludion, à cause de sa sensibilité élevée. Cette étude a été conduite relativement à deux groupes de facteurs : facteurs externes et facteurs internes aux animaux étudiés. Comme dans l'étude précédente, les résultats ont été exprimés par rapport à l'individu.

3.4.2. Méthodologie

3.4.2.1. Description du ludion à bouchon

Depuis la description de son principe en 1937 par LinderstromLang, la technique du respiromètre à ludion standard a connu de nombreuses améliorations (Linderstrom-Lang, 1943 ; Linderstrom-Lang & Holter, 1942 ; Holter & Zeuthen, 1966 ; Klekowski, 1971). Elle a été utilisée pour mesurer la consommation d'oxygène des nématodes par Nielsen (1949), Rohde (1960), Boell (1960), Wallace et Greet (1964) et Bhatt et Rohde (1970).

Cette technique présente une sensibilité élevée. En effet, avec un ludion d'un volume de 10 µl, facilement atteint, une mesure d'une bonne précision peut être effectuée avec moins d'une centaine de nématodes d'une taille courante. Cet effectif réduit permet un dénombrement précis des animaux soumis à la mesure. De plus, des mesures peuvent être effectuées même à partir d'un élevage quantitativement réduit.

Par ailleurs, comme le ludion est fabriqué par son utilisateur, ce dernier est en mesure d'adapter exactement son instrument au but qu'il se propose. Dans le but de mesurer la consommation d'oxygène des nématodes phytoparasites, nous avons donc été conduits à mettre au point un modèle qui répond à deux exigences. Il doit tout d'abord permettre l'introduction d'animaux encombrants (adultes d'Hirschmanniella spinicaudata) ou de pipettes destinées à déposer des groupes d'animaux plus petits. Dans ces conditions le diamètre interne requis est de l'ordre de 1 mm. Par ailleurs, sa mise en oeuvre doit être rapide, ce qui exclut l'emploi du ludion standard, d'une manipulation très délicate. Nous avons donc imaginé un ludion à bouchon, synthèse du ludion à bouchon de Zeuthen (1950) et du ludion simple de Nigon et Fourche (1958).

La figure 66 A représente, en équilibre dans un liquide de flottaison, un ludion à bouchon chargé d'un animal. Ce liquide de flottaison est constitué par de la soude décinormale, qui absorbe le gaz carbonique émis par l'animal.

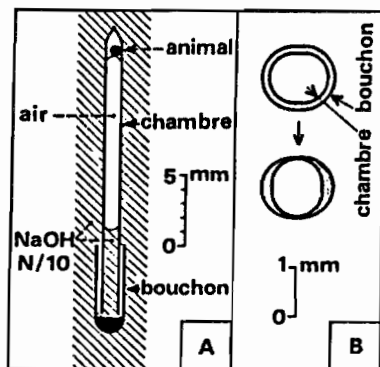


Fig. 86. - Ludion de 10 μ l, chargé d'un animal, en équilibre dans le liquide de flottaison (soude décimale).

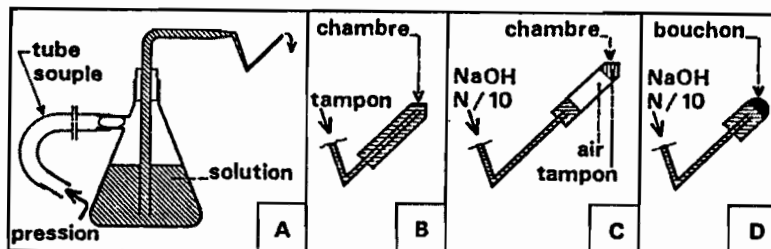


Fig. 87. - Mise en oeuvre du ludion : rinçages (A : pipette de rinçage ; B : rinçage de la chambre respiratoire ; C : rinçage du col de la chambre respiratoire ; D : rinçage du bouchon).

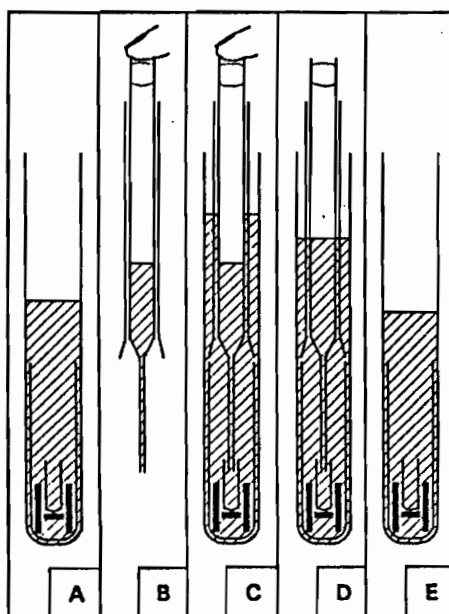


Fig. 88. - Mise en oeuvre du ludion : introduction des nématodes dans la chambre respiratoire par sédimentation. (Les opérations A, B, C, D et E sont commentées dans le texte).

Le ludion à bouchon est formé de deux pièces cylindriques en pyrex, dont l'une, la chambre respiratoire, qui contient l'animal, pénètre dans l'autre, le bouchon. L'extrémité supérieure de la chambre respiratoire se termine par un cône fermé. L'extrémité inférieure du bouchon est obturée par une masse de pyrex soudée qui sert également de contrepoids. La section de chacune des deux pièces est légèrement ovalisée. De cette façon, après pénétration, une rotation de la chambre respiratoire la rend mécaniquement solidaire du bouchon (fig. 66 B). Le contact entre les deux pièces n'est donc pas hermétique : il subsiste un passage (hachuré sur la figure 66 B) pour le liquide de flottaison. Ce dernier, en circulant, peut comprimer ou détendre la bulle d'air, conformément au principe du ludion.

Dans cette position d'équilibre, la masse du liquide de flottaison déplacé compense la masse du ludion (m). Celle-ci, le volume de la bulle d'air (Vg) et les masses volumiques du pyrex (Dv) et du liquide flottaison (Ds) sont alors liés par la relation :

$$m = Vg \times Dv \times Ds / (Dv - Ds)$$

La fabrication du ludion à bouchon est décrite dans l'annexe 2. Avec les matériaux employés et la température qui a été fixée pour toutes les expériences courantes, à 28°, un ludion de 10 ul pèse 18,17 mg (Dv = 2,224 mg/ul et Ds = 1,000 mg/ul).

3.4.2.2. Mise en oeuvre du ludion à bouchon

Introduction des animaux dans le ludion

Le ludion est nettoyé par le mélange sulfochromique à chaud puis rincé à l'eau courante. On le manipule dès lors directement avec les doigts, dégraissés fréquemment à l'alcool à 95°. Une pipette de rinçage (fig. 67 A), stérilisée à l'autoclave est garnie de tampon standard (tampon phosphate 50 mM, pH 7), stérilisé par filtration sur filtre Millipore. On rince abondamment la chambre respiratoire (fig. 67 B) à l'aide de cette pipette de rinçage et la chambre respiratoire est laissée remplie de tampon.

La chambre respiratoire peut alors être garnie avec les animaux à étudier, qui ont subi au préalable une stérilisation superficielle. Cette stérilisation est obtenue par centrifugations répétées (cinq fois au moins) dans l'eau stérile pour les juvéniles. Pour des animaux en groupe de faible importance, comme les adultes d'Hirschmanniella spinicaudata, (un à cinq individus par ludion), le dépôt se fait directement dans la chambre respiratoire remplie de tampon et maintenue verticalement, l'ouverture vers le haut. Lorsque le groupe est important, comme les juvéniles d'Heterodera ou de Meloidogyne (80 individus par ludion), on a recours à l'intermédiaire d'une pipette à sédimentation et d'un tube à sédimentation, stérilisés à l'autoclave et dont l'utilisation est schématisée par la figure 68.

La chambre respiratoire, remplie de tampon standard est placée dans le tube à sédimentation garni de tampon standard (fig. 68 A).

Les nématodes sont stérilisés par un séjour de cinq heures dans une solution de 2 methoxyethyl mercure à 5 ppm et de sulfate de streptomycine à 0,1 %, puis rincés à l'eau stérile. Les nématodes, en suspension dans du tampon standard stérile, sont placés sous la loupe binoculaire dans une boîte de Petri stérile. Dans chaque pipette à sédimentation sont alors aspirés, un à un, les animaux en nombre requis dans un faible volume de tampon. Son extrémité supérieure étant fermée (fig. 68 B), la pipette est engagée dans le tube à sédimentation et sa partie effilée est introduite dans la chambre respiratoire (fig. 68 C). Les niveaux de tampon s'équilibrent et le tube est alors placé sur un support vibrant à 28° pendant deux heures : les nématodes sédimentent à l'extrémité de la chambre respiratoire (fig. 68 D). La pipette à sédimentation est alors enlevée (fig. 68 E).

La chambre respiratoire garnie de nématodes est alors récupérée dans le tube à l'aide de pinces. Les nématodes sont réunis en culot à l'extrémité de la chambre respiratoire. On passe alors immédiatement à l'opération suivante, qui consiste à introduire une bulle d'air dans la chambre respiratoire.

Introduction de l'air dans la chambre respiratoire

On dispose d'une pipette à air représentée par la figure 69. Le volume compris entre l'extrémité et le repère du capillaire de cette pipette à air a été jaugé par pesée de mercure et présente un volume V_p inférieur à V_g , volume gazeux du ludion. Juste avant la manipulation, le capillaire est lavé au Cetavlon à 5 % puis rincé à l'eau stérile.

La mise en place de la bulle à air dans la chambre respiratoire du ludion est schématisée par la figure 70. De petites gouttes de tampon standard séparées par de petites bulles d'air sont aspirées dans le capillaire de la pipette à air. Elles sont destinées à ralentir les mouvements des fluides dans le capillaire. Puis on introduit une colonne de tampon d'environ 20 mm de long (croquis A de la figure 70). L'extrémité distale de cette colonne est amenée à L mm du repère (croquis B de la figure 70). Cette longueur L est donnée par la relation :

$$L = 65 (R \times V_g / V_p - 1)$$

R est un coefficient calculé qui tient compte des différences de pression et de température entre l'ambiance et l'intérieur de l'appareil de mesures (Reversat, 1971). Sa valeur est ici de 1,04. Une seconde colonne de tampon standard est alors introduite dans le capillaire (croquis C de la figure 70). La chambre respiratoire, remplie de tampon standard, et contenant les nématodes réunis sous forme d'un culot à son extrémité, est alors engagée sur le capillaire de la pipette à air (croquis D et E de la figure 70). La bulle d'air contenue dans le capillaire de la pipette à air est alors progressivement chassée dans la chambre respiratoire (croquis F de la figure 70). Lorsque la totalité de l'air est passée dans la chambre respiratoire, cette dernière est dégagée (croquis G de la figure 70).

A l'aide d'une pipette de rinçage garnie de liquide de flottaison (Na OH, N/10), le col de la chambre respiratoire et le bouchon

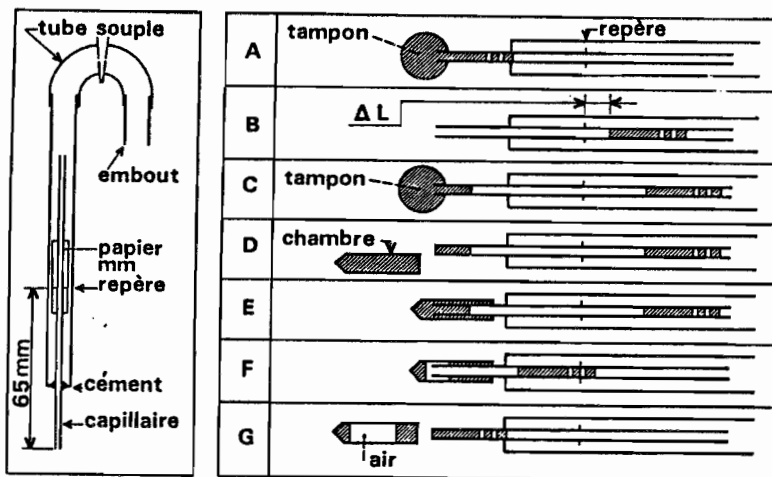


Fig. 69

Fig. 70

Fig. 69. - Mise en oeuvre du ludion : pipette à air.

Fig. 70. - Mise en oeuvre du ludion : introduction de l'air dans la chambre respiratoire. (Les étapes A, B, C, D, E, F et G sont commentées dans le texte).

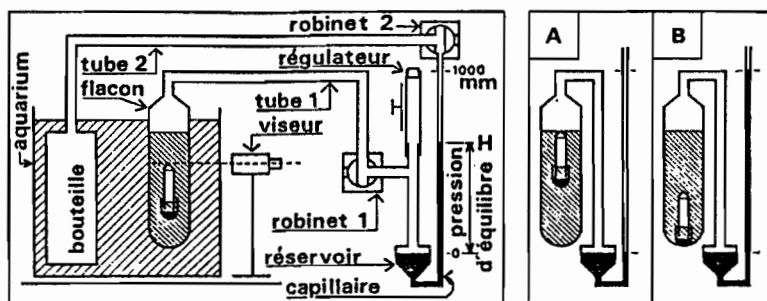


Fig. 71

Fig. 72

Fig. 71. - Schéma de principe de l'appareil de mesure : ludion à l'équilibre.

Fig. 72. - Mise en oeuvre du ludion : mise en place du ludion dans le flacon de flottaison. (A : introduction du ludion dans le flacon ; B : ludion au repos).

sont rincés (croquis C et D de la figure 67). Les deux pièces sont assemblées et le ludion est introduit dans l'appareil de mesure.

3.4.2.3. L'appareil de mesure

Le principe de l'appareil est rappelé par la figure 71 et l'appareil réalisé est représenté par les figures 73 et 74. Les éléments soulignés dans le texte ci-dessous sont repérés sur au moins une de ces trois illustrations. L'appareil comprend trois parties.

Bain thermostaté

On calorifuge un aquarium contenant environ 140 litres d'eau en l'enfermant dans un coffrage isolant constitué de bois et de laine de verre. La température de l'eau est maintenue à $28 \pm 0,01^\circ$ par un Unitherm. La température de la pièce est de $21 \pm 1^\circ$ et l'apport de lumière naturelle est faible. Le coffrage est percé d'une fenêtre avant et d'une fenêtre arrière au niveau desquelles le verre de l'aquarium est doublé par une seconde vitre qui contribue à réduire les déperditions thermiques.

Système manométrique

Un manomètre à lecture monobranche (Nigon et Fourche, 1968) est fixé sur une planche verticale. Son capillaire, vertical, est placé sur un réglelet métallique de 1 m gradué au 1/2 mm. Son réservoir contient 80 cm^3 d'éthanol à 95 % coloré à l'éosine.

La branche gauche du manomètre (réservoir) est reliée au régulateur de pression et au robinet 1. Le régulateur est constitué par un tuyau souple que l'on peut pincer progressivement entre un support fixe et un sabot mobile à l'aide d'une vis. La deuxième sortie de ce robinet 1 est à l'air libre. La troisième sortie de ce robinet est reliée par le tube 1 à une série de dix robinets plans. Chacun de ces robinets plans donne accès par un tube souple à un flacon de flottaison immergé dans l'eau de l'aquarium. Chaque flacon contient 15 cm^3 de liquide de flottaison (NaOH, N/10) saturé en air à la pression normale et à la température de 28° .

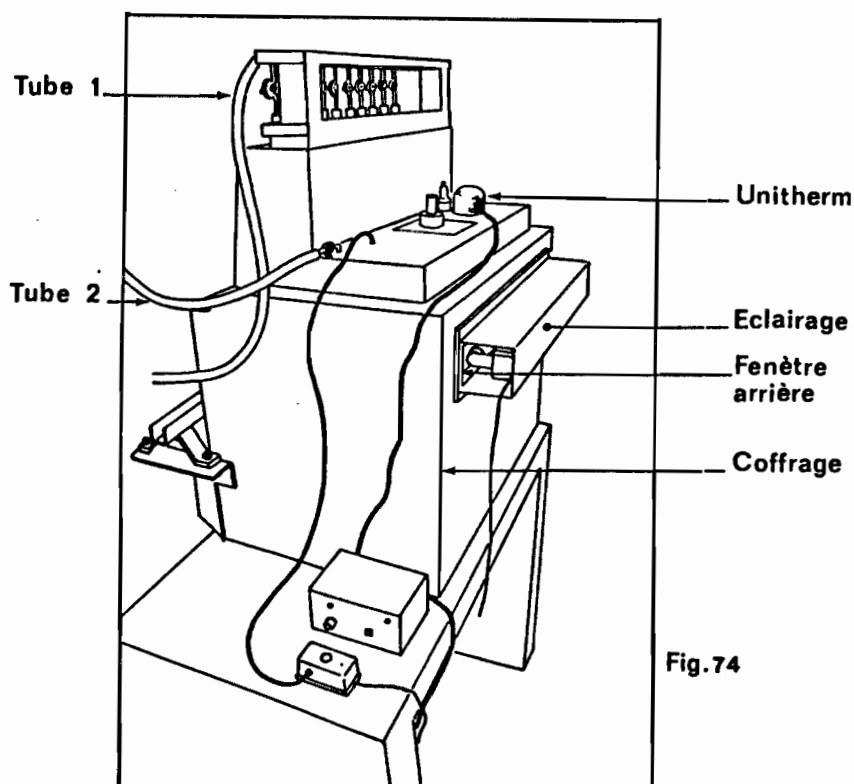
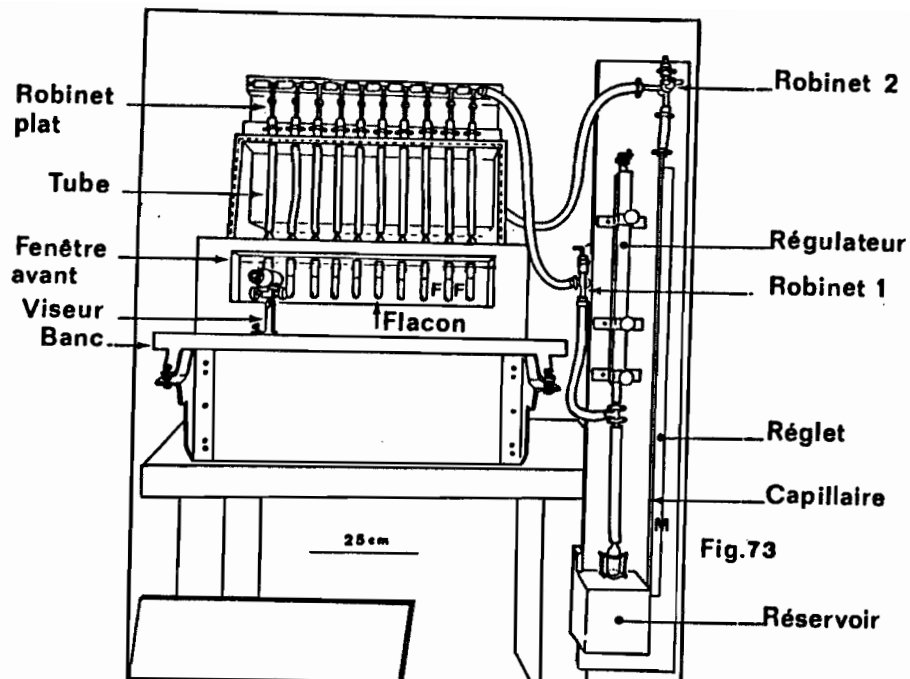


Fig. 73 . - Représentation schématique du respiromètre à ludion : vue de face de l'appareil de mesure.

Fig. 74 . - Représentation schématique du respiromètre à ludion : vue de 3/4 arrière de l'appareil de mesure.

La branche droite du manomètre (capillaire) est reliée au robinet 2. La deuxième sortie de ce robinet est à l'air libre. La troisième sortie de ce robinet est reliée par le tube 2 à une bouteille de référence de cinq litres, qui, lestée, est immergée dans l'eau de l'aquarium.

Les différentes parties de verre et de métal sont reliées entre elles par du tube à vide en caoutchouc.

Système optique

La fenêtre arrière du coffrage est munie d'un éclairage (tube fluorescent). Sur la face avant du coffrage sont fixées deux équerres métalliques supportant un banc d'optique horizontal et parallèle à la rangée de flacons de flottaison. Un viseur muni d'un réticule circule sur ce banc, et permet, à travers la fenêtre avant, de viser à l'intérieur des flacons de flottaison.

3.4.2.4. La mesure

Relevé de la pression d'équilibre du ludion

Le ludion garni (voir 3.4.2.3.) est déposé dans un flacon de flottaison : il flotte à la surface du liquide (fig. 72 A).

Le flacon de flottaison est refermé et les robinets 1 et 2 sont placés de façon à isoler le système de l'extérieur. En agissant sur le régulateur on augmente la pression dans le tube 1 et le niveau d'alcool monte dans le capillaire du manomètre. Ce niveau est amené à 1 000 mm sur le réglet. Au cours de cette manoeuvre le ludion coule au fond du flacon : on dit alors qu'il est au repos (fig. 72 B).

Deux heures après cette mise en place, le viseur est amené en face du flacon. A l'aide du régulateur, la pression d'air du tube 1 est diminuée jusqu'à ce que le ludion quitte le fond du flacon et vienne s'immobiliser en face du réticule du viseur. On dit que le ludion est en équilibre (fig. 71). Au cours de cette manoeuvre le niveau d'alcool dans

le capillaire a baissé par rapport au niveau de repos. Cette nouvelle valeur, notée H , est la pression manométrique d'équilibre du ludion.

Cette mesure de la pression d'équilibre du ludion est ensuite répétée plusieurs fois à des intervalles de plusieurs heures. Entre deux mesures successives, le ludion est laissé au repos.

En l'absence d'animal dans le ludion, ce relevé des valeurs successives de la pression d'équilibre du ludion au cours du temps constitue la mesure à blanc. La consommation d'oxygène d'un animal placé dans le ludion provoque une décroissance de la pression d'équilibre dont la valeur horaire permet de calculer l'intensité de la consommation d'oxygène. Il est donc important qu'au cours de cette mesure à blanc, la pression d'équilibre demeure constante. C'est pour vérifier cette aptitude que chaque ludion, après sa fabrication, est soumis à une mesure à blanc.

Lorsque le ludion est garni d'animaux, on effectue deux mesures successives de la pression d'équilibre du ludion, destinées au calcul de la consommation d'oxygène. La première mesure, de valeur H_1 est faite au temps t_1 , deux heures après la mise en place du ludion dans le flacon de flottaison. La seconde mesure, de valeur H_2 est faite au temps t_2 , plusieurs heures après la première. Entre ces deux mesures principales peuvent être effectuées plusieurs autres mesures. Celles-ci n'interviennent pas dans le calcul de la consommation d'oxygène, mais sont destinées à apprécier la régularité de cette consommation.

Comptage des nématodes après la mesure

Après la dernière mesure H_2 , le ludion est récupéré et son bouchon enlevé. A l'aide d'une pipette de rinçage garnie d'eau déminéralisée, le col de la chambre respiratoire est rincé, puis le contenu du ludion est entraîné dans un verre de syracuse. Quelques heures après leur récupération, les nématodes sont comptés sous la loupe binoculaire. On dénombre N nématodes pour le ludion.

La mesure directe du poids sec du lot de nématodes étudiés à l'aide d'un ludion est impossible pour des raisons de sensibilité. Il est par contre possible d'évaluer ce poids sec du lot étudié à l'aide du nombre de nématodes N, déterminé à partir d'un échantillon plus important comme nous l'avons vu précédemment (voir 3.3.2.2.).

3.4.2.5. Le calcul de l'intensité respiratoire

Calcul de la constante du ludion

Selon Boell (1960), on peut définir une constante du ludion à l'aide de la formule employée pour les respiromètres à volume constant tels que le warburg (Umbreit et al., 1966). Cette constante, k, est donnée par la relation :

$$K = (V_g \times 273 / T + V_f \times \alpha) / P_o$$

V_g est le volume gazeux égal à 10 ul. V_f est le volume total de liquide situé à l'intérieur du ludion : sa valeur est de 4 ul. α, coefficient de solubilité de l'oxygène dans l'eau à 28° est égal à 0,027 mm³ par mm³. T est la température absolue de l'expérience égale à 28°, soit 301°K. P_o pression atmosphérique normale est égale à 76 cm de mercure soit 12 660 mm d'éthanol à 95 % à 21°.

Dans ces conditions la constante du ludion est égale à 725 picolitre d'oxygène par mm d'éthanol. Lorsque la pression d'équilibre du ludion a baissé de 1 mm, les animaux qu'il contient ont consommé 725 picolitres d'oxygène (1 picolitre = 10⁻¹² litre).

Correction de la constante du ludion

Du temps t₁, au temps t₂, la chute de la pression d'équilibre du ludion est égale à H₁ - H₂. Ce chiffre doit subir une correction avant de pouvoir être utilisé pour le calcul de la consommation d'oxygène. Cette correction est faite en le multipliant par un facteur correctif constant. On peut donc reporter la correction sur la

constante du ludion. La nouvelle constante k' est alors donnée en fonction de k par la relation :

$$K' = K (1 + P_o \times S_c / V_b + S_c / S_r)$$

Le premier terme du facteur correctif est égal à 1.

Le second terme tient compte de la détente de l'air contenu dans la bouteille de référence, consécutive à la baisse du liquide dans le capillaire du manomètre (Linderstrom-Lang, 1943). P_o est la pression normale définie plus haut. S_c est la section du capillaire du manomètre égale à $3,14 \text{ mm}^2$. V_b est le volume de la bouteille de référence égal à 5.10^6 mm^3 . Dans ces conditions, ce terme a une valeur égale à $8,2 \cdot 10^{-3}$.

Le troisième terme du facteur correctif tient compte de la hausse du liquide dans le réservoir consécutive à une baisse du même liquide dans le capillaire du manomètre (Nigon & Fourche, 1958). S_c est la section du capillaire égale à $3,14 \text{ mm}^2$. S_r est la section du réservoir du manomètre égale à 1300 mm^2 . Dans ces conditions ce terme a une valeur égale à $2,4 \cdot 10^{-3}$.

Le facteur correctif a une valeur totale égale à 1,0106. La constante k' présente alors une valeur de 733 picolitres par mm de liquide manométrique.

Calcul de la consommation d'oxygène

Ramenée aux conditions normales de température et de pression (0° et 76 cm de mercure), la consommation d'oxygène est donnée par la relation suivante. Le résultat Q_{O_2} , étant exprimé en picolitres d'oxygène par nématode par heure.

$$Q_{O_2} = \frac{k' \cdot (H_1 - H_2)}{N \cdot (t_2 - t_1)}$$

k' est la constante corrigée du ludion (voir 4.3.6.2.) égale à 733 picolitres par mm de liquide manométrique. $H_1 - H_2$ est la chute brute de la pression manométrique d'équilibre du ludion, du temps t_1 au temps t_2 , en mm de liquide manométrique. N est le nombre de nématodes comptés après la mesure (voir 4.3.5.2.). $t_2 - t_1$ est le temps écoulé entre les deux mesures, en heures.

3.4.3. RESULTATS

3.4.3.1. Les contraintes de la technique

Mesures à blanc

Nous avons vu précédemment (3.4.2.5.) pour quelles raisons on attend qu'au cours d'une mesure à blanc, la pression d'équilibre du ludion demeure constante.

