

Ph. 7

LES TECHNIQUES D'EVALUATION DES POPULATIONS DE
NEMATODES DANS LE SOL ET LES TISSUS VEGETAUX

par

Georges MERNY et Michel LUC

(Laboratoire de Nématologie - Centre O.R.S.T.O.M.
d'Adiopodoumé - Côte d'Ivoire).

Août 1968

12 NOV. 1968

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° B/2546

546

P L A N

Examen direct.

Extraction.

- Méthodes par gravité.
 - Sédimentation.
 - Elutriation.
 - Centrifugation.
- Méthodes utilisant la mobilité des nématodes.
 - Méthode de Baermann.
 - Modifications de la méthode de Baermann.
 - Aspersión et "incubation".
- Méthodes par désintégration du milieu.
 - Désintégration par moyen mécanique.
 - Désintégration par enzymes ou agents chimiques.

Comptage.

- Concentration des suspensions.
 - De nématodes mobiles.
 - De kystes.
- Comptage de parties aliquotes.

Echantillonnage.

- Instruments utilisés.
- Méthodes d'échantillonnage.
 - Méthode de l'échantillon global.
 - Méthode des échantillons multiples.
 - Cas des endoparasites fixés.

Conclusion.

Si les nématodes extraits des tissus végétaux sont tous a priori phytoparasites, ceux extraits du sol peuvent appartenir à des groupes biologiques très divers : phytoparasites accomplissant dans le sol une partie plus ou moins longue de leur cycle, espèces bactériophages, mycophages, prédatrices ou parasites de l'homme et des animaux. La proportion des divers groupes peut varier beaucoup d'un sol à l'autre, selon l'état physique, chimique ou biologique de celui-ci, la nature du couvert végétal, etc...

Les méthodes décrites ci-dessous visent à évaluer l'importance du peuplement de nématodes présents dans un milieu donné et sont, en principe, valables pour tous les groupes. Cependant le but poursuivi par ceux qui les ont élaborées était, dans la plupart des cas, l'estimation des populations de nématodes phytoparasites ; ceux-ci, présentent en effet pour l'agriculture une importance économique variable mais certaine et la connaissance de l'infestation d'un milieu est essentielle, qu'il s'agisse de conseiller un agriculteur ou de mettre en train une expérimentation.

En dehors de l'examen direct des nématodes dans leur milieu qui ne peut que difficilement fournir des données quantitatives valables, l'estimation d'une population de nématodes comprend un certain nombre d'opérations qu'il est possible de diviser en trois phases successives : échantillonnage, extraction et comptage.

Au cours de la première phase on prélève, sur le terrain ou sur les végétaux considérés, un certain nombre d'échantillons supposés représentatifs de l'ensemble. Dans la seconde on tente d'extraire, par des moyens appropriés, la totalité des nématodes contenus dans ces échantillons et, enfin, dans la troisième, l'extrait ainsi obtenu est concentré et il y est prélevé des parties aliquotes dans lesquelles seront comptés les nématodes.

Au cours de ce processus, se révèlent deux sources d'erreur qui ne peuvent être éliminées totalement : la première concerne l'échantillonnage, la seconde le comptage. En supposant en effet que l'on arrive à connaître le nombre exact de nématodes existant

d'une part dans les échantillons et d'autre part dans les parties aliquotes, les nombres ainsi obtenus permettent certes de calculer une densité moyenne de population rapportée à l'unité de poids ou de volume du sol ou des tissus végétaux ; mais cette moyenne s'écartera forcément de la moyenne vraie et ceci d'autant plus que la distribution des nématodes in situ sera moins régulière et que le nombre et la taille des échantillons seront plus petits.

Une troisième source d'erreur existe au niveau de l'extraction. Il est bien évident qu'aucune technique ne permettra d'extraire la totalité des nématodes contenus dans un échantillon. Cela est moins grave qu'il ne le paraît si la technique choisie est fidèle, permettant donc d'extraire des pourcentages constants. Toutefois il ne faut pas se dissimuler que ces pourcentages varieront avec les espèces de nématode en raison de leurs différences de taille, d'ornementation cuticulaire (Criconema avec épines) de leur mobilité etc... Certaines techniques modernes approchent cependant de la perfection si l'on ne prend qu'une seule espèce en considération.

L'évaluation de la densité d'une population de nématodes est donc une opération complexe qui nécessite beaucoup de soin pendant ses diverses phases et une grande prudence dans l'énoncé des résultats.

La logique découlant de l'ordre normal des opérations voudrait que l'échantillonnage soit traité en premier lieu. Toutefois, cette question est la plus délicate et ce n'est que si l'on possède de bonnes méthodes d'extraction et de comptage qu'il sera possible de juger la valeur d'un échantillonnage. Il nous a donc semblé préférable de traiter cette question en dernier.

EXAMEN DIRECT

Les méthodes relevant de l'examen direct du sol sont les plus simples et celles qui nécessitent le moins de matériel. Mais elles sont longues et ne peuvent s'adresser qu'à de petits échantillons qui ont peu de chance d'être représentatifs du milieu.