En fait au cours d'une mesure à blanc, la pression d'équilibre d'un ludion peut soit demeurer constante soit varier. Dans ce dernier cas, on dit que le ludion présente une dérive : dérive négative si la pression d'équilibre diminue, positive si elle augmente.

Nos ludions présentent une faible dérive négative. La figure 75 montre le relevé type d'une mesure à blanc d'un ludion de 10 ul. On a convenu de ne garder que les ludions dont la dérive négative est inférieure à 1 mm d'éthanol en 24 heures et d'éliminer les autres.

Mesures avec des animaux

On emploie des ludions de 10 ul. Chacun d'eux est garni à l'aide de 80 juvéniles d'Heterodera oryzae. Le ludion, garni de nématodes, est représenté par la figure 76. Par gravité, les nématodes sédimentent et se répartissent au contact du ménisque qui sépare leur milieu de la bulle d'air. Un relevé type de la pression d'équilibre d'un ludion dans ces conditions au cours d'une mesure de vingt heures, est représenté par la figure 77. Les points correspondant aux mesures

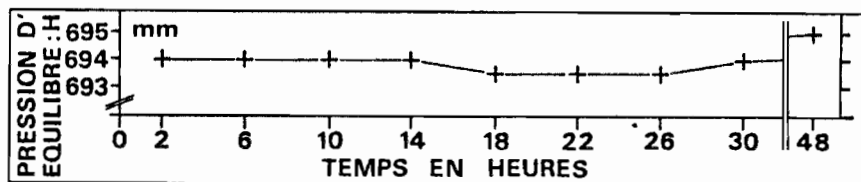


Fig. 75. - Mesure à blanc d'un ludion de 10 µl à 28° C.

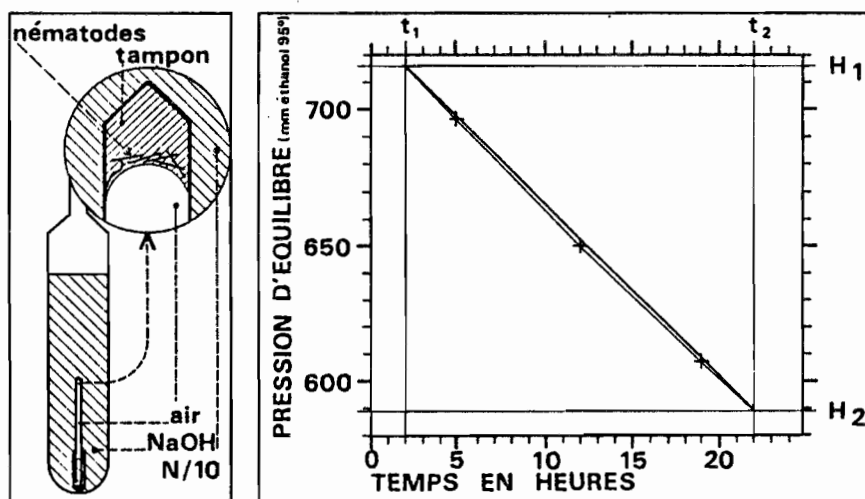


Fig.76

Fig.77

Fig. 76. - Mesure : ludion de 10 µl, garni de nématodes, au repos dans le flacon de flottaison.

Fig. 77. - Mesure : relevé à 28° C, en fonction du temps, de la pression d'équilibre d'un ludion de 10 µl contenant 80 juvéniles d'Heterodera oryzae.

secondaires sont toujours situés en dessous de la droite qui joint les deux points correspondant aux mesures principales H1 et H2. L'intensité de la consommation d'oxygène diminue donc au cours d'une expérience. (De l'ordre de 5 à 20 % suivant l'expérience.)

Effet de groupe

Lors du comptage effectué après l'expérience, l'effectif trouvé est parfois inférieur à l'effectif prélevé dans la pipette de sédimentation : de 68 à 80 individus au lieu de 80. Ces pertes se produisent lors de la sédimentation : certains animaux restent collés sur la paroi de la pipette à sédimentation. Il importait de déterminer si l'effectif pouvait présenter une incidence sur la consommation moyenne.

Pour cela on a réalisé une expérience avec vingt ludions manipulés simultanément (on utilise alors deux appareils de mesure). On place dans chaque ludion un nombre différent de juvéniles d'Heterodera oryzae. La mesure est faite sur vingt heures. Les résultats de cette expérience sont donnés par la figure 78. Le coefficient de corrélation est de 0,49 : l'effet du nombre de juvéniles dans le ludion est significatif avec un risque d'erreur compris entre 2 et 5 %.

Il y a donc un effet de groupe très faible sur la consommation d'oxygène. La consommation moyenne diminue de 0,05 pl lorsque l'effectif augmente d'une unité.

De la même façon, chez les femelles d'Hirschmanniella spinicaudata, on observe un effet de groupe sur l'intensité respiratoire (fig. 79).

La pipette à sédimentation n'est garnie que de juvéniles actifs d'Heterodera oryzae. Cependant dès la première mesure (H1), la plupart des juvéniles contenus dans le ludion sont inactifs et présentent un habitus droit semblable à celui des juvéniles morts. Cette situation se maintient pendant toute la durée de l'expérience. Une heure après leur récupération, à la fin de l'expérience, tous les juvéniles sont actifs.

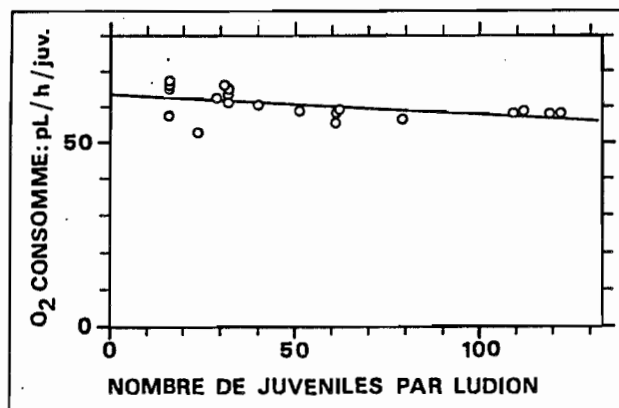


Fig. 78. - Effet de groupe sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Chaque point représente le résultat obtenu à l'aide d'un ludion).

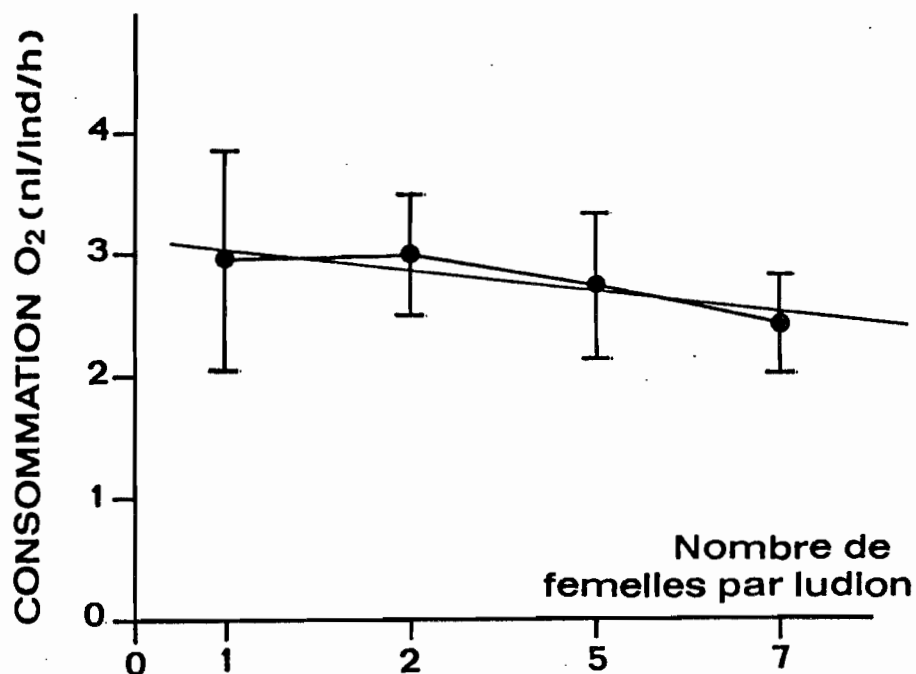


Fig. 79. - Effet de groupe sur l'intensité respiratoire des femelles d'*Hirschmanniella spinicaudata* (Pour chaque point, la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

3.4.3.2. Influence des facteurs externes sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'*Heterodera oryzae*

En préambule à la relation de cette série d'expériences consacrée à l'effet de la pression osmotique sur la respiration, il convient d'expliquer pourquoi l'eau pure ne convient pas comme milieu standard au cours des mesures respirométriques. En effet l'eau distillée, donc très pure, dissout, lors de la condensation, du gaz carbonique à partir de l'atmosphère ambiante, ce qui lui donne une réaction acide (pH = 5,5). Une fois ce milieu introduit dans le ludion (fig. 76), le gaz carbonique dissout quitte le milieu, transite sous forme gazeuse par la bulle du ludion, puis est capté par la soude présente dans le col du ludion. Une fois ce dégazage achevé, le pH de l'eau pure est redevenu neutre. Il y a plus : en fait au cours des mesures respirométriques, on s'aperçoit que le milieu de suspension des nématodes a tendance à s'alcaliniser, cela peut provenir soit du relargage de cations par le verre du ludion lui même, soit de l'excrétion par les nématodes de cations dont l'ammoniaque. On a pu vérifier ce phénomène d'alcalinisation par l'usage de colorants. Par ailleurs, il n'est pas pensable qu'il y ait communication entre le milieu et la soude environnante, car la basicité observée est faible. Or les pH basiques, supérieurs à 8, sont très toxiques pour les nématodes. Pratiquement on est conduit à utiliser comme milieu standard du tampon phosphate pH 7, à la concentration de 50 mM. Des expériences séparées ont montré que dans ce milieu, la longévité des juvéniles n'est pas différente de celle observée dans l'eau pure.

Au cours de cette étude sur l'influence de la pression osmotique, trois expériences ont été réalisées, chacune avec quatre valeurs de la pression osmotique et cinq répétitions pour chaque valeur. Pour deux des expériences on a employé du tampon phosphate pH 7 pur à différentes concentrations : 5, 10, 20 et 40 mM pour la première expérience et 40, 80, 160 et 320 mM pour la seconde expérience. Dans la troisième expérience de l'urée a été dissoute à 5, 20, 80 et 320 mM dans du tampon phosphate pH 7 à 5 mM. Afin de tenir compte des natures différentes des deux substances utilisées, les pressions osmotiques ont été exprimées en atmosphères, en se basant sur un calcul, d'après la concentration et la dissociation ionique (Collis-George & Sands, 1962).

Au cours des trois expériences les juvéniles étaient placés dans les milieux appropriés six heures avant la première mesure de la pression d'équilibre des ludions.

Les résultats des trois expériences sont présentés dans la figure 80. L'analyse de variance révèle un effet significatif ($p < 1\%$) de la pression osmotique dans les trois cas. Avec l'urée, on observe une intensité respiratoire maximale pour une pression osmotique de 2 atm, tandis qu'avec le tampon phosphate, l'intensité respiratoire diminue régulièrement lorsque la pression osmotique augmente.

Influence du pH

Pour étudier l'influence du pH deux expériences ont été réalisées avec chacune quatre valeurs du pH et cinq répétitions par valeur. Au cours de la première expérience a été utilisé du tampon citrate (50mM ; pH : 3, 4, 5 et 6) tandis qu'au cours de la seconde expérience a été utilisé du tampon citrate phosphate (50 mM ; pH : 5, 6, 7 et 8). La préparation de ces deux tampons est donnée par Gomori (1955). Les juvéniles étaient placés dans les tampons six heures avant la première mesure de la pression d'équilibre des ludions.

Les résultats de ces deux expériences sont données dans la figure 81. L'analyse de variance révèle un effet significatif du pH ($p < 1\%$) : dans le tampon citrate, l'IR décroît quand le pH augmente tandis qu'elle croît dans le tampon citrate-phosphate.

Influence de substrats exogènes

Pour étudier l'influence des substrats exogènes, deux expériences ont été réalisées. Dans la première, des sucres à la concentration de 50 mM ont été ajoutés au tampon phosphate standard. Il y avait quatre traitements avec cinq répétitions chacun : glucose, fructose, saccharose et un témoin sans sucre. Dans les quatre traitements, un antibiotique, du 2 ethoxy ethyl mercure était ajouté à la concentration de 5 ppm. La seconde expérience comportait deux traitements de cinq répartitions : d'une part du tampon phosphate standard (pH : 7 ; 50 mM) et d'autre part du tampon citrate phosphate (pH : 7 ; 50 mM). Au

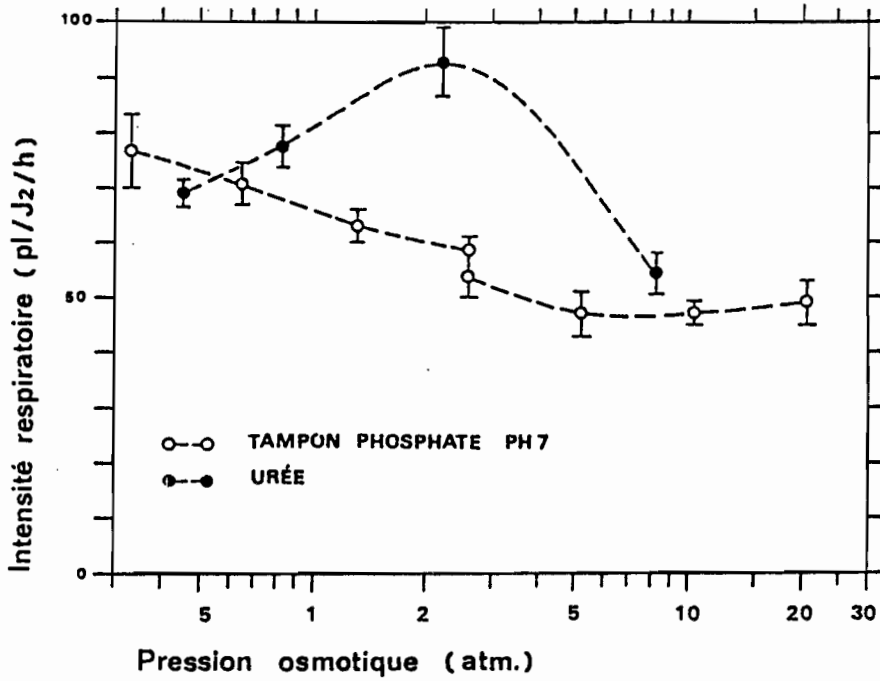


Fig. 80. - Influence de la pression osmotique sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Pour chaque point, la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

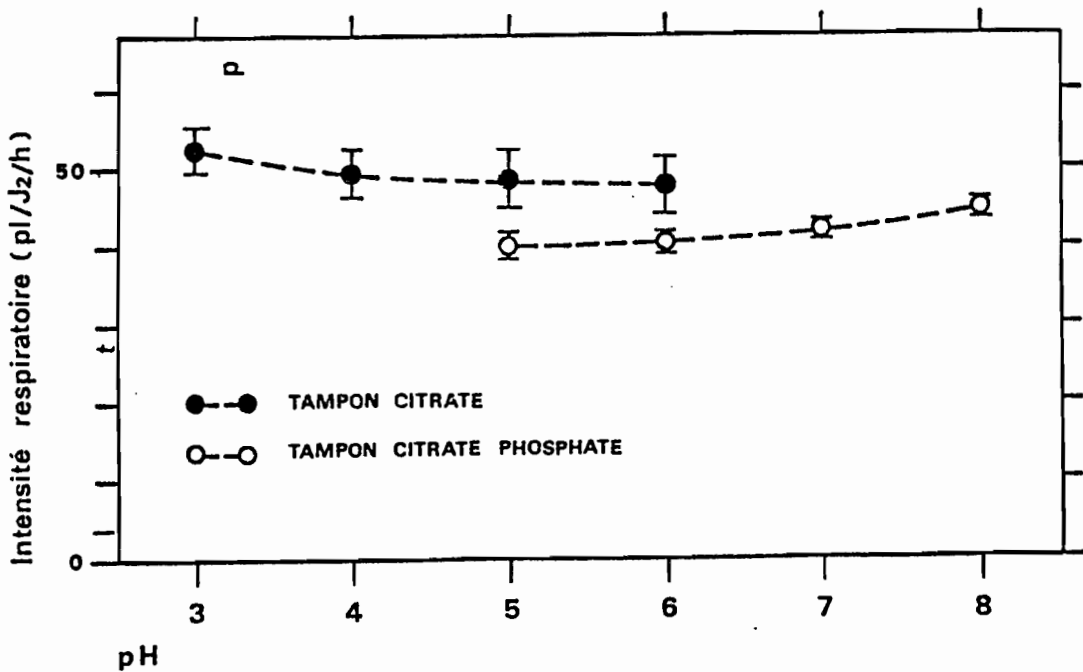


Fig. 81. - Influence du pH sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Pour chaque point, la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

cours des deux expériences, les juvéniles ont été placés dans les différents milieux six heures avant la première mesure de la pression d'équilibre des ludions.

Les résultats de ces deux expériences sont donnés par le tableau 22. Aucun des trois glucides, glucose, fructose ou saccharose, n'a d'influence significative sur l'IR par comparaison avec le milieu standard (Expérience n°1). Par contre le tampon citrate phosphate déprime l'IR par comparaison avec le tampon citrate. De plus on retrouve, comme précédemment (fig. 81), que ce tampon citrate phosphate réduit considérablement la variabilité des mesures (Ecart type égal à 1,1 dans le citrate phosphate et à 5,2 dans le tampon phosphate).

Influence de la tension d'oxygène

Cette expérience a pu être reproduite avec des résultats identiques, on ne décrira donc que la première. On utilise quatre concentrations d'oxygène avec cinq répétitions par concentration. Des mélanges d'air comprimé (21 % d'oxygène en volumes) et d'azote industriel comprimé (3 % d'oxygène en volumes) sont réalisés dans quatre bouteilles métalliques pour gaz comprimé. Les tensions d'oxygène de ces quatre mélanges sont mesurées avec un analyseur d'oxygène à électrode de verre Beckman : 156 mm Hg (air normal) ; 111,4 mmHg ; 66,8 mmHg ; 22,3 mmHg. A l'aide de chacune de ces quatre bouteilles on alimente une microchambre, par un flux continu gazeux, dans laquelle a lieu l'opération de remplissage gazeux du ludion (voir fig. 70 en particulier l'étape B). Le premier contact des juvéniles avec le mélange gazeux a lieu trois heures avant la première mesure de la pression d'équilibre du ludion.

Les résultats de cette expérience sont donnés par la figure 82. L'analyse de variance montre un effet significatif ($p < 0,1 \%$) de la tension d'oxygène sur l'IR : celle-ci décroît rapidement lorsque cette tension diminue. Vis à vis de la tension d'oxygène, l'IR des nématodes se classe en deux catégories : dépendante ou indépendante. Chez les juvéniles d'Heterodera oryzae, l'IR est manifestement dépendante. Chez des nématodes zooparasites qui présentaient vis à vis de l'oxygène une relation analogue, Rogers (1949) a pu établir, par le biais d'une

TABLEAU 22 . Influence de quelques substrats exogènes sur la consommation d'oxygène des juvéniles d'*Heterodera oryzae*

Expérience n°	Substrat	Consommation d'O ₂ $\mu\text{l}/\text{juvénile}/\text{h.}$ (1)	Ecart type
1	Témoin	53,6	5,5
	Glucose 50 mM	52,3	2,4
	Fructose 50 mM	61,6	7,6
	Saccharose 50 mM	48,8	2,2
2	Tampon phosphate pH 7 50 mM	53,8	5,2
	Tampon citrate phosphate pH 7 50 mM	47,2	1,1

(1) Moyenne de 5 répétitions.

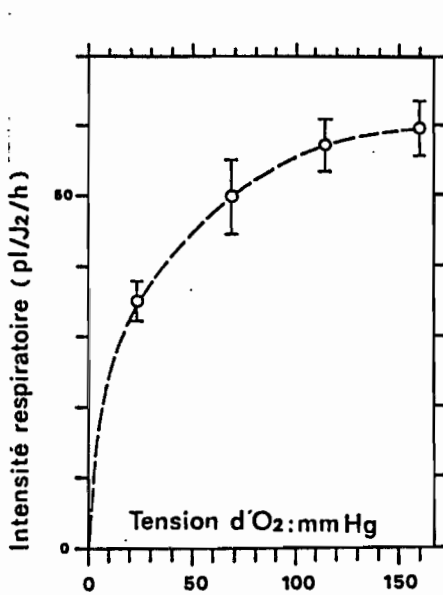


Fig. 82

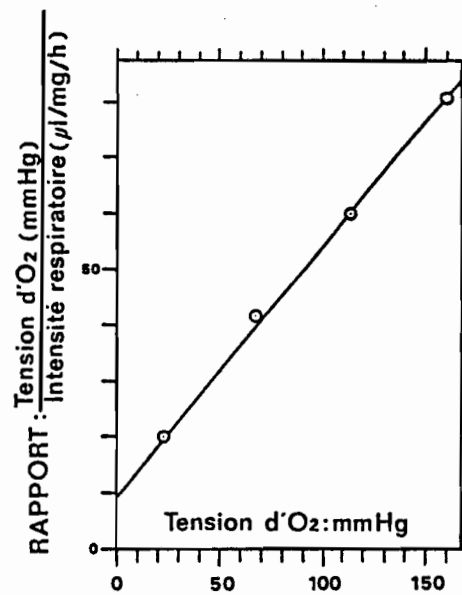


Fig. 83

Fig. 82. - Influence de la tension d'oxygène sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Pour chaque point, la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

Fig. 83. - Influence de la tension d'oxygène sur le rapport tension d'oxygène/intensité respiratoire (Chiffres de la fig. 82 transformés sur la base d'un poids sec de 30 ng par juvénile).

transformation mathématique des résultats bruts, une propriété intéressante. Dans la figure 83 on porte le rapport, tension d'oxygène : IR, en fonction de la tension d'oxygène : les points transformés sont alignés. En désignant par (O_2) la tension d'oxygène, la relation tenant compte de cette propriété de linéarité s'écrit : $IR = (O_2) / K_1 + K_2 (O_2)$. Cette relation peut être interprétée comme caractéristique d'une réaction entre l'oxygène et une enzyme. Les valeurs de K_1 et K_2 déterminées à partir de la fig. 83 par l'ordonnée de l'intersection ($K_1 = 9,5$) et par la pente de la droite ($K_2 = 0,44$) sont très semblables aux valeurs trouvées par Rogers (1949) chez diverses espèces de nématodes.

Respiration postanaérobie

Cette expérience comprend trois traitements avec chacun cinq répétitions : un témoin sans anaérobiose, un premier essai avec douze heures d'anaérobiose et un second essai avec 24 heures d'anaérobiose. Afin de maintenir les juvéniles en état d'anaérobiose, on utilise la méthode au sulfite décrite en détail précédemment (voir 2.3.2.5). Une fois les juvéniles introduits dans les chambres respiratoires des ludions (voir fig. 68), celles-ci sont introduites dans les tubes contenant le sulfite en les tenant soigneusement verticales afin que les juvéniles restent en place. On considère que la période d'anaérobiose commence instantanément. Après l'intervalle de temps requis (12 ou 24 heures) chaque chambre respiratoire est récupérée et le sulfite qu'elle contient est soigneusement rincé sans déranger les nématodes qui doivent rester à l'extrémité. Puis la procédure normale est reprise avec l'introduction de la bulle d'air. Pour les trois traitements, la mesure de la pression d'équilibre des ludions est réalisée toutes les quatre heures et l'IR est calculée pour le milieu de l'intervalle de temps considéré.

Les résultats de cette expérience sont donnés dans la figure 84. Pour les témoins, l'IR initiale est de 65 pl/J₂/h, et l'IR décroît ensuite lentement. Après 12 h et 24 h d'anaérobiose les IR initiales sont respectivement de 91 et 103 pl/J₂/h. Par la suite l'IR décroît régulièrement pour rejoindre le niveau du témoin 30 heures après. Au cours de l'anaérobiose les juvéniles sont immobiles, figés en habitus

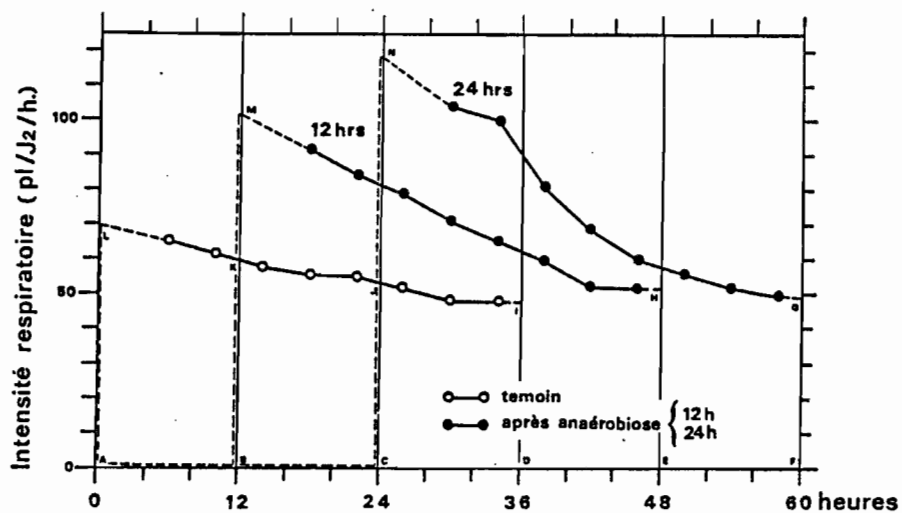


Fig. 24. - Intensité respiratoire postanaérobie des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Les lignes interrompues représentent les valeurs extrapolées des intensités respiratoires et les lettres A, B, ..., M, N sont relatives aux calculs du tableau 23).

TABLEAU 23. Calcul du taux de compensation de la dette l'oxygène chez les juvéniles d'*Heterodera oryzae*. (Le calcul, commenté dans le texte a été effectué à partir des données de la fig.).

Paramètres		Durée de l'anaérobiose		
		0	12 heures	24 heures
Dettes d'oxygène	Lettres de référence	-	ABKL	ACJL
	Symbole	-	S 12	S 24
	Valeur numérique (1)	-	782,6	1449,6
Consommation d'oxygène	Lettres de références	ADIL	BEHM	CFGN
	Symbole	Ro	R 12	R 24
	Valeur numérique (1)	2036,9	2602,5	2718,8
Consommation de compensation	Symbole	-	(R12 - Ro)	(R24 - Ro)
	Valeur numérique (1)	-	565,6	681,9
Taux de compensation	Symbole	-	$\frac{(R12 - Ro)}{S 12}$	$\frac{(R24 - Ro)}{S 24}$
	Valeur numérique	-	0,72	0,47

(1) Surface en pl/juvenile.

droit, mais plusieurs heures après leur retour dans une ambiance normale, tous ont repris leur activité. L'IR temporairement accrue que l'on observe chez les juvéniles d'Heterodera oryzae après anaérobiose (fig. 84) constitue un résultat typique chez les nématodes (von Brand, 1960a ; Barrett, 1969b ; von Brand, 1943). Cette augmentation est souvent appelée paiement de la dette d'oxygène lorsqu'on l'interprète comme étant due à l'oxydation métabolique rapide des produits de fermentation accumulés au cours de l'anaérobiose (von Brand, 1960a).