Stöckli (1943) examine dans l'eau, sous la loupe binoculaire, de très petites quantités de sol n'excédant jamais 0,1 g. Mindermann (1956) utilise, pour examiner les nématodes dans le sol ou la litière de forêt, des méthodes plus élaborées. Il colore un échantillon de 0,25 à 0,5 cm³, placé sur papier filtre dans un entonnoir de Büchner, au bleu coton à 0,05 % ou à la fuschine acide chauffée à 70°. Avant coloration, la litière de forêt est éclaircie, pendant une à 24 heures, dans un mélange de trois volumes d'eau, un volume d'ammoniaque à 20 % et un volume d'eau oxygénée à 30 %. Les nématodes, colorés préférentiellement en bleu ou en rouge, suivant le colorant employé, sont ainsi rendus mieux visibles.

L'examen direct est, par contre, d'un emploi courant pour évaluer, dans certains cas, l'infestation d'un système racinaire par des endoparasites. Les masses d'oeufs ou kystes des Heteroderidae (surtout genres Heterodera et Meloidogyne) font généralement saillie à l'extérieur de la racine parasitée et on les y compte aisément à la loupe binoculaire.

La coloration différentielle des nématodes dans les tissus végétaux a été réalisée pour la première fois par Godfrey (1935) qui utilise la solution de Flemming. Ce colorant a été pratiquement abandonné au profit du bleu coton ou de la fuschine acide, en solution dans le lactophénol (Goodey, 1937). La technique classique (Franklin, 1949 ; Franklin & Goodey, 1949) consiste à faire bouillir la portion de végétal dans la solution colorée de lactophénol et à éclaircir ensuite les tissus dans le lactophénol pur. De Guiran (1966a) perfectionne le processus en renversant l'ordre des opérations : le tissu infesté, est mis à bouillir dans le lac-

lactophénol pur puis plongé dans une solution faible de bleu coton dans le lactophénol froid pendant des temps variables suivant les espèces de nématodes et le tissu végétal ; on évite ainsi la différenciation, toujours délicate, le bleu coton se fixant électivement sur les nématodes et d'excellentes colorations sont obtenues.

EXTRACTION

En dehors de l'examen direct des nématodes dans le milieu, sol ou tissu végétal, où ils vivent normalement, technique d'un emploi difficile et limité, l'évaluation d'une population de nématodes nécessite le recours à une des nombreuses méthodes d'extraction permettant de les séparer de la matière minérale ou végétale qui les englobe.

Parmi ces méthodes il est possible de distinguer celles utilisant le poids spécifique des nématodes, (méthodes par gravité) de celles fondées sur la propriété qu'ont les nématodes de se mouvoir, (méthodes par mobilité). Un troisième groupe peut être créé qui comprend les techniques visant à désintégrer le milieu où se trouvent les animaux ; elles ne s'appliquent toutefois qu'à des espèces endoparasites, vivant donc à l'intérieur des tissus végétaux.

Ces méthodes sont nombreuses et diverses mais, à l'exception de celles consistant à désintégrer le milieu dans lequel les nématodes sont inclus, elles dérivent toutes soit de la méthode de décantation et de tamisage de Cobb (1918) soit de celle de l'entonnoir de Baermann (1917). Au cours des quinze dernières années, plusieurs excellentes mises au point ont été faites sur ce sujet notamment celles d'Oostenbrink (1960), de Seinhorst (1962a) et de Goodey (1963), auxquelles nous emprunterons de larges extraits.

METHODES PAR GRAVITE

Toutes les méthodes groupées sous ce vocable sont fondées sur le fait que le poids spécifique moyen des nématodes n'est que très légèrement supérieur à celui de l'eau. Si donc du sol contenant des nématodes est mis en suspension dans l'eau, la plus grande partie des particules du sol sédimentera plus vite qu'une forte proportion des nématodes ; ceux-ci pourront être séparés

du liquide supérieur ne contenant que de fines particules de sol en suspension, par passage sur un tamis dont les mailles, de dimension appropriée, retiendront alors que les particules de sol en suspension traverseront ce tamis. En répétant l'opération plusieurs fois, on peut espérer extraire la presque totalité des nématodes contenus dans l'échantillon. C'est la méthode qu'employait Cobb (1918) et d'où découlent, par améliorations successives, les méthodes employées actuellement, de sédimentation, élutriation et centrifugation.

Cette méthode de Cobb, très simple, ne nécessitant que du matériel élémentaire, n'est plus que rarement employée. En effet la sédimentation est appréciée "à l'oeil" et des extractions homogènes ne peuvent être obtenues que si l'on a affaire à des échantillons du même type de sol traités par le même opérateur.

Le choix de la dimension des mailles du tamis pose également un problème : trop grande on éliminera la plupart des particules de sol en suspension mais aussi un nombre appréciable de nématodes de faible taille ; trop petite on obtiendra par lavage du tamis une suspension contenant, certes, un plus grand nombre de nématodes mais obscurcis par des particules de sols plus nombreuses.

C'est Seinhorst (1950) qui définit le principe du choix des mailles en fonction de la taille des nématodes : les particules de sol ayant une vitesse de sédimentation voisine de celle des nématodes d'une certaine taille sont de diamètre plus petit que les mailles des tamis à travers lesquels ces mêmes nématodes ne passent pas facilement (0,1 à 0,05 fois leur longueur) ; les particules de sol ayant un diamètre plus grand que les mailles de ces tamis ont, par contre, une vitesse de sédimentation considérablement plus élevée que celle des nématodes de longueur allant jusqu'à vingt fois le diamètre de ces mailles.