Le taux de cette compensation peut être calculé sur la figure 84 par des mesures de surface. Rappelons que sur cette figure, dont les coordonnées sont proportionnelles à des intensités respiratoires, et les abscisses au temps, toute mesure de surface correspond à des volumes d'oxygène. On définit sur la figure 84 intersections, repérées chacune par une lettre (de A à N). Les résultats des mesures sont donnés dans le tableau 23. La surconsommation postanaérobique compense 0,72 et 0,42 de la dette d'oxygène après respectivement 12 et 24 heures d'anaérobiose.

Influence de la température

Cinq expériences différentes ont été réalisées, chacune pour une température différente. Chaque expérience comprend huit répétitions avec deux nématodes et deux répétitions sans nématodes. On utilise deux appareils de mesure : la température du premier appareil est maintenue à la valeur standard de 28°, tandis que la température du second appareil est portée à l'une des cinq valeurs suivantes : 20, 24, 28, 32 et 36°. Au cours de chaque expérience, les dix ludions sont d'abord placés dans le premier appareil où deux mesures de la pression d'équilibre, séparées par un intervalle de deux heures, sont effectuées ; puis les ludions sont transférés dans le second appareil où les mesures de la pression d'équilibre sont réalisées toutes les quatre heures. L'IR est ensuite calculée pour le milieu de chaque intervalle de temps séparant deux mesures consécutives. Les calculs correspondants sont effectués en tenant compte de deux corrections. La première correction est faite en soustrayant la valeur de la variation de pression d'équilibre des ludions témoins (sans nématodes) des ludions essais (avec nématodes). Ceci tient

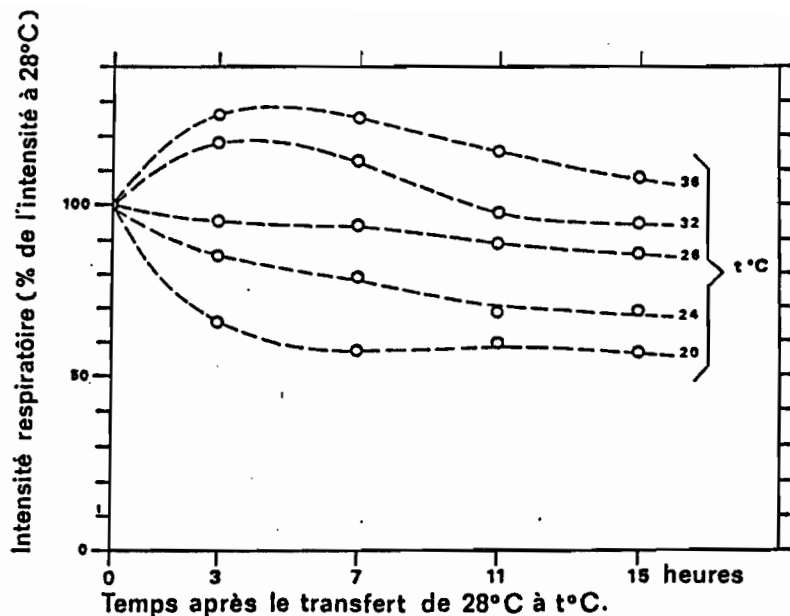


Fig. 85. - Influence d'un changement de température (de 28° C à t° C) sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'Heterodera oryzae.

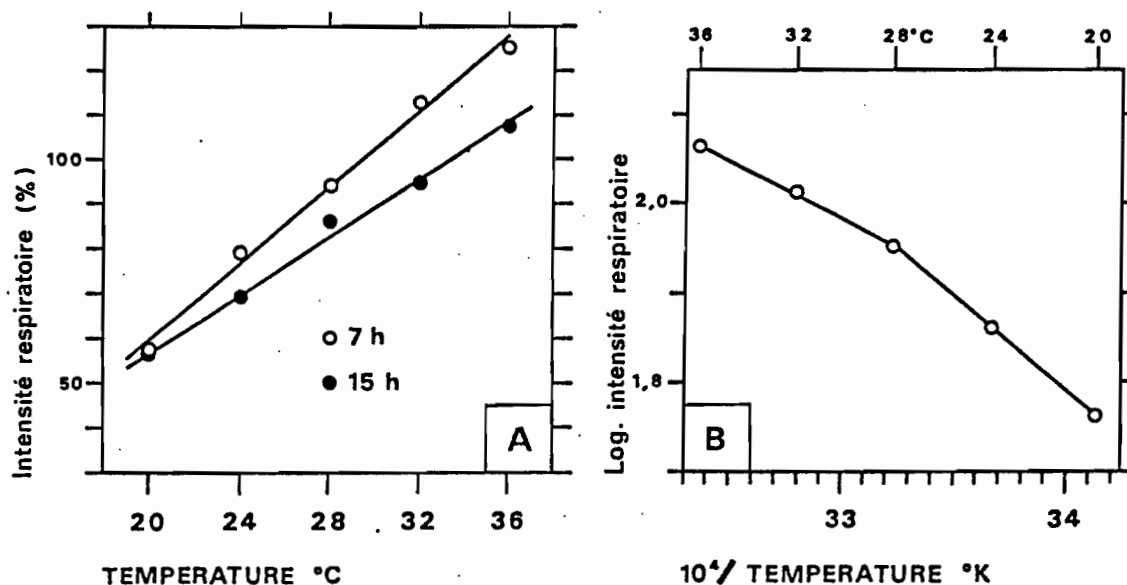


Fig. 86. - Influence de la température sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'Heterodera oryzae (chiffres de la fig. 85).
 A - Résultats non transformés : intensités respiratoires aux temps 7 h et 15 h.
 B - Résultats exprimés suivant la formule d'Arrhénius : moyenne des intensités respiratoires aux temps 7, 11 et 15 h.

compte de l'effet purement physique du changement de température entre les deux appareils. La seconde correction concerne la constante du ludion, dans le calcul de laquelle est impliquée la température (voir 3.4.2.5.).

Le résultat de ces cinq expériences est représenté par la figure 85. Les IR aux différentes températures sont calculées en pourcentages de l'IR mesurée pendant deux heures à 28° au début de chacune des cinq expériences. Pour la température standard, l'IR décroît régulièrement et faiblement. A 32° et 36°, l'IR passe par un maximum quatre heures après le transfert puis décroît. A 20° et 24°, l'IR décroît après le transfert. Pour toutes les températures, huit à dix heures après le transfert, l'IR semble stabilisé.

La température de 28°, dite standard, choisie comme référence au cours de cette étude est celle à laquelle est réalisé l'élevage. Elle correspond également à des mesures de température effectuées dans des rizières de Côte d'Ivoire à une profondeur d'une vingtaine de centimètres.

3.4.3.3. Influence du jeûne sur l'intensité respiratoire

Heterodera oryzae

Cette expérience a été conduite plusieurs fois avec des résultats généraux très semblables. On a choisi de ne donner ici que les résultats d'une seule de ces expériences, couplée avec une mesure l'évolution du poids sec au cours du jeûne (tableau 16). A chaque âge (0, 1, 2, 3 et 4 semaines), on charge dix ludions de 10 ul avec chacun environ 80 juvéniles vivants et stérilisés. La mesure est faite sur un intervalle de vingt heures. A la date de cinq semaines, il n'y avait plus assez de juvéniles pour mesurer le poids sec (voir tableau 16) mais suffisamment pour mesurer la respiration. Cependant au cours de la mise en place des animaux dans la chambre respiratoire (fig. 68), on s'est aperçu que les juvéniles ne sédimentent pas comme prévu mais restent collés à la paroi de la pipette. La mesure à cette date n'a donc pu être réalisée.

Les résultats des différentes mesures sont portés sur la figure 87. Au temps zéro, la respiration initiale est de 58 pl/j2/h. Puis cette intensité décroît jusqu'à 26 pl/j2/h à la date de quatre semaines. Cette décroissance n'est pas régulière : on observe la présence de deux paliers, de une à deux semaines et de trois à quatre semaines. Plutôt qu'à un phénomène lié au seul vieillissement, l'existence de ces paliers relève probablement davantage d'artéfacts, dus aux manipulations préalables à la mesure, et auxquels cette espèce semble particulièrement sensible.

La relation quantitative entre la perte du poids sec et l'oxygène consommé est établie à partir des chiffres du tableau 16 et de la figure 87. Sur cette figure on calcule la somme des surfaces des quatre trapèzes rectangles consécutifs, délimités par l'axe des ordonnées, les segments joignant les points expérimentaux et les verticales joignant ces mêmes points. Les unités employées étant des pl/heure en ordonnée et le temps, en heures, pour les abscisses le résultat s'exprime en pl d'oxygène. On constate que, du temps zéro au temps quatre semaines, chaque juvénile d'Heterodera oryzae consomme 25 600 pl d'oxygène, tandis que sa perte de poids sec est de 12,5 ng. Ceci équivaut à une consommation spécifique de 2 047 ml d'oxygène par gramme de poids sec, valeur très proche des 2 019 ml d'oxygène consommés théoriquement par le métabolisme de un gramme de lipides purs (Polononski et al., 1966).

Meloidogyne javanica

Dans son extension optimale, c'est à dire en suivant l'évolution de la respiration sur la durée la plus longue possible, cette expérience n'a été réalisée qu'une fois. Mais pour les deux premiers points de la courbe correspondant aux âges de zéro et une semaine l'expérience a été reproduite avec des résultats identiques. La première expérience dont nous donnons les résultats ici a été couplée avec celles concernant d'une part l'évolution de la composition chimique (fig. 52 et 53) et d'autre part l'évolution de la demande chimique d'oxygène (fig. 60). A chaque date (0, 1, 2 et 3 semaines), on charge huit ludions

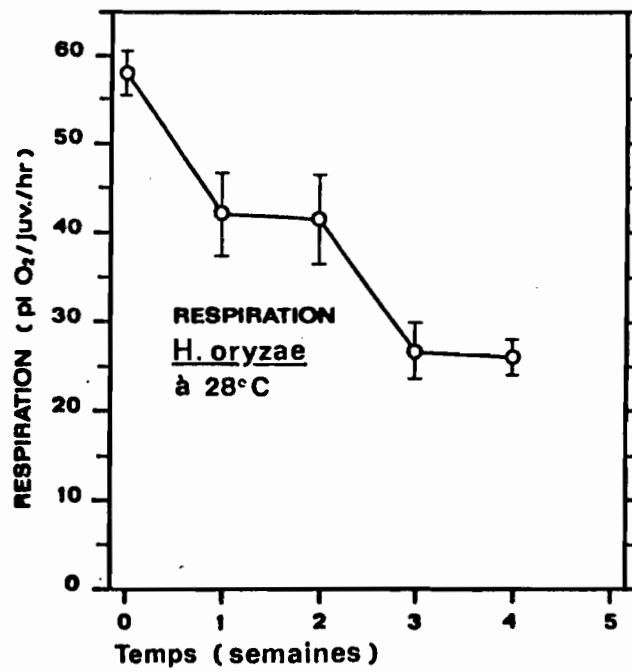


Fig. 87. - Effet de la durée du jeûne sur l'intensité respiratoire des juvéniles d'*Heterodera oryzae* (Pour chaque point la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 %).

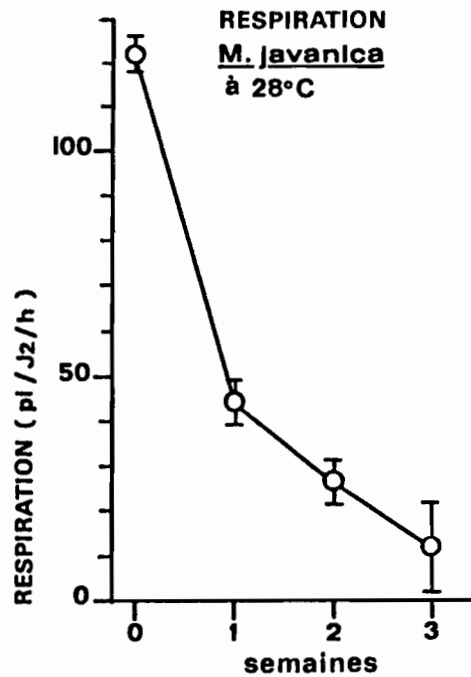


Fig. 88. - Effet de la durée du jeûne sur l'intensité respiratoire des juvéniles de *Meloidogyne javanica* (Pour chaque point, la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

de 10 ul avec chacun environ 80 juvéniles vivants et stérilisés. A la date de quatre semaines, comme pour l'espèce précédente, Heterodera oryzae, à la date de cinq semaines, les propriétés de sédimentation et le comportement sont tellement altérés par la durée du jeûne qu'il n'a pas été possible de garnir correctement les chambres respiratoires des ludions, et la mesure n'a pu être effectuée.

Les résultats de cette expérience sont donnés par la figure 88. A la date zéro, l'intensité respiratoire initiale était de 120 pl/j2/h. Au cours de la première semaine de stockage, cette intensité diminue brutalement jusqu'à 44 pl/j2/h à la date d'une semaine. Puis on observe une décroissance quasi linéaire qui amène l'intensité respiratoire à la valeur de 12 pl/j2/h (10 % de la valeur initiale) à la date de trois semaines.

L'intégration de cette courbe de l'évolution de l'intensité respiratoire par la méthode indiquée pour l'espèce précédente révèle qu'au cours des trois semaines chaque juvénile consomme 23 100 pl. Les quantités d'oxygène nécessaires au métabolisme des lipides glucides et protides ont été mesurées précédemment lors de l'étude de l'évolution de la demande chimique d'oxygène (fig. 60). Au cours des trois semaines, ce paramètre la DCO, diminue de 23,2 nl. L'accord entre les deux chiffres est donc satisfaisant.

Hirschmanniella spinicaudata

Nous avons réalisé deux expériences, pour chacune desquelles, l'évolution de la respiration a été suivie séparément chez les femelles d'une part et chez les mâles d'autre part. Au cours des deux expériences, les animaux étaient maintenus dans une solution de chlorure de 2 méthoxy éthylmercure à 7,5 ppm dans du tampon phosphate pH 7 à 20 mM ; milieu antibiotique qui leur convient et dans lequel, d'ailleurs, a été déterminée la courbe de survie (fig. 16).

Au cours de la première expérience, à chaque date (0, 3, 6, 9 et 12 semaines), on chargeait huit ludions de 10 ul avec chacun de quatre à dix animaux vivants et actifs prélevés au hasard. Les mesures

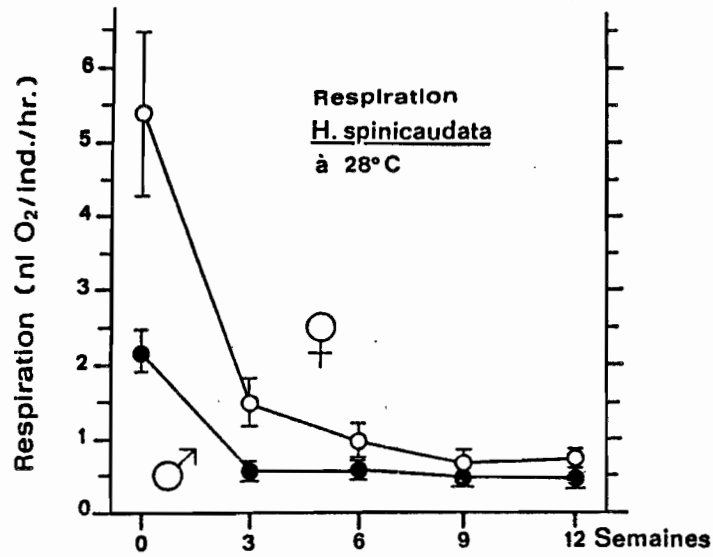


Fig. 89. - Effet de la durée du jeûne sur l'intensité respiratoire des adultes d'*Hirschmanniella spinicaudata* (Pour chaque point, la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

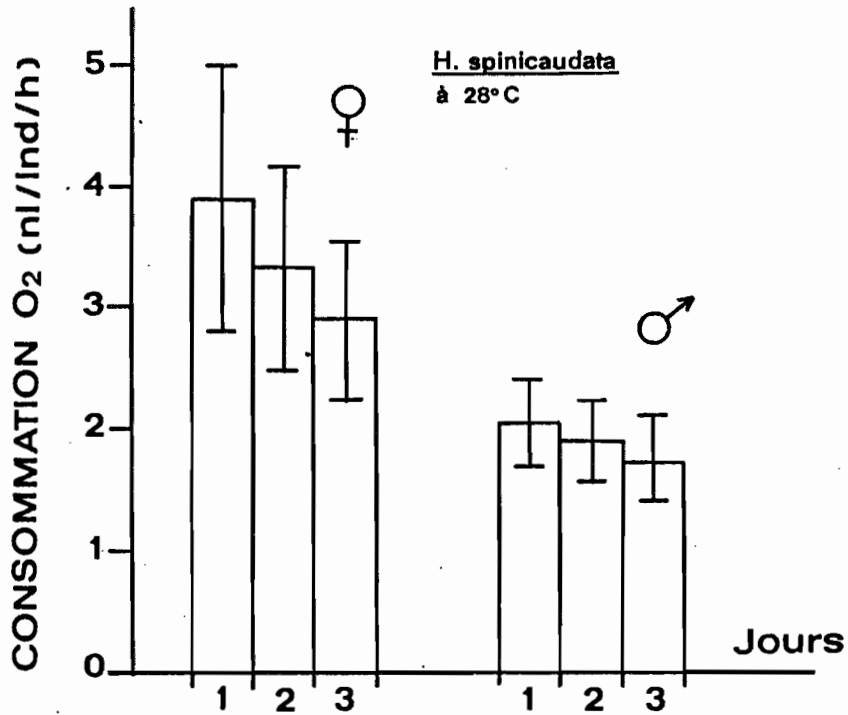


Fig. 90. - Intensité respiratoire des adultes d'*Hirschmanniella spinicaudata* au cours d'une mesure continue de 3 jours (Pour chaque jour, la ligne verticale égale l'intervalle de confiance à 5 % de risque).

étaient faites à 28°, commencées deux heures après l'introduction des animaux dans le ludion, et la seconde mesure de la pression d'équilibre des ludions avait lieu six heures après la première.

Les résultats de cette première expérience sont présentés dans la figure 89. L'intensité respiratoire initiale est beaucoup plus élevée chez les femelles que chez les mâles (5,3 nl/ind/h chez les femelles et 2,1 nl/ind/h chez les mâles). Au terme des trois premières semaines de jeûne, l'intensité respiratoire a subi une décroissance brutale chez les deux sexes : sa valeur n'est plus en effet que de 1,4 nl/ind/h chez les femelles (baisse de 73 %) et de 0,5 nl/ind/h chez les mâles (baisse de 76 %). Par la suite, l'intensité respiratoire enregistrait une faible diminution chez les femelles (0,7 nl/ind/h à la date de douze semaines), tandis qu'elle restait subconstante chez les mâles.

Au cours de la seconde expérience, les conditions étaient quelque peu différentes : on chargeait vingt ludions, dix avec chacun une femelle et dix avec chacun un mâle. Puis, la première mesure de la pression d'équilibre étant réalisée deux heures après, on mesurait la respiration après un, deux et trois jours, sans sortir les ludions de l'appareil. Les résultats (fig. 90) se comparent très favorablement aux résultats de l'expérience précédente. Tout d'abord, l'intensité respiratoire initiale est plus élevée chez les femelles que chez les mâles ; on note qu'il en est de même pour la variabilité. Par ailleurs l'intensité respiratoire décroît avec le temps, avec un taux moyen plus élevé, d'ailleurs, que dans la première expérience.

3.4.4. DISCUSSION

3.4.4.1. Critique de la méthodologie

La mise en oeuvre du ludion

Le remplissage du ludion : Notre ludion et ceux de Zeuthen (1950) et de Nigon et Fourche (1958) n'utilisent que deux solutions : le milieu de suspension de l'animal et le milieu de flottaison du ludion. Ces deux

solutions se retrouvent également dans le ludion standard (Holter et Zeuthen, 1966), mais deux autres viennent alors s'y ajouter : l'alcali absorbant et l'huile. L'introduction de ces quatre solutions dans le ludion standard nécessite un appareil spécial (Boell, 1960) d'une manipulation délicate. Du ludion standard aux trois ludions simplifiés, les modifications ont été d'inclure l'alcali absorbant dans le liquide de flottaison et de supprimer l'huile. La simplification des accessoires a suivi celle du ludion : l'appareil spécial est remplacé par des pipettes de fabrication facile (fig. 67 A et 69).

L'appareil de mesures : Par rapport à l'appareil de mesures classiques (Glick, 1961 ; Holter et Zeuthen, 1966) notre appareil comporte quatre modifications qui simplifient la manipulation. La première modification a été introduite et discutée par Nigon et Fourche (1958) : il s'agit du manomètre monobranche. Deux autres modifications ont été apportées par Fourche (Communication personnelle) : la calorifugation de l'aquarium et la régulation thermique par Unitherm. La calorifugation diminue et régularise la déperdition thermique de la masse d'eau. La sollicitation du chauffage est alors faible et régulière : il n'y a pas de microvariation cyclique de la température pouvant influencer la pression d'équilibre des ludions. La dernière modification est propre à notre appareil : le banc d'optique. Elle assure la reproductibilité de la position du viseur par rapport à un ludion donné d'une mesure à l'autre.

Le comportement du ludion au cours des mesures à blanc

La diffusion de l'air : Linderstrom-Lang et Holter (1942) ont montré que la bulle d'air d'un ludion perd par diffusion une quantité d'air proportionnelle au rapport de la section de diffusion à la longueur de diffusion. Cette perte provoque une dérive négative du ludion. La valeur de ce rapport pour le ludion de Nigon et Fourche (1958) est telle que cette dérive n'est pas sensible, mais dans ce cas le diamètre du ludion est de 0,5 mm et l'expérience ne dure qu'une heure. Le calcul prévoit et l'expérience prouve que la dérive devient importante pour un diamètre de 1 mm et des durées de 24 heures. En fait, le ludion simple est pratiquement limité à un diamètre de 0,5 mm. Dans le ludion de Zeuthen (1950) et notre ludion la section de diffusion est distincte de la

section d'introduction de l'animal. Pour un ludion d'une diamètre de 1 mm, la section de diffusion est réduite à une étroite couronne circulaire équivalente à la section de diffusion d'un ludion simple de 0,25 mm de diamètre. Notons que la solution la plus radicale à ce problème de la diffusion de l'air du ludion a été apporté par Rocher (1943) : elle consiste à fermer le ludion par une goutte de mercure. Cependant à cause de la densité du mercure, la masse du bouchon ainsi mis en place demande à être compensée par des volumes gazeux importants, ce qui réduit d'autant la sensibilité.

La dérive : Nos ludions sélectionnés donnent des mesures à blanc satisfaisantes : la dérive négative observée est inférieure à 0,04 mm d'éthanol par heure. Cette dérive est en fait la résultante de deux dérives opposées : l'une négative, l'autre positive. L'origine de la dérive négative vient d'être discutée : il s'agit de la diffusion de l'air. La dérive positive est due à l'allègement du ludion par dissolution du pyrex qui le constitue dans le milieu de flottaison. Cette dérive est proportionnelle à la surface de contact entre le ludion et le liquide de flottaison.

Les paramètres de construction de nos modèles de 10 ul sont tels que ces dérivées se compensent à peu près pour des durées de manipulation allant jusqu'à 24 heures. Au-delà de cette durée la dérive due à la diffusion devient très faible parce que le liquide du tube de flottaison se sature en air à la pression de repos du ludion. Dès lors, la dérive due à la dissolution l'emporte (point à 48 heures de la figure 75). Pour continuer à tirer parti de la compensation des deux dérives au-delà de 24 heures, il serait nécessaire de modifier la technique en empêchant cette solubilisation de l'air dans le liquide du flacon de flottaison.

La compensation des deux dérives n'est réalisée que pour certaines valeurs particulières des paramètres de construction du ludion. Les valeurs de ces paramètres ont été données pour un volume de 10 ul. Pour d'autres volumes on recherchera cette compensation en modifiant la longueur du bouchon qui est aussi la longueur de diffusion.

Au cours de sa durée de vie (dix manipulations de 24 heures) un ludion de 10 ul perd environ 0,3 % de sa masse par dissolution dans le liquide de flottaison. Il n'y a donc pas lieu de corriger sa masse au cours de son utilisation.

Les contraintes physiologiques liées aux méthodes

Trois phénomènes observés au cours de ces mesures semblent pouvoir être attribués à des contraintes liées à la méthode. Il s'agit de l'immobilisation réversible des juvéniles, de la diminution de leur consommation d'oxygène au cours de la mesure et de l'effet de groupe sur leur consommation d'oxygène.

L'immobilisation réversible des juvéniles : Rohde (1960) observe un ralentissement de l'activité des nématodes placés dans un ludion dont le col est garni de potasse. Ce phénomène paraît semblable à celui qui est observé avec des juvéniles d'Heterodera oryzae, mais dans ce dernier cas, il est plus marqué puisqu'il conduit à l'immobilisation. Celle-ci se produit avec des juvéniles non stérilisés, il ne s'agit donc pas d'une conséquence du traitement aux antibiotiques.

Il est possible de simuler, dans une boîte de Petri fermée hermétiquement par de la paraffine, les conditions qui existent dans le ludion au cours d'une mesure. Pour cela, avant la fermeture de cette boîte, on y dépose deux verres de syracuse dont l'un contient des juvéniles d'Heterodera oryzae dans du tampon et l'autre contient de la soude décinormale qui capte le gaz carbonique. Dans ces conditions, nous avons constaté que l'immobilisation des juvéniles se produit dans les mêmes délais que ceux observés dans le ludion.

Comme dans ce cas, le volume d'air est très important (50 cm^3) en regard de celui du ludion (10 ul), l'immobilisation ne peut pas être due à une baisse de la pression partielle d'oxygène consécutive à la respiration des juvéniles.

De la même façon, le volume de tampon étant très important (5 cm^3) en regard de celui du ludion (1,5 ul), l'immobilisation ne peut

être due à une autointoxication provoquée par d'éventuels produits d'excrétion des juvéniles.

Nous sommes conduits à admettre que l'immobilisation est provoquée par l'absence de gaz carbonique ambiant, consécutive à l'action de la soude. Une certaine tension de gaz carbonique serait donc indispensable à l'activité spontanée de certains nématodes phytoparasites. ceci est à rapprocher de la stimulation que le gaz carbonique exerce sur l'intensité respiratoire chez certains nématodes (Rohde, 1960).

La diminution de la consommation d'oxygène : La diminution de la consommation d'oxygène au cours des mesures respirométriques est un phénomène déjà rapporté chez les nématodes phytoparasites : Rohde (1960), Sembdner et al., (1961). Dans notre cas cette diminution présente deux caractéristiques : d'une part sa valeur est irrégulière (de 5 à 20 %) et d'autre part elle n'est jamais nulle (au moins 5 %). Ceci permet de penser que cette diminution est due à deux groupes de contraintes : l'un permanent, d'effet faible et constant, l'autre accidentel, d'effet plus important et variable.