Dans la méthode de décantation de Cobb, si on laisse reposer une suspension de sol dans l'eau jusqu'à ce que les particules supérieures à une certaine taille soient déposées, une grande proportion des nématodes plus courts que vingt fois le diamètre de ces particules est encore en suspension avec une certaine proportion des particules plus petites. Ces nématodes peuvent être séparés par décantation et passage sur des tamis dont les mailles ont un diamètre légèrement supérieur à celui des plus grosses particules de sol décantées. Pour séparer du sol des nématodes de tailles variées, différents temps de sédimentation et des tamis de différentes mailles doivent donc être employés successivement.

Pendant le temps de sédimentation, les nématodes en suspension se trouvent à des hauteurs diverses dans le vase et n'ont pas tous à parcourir la même distance pour atteindre le fond. Ceux qui sont situés le plus bas ont donc le temps de se déposer entre les plus grosses particules de sol et y restent alors que le surnageant est décanté. La séparation ne peut donc être améliorée qu'en répétant l'opération.

Théoriquement, si la vitesse de sédimentation des nématodes pouvait être réduite à zéro ou, même, s'ils pouvaient être amenés à se déplacer lentement vers le haut, la séparation serait parfaite.

C'est ce que réalisent les méthodes décrites ci-dessous. Dans la première (méthode par sédimentation) le courant dirigé de bas en haut est produit simplement par échange entre deux récipients réunis par un étranglement ; le récipient supérieur contient l'échantillon de sol et ce dernier, en descendant dans le récipient inférieur, est remplacé par un volume d'eau équivalent venant du récipient inférieur ; l'étranglement provoque des turbulences qui favorisent la séparation des particules de sol de différents diamètres et des nématodes.

Dans la seconde méthode (élutriation) le courant ascendant est provoqué et entretenu pendant une partie de l'opération.

Sédimentation.

Cette méthode mise au point par Seinhorst (1955) permet donc d'obtenir, dans deux vases différents, le sol sédimenté, d'une part, et le liquide supérieur d'autre part.

Le mode opératoire pratique est le suivant (fig. 1) :

L'échantillon de 500 g de sol est mis en suspension dans 700 cm³ d'eau, dans un bécher, passé au travers d'un tamis à mailles de 2 mm et transféré dans une fiole d'Erlenmeyer de 2 l. remplie, ensuite, d'eau (A). Celle-ci est retournée au-dessus d'une autre fiole d'Erlenmeyer (B) de 1 l de capacité, de façon que le tube de l'entonnoir de A plonge d'un ou deux cm dans l'eau contenue par B. Le sol tombe de A dans B. Il est remplacé par de l'eau qui monte de B dans A, ce qui crée, dans la partie étroite de l'entonnoir, un courant ascendant qui retient la plus grande partie des particules de sol inférieures à 100 μ et des nématodes. Cette première phase dure environ 10 minutes.

La fiole A est ensuite renversée au-dessus d'un bécher (C) plein d'eau, pendant 10 à 20 minutes. Le contenu de A se sédimente, en commençant par les particules les plus grosses. A la fin, A ne contient plus que des particules inférieures à 50 μ et C des particules inférieures à 100 μ .

Pendant le même temps, B est renversé sur un bécher (D) plein d'eau. Le processus est le même qu'entre A et B au cours de la première phase. A la fin de l'opération, D contient les particules les plus lourdes et B les particules inférieures à 100 μ qui avaient réussi, au cours de la première phase, à passer de A à B.

La fiole B est ensuite renversée, pendant 20 à 30 minutes, sur le bécher C et le processus est le même qu'entre A et C au cours de la deuxième phase. A la fin B ne contient plus que des particules inférieures à 50 μ et C des particules inférieures à 100 μ .

A la fin de l'opération, 50 % des plus petits nématodes se trouvent dans A et le reste se trouve dans B et C, ce dernier contenant aussi 75 % environ des nématodes les plus gros. Les contenus de A et B sont passés sur des tamis de 50 μ et celui de C sur des tamis de 100 μ . Les particules de sol restant en suspension dans l'eau sont ainsi éliminées alors que les nématodes, par suite de leur forme allongée, sont retenus sur les tamis où on les récupère par lavage. Le contenu du bécher D est éliminé.

Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter d'appareils spéciaux et de permettre la récupération de la plupart des nématodes de petite taille. Elle est, par contre, beaucoup moins efficace pour ceux de grande taille.

Elutriation.

Le principe de l'élutriation est le même que celui de la sédimentation, à ceci près que la différence de vitesse de sédimentation entre les particules grossières du sol d'une part et les particules fines et les nématodes d'autre part, se trouve accentuée par un courant d'eau ascendant, soigneusement réglé et entretenu dans le récipient inférieur sur lequel la fiole d'Erlenmeyer est renversée. Le courant ascendant, empêche les nématodes d'atteindre le fond de l'appareil sans, toutefois, empêcher de se déposer les particules de sol qui seraient retenues par les mêmes tamis que ces nématodes.