Les contraintes permanentes susceptibles de diminuer la consommation d'oxygène sont nombreuses. On peut les citer à titre d'hypothèses, mais le rôle effectif de chacune d'entre elles ne pourrait être établi qu'à l'aide d'expériences complémentaires. Il y a tout d'abord le vieillissement des animaux au cours de la mesure. Les juvéniles de certains nématodes phytoparasites voient leur consommation d'oxygène diminuer progressivement avec le temps (Van Gundy et al., 1967 ; Bhatt et Rohde, 1970). Il y a ensuite à considérer la baisse de la pression partielle d'oxygène dans le ludion, due à la consommation des animaux. Chez certains nématodes la consommation d'oxygène baisse avec la pression partielle du même gaz (Bair, 1955). Il y a enfin dans notre cas particulier, l'immobilisation des animaux au cours de la mesure. On pouvait en effet penser qu'une certaine partie de la consommation d'oxygène correspond aux mouvements et cesse lors de l'immobilisation. A cette dernière hypothèse s'oppose le fait que la diminution se poursuit bien après que le dernier juvénile se soit immobilisé. Une dernière

possibilité suppose l'excrétion par les juvéniles d'une substance qui inhiberait leur respiration. Dans ce dernier cas, la concentration et l'effet de la substance augmenteraient progressivement au cours de la mesure.

Les contraintes accidentelles se produisent au cours des manipulations des animaux qui précèdent la mesure elle-même. Il s'agit alors d'un changement rapide et important de température ou de pression partielle d'oxygène. Wilson (1965b) et Barrett (1969) ont montré que dans ce cas se produit une hyperconsommation suivie d'un long retour progressif vers une consommation normale. La diminution de la consommation observée au cours de nos mesures correspondrait à ce retour vers une consommation plus faible.

L'effet de groupe sur la consommation d'oxygène : L'effet de groupe observé est quantitativement faible et l'erreur introduite par un effectif faible (68 au lieu de 80), de l'ordre de 10^{-2} , peut être négligée. Il se pose néanmoins la question de l'origine de cet effet de groupe. Deux hypothèses, d'ailleurs compatibles peuvent être émises à ce sujet. Nous avons déjà mentionné la première des hypothèses : l'excrétion par les juvéniles d'une substance inhibant leur respiration. Dans ce cas, la concentration et l'effet de la substance augmenteraient progressivement avec le nombre de juvéniles présents dans le ludion.

L'autre hypothèse suppose une insuffisance de l'approvisionnement en oxygène des animaux. Les nématodes dans le ludion (voir fig. 76) sont alimentés en oxygène par diffusion à travers le tampon qui les sépare de la bulle d'air. Linderstrom-Lang (1943) a montré que dans ces conditions un équilibre s'établit et présente les caractéristiques suivantes. Tout d'abord la pression partielle d'oxygène existant au contact des animaux est inférieure à la pression partielle d'oxygène de la bulle d'air du ludion. Ensuite cet écart des pressions partielles est d'autant plus important que les animaux sont plus nombreux. Or nous avons déjà mentionné que la consommation d'oxygène de certains nématodes baisse progressivement lors d'une diminution de la pression partielle du même gaz (Bair, 1955). Dans ce cas, dans un ludion plus l'effectif est important, plus la pression partielle d'oxygène serait faible et plus la consommation d'oxygène serait faible.

La précision des résultats

L'efficacité de la stérilisation superficielle des juvéniles est à l'origine d'une réduction déjà notable de la variabilité des mesures. En effet des mesures effectuées avec des juvéniles non stérilisés donnent des chiffres plus élevés et beaucoup plus variables. Dans ce cas, la valeur supérieure de la consommation peut être attribuée à la présence de microorganismes consommant de l'oxygène. La variabilité importante des résultats viendrait de la contamination quantitativement variable des lots de juvéniles.

La variabilité des résultats peut être caractérisée par le coefficient de variation relative égal au quotient de l'écart type par la moyenne. Ce coefficient est de l'ordre de 5 % pour la consommation d'oxygène rapportée par juvénile. Ce chiffre est faible et la précision ainsi obtenue est acceptable pour des mesures courantes. Il n'est cependant pas inutile de rechercher les origines possibles de cette variabilité afin de déterminer si la méthode est perfectible en ce qui concerne la précision.

La première source de variabilité est d'origine biologique. Elle tient d'une part à la variabilité de la taille individuelle des animaux et d'autre part à la variabilité de leur âge moyen.

Pour exprimer la consommation d'oxygène des nématodes, il est courant de rapporter les chiffres au poids frais (Rohde, 1960). Pour cela, on détermine par la méthode d'Andrassy (1956), le volume du nématode et on le multiplie par une masse volumique fixe. Ce faisant, on admet que la consommation d'oxygène de l'unité de volume du nématode est constante. La variabilité individuelle de la consommation d'oxygène tire alors son origine de la variabilité individuelle du volume des nématodes. Le tableau 24 donne les volumes minimum et maximum des juvéniles d'Heterodera oryzae calculés à partir des données de Luc à Berdon (1961) par la méthode d'Andrassy (1956). On admet que le volume suit une loi normale et que les deux valeurs calculées bornent 95 % des valeurs. L'écart entre les deux valeurs calculées est donc égal à quatre fois

l'écart type. Dans ces conditions le volume moyen est de $86\,569\ \mu\text{m}^3$ et l'écart type est de $13\,417\ \mu\text{m}^3$. Le coefficient de variation relative est alors de 15 %.

D'après les observations faites précédemment (fig. 77) on peut estimer que la consommation d'oxygène des juvéniles d'Heterodera oryzae baisse au maximum de 5 % par 24 heures. Du fait de l'étalement des éclosions sur trois jours, l'âge moyen des juvéniles est connu à + 36 heures. Le coefficient de variation relative dû à ce facteur est donc de 15 %.

Le coefficient de variabilité total de la population est égal à la somme des deux précédents soit 30 %. Lorsqu'on mesure la consommation d'oxygène sur des échantillons de 80 juvéniles pris dans cette population, le coefficient de variation relative des résultats est égal à $30\% / \sqrt{80}$ soit 3,3 %.

TABLEAU 24. Variabilité du volume des juvéniles d'Heterodera oryzae (Données de Luc et Berdon, 1961 ; formule d'Andrassy, 1956)

Paramètre	Symbole	Valeur minimale	Valeur moyenne	Valeur maximale
Longueur	L μm	373	440	507
Largeur	l μm	16,5	17,7	19,5
Volume	$\frac{L\ l^2}{1,7} \mu\text{m}^3$	59.735	81.086	113.404

La seconde source de variabilité est d'origine instrumentale. Les erreurs portent sur les facteurs de la relation permettant le calcul de la consommation d'oxygène (voir 3.4.2.5.). L'erreur sur k' est en fait celle faite sur la détermination de la masse du ludion, sa valeur est de $+ 0,05/18,17 = 0,3 \cdot 10^{-2}$. L'erreur sur N est nulle. L'erreur sur $t_2 - t_1$ est de $+ 15$ secondes sur 20 heures soit $0,02 \cdot 10^{-2}$. D'après Nigon et Fourche (1958) l'erreur standard dans la mesure d'une différence de pression est de 0,6 mm pour le manomètre monobranche à alcool. L'erreur relative sur $H_1 - H_2$ serait alors de $0,6/120$ soit $0,5 \cdot 10^{-2}$. Au total l'erreur relative d'origine instrumentale serait de $0,8 \cdot 10^{-2}$.

Le total des erreurs estimées $3,3 \cdot 10^{-2}$ et $0,8 \cdot 10^{-2}$ soit $4,1 \cdot 10^{-2}$ est de l'ordre du coefficient de variabilité relative observé $4,3 \cdot 10^{-2}$. Il y aurait donc trois sources principales d'erreurs : l'éventail d'âge des juvéniles, la variabilité de la taille individuelle des juvéniles et l'erreur sur la lecture des pressions d'équilibre.

L'éventail d'âge des juvéniles peut être réduit en recueillant les juvéniles sur des intervalles d'éclosion plus courts : 24 heures ou moins. On peut essayer de réduire en partie la variabilité de la taille individuelle des juvéniles par l'emploi de juvéniles issus de lignées généalogiques (Netscher et Pernès, 1971). Enfin l'augmentation du nombre de juvéniles dans le ludion réduit à la fois l'effet de variabilité biologique et l'erreur relative sur la mesure de la variation de pression d'équilibre.

L'effet de l'augmentation du nombre de juvéniles dans le ludion sur la dispersion des résultats est sensible sur le graphique de la figure 78.

3.4.4.2. Influence du milieu sur l'intensité du métabolisme

Le milieu

Le biotope des formes infestantes des nématodes phytoparasites en l'absence de plante hôte est constitué par la solution de sol. Dans les sols saturés cette solution remplit complètement les pores du sol, tandis que dans un sol réessuyé, cette solution tapisse sous forme d'un film, retenu par la tension superficielle, les particules de sol. Compte tenu des apports et des retraits qui résultent soit des phénomènes naturels soit de l'intervention humaine, les propriétés physiques et chimiques de ce milieu sont susceptibles de subir des variations importantes. On peut établir, comme base de comparaison, le cas idéal des conditions standards : pressions partielles gazeuses équivalentes à celles de l'air (21 % O_2 ; 0,03 % CO_2), température de 28°, pression osmotique nulle, pH neutre et absence de produits organiques et minéraux solubles. Cet état idéal pourrait se manifester dans un sol réessuyé, mais en présence des racines d'une plante, des organismes vivants dans le sol, d'un apport d'eau d'irrigation certains paramètres évolueraient rapidement. Sous l'effet de la respiration des organismes vivants et des racines, la pression partielle de gaz carbonique augmenterait tandis que celle de l'oxygène diminuerait ; ce dernier paramètre d'ailleurs pourrait s'annuler dans le cas d'un apport d'eau suffisant pour saturer le sol. Sous l'effet d'un apport d'engrais ou d'un relargage à partir du complexe absorbant du sol, la solution peut s'enrichir en sels minéraux, de même que l'exsudation des racines peut l'enrichir en matières organiques, l'ensemble de ces apports augmentant la pression osmotique. A l'inverse l'absorption des sels minéraux par les racines ou la consommation des substances organiques par les protistes peuvent diminuer la pression osmotique. Des considérations identiques peuvent être émises à propos du pH et de la température, encore que dans ce dernier cas la masse calorifique du sol humide est telle que les amplitudes des variations thermiques nycthérales du sol sont considérablement atténuées par rapport à celles de l'air qui est au dessus.

L'effet de l'urée sur l'intensité respiratoire a déjà été rapporté chez des espèces différentes de nématodes par Wallace et Greet (1964) et Bhatt et Rohde (1970). On peut donc le considérer comme caractéristique. La valeur optimale de la pression osmotique est de 2 atm. chez Heterodera oryzae (fig. 80), ce qui est très proche de la valeur de 2,24 atm. qui a été relevée chez Anguina tritici et Ditylenchus dipsaci (Bhatt & Rohde, 1970) et chez Tylenchorhynchus icarus (Wallace & Greet, 1964). La faible dépression de l'intensité respiratoire que provoque le tampon phosphate chez Heterodera oryzae a déjà été observé avec d'autres substances minérales chez de nombreuses espèces de nématodes libres, zoo ou phytoparasites (Barrett, 1969b ; Bhatt & Rohde, 1970 ; von Brand, 1942 ; Fernando, 1963 ; Schwabe, 1957).

Si les deux solutés, urée ou phosphate, n'agissaient que selon leurs propriétés osmotiques, la différence de leurs effets serait difficile à expliquer. Mais des résultats d'expériences, portant sur les effets de contraintes osmotiques, poursuivies par Viglierchio et al., (1969) et Myers (1966), suggèrent fortement que certains solutés ne sont pas des agents osmotiques parfaits, mais au contraire pénètrent dans le corps des nématodes.

Dans le cas des agents osmotiques parfaits, la solution externe hypertonique sollicite le départ d'eau des cellules de l'animal. La perméabilité des nématodes à l'eau a été prouvée par l'usage d'eau tritiée (Marcks et al., 1968) et par des changements de volume du corps liés à des variations de la tonicité du milieu (Stephenson, 1942 ; Myers, 1966 ; Viglierchio et al., 1969). Ces mouvements d'eau sont attribués à un processus actif d'osmorégulation, impliquant une certaine dépense d'énergie (Stephenson, 1942 ; von Brand, 1960b). Afin d'assurer l'homéostasie, ce mécanisme actif s'opposerait au départ d'eau sollicité par la solution externe hypertonique. La dépense d'énergie et par conséquent l'intensité respiratoire seraient d'autant plus élevées que la pression osmotique du milieu serait plus forte. Au delà d'un certain seuil, ce mécanisme actif de rétention d'eau ne serait plus assez efficace et la perte d'eau cellulaire qui en résulterait déprimerait le métabolisme, d'où une baisse de l'intensité respiratoire. Ce schéma pourrait correspondre à l'action de l'urée (fig. 80).

Dans le cas des agents osmotiques imparfaits, un ou plusieurs des constituants du soluté pénétreraient directement dans le milieu cellulaire créant un déséquilibre qui déprimerait le métabolisme. Ce second schéma pourrait correspondre à l'action du tampon phosphate.

L'étendue du domaine des pH testés au cours de ces expériences excède les limites qui sont habituellement rencontrées dans les sols de rizière (Angladette, 1966). D'une façon générale le pH des sols cultivés varie peu, même en présence de matière organique en décomposition (Bell, 1969). Ainsi, au vu de la faible variation observée (fig. 81), on peut estimer que le pH n'exerce qu'une contrainte mineure sur le métabolisme des juvéniles d'Heterodera oryzae. Des résultats semblables ont été obtenus avec les juvéniles d'espèces libres et zooparasites (Cooman, 1950 ; Barret, 1969b ; Schwabe, 1957 ; von Brand, 1943).

Nous avons signalé (voir 3.2.3.) que l'éventualité d'une consommation de substrats solubles exogènes pouvait être importante à considérer dans le cas des nématodes. Les résultats exposés dans ce chapitre ont montré que la longévité des nématodes est étroitement liée à leurs réserves énergétiques. Dans les sols de rizière les racines du riz exsudent des glucides simples (Mac Rae & Castro, 1966 ; Boureau, 1977), l'absorption et la consommation de ces substances par les nématodes présents dans ces sols pourrait accroître la longévité de ces animaux. Un des moyens préconisés pour vérifier cette hypothèse est d'étudier l'influence de ces substances sur l'intensité respiratoire : une action stimulante prouverait la consommation. Chez les juvéniles d'Heterodera oryzae, aucune stimulation n'est observée : Bhatt and Rohde (1970), Barrett (1969a), Stannard et al., (1938) et Fernando (1963) ont obtenu un résultat analogue chez différentes espèces. Par contre Sembdner et al., (1961) ont noté une stimulation chez les juvéniles de Globodera rostochiensis. Compte tenu d'une absence notable de précautions à l'encontre d'éventuelles contaminations bactériennes, ce dernier travail demande à être confirmé. Au vu de l'ensemble de ces données négatives, il semblerait que cette vérification respirométrique n'est pas très adaptée. Un autre moyen consiste à évaluer un gain éventuel de longévité en

présence de glucides dans le milieu. J'ai tenté plusieurs fois ce genre d'expériences, mais, la présence d'un glucide dans le milieu favorise le développement de contaminants, qu'il est impossible d'éviter au cours d'expériences qui durent plus d'une semaine. Je n'ai pas eu l'occasion d'essayer le troisième moyen : l'emploi de glucides marqués par le carbone radioactif.

Par contre la dépression de l'intensité respiratoire et surtout la réduction de sa variabilité par le tampon citrate phosphate constituent un résultat très intéressant. Cette propriété du citrate a été déjà trouvée par Karpiac et al., (1965), chez Trichinella spiralis. Comme dans les résultats concernant la pression osmotique une hypothèse explicative immédiate est à retenir : une action directe, les deux substrats citrate et phosphate pénétreraient dans les cellules et satureraient une voie métabolique.

Cependant en plus de ces hypothèses reposant sur l'action directe des solutés au niveau cellulaire (fuite de l'eau, entrée d'ions ou de substances), on ne peut écarter l'éventualité d'une action indirecte par le biais des récepteurs chimiques présumés (amphides, phasmes). L'action sur le métabolisme cellulaire serait alors d'origine nerveuse. Dans le cas de ces nématodes de petite taille, on paraît assez mal armé pour imaginer des interventions sur ces récepteurs destinés à tester cette hypothèse.

Influence du milieu gazeux

Vis à vis des tensions d'oxygène, l'intensité respiratoire des nématodes se classe en deux catégories : dépendante ou indépendante (Von Brand, 1960b). Chez les juvéniles d'Heterodera oryzae, il existe manifestement une relation de dépendance. Chez des nématodes zooparasites, qui présentaient vis à vis de l'oxygène une relation analogue, Rogers (1949) a pu approfondir, par le biais d'une transformation mathématique des résultats bruts, l'étude de cette propriété. Dans la figure 83 on porte le rapport, tension d'oxygène / IR, en fonction de la tension d'oxygène : les points transformés sont alignés. En désignant par (O_2) la tension d'oxygène, la relation

rendant compte de cette propriété de linéarité s'écrit : $IR = (O_2) / K_1 + K_2 (O_2)$. Cette relation peut être interprétée comme caractéristique d'une réaction entre l'oxygène et une enzyme. Les valeurs de K_1 et K_2 déterminées pour Heterodera oryzae par l'ordonnée de l'intersection ($K_1 = 9,5$) et par la pente de la droite ($K_2 = 0,44$) sont très semblables aux valeurs trouvées par Rogers (1949) chez diverses espèces de nématodes.

L'IR temporairement accrue que l'on observe chez les juvéniles d'Heterodera oryzae après anaérobiose (fig. 84) constitue un résultat typique chez les nématodes (von Brand, 1960a ; Barrett, 1969b ; von Brand, 1943). Cette augmentation est souvent appelée paiement de la dette d'oxygène et on l'interprète comme étant due à l'oxydation métabolique rapide des produits de fermentation accumulés au cours de l'anaérobiose (von Brand, 1960a). Le taux de cette compensation peut être calculé sur la figure 84 par des mesures de surface. Rappelons que sur cette figure, dont les ordonnées sont proportionnelles à des intensités respiratoires, et les abscisses au temps, toute mesure de surface correspond à des volumes d'oxygène. On définit sur cette figure les intersections, repérées chacune par une lettre (de A à N). Les résultats des mesures sont donnés dans le tableau 23. La surconsommation postanaérobique compense 0,72 et 0,42 de la dette d'oxygène après respectivement 12 et 24 heures d'anaérobiose. L'immobilité observée au cours de l'anaérobiose est généralement attribuée à la toxicité des produits de fermentation (von Brand, 1960a). Comme cet état d'anaérobiose s'est révélé en fait peu toxique chez Heterodera oryzae, il semblerait plus juste de l'interpréter comme la preuve du caractère indispensable de la présence d'oxygène pour l'activité des juvéniles.

Influence de la température

Les résultats concernant l'influence de la température sur l'IR peuvent être interprétés de deux façons d'ailleurs complémentaires.

L'interprétation la plus évidente considère que les juvéniles subissent passivement les changements de température. Un niveau de métabolisme constant existerait pour chaque température, même si un

certain délai est nécessaire pour l'atteindre après le changement de température. Dans ces conditions la décroissance de l'IR à 32° et 36° pourrait s'expliquer par un effet de vieillissement (van Gundy et al., 1967). La relation véritable entre IR et température s'exprimerait plusieurs heures après le transfert. Le niveau métabolique correspondant à la température considérée serait atteint mais les effets du vieillissement ne seraient pas encore sensibles. Cet instant privilégié interviendrait sept heures après le transfert.

La seconde interprétation, qui paraît plus probable, considère qu'Heterodera oryzae est capable de réagir contre l'effet primaire de la température. L'aptitude des animaux poikilothermes à compenser les effets des variations brusques de température a fait l'objet d'une revue par Bullock (1955). Dans ces conditions la croissance puis la décroissance de l'IR à 32° et 36° représenterait cette phase de réaction. La relation véritable entre IR et température s'exprimerait quinze heures après le transfert lorsque les réactions des animaux sont apaisées.

Les relations entre l'IR et la température à ces deux dates de sept heures et quinze heures sont linéaires (fig. 86). Le Q_{10} mesuré est de 1,63 à 7 heures et de 1,49 à quinze heures. Des résultats très voisins (linéarité de la relation, valeur du Q_{10}) ont été obtenus chez Panagrellus redivivus (Santmyer, 1956) et Anguina tritici (Bhatt & Rohde, 1970).

3.4.4.3. Influence du jeûne sur l'intensité du métabolisme

Lorsque l'on entreprend de caractériser l'évolution de l'intensité respiratoire au cours du jeûne chez un nématode, l'ensemble des résultats rassemblés au cours de ce chapitre montre qu'il y a lieu de distinguer l'évolution à court terme (période de l'ordre de la journée) de l'évolution à long terme (période de l'ordre de la semaine).

L'origine de l'évolution à court terme a déjà été envisagée au cours de la critique de la méthodologie employée. Il s'agit de variations accidentelles des paramètres physiques et chimiques de

l'environnement des nématodes au cours des manipulations qui précèdent la mesure. Nous avons vu en effet qu'un changement de température, ou un retour en milieu aéré après une anaérobiose, étaient susceptibles de faire varier l'intensité respiratoire sur une durée de plusieurs heures (fig. 84 et 85). Or ce sont précisément des altérations de milieu de ce type auxquels sont soumis les nématodes au cours des manipulations. On peut penser qu'en opérant dans des conditions identiques à chaque date, cet effet accidentel sera constant et ne masquera pas l'évolution à long terme. Cependant l'existence de paliers dans la courbe obtenue pour Heterodera oryzae (fig. 87) montre que cette espèce est sans doute plus sensible à ce genre de perturbation que les deux autres espèces, Meloidogyne javanica et Hirschmanniella spinicaudata (fig. 88 et 89).

Les variations à long terme de l'intensité respiratoire que nous avons obtenues avec les trois espèces (fig. 87, 88 et 89) constituent un résultat marquant. Elles confirment tout d'abord cette tendance à la variation obtenue lors de travaux antérieures (Santmyer, 1956 ; Rohde, 1960 ; Sembdner et al., 1961 ; Van Gundy, Bird & Wallace, 1967 ; Bhatt & Rohde, 1970) contre ceux qui ne l'ont pas observée (Nielsen, 1949 ; Wallace & Greet, 1964) et ceci pour trois nouvelles espèces. Quelques éléments permettent de préciser quels sont les facteurs qui permettraient de mieux mettre en évidence cette tendance. Il y a tout d'abord le système de référence de l'expérience : poids sec ou individu. Les figures 91 et 92 montrent l'évolution des intensités respiratoires chez Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica en fonction des deux systèmes. C'est sur la base de l'individu que l'amplitude de la décroissance est la plus grande. Il y a ensuite le problème du délai entre l'arrêt de la nutrition des animaux et le moment du début de la mesure. Dans notre cas la mesure commence peu de temps après l'éclosion (36 heures pour Heterodera oryzae, 48 heures pour Meloidogyne javanica) ou la rupture du contact alimentaire avec la racine (trois jours pour Hirschmanniella spinicaudata). Chez les animaux utilisés par Wallace et Greet (1964), cette période est indéterminée, dans la mesure où les animaux sont prélevés dans le sol et non pas sur la racine. Si chez, Hirschmanniella spinicaudata, les animaux avaient été prélevés deux à trois semaines après la rupture du contact alimentaire on aurait pu également conclure au maintien de l'intensité respiratoire au cours du jeûne (voir fig 89).

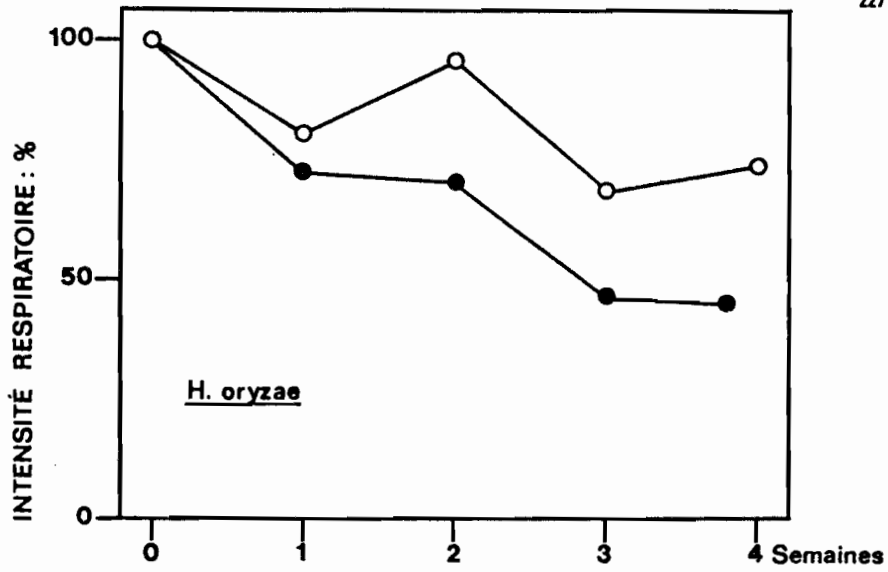


Fig. 91. - Effet de la durée du jeûne sur les variations relatives de l'intensité respiratoire des juvéniles d'*Heterodera oryzae*, rapportées au poids sec (○) et rapportées à l'individu (●). Calculé à partir des résultats de la fig. 87 et du tableau 16.

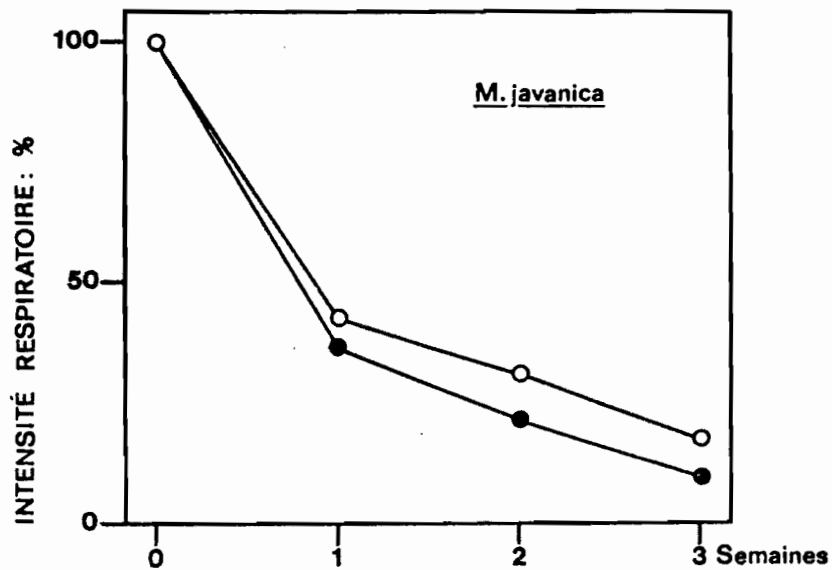


Fig. 92. - Effet de la durée du jeûne sur les variations relatives de l'intensité respiratoire des juvéniles de *Meloidogyne javanica*, rapportées au poids sec (○) et rapportées à l'individu (●). Calculé à partir des résultats des fig. 53 et 88.

Il reste maintenant à rechercher l'origine de cette diminution de l'intensité respiratoire au cours du jeûne. Dans la mesure où il n'est pas possible de distinguer les effets du jeûne de ceux du vieillissement, il conviendra que l'explication proposée tienne compte des deux phénomènes.