La délicate question de la vitesse du courant ascendant à employer a été soigneusement étudiée par Seinhorst. Les nématodes mesurant environ 500 μ de long sont séparés par des tamis à mailles de 50 μ et ceux mesurant environ 1000 μ par des tamis à mailles de 100 μ . Les particules de sol de 50-100 μ ont une vitesse de sédimentation supérieure à 350 cm/h et celles de plus de 100 μ ont une vitesse de sédimentation supérieure à 700 cm/h.

Donc 350 cm/h et 700 cm/h sont les vitesses optimum de courant pour séparer les nématodes des suspensions qui doivent être passées dans des tamis de 50 μ et 100 μ respectivement.

Le tableau 1 montre la relation qui existe, en fait, entre la vitesse du courant ascendant, la maille des tamis utilisés et la taille des nématodes recueillis.

TABLEAU 1

Vitesse du courant	Tamis	Taille des nématodes recueillis.
250-350 cm/h	50 μ	0,3 - 1,2 mm
600-700 cm/h	100 μ	1,2 - 4 mm
1.400 cm/h	250 μ	4 mm

La taille des nématodes n'est d'ailleurs pas seule en cause, certains, tels ceux appartenant aux genres Criconemoides etc... sont petits mais courts et trapus et ont une vitesse de sédimentation assez grande. Bien que leur longueur soit de l'ordre de 500 μ , ils ne sont séparés du sol que par un courant de 700 cm/h.

L'application de ce principe a amené divers auteurs à décrire des appareils plus ou moins perfectionnés qui, s'ils diffèrent par leur forme, la matière dont ils sont construits et le moyen utilisé pour obtenir un courant constant, fonctionnent tous de la même manière.

Oostenbrink (1954) décrit un appareil dont la figure 2 représente une version ultérieure, améliorée (Oostenbrink, 1960). L'appareil est réalisé en métal inoxydable. Un échantillon de 100cc ou plus de sol humide (1) est placé dans un tamis à mailles de 1 mm (2). Si la partie inférieure a subi la modification représentée en B, l'échantillon de sol peut avoir un volume allant jusqu'à 1 l.

Le sol est entraîné dans l'appareil (3) par un courant d'eau d'environ 700 cc à la minute, délivré par le pulvérisateur (5). Ce courant est coupé quand tout le sol est passé au travers du tamis. Au début de l'opération, le niveau de l'eau dans l'appareil est ajusté de telle sorte que l'extrémité inférieure de l'entonnoir (4) soit tout juste immergée. En même temps, un courant d'eau entre dans le bas de l'appareil par le tube (7) ; il est ajusté à l'aide d'un niveau constant situé en hauteur, dans la pièce. Il doit être de 800 cm³ environ, par minute, au début de l'opération, quand le sol est entraîné dans l'appareil. Il peut être, ensuite, réduit à 400 cm³ par minute. Un appareil à mesurer le courant permet de vérifier que l'ajustage est satisfaisant. Ce courant empêche les nématodes et les particules fines de pénétrer dans la partie étroite, inférieure, pendant que les particules les plus lourdes sédimentent au fond. L'opération, qui prend 10-15 minutes, est arrêtée quand l'eau atteint le niveau (14). Le bouchon (11) est alors enlevé et le contenu de toute la partie supérieure de l'appareil est passé au travers de quatre tamis à mailles de 45-50 μ (10).

Tarjan, Simanton & Russell (1956) ont réalisé un élutriateur assez semblable à celui d'Oostenbrink dans lequel ils utilisent un courant ascendant sensiblement plus fort. L'appareil est plein d'eau au départ. L'excès d'eau amené par le courant ascendant s'écoule par un trop plein et passe à travers une série de tamis inclinés à 45° sur lesquels les nématodes sont recueillis.

Seinhorst (1956) décrit un appareil d'une conception toute différente quoique fonctionnant sur le même principe. Il consiste essentiellement en une colonne de verre composée de plusieurs éléments ajustés par des bouchons percés et présentant des étranglements de diamètres divers. Le sol, qui passe également au travers d'un tamis à grandes mailles, n'est pas entraîné directement dans l'appareil mais est placé dans une fiole d'Erlenmeyer de 2 l. munie d'un entonnoir ajusté à son orifice, et renversée sur la colonne. L'étude minutieuse de l'influence des dimensions des

diverses parties de l'appareil amène l'auteur à en décrire une nouvelle version perfectionnée, (Seinhorst, 1962b), représentée à la figure 3, qui présente l'avantage de recueillir la quasi totalité des nématodes de grande taille et de permettre un fractionnement de l'échantillon basé sur la taille des animaux.

Le déroulement des opérations est le suivant : un échantillon de sol de 500 g est mélangé à environ 600 cc d'eau dans un Bécher de 1 l. On agite pour disperser le sol dans l'eau en évitant de triturer les mottes, ce qui tuerait une assez forte proportion des nématodes. Si le sol est très argileux, il est nécessaire d'ajouter de l'oxalate de sodium qui, en précipitant le calcium, permet une meilleure dispersion. Les particules organiques du sol sont souvent connectées entre elles par des hyphes mycéliennes et forment des amas que l'on disperse au moyen du "vibro-mixer", appareil dans lequel une plaque horizontale percée de trous coniques ayant leur diamètre le plus large tourné vers le bas est animée de mouvements vibratoires rapides dans le sens vertical. L'échantillon est, ensuite, passé à travers un tamis à mailles de 2 mm et versé, à l'aide d'un entonnoir, dans une fiole d'Erlenmeyer spéciale (A). Le goulot de cette fiole est de forme tronconique, rodée à l'extérieur. On y ajuste un entonnoir de verre rodé intérieurement. L'ensemble est renversé sur la colonne préalablement remplie d'eau. Cette colonne est composée de quatre éléments (C, D, E₁ et E₂) dont les deux premiers comportent une partie large (C₁ et D₁) et une partie étroite, (C₂ et D₂). Les trois premiers éléments sont munis, à leur base, d'un tuyau de vidange auquel est ajusté un tuyau de caoutchouc fermé par une pince de Mohr. Le troisième élément (E₁) est ouvert à son extrémité inférieure mais peut être fermé par un bouchon actionné à l'aide d'une commande souple, fil ou chaînette, qui remonte tout au long de la colonne et sort à l'extrémité supérieure de l'élément C. L'orifice inférieur de l'élément E₂ est fermé par un bouchon. Le courant ascendant, dans les deux éléments su-

périeurs, est fourni par un dispositif à niveau constant assurant une pression stable dans des aiguilles calibrées. L'excès d'eau amené par ce courant se déverse, par l'entonnoir F, dans le récipient I. (fig. 3,1).

Après 7 minutes, les plus grosses particules de sol se retrouvent à l'extrémité inférieure de l'élément E₂ et les nématodes de grande taille commencent à arriver dans l'élément E₁. Celui-ci est alors fermé par le bouchon G (fig. 3,2).

Pendant la suite de l'opération les particules supérieures à 50 μ réussissent à forcer le courant en C₂ alors que, seules, celles supérieures à 100 μ peuvent passer en D₂. Vingt minutes après le début de l'opération, la fiole d'Erlenmeyer ne contient plus que des particules inférieures à 50 μ . Son contenu est versé dans le récipient I (fig. 3,3). Au bout de 30 minutes, c'est l'élément C qui ne contient plus que des particules inférieures à 50 μ . Son contenu est également versé dans le récipient I (fig. 3,4).

A ce moment, l'élément D ne contient plus que des particules inférieures à 100 μ et, les particules supérieures à 250 μ ayant atteint l'élément E₂ pendant les 7 premières minutes de l'opération, l'élément E₁ ne contient plus que des particules inférieures à cette dimension. Leurs contenus sont versés dans les récipients II et III respectivement (fig. 3,5 et 6).

L'élément E₂ est alors débouché, le sol tombe et l'appareil peut être lavé.

On est alors en présence de trois récipients dont le premier contient des particules inférieures à 50 μ et des nématodes de 0,3 à 1,2 mm de long, le second des particules inférieures à 100 μ et des nématodes ayant une longueur de 1,2 à 4 mm et le troisième des particules inférieures à 250 μ et des nématodes d'une longueur supérieure à 4 mm. Les contenus de ces trois récipients vont être passés sur des batteries de tamis appropriés pour éliminer les particules de sol et retenir les nématodes. Les mailles des tamis seront de 50 μ pour le contenu du récipient I, 100 μ pour celui du récipient II et 250 μ pour celui du récipient III.

Théoriquement, la séparation des nématodes est parfaite. En fait, il y a souvent une proportion non négligeable de particules de sol qui ne passent pas au travers des tamis ainsi que de fins débris végétaux ou animaux qui sont restés en suspension dans la colonne et qui peuvent, par la suite, gêner les comptages. Il y a lieu, alors, d'employer une technique qui fait appel à la mobilité de l'animal et qui sera décrite plus loin.

Parmi les techniques de séparation des nématodes par gravité, celle concernant les kystes d'Heterodera représente un cas très particulier. En effet, le kyste, constitué par les téguments durcis de la femelle morte, peut être assimilé à une grosse particule quasi-isodiamétrique bourrée d'oeufs, dont la vitesse de sédimentation est nettement plus rapide que celle de la plupart des nématodes normaux. Une première technique employée pour séparer les kystes d'un échantillon de sol, (Fenwick, 1940) consiste à faire sécher assez fortement celui-ci pour que, le kyste ayant perdu une partie de son eau, sa densité diminue au point que la plupart des kystes de l'échantillon ainsi traité deviennent capables de flotter sur l'eau. On peut ainsi les extraire d'échantillons de sol de 50 à 200 g au moyen de l'appareil de Fenwick représenté à la figure 4 qui comporte un fond incliné, modification apportée par Oostenbrink (1950). Le corps de l'appareil (D), tron~~que~~conique mesure environ 30 cm de hauteur, 15 cm de diamètre à la base et environ 9 cm au sommet. Il est surmonté d'un entonnoir (B) supportant un tamis (A) à mailles de 1 mm. Le haut du corps de l'appareil est entourée d'une gouttière inclinée.