La première hypothèse met en cause l'altération des composants respiratoires cellulaires (mitochondries, enzymes respiratoires) sous l'effet du vieillissement. Sur des échelles de temps aussi courtes que les quelques semaines qu'ont duré nos expériences, Rothstein (1975) et Van Gundy et al., (1967) ont en effet pu mettre en évidence la diminution de l'activité de certains enzymes du métabolisme énergétique. Cependant le caractère irréversible que l'on prête généralement aux altérations apportées par le vieillissement s'accorderait mal avec la reprise de développement observée lorsque les animaux âgés sont replacés ultérieurement en contact avec la plante hôte (fig. 43).

La seconde hypothèse implique les effets du jeûne à deux niveaux. Tout d'abord les lipides constituent le substrat le plus consommé par ces animaux au cours du jeûne. Or ces lipides au niveau cellulaire se présentent sous forme de globules sphériques. Lors de la consommation de ces globules, leur surface de contact avec le milieu cellulaire diminue et on peut considérer que le matériel nécessaire à l'exploitation de ce globule ait besoin d'une certaine surface pour son activité. La vitesse de consommation des lipides serait ainsi progressivement freinée. Ceci s'accorderait fort bien avec l'allure asymptotique observée dans les différentes courbes de consommation des lipides (voir fig. 48, 52, 56 et 64). Ensuite, il faut considérer que la disparition des substances de réserve au cours du jeûne provoque une dilution du milieu cellulaire. En effet, le volume global des animaux ne change pas, ce qui a été montré par Davide (1980) chez Meloidogyne javanica alors qu'une part substantielle de réserves disparaît et est donc compensée en volume par de l'eau. On peut penser que cette dilution diminue l'intensité du métabolisme comme cela a été observé chez certains insectes (Baùd et al.; 1965).

3.4.4.4. Relations entre la consommation d'oxygène et la consommation des réserves

Heterodera oryzae

On peut tenter d'établir une relation quantitative entre la perte du poids sec et l'oxygène à partir des chiffres du tableau 16 et de la figure 87. Sur cette figure on calcule la somme des surfaces des quatre trapèzes rectangles consécutifs, délimités par l'axe des ordonnées, les segments joignant les points expérimentaux et les verticales joignant ces même points. Les unités employées étant des pl/heure en ordonnée et le temps, en heures, pour les abscisses le résultat s'exprime en pl d'oxygène. On constate que, du temps zéro au temps quatre semaines, chaque juvénile d'Heterodera oryzae consomme 25 600 pl d'oxygène, tandis que sa perte de poids sec est de 12,5 ng. Ceci équivaut à une consommation spécifique de 2 047 ml d'oxygène par gramme de poids sec, valeur très proche des 2 019 ml d'oxygène consommés théoriquement par le métabolisme de un gramme de lipides purs (Polonowski et al., 1966).

Meloidogyne javanica

Chez Meloidogyne javanica, l'intégration de la courbe d'évolution de l'intensité respiratoire (fig. 88) par la méthode indiquée pour l'espèce précédente révèle qu'au cours des trois semaines chaque juvénile consomme 23 100 pl. Les quantités d'oxygène nécessaires au métabolisme des lipides glucides et protides ont été mesurées précédemment lors de l'étude de l'évolution de la demande chimique d'oxygène (fig. 60). Au cours des trois semaines, ce paramètre la DCO, diminue de 23,2 nl. L'accord entre les deux chiffres est donc satisfaisant.

Hirschmanniella spinicaudata

Cette corrélation entre consommation d'oxygène et consommation des réserves, qui s'est révélée pleine d'intérêt chez les deux espèces précédentes, ne peut pas être établie a priori avec autant

de rigueur chez Hirschmanniella spinicaudata, puisque la consommation des protides au cours du jeûne chez cette espèce n'a pu être établie. Cependant, la considération des seules données disponibles, concernant les lipides et les glucides, fait apparaître, entre mâles et femelles, une différence significative. Au cours de l'intervalle de temps compris entre la date zéro et la date neuf semaines, on intègre d'une part les courbes d'intensité respiratoire (fig. 89) selon la méthode décrite précédemment, et on calcule d'autre part, à l'aide des coefficients du tableau 20 les quantités d'oxygène nécessaires au métabolisme des lipides (fig. 56) et des glucides (fig. 57). On obtient une bonne correspondance pour les femelles : chaque animal consomme, au cours de cette période, 2 760 nl d'oxygène, tandis que le métabolisme en réclame 2 720 nl. Par contre, pour les mâles, la quantité d'oxygène consommée, 1 250 nl, est plus faible que la quantité théoriquement nécessaire, 1830 nl. Ce déficit, observé chez les mâles, peut être dû soit à un métabolisme incomplet, accompagné de l'excrétion de molécules organiques contenant encore de l'énergie, soit au métabolisme de protéines qui n'ont pas été dosées chez cette espèce. Que ce déficit soit dû à l'une ou l'autre cause, il y aurait là une différence qualitative liée au niveau du métabolisme chez cette espèce. En faveur de la première hypothèse explicative, mettant en cause un métabolisme incomplet, on doit mentionner l'impression, acquise au cours des observations individuelles répétées des mêmes individus au cours de la détermination des courbes de survie, que les mâles vieillissent plus rapidement. En effet, l'éclaircissement du tractus digestif, qui augmente avec la durée du jeûne chez cette espèce comme chez les deux autres, est plus rapide et moins progressif chez les mâles que chez les femelles.

3.5. CONCLUSIONS

3.5.1. Le bilan métabolique

La composition chimique des stades infestants varie au cours de la survie in vitro chez les trois espèces étudiées. On observe la disparition, par ordre d'importance décroissante, des lipides, des glucides et des protides (fig. 48, 49, 50, 52, 56 et 57). on peut admettre d'appeler réserves ces substances qui disparaissent au cours du jeûne avant que n'intervienne la mort de l'animal.

Cependant la disparition de ces réserves ne prouve pas qu'elles quittent le corps de l'animal. On pourrait en effet imaginer que ces réserves sont métabolisées en unités plus petites, de natures chimiques différentes et de ce fait inaccessibles aux méthodes de dosage employées ici. En fait, le reste des mesures effectuées montre que ce n'est pas le cas. D'une part, la différence qui existe entre le poids sec et la somme pondérale des trois espèces chimiques dosées (lipides, glucides, protides) devrait croître si une telle accumulation se produisait, or cette différence reste constante (fig. 51 et fig. 53). D'autre part, ces substances étant oxydables, la demande chimique d'oxygène devrait croître par rapport à celle qui est provoquée par la présence des seuls lipides, glucides et protides ; or la demande chimique d'oxygène mesurée correspond exactement à sa valeur prévue par le calcul (fig. 59 et fig. 60). D'ailleurs, l'accumulation, au niveau cellulaire, d'unités de faible poids moléculaire provoquerait une augmentation de la pression osmotique, incompatible avec un métabolisme normal. On observe ce fractionnement des réserves figurées, avec rétention interne, dans le cas d'une contrainte de dessèchement : l'augmentation de la pression osmotique interne empêche alors la fuite de l'eau (Madin & Crowe, 1975 ; Crowe et al, 1977). Mais dans ces conditions l'apparence (contraction) et le comportement (immobilité) de l'animal sont profondément altérés. Donc ces réserves quittent effectivement le corps de l'animal.

Le fait que les réserves quittent le corps de l'animal ne prouve pas qu'elles aient été métabolisées. En fait, au cours de la discussion, nous avons montré que dans trois cas sur quatre, l'oxygène consommé correspond à l'oxydation complète des réserves disparues. Chez Heterodera oryzae, en quatre semaines, la consommation spécifique d'oxygène par unité de poids sec disparu est très proche de celle des lipides, qui représentent la réserve principale. Chez Meloidogyne javanica, en trois semaines, la consommation d'oxygène correspond à la variation de la demande chimique d'oxygène. Enfin, chez les femelles d'Hirschmanniella spinicaudata, en neuf semaines, la consommation d'oxygène correspond à l'oxydation complète des réserves disparues. Mis à part le cas des mâles d'H. spinicaudata, les stades infestants de ces trois espèces manifestent donc un métabolisme complet, ce qui les

distingue quelque peu d'espèces zooparasites, chez lesquelles ce bilan révèle un catabolisme incomplet, avec excrétion de métabolites intermédiaires notamment d'acides gras volatils (Von Brand, 1966).

3.5.2. La nature des réserves consommées

On constate que les trois sortes de réserves, lipides, glucides et protides, sont consommés au cours du jeûne dans un ordre particulier. Chez les trois espèces, la consommation des lipides commence immédiatement, dès le début du jeûne et est rapide (fig. 48, 52 et 56). Par rapport aux lipides disponibles au début du jeûne, la consommation, en fin d'expérience, représente 71 % chez Heterodera oryzae, 92 % chez Meloidogyne javanica, 88 % chez les femelles et 90 % chez les mâles d'Hirschmanniella spinicaudata. Par contre, les glucides augmentent au cours du premier intervalle de mesure puis restent à un taux constant avant de commencer à décroître en fin d'expérience (fig. 49, 52 et 57). En fin d'expérience, par rapport aux glucides disponibles au début du jeûne, la consommation représente 26 % pour Heterodera oryzae, 70 % chez Meloidogyne javanica, 25 % chez les femelles et 47 % chez les mâles d'Hirschmanniella spinicaudata. Compte tenu de cette utilisation plus rapide et plus importante des lipides et des teneurs initiales plus élevées (le rapport pondéral lipides/glucides est de 2,1 chez Heterodera oryzae, 8,6 chez Meloidogyne javanica, 2,2 chez les femelles et 1,9 chez les mâles d'Hirschmanniella spinicaudata) on doit admettre que les lipides constituent la réserve énergétique principale de ces trois espèces et que les glucides jouent à ce niveau un rôle tout à fait secondaire. Cependant certains indices laissent supposer que les glucides pourraient constituer une étape nécessaire de la dégradation des lipides. En effet, d'une part les teneurs en glucides augmentent au début du jeûne (fig. 49, 52 et 57) or chez au moins deux des trois espèces cette synthèse n'a pu se faire qu'au dépens des lipides (fig. 48 à 51 pour Heterodera oryzae ; fig. 52 et 53 pour Meloidogyne javanica). Par ailleurs, lorsque le métabolisme est fortement diminué par l'osmobiose, la teneur en glucides augmente encore plus au début du jeûne (fig. 54). On peut donc émettre l'hypothèse que les lipides sont transformés au préalable en glucides, avant qu'intervienne une dégradation plus poussée, et que cette voie de transformation n'est pas inhibée par l'état

d'osmobiose. Nous avons vu dans l'étude bibliographique que cette transformation de lipides en glucides est fréquente chez les nématodes des groupes voisins (Passey & Fairbairn, 1957 ; Barret *et al*, 1970 ; Rubin & Trelease, 1975). Il serait maintenant intéressant de déterminer si cette voie est obligatoire : on pourrait dans ce but tenter d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de cette transformation, comme l'acide itaconique (Patel & Mac Fadden, 1978b).

L'utilisation des protéines est certaine (fig. 50 et 52). On peut se demander s'il s'agit de protéines de structure (muscles) ou de granules intestinaux comme cela a été montré chez les juvéniles de Meloidogyne javanica (Chitwood, 1955).

3.5.3. L'intensité du métabolisme

Le résultat principal concerne la description de la consommation des réserves en conditions standards pour les trois espèces (fig. 48 à 51 pour Heterodera oryzae ; fig. 52 et 53 pour Meloidogyne javanica ; fig 56 et 57 pour Hirschmanniella spinicaudata). On possède ainsi une appréciation des délais nécessaires à l'épuisement des réserves dans un sol humide et aéré, qui représente la condition la plus favorable pour la croissance de l'hôte et pour la pénétration des formes infestantes dans les racines. Il apparaît donc que la vitesse de consommation des réserves en conditions standard dépend de l'espèce : plus élevée chez Meloidogyne javanica que chez les deux autres espèces. Si l'on prend comme critère le temps nécessaire à la consommation de la moitié des lipides initiaux, on obtient 1,5 semaine pour Meloidogyne javanica et trois semaines pour Heterodera oryzae et Hirschmanniella spinicaudata. L'intensité du métabolisme ne peut être également caractérisé, au niveau spécifique, par l'intensité respiratoire initiale (au temps zéro sur les fig. 87, 88 et 89). Exprimée en volume d'oxygène par volume de corps (données du tableau 2) et par heure, elles est de 2,00 chez M. javanica, de 0,93 pour les femelles et 0,69 pour les mâles chez H. spinicaudata et de 0,53 chez H. oryzae.

Par ailleurs on a pu mettre en évidence la diminution considérable de cette vitesse de la consommation des réserves chez les animaux maintenus dans certaines conditions particulières de

l'environnement. Chez les juvéniles d'Heterodera oryzae, la diminution du poids sec en deux semaines est de 23 % en conditions standard et de 5 % en anaérobiose (tableau 17). Chez les juvéniles de Meloidogyne javanica, la baisse de l'indice des réserves est 7,5 fois plus rapide en milieu dilué (conditions standard) qu'en milieu concentré (animaux en état d'osmobiose) (fig. 55). Il s'agit donc de véritables quiescences (Cooper & Van Gundy, 1971). Les paramètres physicochimiques contrôlés au cours de ces expériences correspondent à des facteurs qui interviennent naturellement dans le sol. On peut donc, dans ces circonstances particulières, observer des durées de survie tout à fait exceptionnelles.

CONCLUSION GENERALE

A. APPORTS DE L'ETUDE

A.1. Le bilan du métabolisme

Dans le cas des nématodes phytoparasites, cette étude représente le premier bilan complet où l'on ait tenu compte à la fois de la consommation des réserves principales (glucides, lipides et protides) et de la consommation d'oxygène. Nous allons voir les précisions, concernant le métabolisme, qu'apportent ces données.

Au cours du jeûne en conditions standard, les contenus en glucides, lipides et protides diminuent régulièrement (fig. 48 à 57). Ce résultat suggère que ces substances sont consommées mais ne le démontre pas. L'examen des autres paramètres, mesurés de façon concomitante, permet d'élargir la portée de ce premier résultat.

Ces substances pourraient se dégrader en métabolites intermédiaires, qui seraient insensibles aux méthodes de dosage employées ici, et qui s'accumuleraient dans le corps des animaux. Dans ce cas, le poids sec, devrait diminuer moins vite que ne le laisse prévoir la disparition des glucides, des lipides et des protides. Or chez Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica, la décroissance pondérale des réserves (somme des glucides, lipides et protides) est parallèle à celle du poids sec (fig. 51 et 53). De la même façon cette accumulation représenterait une certaine valeur en termes de demande chimique d'oxygène. Or, chez les deux espèces, la valeur mesurée de ce paramètre correspond exactement à sa valeur théorique, calculée sur la base des dosages de glucides, lipides et protides (fig. 59 et 60). Ceci montre que ces réserves qui disparaissent quittent effectivement le corps des animaux.

Par ailleurs, les mesures d'intensité respiratoire effectuées au cours du jeûne in vitro ont révélé que l'oxygène consommé au cours de cette période correspond, chez ces deux espèces, à l'oxydation complète des réserves disparues (fig. 87 et tableau 16 pour H. oryzae et fig. 88 et 52 pour M. javanica). Ceci indique que les réserves disparues ont été métabolisées complètement et qu'elles ont quitté le corps des animaux sous forme d'eau et d'anhydride carbonique.

Les juvéniles infestants des deux espèces, H. oryzae et M. javanica, utilisent donc complètement leurs réserves endogènes par des processus aérobies complets. Ceci les différencie nettement des espèces zooparasites chez qui une part au moins du métabolisme passe par des fermentations qui conduisent à l'excrétion de métabolites (Von Brand, 1966). Ces juvéniles constituent donc des vecteurs parasitaires particulièrement performants puisque l'infestation peut encore être accomplie par des individus qui ont utilisé une fraction notable de leur valeur calorifique initiale (45 % chez H. oryzae, fig. 62, et 70 % chez M. Javanica, fig. 63). Des considérations identiques semblent pouvoir s'appliquer aux femelles d'Hirschmanniella spinicaudata mais pas aux mâles.

A.2. Etats des réserves et survie

Au cours du jeûne en conditions standard, la proportion d'animaux survivants, chez les trois espèces étudiées, décroît selon une loi exponentielle (fig. 13, 15, 16, 18 et 20). Ce phénomène est corrélatif, chez les survivants, d'une diminution des contenus en glucides, lipides et protides (fig. 48 à 57). Cependant, dans la mesure où aucun dosage n'a été effectué chez les animaux éliminés lors des tests de survie, on ne peut, de façon sûre, attribuer cette mortalité à l'épuisement des réserves. On en reste donc, en ce qui concerne le déterminisme de la mort, au niveau des hypothèses. Ou bien la mort est due à un processus programmé, indépendant de l'épuisement des réserves ; dans ce cas on s'explique mal comment des juvéniles de M. javanica, qui ont pénétré à l'âge de quatre semaines, se transforment en femelles qui pondent encore des oeufs huit semaines après leur pénétration (fig. 43), soit une longévité de douze semaines. Ou bien la mortalité est bien liée à l'épuisement des réserves et, dans ce cas, les morts qui interviennent au début de l'étude (fin de la première et de la deuxième semaine) seraient caractérisées, au niveau individuel, par une faible teneur en réserves et une intensité métabolique élevée, conduisant à un épuisement rapide.

A.3. Etat des réserves et pouvoir infestant

Au cours du jeûne en conditions standard, il existe, chez les juvéniles survivants de H. oryzae et de M. javanica une corrélation très nette entre l'état des réserves et le pouvoir infestant : ces deux paramètres décroissent de façon simultanée (fig. 37, 48 et 51 pour H. oryzae ; fig. 39 et 52 pour M. javanica). La présence d'une certaine quantité de réserves est nécessaire pour que les juvéniles soient infestants. On peut relier ceci à la dépense énergétique que les juvéniles doivent mettre en oeuvre pour se déplacer depuis leur lieu d'inoculation (ou d'éclosion) jusqu'au contact de la racine de la plante hôte.

A.4. Variation d'intensité du métabolisme

L'intensité du métabolisme, qui commande la vitesse à laquelle disparaissent les réserves, dépend de deux groupes de facteurs : les facteurs externes et les facteurs internes au nématode.

Les facteurs externes au nématode, introduits expérimentalement dans cette étude présentent selon leur intensité deux effets. Lorsque l'intensité du facteur considéré varie faiblement par rapport aux conditions standard, les animaux gardent leur activité et l'intensité métabolique varie peu. Si la variation de l'intensité du facteur est plus importante, on observe une induction de quiescence : les animaux s'immobilisent et leur intensité métabolique est considérablement réduite, comme dans le cas, par exemple, de l'application de pressions osmotiques élevées (fig. 55).

Les facteurs internes au nématode étudiés ici ont été limités à la variation spécifique et au jeûne. L'intensité respiratoire initiale est deux fois plus élevée chez M. javanica que chez H. oryzae (fig. 87 et 88), ce qui correspond à un pouvoir infestant initial également plus élevé. Cette relation serait-elle généralisable ? Le jeûne provoque une diminution de l'intensité respiratoire. Ceci a déjà été observé chez d'autres nématodes (Van Gundy et al., 1967 ; Stantmyer, 1956 ; Mercer & Cairn, 1973), mais également chez d'autres invertébrés comme les insectes (Fourche, 1965 ; Guillet, 1981). Cette diminution possède incontestablement un caractère adaptatif puisqu'elle réduit la vitesse de consommation des réserves et permet ainsi à l'animal de subsister plus longtemps en l'absence de nourriture. Quant au mécanisme impliqué par cette adaptation, on peut penser qu'il est réversible, puisque certains de ces nématodes, après le jeûne, sont capables de parasiter la plante et de se transformer en femelles fécondes, toutes opérations nécessitant des structures en bon état. Parmi les mécanismes possibles citons l'arrêt de la synthèse des enzymes cytoplasmiques du métabolisme énergétique (Zeelon et al., 1973 ; Rothstein, 1975 ; Klenfenz & Zuckerman, 1978), des modifications structurales réversibles des

mitochondries (Walker, 1965 ; Wigglesworth, 1967), une dilution du cytoplasme due au remplacement des globules lipidiques consommés par de l'eau ou une réduction de la surface accessible de ces globules lipidiques.

A.5. Implication pratiques

Les conditions dans lesquelles se trouvent les animaux soumis au jeûne in vitro reproduisent celles qu'ils connaissent dans le sol en l'absence de la plante hôte. Cette situation prévaut au cours d'une jachère, si la végétation spontanée n'est pas hôte, ou si le sol est maintenu dés herbé. D'après nos résultats, une jachère de six semaines suffirait à éliminer d'un sol les juvéniles infestants d'Heterodera oryzae ou de Meloidogyne javanica. Cette méthode toutefois ne serait efficace que si les conditions physiques et chimiques du sol ne risquaient pas d'induire une quiescence. De plus, en pratique, se pose la question de la présence des oeufs, dont la longévité est beaucoup plus élevée que celle des juvéniles infestants.

B. PERSPECTIVES

B.1. Exploitation du modèle juvénile infestant

Il s'agit du modèle qui a fourni les meilleurs résultats et ceci chez les deux espèces : Heterodera oryzae et Meloidogyne javanica.

On peut dans un premier temps prévoir d'étendre ces études au groupe des nématodes à kystes (Heterodera, Sarisodera) que la méthode d'éclosion au permanganate vient de rendre accessible à l'investigation. Ceci permettrait en particulier de voir si le pouvoir infestant initial se rapproche de l'une ou l'autre des deux espèces déjà étudiées et quelles sont les caractéristiques spécifiques de la courbe de survie et des contenus initiaux en réserves.

Ce modèle du juvénile infestant ne convient manifestement pas pour l'étude du vieillissement. En effet, cette notion de vieillissement n'est en principe admise que pour des organismes adultes et non pour des juvéniles. De plus les effets du jeûne et du vieillissement sont dans ce cas parfaitement indissociables. En effet, il n'est possible de nourrir ces animaux (par pénétration dans une plante hôte) qu'en provoquant un changement de stade.

Par contre, ce modèle convient particulièrement pour l'étude des mécanismes de régulation qui régissent la consommation des réserves au cours du jeûne. Par rapport aux nématodes zooparasites, notre modèle offre l'avantage d'un métabolisme complet permettant l'établissement de bilans précis (chapitre 3). Par rapport aux nématodes libres, ce même modèle permet de disposer d'un matériel particulièrement pur et homogène (chapitre 1). Parmi les directions de recherche à privilégier, on pourrait songer à l'analyse fine de l'utilisation des lipides et à la transformation des lipides en glucides.

Une autre voie consisterait à explorer les voies par lesquelles, au cours de l'ovogénèse, se constituent ces réserves qui sont consommées au cours du jeûne.

B.2. L'exploitation du modèle adulte infestant

Ce modèle n'a été jusqu'à présent exploité que pour les questions de métabolisme chez les femelles et les mâles d'Hirschmanniella spinicaudata.

L'extension pourrait se faire vers les nématodes du genre Pratylenchus, appartenant à la même famille et d'une grande importance dans la zone intertropicale.

Au niveau des thèmes, le problème de la relation parasitaire est à reprendre sur des bases nouvelles. Puisque le caractère parasitaire ne peut être comptabilisé d'une façon reproductible comme dans le cas des

juvéniles précédents, le contact alimentaire peut être mis en évidence à l'aide d'éléments marqués. Par ailleurs comme il s'agit d'adultes, la préoccupation d'une étude sur le vieillissement est parfaitement légitime.

B.3. L'exploitation du modèle oeuf

L'étude sur la survie des oeufs, réalisée dans le présent travail (chapitre 2), n'a qu'un caractère très préliminaire. Or il est évident que c'est ce juvénile infestant encore enfermé dans la coque de l'oeuf, qui a une importance primordiale dans le maintien de l'inoculum d'un sol.

Parmi les thèmes à aborder devrait figurer en priorité une évaluation des relations entre la coque de l'oeuf et les différentes substances donc l'action sur l'ensemble de l'oeuf a déjà été étudiée. Ceci pourrait se faire par différence en faisant agir ces substances sur les juvéniles éclos.

PUBLICATIONS HORS TEXTE

Les résultats rapportés dans ce texte ont, pour partie, déjà fait l'objet des publications dont la liste est donnée ci-dessous.

- REVERSAT, G. -1971- Contribution à l'étude de la biologie d'un nématode phytoparasite : Heterodera oryzae. Thèse de Docteur Ingénieur, Université Claude Bernard de Lyon, 52 p.
- Chapitre 3 : Figures 73 et 74.
- REVERSAT, G. -1975a- Influence d'une inhibition préalable par la pression osmotique sur l'éclosion des masses d'oeufs du nématode Heterodera oryzae. Cah. ORSTOM, Sér. Biol., 10 : 189-206.
- Chapitre 1 : Figure 8 et tableau 2.
Chapitre 2 : Figures 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 et 30.
- REVERSAT, G. -1975b- Méthodes pour la mesure de la consommation d'oxygène des nématodes par la technique du ludion. Cah. ORSTOM, Sér. Biol., 10 : 169-187.
- Chapitre 3 : Figures : 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 75, 76, 77 et 78.
Annexe 2 : Figures : 95, 96, 97, 98 et 99.
- REVERSAT, G. -1975c- Elevage monoxénique du nématode Heterodera oryzae sur le riz. Ann. Zool. Ecol. anim., 7 : 81-89.
- REVERSAT, G. -1975d- Etude préliminaire de la survie en anaérobiose des juvéniles du nématode Heterodera oryzae (Tylenchida : Hétéroderidae). C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, Sér. D, 280 : 2865-2868.
- Chapitre 2 : Figure 14.
Chapitre 3 : Tableau 17.
- REVERSAT, G. -1976- Etude de la composition biochimique globale des juvéniles des nématodes Meloidogyne javanica et Heterodera oryzae. Cah. ORSTOM, sér. Biol., 11 : 225-234.
- Chapitre 3 : Figures 44, 45 et tableaux 12, 13, 14 et 15.
- REVERSAT, G. -1977- Influence of some external factors on the rate of oxygen uptake by second stage juveniles of Heterodera oryzae. Nematologica, 23 : 369-381.
- Chapitre 4 : Figures 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 et tableaux 22 et 23.
- REVERSAT, G. -1980a- More about the drop by drop distribution of a nematode suspension. Revue Nématol., 3 : 148-150.
- Chapitre 3 : Figures 46, 47 et tableaux 10 et 11.

REVERSAT, G. -1980b- Effect of in vitro storage time on the physiology of second stage juveniles of Heterodera oryzae. Revue Nématol., 3 : 233-241.

Chapitre 2 : Figures 13, 37 et 38.

Chapitre 3 : Figures 48, 49, 50, 51 et tableau 16.

REVERSAT, G. -1981a- Effects of ageing and starvation on respiration and food reserves content in adult Hirschmanniella spinicaudata. Revue Nématol., 4 : 125-130.

Chapitre 2 : Figure 16.

Chapitre 3 : Figures 56, 57 et 89.

REVERSAT, G. -1981b- Potassium permanganate as a hatching agent for Heterodera sacchari. Revue Nématol., 4 : 174-176.

Chapitre 1 : Tableau 3.

REVERSAT, G. -1981c- Consumption of food reserves by starved second stage juveniles of Meloidogyne javanica under conditions inducing osmobirosis. Nematologica, 27 : 207-214.

Chapitre 2 : Figures 15, 40, 43.

Chapitre 3 : Figures 52, 53, 54 et 55.

REVERSAT, G. -1981d- Age related changes in the chemical oxygen demand of second stage juveniles of Meloidogyne javanica and Heterodera oryzae. Nematologica, 27 : 220-227.