L'échantillon de sol est séché à l'air puis passé à travers un tamis à mailles de 5 mm ; ce sol tamisé est ensuite soigneusement mélangé. La partie D, est remplie d'eau. Un échantillon de 200 g est placé sur le tamis A, préalablement mouillé et on fait passer le sol au travers du tamis à l'aide d'un fort jet d'eau. On enlève ensuite le tamis A et on lave l'entonnoir B, les débris tombant en D. On laisse reposer au moins 2 minutes pour permettre aux kystes de monter à la surface de l'eau. On fait passer à nouveau de l'eau dans D de façon à ce que les kystes, ainsi que les autres matériaux flottants coulent dans la gouttière C et, de là, dans le tamis E. Ce tamis est ensuite

lavé avec un jet d'eau pour le débarasser de ce qu'il a retenu du limon qui peut y adhérer. Le tamis est incliné et, à l'eau courante, on rassemble les résidus à sa partie inférieure. Ceux-ci sont collectés sur un papier filtre et mis à sécher en vue des opérations ultérieures de concentration et de comptage.

Cette méthode nécessite, préalablement, un séchage assez poussé du sol, ce qui demande un certain temps et pose un problème d'espace si on a de nombreux échantillons à examiner en même temps. Oostenbrink (1960) et Seinhorst (1964) ont décrit des appareils qui permettent de séparer les kystes d'un échantillon de sol humide et qui constituent en fait des modifications de leurs élutriateurs respectifs décrits ci-dessus.

L'appareil d'Oostenbrink est représenté à la figure 5. Il est assez semblable à l'élutriateur déjà décrit pour la séparation des nématodes mobiles mais comporte, à sa partie supérieure, une gouttière inclinée comme l'appareil de Fenwick. Le pulvérisateur à la partie supérieure, délivre 700 cm^3 d'eau à la minute et le tube perforé, à la base de l'appareil, en délivre 4 litres, ce qui correspond à un courant d'environ 60 cm/minute en haut de l'appareil. Les kystes sont entraînés vers le haut par ce courant et, par la gouttière (9) ils sont amenés sur le tamis (10) à mailles de 180μ au travers duquel passent les particules de sol qui ont pu être également entraînées par le courant.

L'appareil de Seinhorst est représenté à la figure 6. Le courant ascendant, dans le tube (B) est de 3 cm/seconde ; il est fourni par le tube (F) de diamètre approprié dans lequel circule de l'eau maintenue sous pression par un dispositif à niveau constant. Les kystes les plus lourds demeurent dans la partie (A) et le haut de la partie (B) où ils sont récupérés, en fin d'opération, au moyen du tube K, en ouvrant le robinet L.

Centrifugation.

Pour séparer les nématodes du sol par gravité, il est intéressant de réduire à zéro leur vitesse de sédimentation, c'est ce qui est réalisé dans l'élutriation au moyen du courant ascendant. On peut obtenir le même résultat en remplaçant l'eau par un liquide de poids spécifique légèrement supérieur à celui des nématodes, mais la vitesse de sédimentation des particules de sol devient faible et il est nécessaire de l'accélérer en ayant recours à la centrifugation.

Caveness et Jensen (1955) ont mis au point une méthode de séparation par centrifugation dérivée de celle élaborée par Faust et all. (1938) pour extraire les kystes de protozoaires et les oeufs de nématodes des excréments animaux. Des échantillons de 50 cm³ de sol sont versés, avec 30 cm³ d'eau, dans des tubes à centrifugation en nitrate de cellulose de 60 cm³. Une première centrifugation de 5 minutes à 2.900 g permet d'éliminer tout le matériel plus léger que l'eau. Celle-ci est, ensuite, remplacée par une solution de saccharose (484,5 g/litre) de poids spécifique de 1,18 et qui est centrifugée à son tour. Les nématodes sont recueillis dans la fraction supérieure.

Les auteurs de la technique ont fait varier le poids spécifique de la solution de saccharose ainsi que la force et la durée de la centrifugation. Une centrifugation de 3 minutes suffit avec des solutions d'un poids spécifique de 1,10 à 1,25 mais il faut 6 à 7 minutes si le poids spécifique est de 1,30-1,35. L'optimum est une centrifugation de 4.500 g combinée à un poids spécifique de 1,10 à 1,30. Les nématodes plus longs que 4 mm ne peuvent être extraits par cette méthode. Au moment où on les recueille, les nématodes sont enroulés et immobiles mais redeviennent actifs après un séjour de 2 h dans l'eau pure.

Mindermann (1956) a décrit une méthode de centrifugation portant sur de très petits échantillons (0,25 cm³). Il utilise une solution de sulfate de magnésium d'un poids spécifique de 1,25.

L'inconvénient de la méthode par centrifugation est de ne pouvoir être appliquée qu'à des échantillons assez petits. C'est toutefois, la seule qui permette d'extraire du sol les oeufs de nématodes.

METHODES UTILISANT LA MOBILITE DES NEMATODES.

De nombreuses méthodes de séparation de nématodes du sol et des tissus végétaux utilisent la propriété qu'ont ces animaux, placés en milieu aqueux, de quitter leur site habituel pour se diriger vers le bas.

Méthode de Baermann.