Chapitre 3 : Figures 58, 59, 60, 62 et 63 et tableaux 19 et 20.

REVERSAT, G., DEMEURE, Y. SOUCHAUD, B., & PAYCHENG, C. -1980- A photographic technique to evaluate the consumption of food reserves in individual starved juveniles of Meloidogyne javanica. Revue Nématol., 3 : 101-105.

Chapitre 3 : Figures 61, 64 et tableau 21.

REVERSAT, G. & MERNY, G. -1973- Influence de quelques facteurs sur la pénétration du nématode Heterodera oryzae dans les racines du riz. Cah. ORSTOM, Sér. Biol., 21 : III-III5.

Chapitre 2 : Figures 31, 32, 33 et 34.

REVERSAT, G. & BOIS, J.F. -1982- Marquage par le ^{35}S d'Heterodera oryzae et d'Heterodera sacchari et application à l'étude de la compétition pour l'infestation de la plante hôte. Bulletin O.E.P.P., 12 : 371-377.

Chapitre 2 : Tableaux 7 et 8.

Annexe 1 : Figures 93, 94 et tableaux 25 et 26.

REFERENCES

- ABRAMS, B.I. & MITCHELL, M.J. -1978- Role of oxygen in affecting survival and activity of Pelodera punctata (Rhabditidae) from sewage sludge. Nematologica, 24 : 456-462.
- AIST, S. & RIGGS, R.O. -1969- Amino acids from Heterodera glycines. J. Nematol., 1 : 254-259.
- ALLISON, L.E. -1965- Organic carbon. In : Methods of soil analysis, C.A. Black, ed., American Society of Agronomy, Inc., publ., Madison, U.S.A., Vol. 2 : 1367-1378.
- ANDERSON, G.L. -1978- Responses of dauerlarvae of Caenorhabditis elegans (Nematoda : Rhabditidae) to thermal stress and oxygen deprivation. Can. J. Zool., 56 : 1786-1791.
- ANDERSON, G.L. & DUSENBERRY, D.B. -1977- Critical oxygen tension of Caenorhabditis elegans. J. Nematol., 9 : 253-254.
- ANDRASSY, I. -1956- Die Rauminhalt und Gewichtsbestimmung der Fadenwürmer (Nematoden). Act. Zool. Hung., 2 : 1-15.
- ANGLADETTE, A. -1966- Le riz. Paris Maisonneuve et Larose, 930 pages.
- ARMSTRONG, W. -1971- Radial oxygen losses from intact rice roots as effected by distance from the apex, respiration and waterlogging. Physiol. Plant., 25 : 192-197.
- ATKINSON, H.J. -1973- The respiratory physiology of the marine nematodes Enoplus brevis (Bastian) and E. Communis (Bastian). J. Exp. Biol., 59 : 255-274
- ATKINSON, H.J. -1976- The respiratory physiology of nematodes. In : The organization of nematodes. Edited by N.A. Croll. Academic Press, London., 243-272.
- ATKINSON, H.J. & BALLANTYNE, A.J. -1977- Changes in the oxygen consumption of cysts of Globodera rostochiensis associated with the hatching of juveniles. Ann. appl. Biol., 87 : 159-166.
- ATKINSON, H.J. & SMITH, L. -1973- An oxygen electrode microrespirometer. J. Exp. Biol., 59 : 247-253.
- BABATOLA, J.O. & BRIDGE, J. -1979- Pathogenicity of Hirschmanniella oryzae, H. spinicaudata and H. imamurai on rice. J. Nematol., 11 : 128-132.
- BABATOLA, J.O. & BRIDGE, J. -1980- Feeding behaviour and histopathology of Hirschmaniella oryzae, H. Imamurai, and H. spinicaudata on rice. J. Nematol., 12 : 48-53.
- BAIR, T.D. -1955- The oxygen consumption of Rhabditis strongyloides and other nematodes related to oxygen tension. J. Parasit., 41 : 613-623.
- BALAAM, L.N. -1972- Fundamentals of Biometry. George Allen and Unwin Ltd, London. 259 pp.
- BANAGE, W.B. -1966- Survival of a swamp nematode (Dorylaimus sp.) under anaerobic conditions. Oikos, 17 : 113-120.
- BANAGE, W.B. & VISSER, S.A. -1965- The effect of some fatty acids and pH on a soil nematode. Nematologica, 11 : 255-262.
- BANYER, R.J., FISCHER, J.M. -1971- Effect of temperature on hatching of eggs of Heterodera avenae. Nematologica, 17 : 519-534.
- BARRETT, J. -1969a- The effect of ageing on the metabolism of the infective larvae of Strongyloides ratti Sandground, 1925. Parasitology, 59 : 3-17.
- BARRETT, J. -1969b- The effect of substrates and inhibitors on the rate of respiration of the infective larvae of Strongyloides ratti Sandground, 1925. Parasitol., 59 : 343-347.
- BARRETT, J. -1969c- The effect of physical factors on the rate of respiration of the infective larvae of Strongyloides ratti Sandground, 1925. Parasitol., 59 : 859-875.

- BARRETT, J. -1976- Energy metabolism in nematodes. In : The organization of nematodes, Edited by N.A. Croll, Academic Press London, 11-70.
- BARRETT, J., WARD, C.W. & FAIRBAIRN, D. -1970- The glyoxalate cycle and the conversion of triglycerides to carbohydrates in developing eggs of Ascaris lumbricoides. Comp. Biochem. Physiol., 35 : 577-586.
- BARRETT, J., WARD, C.W. & FAIRBAIRN, D. -1971- Lipid metabolism in the free living nematodes Panagrellus redivivus and Turbatrix aceti. Comp. Biochem. Physiol., 38 B : 279-284.
- BAUD, L., LEGAY, J.M. & PASCAL, M. -1965- Evolution de la teneur en eau de la larve de Bombyx mori au cours du jeûne absolu. Bull. Biol., 99 : 525-533.
- BAUNACKE, W. -1922- Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Rubennematoden Heterodera schachtii Schmidt. Arb. biol. Reichsanst. Berl., 11 : 185-288.
- BAXTER, R.I. & BLAKE, C.D. -1969- Oxygen and the hatch of eggs and migration of larvae of Meloidogyne javanica. Ann. appl. Biol., 63 : 191-203.
- BEQUET, B. -1971- Influence du vieillissement parental sur la fécondité de la descendance chez un nématode hermaphrodite Caenorhabditis elegans. Thèse, Université Claude Bernard de Lyon. 51 pages.
- BELL, R.G. -1969- Studies on the decomposition of organic matter in flooded soil. Soil Biol. Biochem., 1 : 105-116.
- BERDON-BRIZUELA, R. & MERNY, G. -1964- Biologie d'Heterodera oryzae Luc et Berdon, 1961. I. Cycle du parasite et réactions histologiques de l'hôte. Rev. Path. veg. Entom. agric. Fr., 43 : 43-53.
- BERGESON, G.B. -1959- The influence of temperature on the survival of some species of the genus Meloidogyne, in the absence of a host. Nematologica, 4 : 344-354.
- BERLINER, E. & BUSCH, K. -1914- Über die Züchtung der Rubennematoden (Heterodera schachtii Schm.) auf Agar. Biol. Zbl., 34 : 349-356.
- BERNARD, C. -1859- De la matière glycogène chez les animaux dépourvus de foie. Soc. Biol. Paris, 1 : 53-55.
- BHATT, B.D. & ROHDE, R.A. -1970- The influence of environmental factors on the respiration of plant parasitic nematodes. J. Nematol., 2 : 277-285.
- BIRD, A.F. -1968- Changes associated with parasitism in nematodes. III. Ultrastructure of the egg shell, larval cuticle, and contents of the subventral oesophageal glands in Meloidogyne javanica with some observations on hatching. J. Parasitol., 54 : 475-489.
- BIRD, A.F. -1971- Specialized adaptation of nematodes to parasitism. In : B.M. Zuckerman, W.F., Mai & Rohde, R.A. (Eds.), Plant Parasitic Nematodes, London, Academic Press, Vol. 2 : 35-49.
- BIRD, A.F. -1979- Ultrastructure of the tail region of the second stage preparasitic larva of the root-knot nematode. Int. J. Parasitol. 9 : 357-370.
- BIRD, A.F. & BUTTROSE, M.S. -1974- Ultrastructural changes in the nematode Anguina tritici with anhydrobiosis. J. Ultrastruct. Res., 48 : 177-189.
- BIRD, A.F. & LOVEYS, B.R. -1975- The incorporation of photosynthates by Meloidogyne javanica. J. Nematol. 7 : 111-113.
- BIRD, A.F. & Mc CLURE, M.A. -1976- The tylenchid (Nematoda) egg shell : structure, composition and permeability. Parasitology, 72 : 19-28.
- BIRD, A.F., SOEFFKY, A. -1972- Changes in the ultrastructure of the gelatinous matrix of Meloidogyne javanica during dehydration. J. Nematol., 4 : 166-169.
- BIRD, G.W. -1971- Influence of incubation solution on the rate of recovery of Pratylenchus brachyurus from cotton roots. J. Nematol., 3 : 378-385.
- BLAKE, C.D. -1962a- The etiology of tulip root disease in susceptible and in resistant varieties of oats infested by the stem nematode Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev. Ann. Appl. Biol., 50 : 703-722.
- BLAKE, C.D. -1962b- Some observations on the orientation of Ditylenchus dipsaci and invasion of oat seedlings. Nematologica, 8 : 177-192.
- BOELL, E.J. - 1960- The cartesian diver technique in respirometry and enzyme assay. In : Nematology fundamentals and recent advances. Sasser J.N. & Jenkins W.R., Chapel Hill, The University of North Carolina Press, U.S.A., 109-121.
- BOLLA, R. & BROT, N. -1975- Age dependant changes in enzymes involved in macromolecular synthesis in Turbatrix aceti. Arch. Biochem. Biophys., 169 : 227-236.
- BOUREAU, M. -1977- Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude de l'exsudation racinaire du riz. Cah. ORSTOM, sér. Biol., 12 : 75-81.
- BRAND, T. VON -1942- Physiological observations upon a larval Eustrongylides. The aerobic respiration. Biol. Bull., 82 : 1-13.

- BRAND, T. VON -1943- Physiological observations upon a larval Eustrongylides. IV. Influence of temperature pH, and inorganic ions upon the oxygen consumption. Biol. Bull., 84 : 148-156.
- BRAND, T. VON -1960a- Influence of pH, ions and osmotic pressure on life processes. In : Nematology Fundamentals and recent advances. Ed. by J.N. Sasser and W.R. Jenkins, Chapel Hill, Univ. North Carolina, Chapter 28, pp. 249-256.
- BRAND, T. VON -1960b- Influence of oxygen on life processes. In : Nematology. Fundamentals and recent advances. Ed. by J.N. Sasser and W.R. Jenkins, Chapel Hill, Univ. North Carolina, Chapter 27, pp. 242-248.
- BRAND, T. VON -1960c- Influence of temperature on life processes. In : Nematology Fundamentals and recent advances. Ed. by J.N. Sasser and W.R. Jenkins, Chapel Hill, Univ. North Carolina, Chapter 29, pp. 257-266.
- BRAND, T. VON -1966- Biochemistry of parasites. New York & London, Academic Press, 429 p.
- BRAND, T. VON -1970- An old-timer's look at parasite physiology. J. Parasit., 56 : 3-11.
- BRUN, J. -1966- Influence des conditions de milieu sur la fécondité de Caenorhabditis elegans à différentes températures. Nematologica, 12 : 539-556.
- BRYANT, C., NICHOLAS, W.L. & JANTUNEN, R. -1967- Some aspects of the respiratory metabolism of Caenorhabditis briggsae (Rhabditidae). Nematologica, 13 : 197-209.
- BULLOCK, T.H. -1955- Compensation for temperature in the metabolism and activity of poikilotherms. Biol. Rev., 30 : 311-342.
- BUNGERBERG DE JONG, H.G. -1949- Reversal of charge phenomena, equivalent weight and specific properties of the ionised group. In : Colloid Science, Kruyt H.R. ed. Elsevier, New York, II : 259-334.
- BURMAN, M & PYE, AE -1980- Neodactena carpocapsae : respiration of infective juveniles. Nematologica, 26 : 214-219.
- BYERS, J.R. & ANDERSON, R.V. -1973- Morphology and ultrastructure of the intestine in a plant parasitic nematode, Tylenchorhynchus dubius. J. Nematol., 5 : 28-37.
- CABARET, J. -1980- Motilité et infestivité des larves L1 des protostrongylides : facteurs de variation. Ann. Parasitol. 55 : 571-581.
- CADET, P. & MERNY, G. -1976- Méthode d'étude de la pénétration et du développement des deux sexes chez les Heterodera (Nematoda : Tylenchida). Cah. ORSTOM, Sér. Biol., 11 : 151-155.
- CADET, P., MERNY, G. & REVERSAT, G. -1975- Facteurs affectant le déterminisme du sexe chez Heterodera oryzae (Nematoda : Tylenchoidea). Cah. ORSTOM, Sér. Biol., 10 : 207-214.
- CASTRO, G.A. & FAIRBAIRN, D. -1969a- Comparison of cuticular and intestinal absorption of glucose by adult Ascaris lumbricoides. J. Parasitol., 55 : 13-16
- CASTRO, G.A. & FAIRBAIRN, D. -1969b- Carbohydrates and lipids in Trichinella spiralis larvae and their utilization *in vitro*. J. Parasitol., 55 : 51-58.
- CAVENESE, FE -1967- Nematology studies 1960-1966, Rep. Min. Agric. & natur. Res. W. Reg. Nigeria & USAID, 135 pp.
- CHABROL, E., CHARDONNAT, R. -1937- Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides : l'oléidémie. Presse méd., 96 : 1713-1714.
- CHITWOOD, H.D. -1951- Notes on the physiology of Meloidogyne javanica (Treub, 1885), Nematoda : Heteroderidae. J. Parasitol., 37 : 96-98.
- CLARK, F.E. -1969- Ancylostoma caninum : food reserves and changes in chemical composition with age in third stage larvae. Exp. Parasitol., 24 : 1-8.
- CLARKE, A.J., COX, P.M. & SHEPHERD, A.M. -1967- The chemical composition of the egg shells of the potato cyst-nematode, Heterodera rostochiensis Woll. Biochem. J., 104 : 1056-1060.
- CLARKE, A.J. & PERRY, R.N. -1977- Hatching of cyst nematodes. Nematologica, 23 : 350-368.
- CLARKE, A.J. & SHEPHERD, A.M. -1964- Synthetic hatching agents for Heterodera schachtii Schm. and their mode of action. Nematologica, 10 : 431-453.
- COLLANDER, R. -1954- The permeability of Nitella cells to non electrolytes. Physiol. Plant, 7 : 420-445.
- COLLIS-GEORGE, N., SANDS, J.E. -1962- Comparison of the effects of the physical and chemical components of soil water energy on seed germination. Aust. J. Agric. Res., 13 : 575-584.
- COOMAN, E.P. de -1950- Le métabolisme respiratoire d'Anquillula silusiae de Man. Ann. Soc. Roy. Zool. Belg., 81 : 5-13.

- COOPER, A.F. Jr. & VAN GUNDY, S.D. -1970- Metabolism of glycogen and neutral lipids by Aphelenchus avenae and Caenorhabditis sp. in aerobic, microaerobic and anaerobic environments. J. Nematol., 2 : 305-315.
- COOPER, S.C. & FERGUSON, J.H. -1973- The effect of cold acclimation upon the oxygen consumption of two species of free-living nematodes. J. Nematol., 5 : 241-245.
- COSTELLO, L.C. & GROLLMAN, S. -1958- Oxygen requirements of Strongyloides papillosus infective larvae. Exptl. Parasitol., 7 : 319-327.
- CREHANGE, J. & METAIS, P. -1972- Etude comparative de quatre méthodes de dosage des lipides totaux sériques. Bull. Soc. Pharm. Strasbourg, 15 : 185-197.
- CROLL, N.A. -1970- Sensory basis of activation in nematodes. Exptl. Parasit., 27 : 350-356.
- CROLL, N.A. -1972- Energy utilisation of infective Ancylostoma tubaeformae larvae. Parasitology, 64 : 355-368.
- CROLL, N.A. & MATTHEWS, B.E. -1973- Activity, ageing and penetration of hookworms larvae. Parasitology, 66 : 279-289.
- CROWE, J.H. -1971- Anhydrobiosis : an unsolved problem. Amer. Nat., 105 : 563-573.
- CROWE, J.H., MADIN, K.A.C. & LOOMIS, S.H. -1977- Anhydrobiosis in nematodes : Metabolism during resumption of activity. J. Exp. Biol., 201 : 57-64.
- DALMASSO, A. -1966- Methode simple d'extraction des nématodes du sol. Rev. Ecol. Biol. Sol., 3 : 473-478.
- DAVIDE, R.G. -1980- Influence of different crops on the dimensions of Meloidogyne arenaria isolated from fig. Proc. Helm. Soc. Wash., 47 : 80-84.
- DAVIES, K.A. & FISHER, J.M. -1976a- Factors influencing the number of larvae of Heterodera avenae invading barley seedlings in vitro. Nematologica, 22 : 153-162.
- DAVIES, K.A. & FISHER, J.M. -1976b- Duration of infectivity of second stage larvae of Heterodera avenae. Nematologica, 22 : 163-168.
- DAVSON, H., DANIELLI, J.F. -1952- The permeability of natural membranes. Cambridge University Press, Cambridge G.B., 365 p.
- DEMEURE, Y. -1975- Résistance à la sécheresse en zone sahélienne, du nématode phytoparasite. Scutellonema cavenessi Sher, 1963. Cah. ORSTOM, sér. Biol., vol. X, 3 : 283-292.
- DEUBERT, K.H. & ZUCKERMAN, B.M. -1968- The histochemical demonstration of cytochrome oxidase in fresh frozen sections of nematodes. Nematologica, 14 : 453-455.
- DIAMOND, J.M., WRIGHT, E.M. -1969- Biological membranes : the physical basis of ion and non electrolyte selectivity. Ann. Rev. Physiol., 31 : 581-646.
- DOBBS, R.A. & WILLIAMS, R.T. -1963- Elimination of chloride interference in the chemical oxygen demand test. Analyst. Chem., 35 : 1064-1067.
- DONCASTER, C.C., SHEPHERD, A.M. -1967- The behaviour of second stage Heterodera rostochinensis larvae leading to their emergence from the egg. Nematologica, 13 : 476-478.
- DONCASTER, C.C. & WEBSTER, J.M. -1968- Clumping of the plant parasitic nematode Ditylenchus dipsaci in water. Nematologica, 14 : 131-136.
- DREYON, 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. -1957- A method for determination of the infectivity of Heterodera rostochiensis larvae. Nematologica, 2 : 72-75.
- DROPKIN, V.H. -1966- Physiology of nematodes of the soil. Ann. New York Acad. Sci., 139 : 39-52.
- 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.
- DROPKIN, V.H. & KING, R.C. -1956- Studies on plant parasitic nematodes homogeneously labeled with radiophosphorus. Exptl. Parasitol. 5 : 469-480.
- DROPKIN, V.H., MARTIN, G.C., JOHNSON, R.W. -1958- Effect of osmotic concentrations on hatching of some plant parasitic nematodes. Nematologica, 3 : 115-126.
- DUSENBERRY, D.S., ANDERSON, G.L. & ANDERSON, E.A. -1978- Thermal acclimation more extensive for behavioral parameters than for oxygen consumption in the nematode Caenorhabditis elegans. J. Exp. Zool., 206 : 191-198.
- ELLENBY, C. & PERRY, R.N. -1976- The influence of the hatching factor on the water uptake of the second stage larva of the potato cyst nematode. Heterodera rostochiensis. J. Exp. Biol., 64 : 141-147.

- ELLIOT, A. -1954- Relationship of aging, food reserves and infectivity of larvae of Ascaridia galli. Exp. Parasitol., 3 : 307-320.
- ELLS, H.A. -1969- Physiology of the vinegar eel, Turbatrix aceti. II. Enzymes of the glycolytic sequence. Comp. Biochem. Physiol., 29 : 689-701.
- ELLS, H.A. & READ, C.P. -1961- Physiology of the vinegar eel Turbatrix aceti (Nematoda). I. Observations on respiratory metabolism. Biol. Bull., 120 : 326-336.
- EPSTEIN, J., HIMMELHOCH, S. & GERSHON, D. -1972- Studies on ageing in nematodes. III. Electromicroscopical studies on age associated cellular damage. Mechanisms of Ageing and Development, 1 : 245-255.
- ERLANGER, M. & GERSHON, D. -1970- Studies on ageing in nematodes. II. Studies of the activities of several enzymes as a function of age. Exper. Gerontol., 5 : 13-19.
- FAIRBAIRN, D. -1960- The physiology and biochemistry of nematodes. In : Nematology, fundamentals and recent advances. J.N. Sasser and W.R. Jenkins. Chapel Hill, The University of North Carolina Press, U.S.A., 30 : 267-296.
- FAURE, M. -1963- Les lipides. In : Techniques de laboratoire. Ed. J. Loiseleur, Masson et Cie Paris, 1 : 1247-1308.
- FEDER, W.A. & FELDMESSER, J. -1955- Further studies on plant-parasitic nematodes maintained in altered oxygen tensions. J. Parasitol., 41 : 47.
- FELDMESSER, J. & FEDER, W.A. -1954- Some effects of altered oxygen tensions on certain plant-parasitic and soil-inhabiting nematodes in vitro. J. Parasitol., 40 : 18.
- FENWICK, D.W. -1939- Studies on the saline requirements of the larvae of Ascaris suum. J. Helminth., 17 : 211-228.
- FERNANDEZ, M. & ORTEGA, J. -1981- Especies de nematodos encontradas en arroz en Cuba. Ciencias de la Agricultura, nº 9, 121.
- FERNANDO, M.A. -1963- Metabolism of hookworms. I. Observations on the oxidative metabolism of free living third stage larvae of Necator americanus. Expl. Parasit., 13 : 90-97.
- FLEGG, J.J.M. -1967- Increase in size of dorylaimid eggs after laying. Nematologica, 13 : 641-642.
- FLETCHER, C.L. & KRUSBERG, L.R. -1973- Investigation of some lipids from Turbatrix aceti. Comp. Biochem. Physiol., 45B : 159-165.
- FORTUNER, R. -1976- Etude écologique des nématodes des rizières du Sénégal. Cah. ORSTOM, sér. Biol., 11 : 179-191.
- FORTUNER, R. & JACQ, V.A. -1976- In vitro study of toxicity of soluble sulphides to three nematodes parasitic on rice in Senegal. Nematologica, 22 : 343-351.
- FORTUNER, R. & MERNY, G. -1973- Les nématodes parasites des racines associés au riz en Basse Casamance (Sénégal) et en Gambie. Cah. ORSTOM, sér. Biol., 21 : 3-20.
- FOURCHE, J. -1965- La respiration larvaire chez Drosophila melanogaster. Consommation d'oxygène au cours du jeûne. C.R. Acad. Sc. Paris, 261 : 3478-3481.
- GABE, M. -1968- Techniques histologiques. Paris, Masson, 1113 p.
- GEVREY, J. -1971- Les coprocultures : réalisation, interprétation en une de la diagnose des strongles digestifs des ruminants et du porc. Rec. Med. Vet., 147 : 287-317.
- GIOVANNOLA, A. -1936- Energy and food reserves in the development of nematodes. J. Parasitol., 22 : 207-218.
- GLICK, O. -1961- Gasometric techniques in : Quantitative chemical techniques of Histo and Cytochemistry. Wiley (Interscience), New York, I : 123-289.
- GOLDEN, A.M. & SHAFER, T. -1960- Survival of emerged larvae of the sugar beet nematode (Heterodera schachtii) in water and in soil. Nematologica, 5 : 32-36.
- GOMORI, G. -1955- Preparation of buffers for use in enzyme studies. In Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. Methods in enzymology. Academic Press, New York, I : 138-146.
- GOODEY, T. -1930- On the presence of fats in the intestinal wall of nematodes. J. Helminth., 8 : 85-88.
- GRANECK, I. -1976- Electrical stimulation applied to second stage larvae of Heterodera rostochiensis to determine viability. J. Nematol., 8 : 91-92.
- GREEN, C.D. & PLUMB, S. -1967- The effect of ultra-violet radiation on the invasion, survival and fertility of larvae of Heterodera rostochiensis. Nematologica, 13 : 186-190.
- GUILLET, C. -1981- Développement embryonnaire et métabolisme énergétique. Etude des mitochondries, de la respiration et des nucléotides adényliques chez Pieris brassicae (Lépidoptère). Thèse de Doctorat d'Etat, Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, 115 p.

- GUIRAN, G. de -1960- Etude comparative de la pénétration des larves de Meloidogyne javanica (Treb 1885) Chitwood, 1949 et de Meloidogyne incognita acrita Chitwood, 1949 dans les racines des plantes hotes et non hotes. Maded. Landbouogesch. Opzoekstns Gent., 25 : 1047-1056.
- GUIRAN, G. de -1966- Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. Nematologica, 12 : 646.
- GUIRAN, G. de & NETSCHER, C. -1970- Les nématodes du genre Meloidogyne, parasites des cultures tropicales. Cah. ORSTOM, sér. Biol., n° 11 : 151-185.
- HIEB, W.F. & ROTHSTEIN, M. -1975- Aging in the free-living nematode Turbatrix aceti. Techniques for synchronization and aging of large-scale axenic culture. Exp. Geront., 10 : 145-153.
- HOGGLAND, D.R. & ARNON, D.I. -1950- The water culture method for growing plants without soil. Circ. Calif. agric. Exp. Stat. n° 347.
- HOCHACHKA, P.W., FIELDS, J. & MUSTAFA, T. -1975- Animal life without oxygen : basic biochemical mechanisms. Amer. Zool., 13 : 543-555.
- HOLTER, H. & ZEUTHEN, E. -1966- Manometric techniques for single cells. In : Physical techniques in biological research, Pollister, A.N. edit., Academic Press, III A : 251-317.
- HOSONO, R. -1978- Age dependent changes in the behaviour of Caenorhabditis elegans on attraction to Escherichia coli. Expl. Gerontol., 13 : 31-36
- HUSSEY, R.S., SASSER, J.N. & HUISINGH, D. -1972- Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of Meloidogyne incognita and M. arenaria. J. Nematol., 4 : 183-189.
- INAGAKI, H. -1977- Courbe de survie du diptère brachycère Musca domestica L. analysée par la loi de la senescence de Teissler (1934) CR Acad. Sci., Paris série D, 284 : 1219-1222.
- ISHIBASHI, N. KONDO, E. MURAKA, M. & YOKOO, T. -1973- Ecological significance of dormancy in plant parasitic nematodes. I. Ecological difference between eggs in gelatinous matrix and cyst of Heterodera glycines Ichinoe (Tylenchida : Heteroderidae). Appl. Ent. Zool., 8 : 53-63.
- IVLEV, U.S. -1934- Eine Mikromethode zur Bestimmung des Kaloriengehalt von Nährstoffen. Biochem. Z., 275 : 49-55.
- JATALA, P. -1975- Efficiency of potassium permanganate in differentiating between live and dead nematodes. Ann. appl. Biol., 80 : 109-113.
- JATALA, P. & JENSEN, H.J. -1976- Histopathology of Beta vulgaris to individual and concomitant infections by Meloidogyne hapla and Heterodera schachtii. J. Nematol., 8 : 336-341.
- JONES, F.G.W. -1975a- The soil as an environment for plant parasitic nematodes. Ann. appl. Biol., 79 : 113-139.
- JONES, F.G.W. -1975b- Accumulated temperature and rainfall as measures of nematode development and activity. Nematologica, 21 : 62-70.
- KAHN, M. & ENESCO, H.E. -1981- Effect of alpha-tocopherol on the lifespan of Turbatrix aceti. Age, 4 : 109-115.
- KAMPF, L. -1978- Der Sauerstoffverbrauch von Nematoden als Ausdruck zootischer Aktivität. Pedobiologia, 18 : 355-365.
- KARPIAC, S.E., KOZAR, Z., KRZYZANOWSKI, M. & KOZAR, M. -1965- Effect of some organic acids on the respiration of Trichinella spiralis larvae. Acta parasitol. pol., 13 : 265-270.
- KERBOEUF, O. -1978- The effects of time and temperature of storage on the infectivity of third stage larvae of Heligmosomoides polygyrus (= Nematospiroides dubius). Ann. Rech. Vet., 9 : 153-168.
- KLEFENZ, H.F. & ZUCKERMAN, B.M. -1978- Review : a comparative analysis of studies of enzymes changes with age with comments on possible sources of errors. Age, 1 : 60-67.
- KLEIBER, M. -1975- The fire life : an introduction to animal energetics. R.E. Krieger Publishing Co, Huntington, U.S.A., 1 vol. 453 pp.
- KLEKOWSKI, R.Z. -1971- Cartesian diver microrespirometry for aquatic animals. Pol. Arch. Hydrobiol., 18 : 93-114.
- KLINGLER, J. & KUNZ, P. -1974- Investigations with a saprozoic nematode Mesodiologaster lheritieri, on a possible respiratory function of air swallowing. Nematologica, 20 : 52-60.
- KOLTHOFF, I.M. & LAITINEN, R. -1940- The voltametric determination of oxygen. Science, 92 : 152-154.
- KONDO, E. & ISHIBASHI, N. -1976- Thermal effects on the fine structure of the 2nd stage larvae of Heterodera glycines Ichinoe. Jap. J. Nematol., 6 : 27-34.
- KROGH, A. -1916- The respiratory exchange of animals and man. Longmans, Green & Co, London.
- KRUSBERG, L.R. -1960- Hydrolytic and respiratory enzymes of species of Ditylenchus and Pratylenchus. Phytopathology, 50 : 9-22.

- 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. -1971- Chemical composition of nematodes. In : Plant parasitic nematodes. Ed : B.M. Zuckerman, W.F. Mai & R.A. Rohde. Academic Press, New York, 2 : 213-234.
- KRUSBERG, L.R. -1972- Fatty acid composition of Turbatrix aceti and its culture medium. Comp. Biochem. Physiol., 41 B : 89-98.
- 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.
- KRUSBERG, L.R. & BABINEAU, D.E., -1977- Application of plant tissue culture to plant nematology. In plant cell and tissue culture, principles and application. Edited by Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock and V. Raghavam, Ohio State University Press : Columbus, Chapter 21, pp 401-419.
- LEE, D.L. & ATKINSON, H.J. -1976- Physiology of nematodes. The Mac Millan Press, Ltd, London, 215p.
- LELLOUCH, M.J. -1964- Nuérations bactériennes, titrage des virus. Inst. Stat. Univ. Paris, Multigraph, 104 p.
- LINDERSTROM-LANG, K. -1937- Principle of the cartesian diver applied to gasometric technique. Nature, London, 140 : 108.
- LINDERSTROM-LANG, K. -1943- On the theory of the cartesian diver microrespirometer. Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, ser. Chim., 24 : 333-398.
- LINDERSTROM-LANG, K. and HOLTZER, H. -1942- Diffusion of gases through protective seals of oil or flottation medium in the cartesian diver. Compt. Rend. trav. Lab. Carlsberg, ser. Chim., 24 : 105-138.
- 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.
- LUC, M. -1957- Radopholus lavabri n.sp. (Nematoda : Tylenchidae) parasite du riz au Cameroun français. Nematologica, 2 : 144-148.
- LUC, M. & BERDON-BRIZUELA, R. -1961- Heterodera oryzae, n. sp. (Nematoda : Tylenchoidea) parasite du riz en Côte d'Ivoire. Nematologica, 6 : 272-279.
- LUC, M. & FORTUNER, R. -1975- Hirschmanniella soinicaudata. CIH Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 5, n° 68, 3p.
- LUC, M. & GOODEY, J.B. -1963- Hirschmanniella nom. nov. for Hirschmannia. Nematologica, 9 : 471.
- LUC, M. LESPINAT, P. & SOUCHAUD, B. -1969- Marquage direct de Hemicyclioophora paradoxa par le phosphore radioactif. Utilisation pour l'étude des déplacements des nématodes phytoparasites dans le sol. Nematologica, 15 : 35-43.
- LUC, M. & MERNY, G. -1963- Heterodera sacchari, n. sp. (Nematoda : Tylenchoidea) parasite de la canne à sucre au Congo-Brazzaville. Nematologica, 9 : 31-37.
- LUC, M. & TAYLOR, M. -1977- Heterodera oryzae. C.I.H. Descriptions of plant parasitic nematodes. Set 7, N° 91, 3p.
- MACRAE, I.C. & CASTRO, T.F. -1966- Carbohydrates and amino acids in the root exudates of rice seedlings. Phyton, 23 : 95-100.
- MADIN, K.A.C. & CROWE, J.H. -1975- Anhydrobiosis in nematodes : carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. J. Exp. Zool., 193 : 335-342.
- MAGAT, W.J., HUBBARD, W.J. & JESKA, E.L. -1972- Ascaris suum : quantitative chemical analysis of eggs and larvae. Expl. Parasit., 32 : 102-108.
- MARKS, C.F. -1971- Respiration responses of a Caenorhabditis sp and Aohelenchus avenae to the nematocide, 1, 2 dibromo-ethane (EDB) J. Nematol., 3 : 113-118.
- MARKS, C.F., THOMASON, I.J. & CASTRO, C.E. -1968- Dynamics of the permeation of nematodes by water, nematocides and other substances. Expl. Parasit., 22 : 321-337.
- MAYO, M.A. & THOMAS, P.R. -1971- Labelling of Longidorus elongatus and Xiphinema diversicaudatum with glucose (14 C). Nematologica, 17 : 23-28.
- Mc CLURE, M.A. -1977- Meloidogyne javanica : a metabolic sink. J. Nematol. 9 : 88-90.
- Mc CLURE, M.A. & BIRD, A.F. -1976- The tylenchid (Nematoda) egg shell : formation of the egg shell in Meloidogyne javanica. Parasitology, 72 : 29-39.
- Mc CLURE, M.A. & ROBERTSON, J. -1973- Infection of cotton seedlings by Meloidogyne incognita and a method of producing uniformly infected root segments. Nematologica, 19 : 425-434.
- Mc NAMARA, D.G. -1980- The survival of Xiphinema diversicaudatum in plant-free soil. Nematologica, 26 : 170-181.

- MERCER, E.K. & CAIRNS, E.J. -1973- Food consumption of the free-living aquatic nematode Pelodera chitwoodi. J. Nematol., 5 : 201-208.
- MERNY, G. -1966- Biologie d'Heterodera oryzae Luc et Berdon 1961. II. Rôle des masses d'oeufs dans la dynamique des populations et la conservation de l'espèce. Ann. Epiphyties, 17 : 445-449.
- MERNY, G. -1970a- Loi de croissance, sur plant de riz, d'une population endophyte d'Hirschmanniella spinicaudata (Nematoda : Tylenchoidea) en fonction d'un inoculum variable. Nematologica, 16 : 227-234.
- MERNY, G. -1970b- Les nématodes phytoparasites des rizières inondées de Côte d'Ivoire. I. Les espèces observées. Cah. ORSTOM, sér. Biol., 11 : 3-43.
- MERNY, G. -1972- Les nématodes des rizières inondées de Côte d'Ivoire. III. Etude sur la dynamique des populations de deux endoparasites: Hirschmanniella spinicaudata et Heterodera oryzae. Cah. ORSTOM, sér. Biol., 16 : 31-87.
- MERNY, G. & LUC, M. -1969- Les techniques d'échantillonnage des peuplements de nématodes dans le sol. In : Problèmes d'écologie : l'échantillonnage des peuplements animaux des milieux terrestres. Ed. par M. Lamotte, Paris, Masson, 237-272.
- MOJE, W. -1959- Structure and nematocidal activity of allylic and acetylenic halides. Agric. Food. Chem., 7 : 702-707.
- MORIARTY, F. -1963- Variance of counts from larval suspension of eelworms. Pl. Path., 12 : 177-179.
- MURFITT, R.R., VOGEL, K. & SANADI, D.R. -1976- Characterization of the mitochondria of the free-living nematode, Caenorhabditis elegans. Comp. Biochem. Physiol., 53 B : 423-430.
- MYERS, R.F. -1966- Osmoregulation in Panagrellus redivivus and Aphelenchus avenae. Nematologica, 12 : 579-586.
- MYERS, R.F. & KRUSBERG, L.R. -1965- Organic substances discharged by plant parasitic nematodes. Phytopathology, 55 : 429-437.
- NAPHADE, J.D. -1971- Oxygen relation in rice plant. Riso, 2 : 157-162.
- NETSCHER, C. -1969- L'ovogenèse et la reproduction chez Heterodera oryzae et H. sacchari (Nematoda : Heteroderidae). Nematologica, 15 : 10-14.
- NETSCHER, C. & PERNES, J. -1971- Etude concernant l'influence de la constitution génétique sur la longueur des larves d'Heterodera oryzae. Nematologica, 17 : 336-346.
- NETSCHER, C. & SEINHORST, J.W. -1969- Propionic acid better than acetic for killing nematodes. Nematologica, 4 : 286.
- NICHOLAS, W.L. -1975- The biology of free-living nematodes. Clarendon Press, Oxford.
- NICHOLAS, W.L. & JANTUNEN, R. -1966- The effect of different concentrations of oxygen and carbon dioxide on the growth and reproduction of Caenorhabditis briggsae. Nematologica, 12 : 328-336.
- NICHOLAS, W.L. & JANTUNEN, R. -1964- Caenorhabditis briggsae (Rhabditidae) under anaerobic conditions. Nematologica, 10 : 409-418.
- NICHOLAS, W.L. & STEWART, A.C. -1978- The calorific value of Caenorhabditis elegans (Rhabditidae). Nematologica, 24 : 45-50.
- NIELSEN, C.O. -1949- Studies on the soil microfauna : The soil inhabiting nematodes. Nat. Jutl., 2 : 1-131.
- NIGON, V. & FOURCHE, J. -1958- La précision des mesures respirométriques réalisées à l'aide du ludion. Bull. biol. France et Belg., 17 : 36-54.
- OGUNFOWORA, A.O. -1979- Factors affecting emergence, survival and infectivity of Meloidogyne naasi. Nematologica, 24 : 72-80.
- cyst
- OHSHIMA, Y. -1974- Heterodera elachista n.sp., an upland rice ~~and~~ nematode from Japan. Jap. J. Nematol., 4 : 51-56.
- ORTON WILLIAMS, K.J. -1972- Meloidogyne javanica. CIH Descriptions of plant parasitic nematodes, Set 1, n° 3, 4 pp.
- PALADE, G.E. -1959- Functional changes in structures of cell components. In : Subcellular particles, Edited by T. Ayashi, Ronald Press c°, New York, 64-83.
- PASSEY, R.F. & FAIRBAIRN, D. -1957- The conversion of fat to carbohydrates during embryonation of Ascaris eggs. Can. J. Biochem. Physiol., 35 : 511-525.
- PATEL, T.R. & Mc FADDEN, B.A. -1978a- Axenic and synchronous cultures of Caenorhabditis elegans. Nematologica, 24 : 51-62.
- PATEL, T.R. & Mc FADDEN, B.A. -1978b- Caenorhabditis elegans and Ascaris suum : Inhibition of isocitrate lyase by itaconate. Exol. Parasit., 44 : 262-268.

- FERRY, R.N. -1977- Water content of the second stage larva of Heterodera schachtii during the hatching process. Nematologica, 23 : 431-437.
- PETERS, B.G. -1941- Dilution egg counts and the Poisson distribution series. J. Helminth., 19 : 59-62.
- PETERS, B.G. -1952- Toxicity tests with vinegar eelworm. I. Counting and culturing. J. Helminth., 26 : 97-110.
- PHILLIPSON, J. -1964- A miniature bomb calorimeter for small biological samples. Oikos, 15 : 130-139.
- POLONOWSKI, M., BOULANGER, P., MACHEBOEUF, M. & ROCHE, J. -1966- Biochimie médicale. Fascicule I : Les constituants de la matière vivante, 238 pp. Fascicule II : Enzymes et métabolisme, Paris, Masson, 431 p.
- PRESSAT, R. -1973- L'analyse démographique. Presses Universitaires de France, Paris. 321 pages.
- PROT, J.C. -1975- Recherches concernant le déplacement des juvéniles de Meloidogyne spp. vers les racines. Cah. ORSTOM, sér. Biol., 10 : 251-262.
- RAALTE, M.H., VAN, -1941- On the oxygen supply of rice roots. Ann. Bot. Garden Buitenzorg, 51 : 43-57.
- RAALTE, M.H., VAN, -1942- On the oxidation of the environment by the roots of rice (Oryza sativa L.). Syokubutu-Iko, 1 : 15-34.
- RAHEMTULLA, F. & LOVTRUP, S. -1974- The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides. II. Nematoda, Annelida. Comp. Biochem. Physiol., 49 B : 639-676.
- RAO, Y.S. & JAYAPRAKASH, A. -1977- Leaf chlorosis due to infestation by a new nematode. International Rice Research Letter.
- RAO, Y.S. & JAYAPRAKASH, A. -1978- Heterodera oryzicola n.sp. (Nematoda : Heteroderidae) a new nematode on rice (Oryza sativa L.) from Kerala state, India. Nematologica, 24 : 341-346.
- REINDERS, W. & VLES, S.L., -1925- Reaction velocity of oxygen with solutions of some inorganic salts. III. The catalytic oxidation of sulfites. Rec. Trav. Chim., 44 : 249-268.
- RITTER, M. -1965- Ecologie et cycles évolutifs des nématodes phytoparasites. Relation hôte parasite chez les nématodes phytophages. In : Grassé, P.P. (Edit.). Traité de Zoologie, Paris, Masson, 5 (2) : 464-501.
- RITZROW, H. & KAMPF, L. -1971- Untersuchungen zur Respiration normaler und wirkstoffbeeinflusster Nematoden. Nematologica, 17 : 325-335.
- ROBINSON, R.A. & STOKES, R.H. -1949- Tables of osmotic and activity coefficients of electrolytes in aqueous solutions at 25°C. Trans. Faraday Soc., 45 : 612-624.
- ROCHER, H. -1943- Micromanomètre basé sur le principe du ludion. Bull. Soc. Chim. Biol., 10 : 486-492.
- ROGERS, W.P. -1949- On the relative importance of aerobic metabolism in small nematode parasites of the alimentary tract. Aust. J. Sci. Res. Sec., 2 B : 157-174.
- ROGERS, W.P. -1962- The nature of parasitism. Academic Press New York & London. 287 pages.
- ROHDE, R.A. -1960- The influence of carbon dioxide on respiration of certain plant parasitic nematodes. Proc. helminth. Soc. Wash., 27 : 160-164.
- ROHDE, R.A. -1971- Respiration. In : Plant parasitic nematodes. Edited by B.M. Zuckerman, W.F. Mai and R.A. Rohde. Academic Press, New York and London. Vol. II, Chapter 23 : 235-246.
- ROHDE, R.A. & Mc CLURE, M.A. -1975- Autoradiography of developing syncytia in cotton roots infested with Meloidogyne incognita. J. Nematol., 7 : 64-69.
- ROTHSTEIN, M. -1963- Nematode biochemistry - II. Excretion products. Comp. Biochem. Physiol., 9 : 51-59.
- ROTHSTEIN, M. -1980- Aging and the alteration of enzymes : a review. Mechanisms of Aging and development, 4 : 325-338.
- ROTHSTEIN, M. & GOTZ, P. -1968- Biosynthesis of fatty acids in the free living nematode, Turbatrix acati. Archs Biochem. Biophys., 126 : 131-140.
- RUBIN, H. & TRELEASE, R.N. -1975- Ultrastructure of developing Ascaris larvae undergoing lipid to carbohydrate interconversion. J. Parasitol., 61 : 577-588.
- RUTHERFORD, T.A. & WEBSTER, J.M. -1974- Transcuticular uptake of glucose by the entomophilic nematode Meris nigrescens. J. Parasit., 60 : 804-808.
- RYDING, S.O. & FORSBERG, A. -1977- A mercury-free accelerated method for determining the chemical oxygen demand of large numbers of water samples by autoclaving them under pressure with acid dichromate. Water Res., 11 : 801-805.

- SANTMYER, P.H. -1956- Studies on the metabolism of Panagrellus redivivus (Nematoda : Caphalobidae). Proc. Helminth. Soc. Wash., 23 : 30-36.
- SAYRE, R.M. -1980- Promising organisms for biocontrol of nematodes. Plant disease, 64 : 526-532.
- SCHUURMANS-STEKHOUVEN, J.V. -1944- Expl. Parc Natn. Albert, 9 : 1-31.
- SCHWABE, C.W. 1957- Observations on the respiration of free-living and parasitic Nippostrongylus muris larvae. Amer. J. Hyg., 65 : 325-337.
- 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. -1959- A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. Nematologica, 4 : 67-69.
- SEINHORST, J.W. -1950- De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting dor het stengelaaaltje (Ditylenchus sipsaci (Kühn) Filipjev). Tijdschr. Pl. Ziekt., 56 : 291-349.
- SEMBDNER, G. OSSKE, G. & SCHREIBER, K. -1961- Untersuchungen zur Atmung des Kartoffelnematoden Heterodera rostochiensis Woll. Biol. Z. Bl., 80 : 551-561.
- SHEPHERD, A.M. -1962a- New blue R, a staine that differentiates between living and dead nematodes. Nematologica, 8 : 201-208.
- SHEPHERD, A.M. -1962b- The emergence of larvae from cysts in the genus Heterodera. Technical Communication n° 32 of the Commonwealth Bureau of Helminthology St Albans. CAB Farnham Royal Bucks, England, 1 vol., 90 pp.
- SHER, S.A. -1968- Revision of the genus Hirschmanniella Luc & Goodey, 1963 (Nematoda : Tylenchoidea). Nematologica, 14 : 243-275.
- SHIMIZU, K. -1975- Intake of labelled nutrient by Heterodera elachista at different developmental stages. Jap. J. Nematol., 5 : 32-35.
- SLACK, D.A., RIGGS, R.D. & HAMBLEN, M.L. -1972- The effect of temperature and moisture on the survival of Heterodera glyclines in the absence of a host. J. Nematol., 4 : 263-266.
- SIVAPALAN, P. & JENKINS, W.R. -1966- Phospholipids and long chain fatty acid composition of the nematode Panagrellus redivivus. Proc. Helm. Soc. Wash., 33 : 149-157.
- SHYTH, J.O. -1969- Parasites as biological models. Parasitology, 59 : 73-91.
- STANNARD, J.N., MCCOY, G.R. & LATCHFORD, W.B. -1938- Studies on the metabolism of Trichinella spiralis larvae. Amer. J. Hyg., 27 : 666-682.
- STEPHENSON, W. -1942- The effects of variations in osmotic pressure upon a free-living soil nematode. Parasitol., 34 : 253-265.
- STOLZY, L.H. & VAN GUNDY, S.D. -1968- The soil as an environment for microflora and microfauna. Phytopathology, 58 : 889-899.
- STONER, L.C. & DUNHAM, P.B. -1970- Regulation of cellular osmolarity and volume in Tetrahymena. J. Exp. Biol., 53 : 391-399.
- STOREY, R.M.J. -1983- The initial neutral lipid reserves of juveniles of Globadera spp. Nematologica, 29 : 144-150.
- TAYLOR, D.P. -1978- Parasitism of banana by Heterodera oryzae. Revue Nématol., 1 : 165-169.
- TAYLOR, D.P. & NETSCHER, C. -1974- An improved technique for preparing perineal patterns of Meloidogyne spp. Nematologica, 20 : 268-269.
- TEISSIER, G. -1934- Recherches sur le vieillissement et les lois de la mortalité. Ann. Physiol. Physico Chim. biol., 10 : 237-284.
- THOMASON, I.J., VAN GUNDY, S.D. & KIRKPATRICK, J.D. -1964- Motility and infectivity of Meloidogyne javanica as affected by storage time and temperature in water. Phytopathology, 54 : 192-195.
- TILBY, M.J. & MOSES, V. -1975- Nematode ageing. Automatic maintenance of age synchrony without inhibitors. Exp. Gerontol., 10 : 213-223.
- TRACEY, M.V. -1958- Cellulase and chitinase in plant nematodes. Nematologica, 3 : 179-183.
- TURNER, D.R. & CHAPMAN, R.A. (1972). Infection of seedlings of alfalfa and red clover by concomitant populations of Meloidogyne incognita and Pratylenchus penetrans. J. Nematol., 4 : 280-286.
- UMBREIT, W.W., SUPPIS, R.H. and STAUFFER, J.F. -1966- Manometric techniques. Burgess Publishing Co, Minneapolis, U.S.A., 338 p.
- VAN GUNDY, S.D. -1965- Factors in survival of nematodes. Ann. Rev. Phytopath., 3 : 43-68.

- VAN GUNDY, S.D., BIRD, A.F. & WALLACE, H.R. -1967- Aging and starvation in larvae of Meloidogyne javanica and Tylenchulus semidenetrans. Phytopathology, 57 : 559-571.
- VIQUIERCHIO, D.R., CROLL, N.A. & GORTZ, J.H. -1969- The physiological response of nematodes to osmotic stress and an osmotic treatment for separating nematodes. Nematologica, 15 : 15-21.
- WALKER, P.A. -1965- The structure of the fat body in normal and starved cockroaches as seen with the electron microscope. J. Insect Physiol., 11 : 1625-1631.
- WALLACE, H.R. -1958- Movement of eelworm. II. A comparative study of the movement in soil of Heterodera schachtii Schmidt and of Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev. Ann. Appl. Biol., 46 : 86-94.
- WALLACE, H.R. -1961- The bionomics of the free-living stages of zoo-parasitic and phyto-parasitic Nematodes - a critical survey. Helminth. Abstr., 30 : 1-22.
- WALLACE, H.R. -1963- The biology of plant parasit nematodes. Edward Arnold, London, 1 vol. 280 pp.
- WALLACE, H.R. -1966a- The influence of moisture stress on the development, hatch and survival of eggs of Meloidogyne javanica. Nematologica, 12 : 57-60.
- WALLACE, H.R. -1966b- Factors influencing the infectivity of plant parasitic nematodes. Proc. Roy. Soc., London, 164 B : 592-614.
- WALLACE, H.R. -1968- The influence of soil moisture on survival and hatch of Meloidogyne javanica. Nematologica, 14 : 231-242.
- WALLACE, H.R. -1971a- The influence of temperature on embryonic development and hatch in Meloidogyne javanica. Nematologica, 17 : 179-186.
- WALLACE, H.R. -1971b- Abiotic influence in the soil environment. In : Plant parasitic nematodes, ed. by Zuckerman, B.M., Mai, W.F. & Rohde, R.A., Academic Press, New York & London, 1 : 257-280.
- WALLACE, H.R. -1974- The influence of rootknot nematode, Meloidogyne javanica, on photosynthesis and on nutrient demand by roots of tomato plant. Nematologica, 20 : 27-33.
- WALLACE, H.R. & GREET, D.N. -1964- Observations on the taxonomy and biology of Tylenchorhynchus macrurus (Goodey, 1932) Filipjev 1936 and Tylenchorhynchus icarus sp. nov. Parasitology, 54 : 129-144.
- WANG, E.L.H. & BERGESON, G.B. -1978- Amino acids and carbohydrates secreted by Meloidogyne javanica. J. Nematol., 10 : 367-368.
- WARD, C.W. & FAIRBAIRN, D. -1970- Enzymes of B oxidation and their function during development of Ascaris lumbricoides eggs. Develop. Biol., 22 : 366-387.
- WEBER, R.F. & VAN MARREWIK, W.J.A. - 1972- Free amino acids in the shrimp Crangon and their osmoregulatory significance. Neth. J. Sea Res., 5 : 391-514.
- WIGGLESWORTH, V.B. -1967- Cytological changes in the fat body of Rhodnius during starvation, feeding and oxygen want. J. Cell. Sc., 2 : 243-256.
- WILSON, P.A.G. -1965a- Changes in lipid and nitrogen content of Nippostrongylus brasiliensis infective larvae aged at constant temperature. Exp. Parasitol., 16 : 190-194.
- WILSON, P.A.G. -1965b- The effect of temperature change on the oxygen uptake of the infective larvae of Nippostrongylus brasiliensis. Exptl. Parasitology, 17 : 318-325.
- WILSON, P.A.G. -1976- The ageing process in infective larvae of the roundworms Haemonchus contortus and Nippostrongylus brasiliensis: carbohydrate content. Z. Parasitkde, 49 : 243-252.
- WISSE, E. & DAEMS, W. -1968- Electron microscopic observations on second stage larvae of the potato-root eelworm Heterodera rostochiensis. J. Ultrastruct. Res., 24 : 210-231.
- WOOD, F.C. & GOODEY, J.B. - 1957- Effects of gamma ray irradiation on nematodes infesting cultivated mushroom beds. Nature, 180 : 760-761.
- YOSHIDA, S., OHNISHI, Y. & KITAGISHI, K. -1959- Role of silicon in rice nutrition. Soil. Pl. Food, 5 : 127-133.
- YOSHIDA, T. -1971- Microbial metabolism of flooded soils. In : Paul, E.A. & McLaren, A.C. (Eds). Soil biochemistry, New York, Marcel Dekker, 3 : 83-122.
- ZEELON, P. GERSHON, H. & GERSHON, D. -1973- Inactive enzyme molecules in aging organisms. Nematode fructose 1-6 diphosphate aldolase. Biochemistry, 12 : 1743-1750.
- ZEUTHEN, E. -1950- Cartesian diver respirometer. Biol. Bull., 98 : 139-143.
- ZEUTHEN, E. -1955- Comparative physiology. Ann. Rev. Physiol., 17 : 459-482.
- ZMORAY, I. -1970- The ecological aspect of the study of the intestinal ultrastructure of nematodes. Z. Parasitenkde, 39 : 127-135.

ZUCKERMAN, B.M. -1971- Gnotobiology, in : Plant parasitic nematodes. Edited by B.M. Zuckerman, W.F. Mai and R.A. Rohde. Academic Press, New York and London, Vol. II, Chapter 20, 159-184.

ZUCKERMAN, B.M. -1976- Nematodes as models for aging studies. In : The organisation of nematodes, edited by N.A. Croll, Academic Press, London, pp. 211-241.

ZUCKERMAN, B.M., HIMMELHOCH, S., NELSON, B., EPSTEIN, J. & KISIEL, M. -1971- Aging in Caenorhabditis briggsae. Nematologica, 17 : 478-487.