La plus ancienne de ces méthodes est celle de l'entonnoir de Baermann (1917) : un entonnoir, muni à sa base d'une certaine longueur de tube de caoutchouc fermé par une pince de Mohr est presque entièrement rempli d'eau. Le matériel contenant des nématodes (sol, matière végétale en décomposition ou tissus végétaux coupés en morceaux) est placé dans un carré de mousseline ou de toile à bluter dont les coins sont rabattus pour former une sorte de sac, plongé doucement dans l'entonnoir (fig. 7). Les nématodes sortent du matériel immergé, passent à travers le tissu et tombent dans le tube de caoutchouc où ont les recueille au bout de quelques heures en ouvrant la pince de Mohr pour faire couler une faible quantité d'eau. Le matériel, pour plus de commodité, peut être posé sur un tamis préalablement placé dans l'entonnoir mais ce n'est nullement indispensable.

Depuis sa création, de nombreux auteurs ont décrit des modifications très diverses de la méthode de Baermann, imaginées dans le but d'en simplifier les modalités pratiques ou de la rendre plus efficace.

Modifications de la méthode de Baermann.

Il apparaît inutile de décrire dans le détail toutes les modifications apportées à la méthode primitive de Baermann. Nous nous bornerons donc à citer celles qui ont abouti aux techniques les plus utilisées actuellement et qui ont tendu, pour la plupart, à éviter le manque d'aération du matériel, grave défaut du "Baermann", rendant inactifs de nombreux nématodes qui ne traversent pas la mousseline et ne peuvent donc être récoltés (Seinhorst, 1962).

Pour traiter des échantillons de sol, Christie et Perry (1951) combinent le tamisage et la méthode de Baermann. Celle-ci subit une légère modification : la mousseline, au lieu de constituer un sac fermé, a la forme d'un récipient hémisphérique maintenu ouvert par un fil métallique passé dans l'ourlet. Le sol est placé dans un récipient contenant 3 ou 4 fois son volume d'eau et le tout est versé sur deux tamis superposés, le supérieur à grosses mailles (20-24 à l'inch) et l'inférieur à mailles plus petites (200 à l'inch). Ce qui a été recueilli sur le tamis inférieur est versé sur la mousseline elle-même placée dans l'entonnoir de Baermann préalablement rempli d'eau tiède. Cette méthode a l'avantage d'éliminer la plus grande partie des fractions les plus grossières du sol, mais il est malheureusement probable qu'une proportion non négligeable des nématodes est ainsi retenue avec elles.

Staniland (1954), ainsi que Walker et Wilson (1960) remplacent le sac de mousseline par une couche d'un tissu fin tapisant le fond d'un tamis à grosses mailles placé à la partie supérieure de l'entonnoir. Cette méthode doit permettre, en travaillant

avec des couches plus minces de matériel, d'assurer une meilleure aération de celui-ci, donc une meilleure sortie des nématodes.

Oostenbrink (1960) met au point un filtre spécial composé d'une **armature** de nylon soutenant une mince couche de coton hydrophile ; ces filtres spécialement fabriqués, pèsent environ 1 g au dm^2 . Ils sont placés dans un tamis à large maille, reposant lui-même dans une sorte d'assiette creuse*, où le niveau d'eau est réglé de façon à affleurer le filtre supportant le matériel. L'auteur combine la décantation pratiquée par Cobb (1918) et le passage sur filtre de coton. Cette méthode est utilement employée pour clarifier les suspensions provenant du lavage des tamis après élutriation. La suspension de nématodes sortant des élutriateurs, qui contient en effet souvent des débris végétaux flottants et une quantité variable de particules de sol, est versée sur un filtre d'Oostenbrink recouvrant un tamis à mailles larges, lui même placé sur des cales dans une boîte de Pétri où l'on fait affleurer le niveau de l'eau à la surface du filtre (fig. 8). A défaut du filtre spécial, il est possible d'utiliser une ou deux épaisseurs de papier "**kleenex**".

Ces dernières méthodes permettent une aération du matériel car celui-ci n'est pas plongé dans l'eau mais n'est en contact avec elle que par sa partie inférieure ; de plus il est disposé, sur le filtre, en couches relativement minces.

L'aération peut aussi être obtenue par agitation, ce que réalise Mindermann (1956) pour extraire les nématodes de la litière de forêt. Le matériel, coupé en fragments d' 1 cm^2 environ, est placé dans un tamis hémisphérique, en cuivre, trempant dans l'eau contenue dans un béccher de 100 cc. Une batterie de bécchers est posée sur un agitateur horizontal à va-et-vient subissant une agitation de 1 minute toutes les 5 minutes. Pendant 48 heures, la sortie des nématodes est régulière et semble suivre la courbe

$$y = 1 - \left(\frac{1}{2}\right)^x$$

où y est la proportion de nématodes extraits et x le temps. Après 48 heures, le nombre de nématodes recueillis augmente d'une façon qui semble anormale à l'auteur et serait due, d'après celui-ci, à l'éclosion des oeufs contenus dans la litière.

Aspersión et incubation.