ANNEXE 1LE MARQUAGE D'HETERODERA ORYZAE ET D'HETERODERA SACCHARIPAR LE SOUFRE RADIOACTIF ^{35}S .1 - PRINCIPE

Le marquage radioactif des nématodes phytoparasites a été réalisé principalement avec le phosphore ^{32}P (Dropkin & King, 1956 ; Luc et al., 1969 ; Shimizu, 1975), le carbone ^{14}C (Mayo & Thomas, 1971 ; Wallace, 1974 ; Bird & Loveys, 1975 ; Shimizu, 1975 ; Mc Clure, 1977) et le tritium ^3H (Rohde & Mc Clure, 1975).

A notre connaissance le soufre ^{35}S n'a pas encore été utilisé pour de telles études. Cet isotope, cependant, présente un certain nombre d'avantages. Tout d'abord, sa demi-vie radioactive, de 88 jours, le rend plus adopté que le phosphore ^{32}P , dont la demi-vie radioactive est de quatorze jours, pour le marquage des nématodes phytoparasites, dont le cycle de développement est généralement compris entre quatre et huit semaines. Par ailleurs, le soufre ^{35}S peut être ajouté comme sulfate soluble à l'eau d'irrigation de la plante, tandis que le carbone ^{14}C doit être fourni à la plante sous forme gazeuse, ce qui implique un équipement complexe.

La méthode décrite ici permet d'obtenir des juvéniles d'Heterodera oryzae et d'Heterodera sacchari marqués par le soufre ^{35}S . Le marquage est obtenu en développant ces deux espèces sur un milieu nutritif contenant à l'état dissout du sulfate de sodium radioactif, $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$. Les animaux marqués sont ensuite détectés au cours de leur utilisation par autoradiographie.

2 - MATERIEL ET METHODES

Production de nématodes marqués.

Dans des boîtes cylindriques en matière plastique sont introduits 250 ml de solution nutritive d'Hoagland, la dose nécessaire de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ et 500 ml de terre stérile. On repique dans chaque boîte dix plantules de riz (Morobérékan), puis dix jours après, chaque boîte est inoculée avec 8 000 juvéniles de l'une ou l'autre espèce. Au cours d'une première expérience effectuée avec Heterodera oryzae six doses ont été expérimentées : 0-0,03-0,1-0,3-1 et 3 mCi/boîte. Au cours d'une seconde expérience, portant sur les deux espèces, deux doses ont été utilisées : 0 et 0,3 mCi/boîte.

Cinq semaines après l'inoculation les masses d'oeufs et les kystes d'Heterodera oryzae sont récoltés et placés dans du NaCl 0,3 M qui inhibe les éclosions. On procède de même pour les kystes d'Heterodera sacchari, huit semaines après l'inoculation.

Effets de la dose chez Heterodera oryzae

Des masses d'oeufs provenant des récoltes des six doses d'isotopes sont mises à éclore dans l'eau pendant trois jours. Une partie des juvéniles éclos est colorée au bleu coton (De Guiran, 1966), puis l'intensité de leur marquage est déterminé par autoradiographie. Le reste des juvéniles est inoculé sur des pots de riz (1 000 juvéniles par pot sur trois pots par dose) puis les animaux descendants sont récoltés cinq semaines après, mis à éclore pendant quatre semaines, et les juvéniles éclos sont comptés.

Détection des juvéniles par autoradiographie

Sur des feuilles de bristol quadrillées, les animaux précédemment colorés sont déposés individuellement puis fixés par une goutte de vernis transparent (épaisseur après séchage : environ 30 μm).

Un film radiographique Kodak Kodirex est appliqué et pressé fermement sur le bristol. Quatre temps d'exposition (1, 2, 3 et 4 semaines) ont été essayés.

Après le temps d'exposition requis, les films sont développés dans le révélateur Radio Kodak LX 24 durant 3 mn, rincés pendant 2 mn puis fixés dans le fixateur Radio Kodak AL 4 durant 8 mn.

Relation entre la dose d'isotope radioactif et l'intensité des images autoradiographiques

A partir de la solution d'origine de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, on prépare quatre dilutions (à 1, 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) pour chacune desquelles la radioactivité est évaluée en scintillation liquide et par autoradiographie.

La mesure en scintillation liquide est effectuée avec spectromètre à scintillation liquide, type SL 30 Intertechnique. On introduit 100 ul de la dilution dans une fiole contenant 10 ml de liquide scintillant (deux volumes de toluène ; 1 volume de triton X 100 ; 5g/l de PPOP, 1,5 phényloxazolyl benzène).

Les dilutions sont déposées sur des feuilles de bristol comme précédemment à raison de 0,4 ul par dépôt. Après séchage et protection des dépôts par du vernis, des films sont appliqués sur ces feuilles pendant une, deux, trois, ou quatre semaines, puis traités comme précédemment.

3 - RESULTATS

Effet de la dose sur l'intensité du marquage chez d'*Heterodera oryzae*

La figure 93 présente, pour chacune des vingt combinaisons temps d'exposition-dose, l'aspect de deux spots autoradiographiques dus à des juvéniles d'*Heterodera oryzae* marqués. Pour chacun des temps d'exposition la proportionnalité entre la dose et la surface du spot est bien marquée. Par contre, pour les deux plus fortes doses, le temps

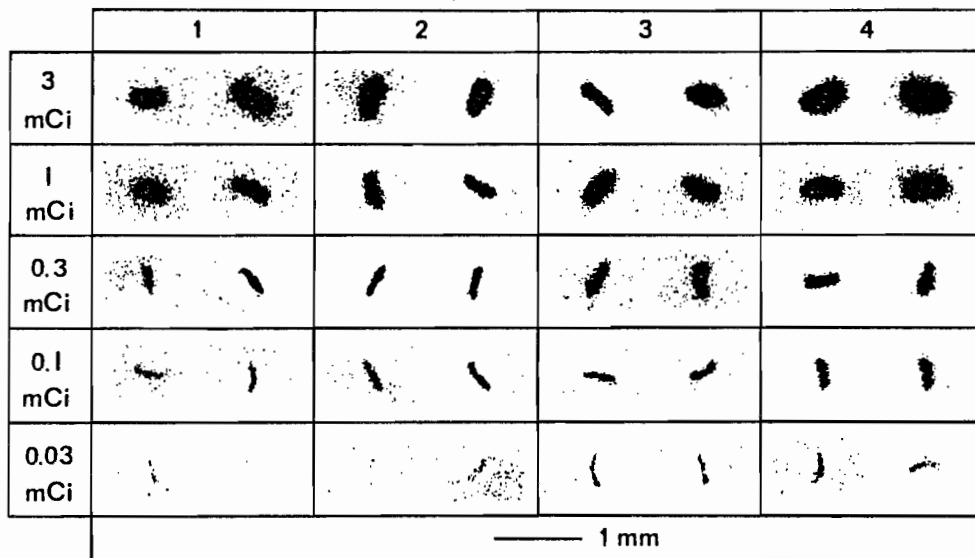


Fig. 93. - Reproduction photographique des spots autoradiographiques obtenus par l'exposition de juvéniles d'*Heterodera oryzae* marqués par le ^{35}S (chiffres horizontaux : temps d'exposition en semaines; chiffres verticaux : dose d'isotope radioactif par boîte d'élevage; deux spots pour chacune des 20 combinaisons).

TABLEAU 25 Effet de la dose de marquage de ^{35}S sur la fécondité des juvéniles marqués d'*Heterodera oryzae* (Moyenne de 3 répétitions \pm écart type)

Dose par boîte d'élevage (mCi)	Nombre de juvéniles descendants
0	50 400 \pm 8 000
0,03	61 300 \pm 6 000
0,1	76 000 \pm 8 000
0,3	46 900 \pm 6 000
1,0	27 500 \pm 5 000
3,0	3 500 \pm 1 000

d'exposition affecte peu la surface du spot. La descendance des juvéniles marqués (tableau 25) est significativement diminuée aux doses 1 et 3 mCi/pot.

Relation entre la dose d'isotope radioactif et la densité des images autographiques

Les activités des dilutions de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ sont données par le tableau 26 et l'intensité des spots autoradiographiques par la figure 94. La solution à 10^{-3} n'a donné aucun spot détectable et n'a donc pas été représentée.

Le marquage

Le marquage obtenu au cours de ce travail est durable, même lorsqu'il y a eu mue des animaux après l'infestation des racines. Ceci prouve qu'il y a eu incorporation du ^{35}S dans les structures stables de l'animal ; on peut en particulier penser aux acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) qui existent dans les protéines. Pour des raisons de sensibilité, la détermination du marquage d'un seul juvénile en scintillation liquide est impossible. Il est néanmoins possible d'obtenir un ordre de grandeur du marquage réalisé en comparant les spots autoradiographiques donnés par les figures 93 et 94. On peut estimer que chaque nématode correspond à une source dont l'activité est intermédiaire entre les deux dilutions 10^{-2} et 10^{-1} , ce qui correspond à des sources de 0,8 à 8 pCi. Ceci est en accord avec les résultats de Mayo & Thomas (1971), qui, utilisant du carbone ^{14}C , obtiennent des spots autoradiographiques semblables à ceux de la figure 93 pour des intensités de marquage individuel de l'ordre de 6 pCi.

Le marquage provoque des effets secondaires certains sur la biologie des nématodes. L'effet le plus évident concerne la reproduction aux fortes doses (1 et 3 mCi, tableau 25). Ces effets des rayonnements sur la reproduction des nématodes ont déjà été observés pour les rayons (Wood & Goodey, 1957) et les rayons UV (Green & Plumb, 1967). Par ailleurs, on observe une tendance à la stimulation des nématodes aux doses moyennes (0,1 et 0,3 mCi/boîte), la reproduction étant supérieure

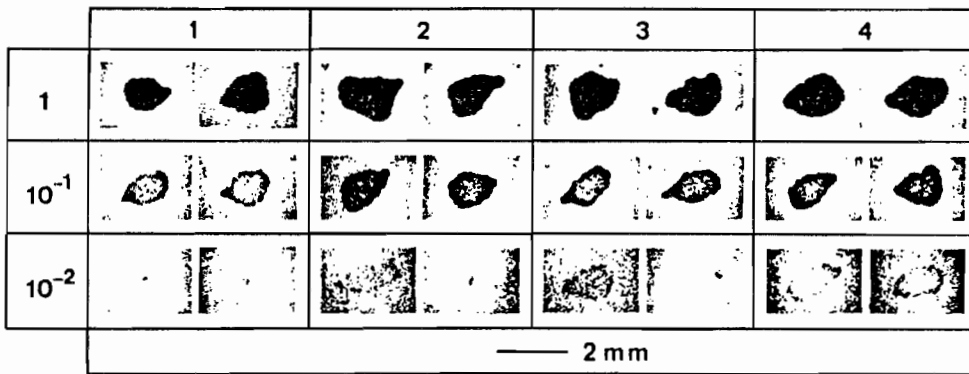


Fig. 94. - Reproduction photographique des spots autoradiographiques obtenus par exposition des dépôts de trois dilutions de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (chiffres horizontaux : temps d'exposition en semaines; chiffres verticaux : dilutions dont les activités sont données par le tableau 26; deux spots pour chacune des 12 combinaisons).

TABLEAU 26 Radioactivité (coups par minute) d'une série de solutions de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$

Concentration	Activité mesurée cpm/100 ul	Activité calculée cpm/0,4 ul (1)
1	42 910 ± 270	171
10^{-1}	4 357 ± 21	17
10^{-2}	524 ± 25	1,7
10^{-3}	155 ± 6	0,2
0	106 ± 2	-

(1) Correspond aux activités ayant provoqué les spots autoradiographiques de la figure 44.

(tableau 25). On observe que le pourcentage correspondant à l'animal marqué est toujours supérieur à celui correspondant à l'animal non marqué dans l'expérience réciproque. Cela suggère que le marquage pourrait stimuler le pouvoir infestant. Cette observation reste à confirmer ; cependant, il conviendrait de prendre une dose de marquage plus faible. Compte tenu de la netteté des spots obtenus (fig. 93), la dose de 0,1 mCi/boîte paraîtrait plus appropriée dans les conditions retenues (500 ml de terre - 250 ml de solution nutritive - une dizaine de plantules de riz).

ANNEXE 2

LA FABRICATION DES LUDIONS A BOUCHON DE VERRE

1 - PROPRIETES DU LUDION

La mise au point de la méthode de fabrication de ce ludion nécessitait la connaissance de propriétés dont la formulation, à partir des paramètres de construction du ludion décrit (fig. 66), était trop complexe. Ces propriétés ont donc été étudiées sur un modèle théorique simplifié, représenté par la figure 95.

On considère un tronçon de capillaire cylindrique en pyrex, de diamètre interne (d) et d'épaisseur (e) uniformes, immergé dans du liquide de flottaison. Une partie de ce tronçon est occupée par une bulle d'air de longueur L_g et de volume V_g , tandis que le reste de longueur L_l est rempli de liquide de flottaison. Les ménisques sont supposés plans.

Propriétés du modèle théorique simplifié

A partir des deux paramètres d et L_g , le volume gazeux V_g est donné par la relation :

$$V_g = \pi \times d^2 \times L_g / 4$$

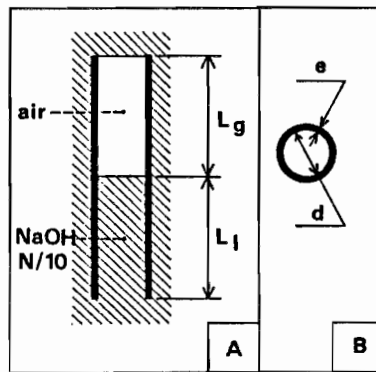


Fig. 95. - Le modèle théorique simplifié du ludion (A : coupe longitudinale. B : coupe transversale).

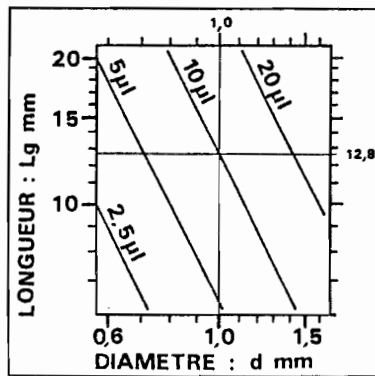


Fig. 96

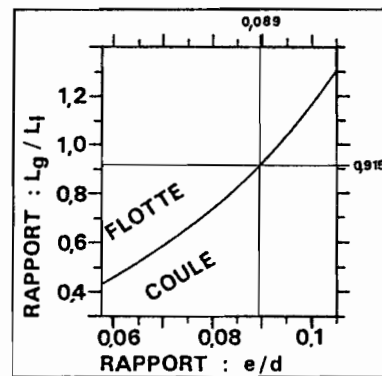


Fig. 97

Fig. 96. - Volume gazeux du modèle théorique simplifié (Voir également le texte).

Fig. 97. - Flottabilité du modèle théorique simplifié (Voir également le texte).

D'après cette relation, pour un volume gazeux donné, la représentation graphique de L_g en fonction de d se traduit en coordonnées logarithmiques par une droite. Le graphique de la figure 96 représente ces droites pour quatre valeurs de V_g . Par exemple, d'après ce graphique, dans un capillaire de 1 mm de diamètre interne, une bulle gazeuse de 10 ul de volume aurait une longueur de 12,8 mm.

A partir des quatre paramètres d , e , L_g , et LI , on peut calculer le volume du pyrex V_v , constituant le modèle théorique simplifié, donné par la relation :

$$V_v = \pi \times e \times (e + d) \times (L_g + LI)$$

Ce volume de pyrex et la masse du ludion sont liés par la relation :

$$m = V_v \times D_v$$

Le modèle théorique simplifié flotte si la masse du liquide déplacé est supérieure à la masse du ludion ; cette situation est traduite par la relation :

$$D_s \times (V_v + V_g) > m$$

Après remplacement de V_g , V_v et m par leurs valeurs données respectivement par les relations précédentes, la résolution de cette relation conduit à la relation explicite :

$$\frac{L_g}{LI} > \frac{4 \times \frac{e}{d} \times \left(1 + \frac{e}{d}\right) \times (D_v - D_s)}{D_s - 4 \times \frac{e}{d} \times \left(1 + \frac{e}{d}\right) \times (D_v - D_s)}$$

D'après cette relation, la représentation graphique du rapport limite L_g/LI au fonction du rapport e/d se traduit par la courbe

de la figure 97. Sur cette figure, l'ensemble des paramètres d'un modèle théorique simplifié est représenté par un point d'abscisse égale à e/d et d'ordonnée égale à L_g/LI . Si ce point est situé au-dessus de la courbe, le modèle flotte et le modèle coule si ce point est situé en dessous de la courbe.

Pour reprendre l'exemple chiffré précédent ($d = 1 \text{ mm}$, $V_g = 10 \text{ ul}$ et $L_g = 12,8 \text{ mm}$) nous fixerons la valeur de LI à 14 mm , valeur qui sera justifiée et utilisée par la suite. Le rapport L_g/LI est alors égal à $0,915$. Sur la graphique de la figure 97, on trace l'horizontale d'ordonnée L_g/LI égale à $0,089$. Cette valeur est appelée rapport critique. Pour que le modèle théorique simplifié flotte, il faut que son rapport e/d soit inférieur au rapport critique.

2 - PRINCIPE DE LA FABRICATION DU LUDION

Les calculs précédents sont adaptables au modèle décrit en considérant la longueur LI comme équivalente à la somme de la longueur de liquide flottaison dans la chambre respiratoire et de la longueur du bouchon.

Outre ce premier paramètre LI fixé par la fabrication, deux autres paramètres sont à choisir. L'un, le volume gazeux V_g est choisi en fonction de l'intensité respiratoire à mesurer. Nos essais ont cependant été limités à des volumes compris entre $2,5 \text{ ul}$ et 20 ul . L'autre, le diamètre interne du ludion, d , est choisi en fonction de l'encombrement de l'animal étudié ou des dispositifs qui permettent l'introduction de l'animal étudié dans la chambre respiratoire. On s'impose un diamètre, mais avec une certaine tolérance, par exemple de $0,95$ à $1,05 \text{ mm}$. Les ludions d'une série présentant le même volume gazeux sont d'autant plus semblables que cette tolérance est faible.

Une fois fixés ces trois paramètres LI , V_g et d , les figures 96 et 97 permettent de déterminer respectivement la longueur de la bulle gazeuse et le rapport critique. La fabrication d'un ludion se déroule alors en deux étapes successives.

Fabrication d'un assemblage capillaire

On découpe dans un capillaire deux tronçons dont l'un peut pénétrer dans l'autre et s'y bloquer par rotation. La partie mâle de l'assemblage constituera la chambre respiratoire du ludion, et la partie femelle constituera le bouchon du ludion. On vérifie que le diamètre d convient et que le rapport e/d est inférieur au rapport critique.

Finition du ludion

Chacun des deux tronçons de l'assemblage est façonné jusqu'à sa forme définitive et la masse de l'ensemble est ajustée à la valeur m .

3 - FABRICATION DU LUDION

On décrira la fabrication du ludion correspondant à l'exemple chiffré précédent ($L_I = 14$ mm, $V_g = 10$ ul, $L_g = 12,8$ mm, arrondi à 13 mm, $0,95 < d < 1,05$ mm, rapport critique = $0,089$ m = 18,17 mg).

Fabrication d'un assemblage capillaire

Un tube de pyrex (diamètre interne 14-15 mm, épaisseur 1,5-1,8 mm) est étiré au chalumeau. Après un chauffage uniforme par rotation, le tube est immobilisé une à deux secondes dans la flamme. Cette surchauffe dissymétrique ovalise la section. Le tube est alors sorti de la flamme, étiré, et le produit de l'étirage est coupé en son centre et à ses deux extrémités : on obtient deux capillaires légèrement coniques.

La recherche de l'assemblage capillaire est représentée par la figure 98.

Un des capillaires précédemment obtenus est coupé, à l'aide d'une cristal de carborundum, en tronçons consécutifs de 30 mm (fig. 98 A). Chaque tronçon étant conique, on mesure le plus petit de ses diamètres internes d et l'épaisseur correspondante e (fig. 98 B). Pour cela on utilise une loupe binoculaire, munie d'un micromètre oculaire

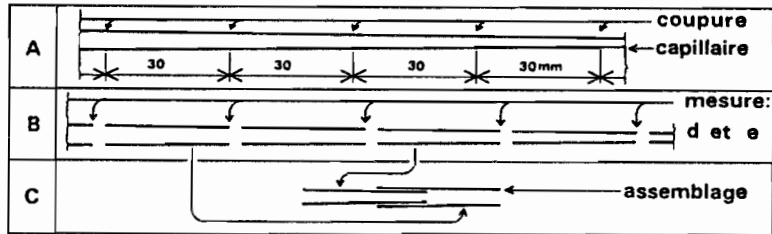


Fig. 98. - Fabrication du ludion : recherche d'un assemblage capillaire. (Les étapes A, B et C sont commentées dans le texte. La conicité du capillaire représenté est volontairement exagérée).

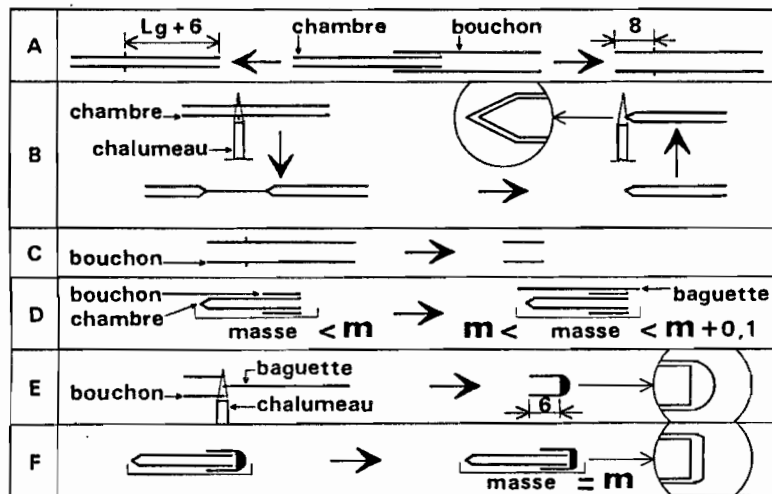


Fig. 99. - Fabrication du ludion : finition. (Les étapes A, B, C, D, E et F sont commentées dans le texte).

étalonné, sous laquelle chaque tronçon est présenté verticalement. Si aucun des tronçons ne présente le diamètre requis, (de 0,95 à 1,05 mm) le tout est éliminé. Si l'un d'eux convient, on calcule son rapport e/d que l'on compare au rapport critique (0,089). Si le rapport trouvé est supérieur au rapport critique, le tout est éliminé. Si le rapport trouvé est inférieur au rapport critique, le tronçon est considéré désormais comme la future chambre respiratoire du ludion. On cherche alors (fig. 74 C) parmi les autres tronçons du même capillaire, celui qui peut constituer le bouchon. Il est parfois nécessaire de fractionner ce deuxième tronçon pour y trouver la portion la plus apte à réaliser le bouchon.

Un morceau du même tube qui a servi à fabriquer les capillaires, est chauffé au chalumeau jusqu'à formation d'une masse homogène, puis étiré. La tige obtenue est coupée en baguettes de 50 mm. Chacune est pesée et rangée selon sa masse (de mg en mg). Une pince à ongles permet à l'aide d'un papier millimétré de couper des morceaux de 0,5 mm de ces baguettes, soit 1/100 de la masse initiale. Ces baguettes serviront ultérieurement à ajuster la masse du ludion.

Finition du ludion

La figure 99 représente les six opérations qui constituent la finition du ludion.

A - Traçage. Sur le tronçon mâle de l'assemblage (future chambre respiratoire) on trace un repère à l'encre à une distance égale à $L_g + 6$ à partir de l'extrémité entrante (soit à $13 + 6 = 19$ mm). Sur le tronçon femelle de l'ensemble (futur bouchon, on trace un repère à l'encre à une distance de 8 mm à partir de l'extrémité pénétrée. La somme de ces longueurs fixes (6 mm pour la chambre respiratoire et 8 mm pour le bouchon) représente la valeur du paramètre LI égale à 14 mm.

B - Finition de la chambre respiratoire. A l'aide d'un microchalumeau, le tronçon mâle de l'assemblage est étiré au niveau du repère, puis la partie excédentaire est coupée et éliminée. L'extrémité de la chambre respiratoire est fermée soigneusement à l'aide du microchalumeau.

C - Coupure du bouchon. A l'aide d'un cristal de carborundum, le tronçon femelle de l'assemblage est coupé au niveau du repère et la partie excédentaire est éliminée.

D - Premier ajustement de la masse. Les deux pièces sont pesées ensemble. Si la masse dépasse m (18,17 mg), l'ébauche est éliminée. Si la masse est inférieure à m , on choisit une baguette de masse convenable que l'on pèse avec les deux pièces. Puis la baguette est réduite par coupures successives jusqu'à ce que la masse totale des deux pièces et de la baguette soit comprise entre m et $m + 0,1$ mg (de 18,17 à 18,27 mg).

E - Finition du bouchon. A l'aide du microchalumeau la baguette est fondue et incorporée au bouchon de façon à la fermer et la longueur est amenée à 6 mm.

F - Ajustement fin de la masse. Le ludion est pesé à nouveau. Si sa masse est supérieure à m (18,17 mg), le contrepois du bouchon est usé par frottement sur une toile émeri fine. La masse du ludion est ainsi amenée à $m + 0,05$ mg (de 18,12 à 18,22 mg). Si la masse est inférieure à m , on incorpore, à l'aide du microchalumeau, un morceau de baguette de masse convenable au contrepois du bouchon et l'on est ramené au problème précédent.

4 - DISCUSSION

L'assemblage capillaire : La mesure du rapport e/d de chaque assemblage capillaire pourrait être évitée par l'emploi systématique de capillaires à parois fines obtenus par étirage de tubes à parois plus fines ($d = 14-15$ mm, $e = 1,0-1,3$ mm).

Cependant un ludion se révèle, à l'usage, d'autant plus fragile que son rapport e/d est plus faible. On a donc intérêt à utiliser des capillaires dont le rapport e/d soit maximal, bien qu'inférieur au rapport critique, afin d'augmenter la durée de vie des ludions. Par

ailleurs, à partir d'une même tube, le rapport e/d des capillaires obtenus varie beaucoup d'un étirage à l'autre. Une mesure du rapport e/d est donc nécessaire pour chaque assemblage.

Le calibrage du ludion : Dans le bouchon du ludion de Zeuthen (1950) est enfermé définitivement par soudure un certain volume d'air dont la valeur indéterminée oblige à calibrer empiriquement le ludion. Pour cela de petites quantités d'air sont ajoutées progressivement dans la chambre respiratoire jusqu'à ce que le ludion flotte. Puis la quantité d'air ainsi ajoutée est évaluée à l'aide d'une micropipette. Ce procédé est long, peu précis et sauf hasard ce calibrage varie d'un ludion à l'autre. Par contre, le ludion simple (Nigon et Fourche, 1958) et notre modèle sont calibrés directement par pesée. Le procédé est rapide et précis (erreur relative de l'ordre de 0,3 %). De plus les ludions d'une série ayant la même masse ont nécessairement le même volume (voir 3.4.2.1.).

La sensibilité du ludion : Dans le domaine de la sensibilité qui est inversement proportionnelle au volume gazeux, notre ludion est inférieur aux modèles dont il dérive. En effet, sa fabrication avec un volume inférieur à 2 ul devient techniquement difficile alors que le ludion de Nigon et Fourche (1958) peut atteindre 0,25 ul et que le volume de ludion de Zeuthen (1950) peut être théoriquement aussi faible qu'on le désire.