Dans la technique de Baermann, ou dans les techniques dérivées, c'est le fait que le matériel (sol ou tissus végétaux) se trouve en milieu aqueux qui amène les nématodes à en sortir, l'écueil étant le manque d'aération si ce matériel est entièrement plongé dans de l'eau au repos. Le meilleur moyen de placer du sol ou du matériel végétal dans de bonnes conditions d'aération et d'humidité consiste à le mettre dans une atmosphère telle qu'il sera couvert d'une fine pellicule d'eau constamment renouvelée. C'est ce qui est réalisé dans les deux techniques, voisines, de l'aspersión et de l'"incubation".

Seinhorst (1950) a imaginé un appareil ("asperseur") où le matériel végétal infesté, placé dans un tamis posé à la partie supérieure d'un entonnoir, reçoit un fin brouillard qui le maintient continuellement humide. L'eau qui coule le long du matériel entraîne les nématodes sortis, suit l'entonnoir et est recueillie dans un récipient muni d'un trop plein au fond duquel les nématodes sédimentent (fig. 9). Peters (in Goodey, 1963) a mis au point un double récipient dans lequel le trop plein de la première partie s'écoule dans la seconde où l'on recueille les nématodes qui ont pu être entraînés. Chaque partie est munie, au fond, d'une cavité percée, en son centre, d'un trou obturé par un bouchon (fig. 10). Ce dispositif facilite la collecte des nématodes qui sont, ensuite, séparés de l'eau par tamisage ou par décantation.

Il arrive que le matériel végétal, quoique bien lavé au préalable, soit l'objet d'une certaine desquamation. L'eau recueillie après aspersion est alors trouble et le comptage des nématodes est difficile. Il faut alors, comme après élutriation, avoir recours aux filtres d'Oostenbrink. La durée de l'opération est variable, et doit être poursuivie en principe jusqu'à ce que des nématodes cessent d'être extraits. En pratique, l'opération dure le plus souvent, de deux à trois semaines. Si les racines sont longues à pourrir, il arrive qu'on puisse, en continuant l'opération, recueillir encore des nématodes après plusieurs mois. On peut se demander s'il s'agit encore d'une extraction ou d'un véritable "élevage" de nématodes.

Ce dispositif a été imaginé pour extraire les nématodes des tissus végétaux, la plupart du temps des racines, mais il peut aussi être utilisé pour les extraire du sol. De Guiran (1966b) a comparé le nombre de larves de Meloidogyne extraites du sol par élutriation et par aspersion. Elles sont beaucoup plus nombreuses dans le dernier cas par suite de l'éclosion, au cours de l'aspersion, des oeufs contenus dans le sol à l'intérieur des masses d'oeufs. L'utilisation comparative de ces deux méthodes a permis à de Guiran de distinguer l'"infestation actuelle" d'un sol par Meloidogyne c'est à dire le nombre de larves actives à un certain moment, mesurable par élutriation, et l'"infestation potentielle", nombre de larves pouvant devenir actives si les conditions nécessaires à leur éclosion sont réalisées, mesurable par aspersion.

L'aspersion peut également être utilisée pour extraire les nématodes d'un sol qui contient trop de débris végétaux pour être passé à l'élutriateur (terraau ou litière de forêt).

Young (1954) a imaginé une technique, qu'il nomme "incubation". De jeunes racines, dont le diamètre n'excède pas 6 mm, sont placées dans un récipient fermé contenant un peu d'eau dans le fond, pour maintenir une atmosphère humide. Les nématodes sortent des racines et sont entraînés dans le fond du récipient par

l'eau de condensation. Il est très probable que des changements de température même assez faibles, peuvent sérieusement perturber l'opération ; il faut donc prendre soin de travailler à une température aussi constante que possible.

METHODES PAR DESINTEGRATION DU MILIEU.

Quelle que soit la méthode employée pour extraire des nématodes contenus dans des tissus végétaux (aspersion, incubation ou par tout autre méthode **plus** ou moins apparentée à celle de Baermann), leur sortie a lieu progressivement et l'opération peut durer plusieurs semaines. Pendant cette période, la population hébergée par le matériel végétal continue à évoluer : des animaux meurent, des oeufs éclosent, plus vite peut être qu'ils ne le feraient normalement, par suite des conditions particulièrement favorables d'humidité et d'aération. D'autre part, si à un certain moment, la sortie des nématodes cesse, rien ne permet d'affirmer qu'un certain nombre ne soient pas, pour une cause inconnue, restés à l'intérieur des tissus végétaux. Il n'est donc pas possible d'affirmer que les résultats obtenus par les méthodes décrites ci-dessus représentent bien la population existant, au temps t , dans un échantillon donné.

Il était donc normal que certains auteurs aient été amenés à tenter d'évaluer la population existant, à un instant donné, dans des tissus végétaux, en opérant une destruction rapide de ceux-ci. Deux méthodes ont été employées, la première consistant à détruire les tissus par un moyen mécanique et l'autre par des enzymes ou des agents chimiques.

Désintégration par moyen mécanique.

Stemerding (1963), extrait les populations de Pratylenchus penetrans des racines de plantes diverses en désintégrant les tissus dans un "mixer" domestique tournant à 10.000 tours/minute.

La suspension obtenue qui contient des nématodes et des débris de racines, est passée ensuite sur filtre d'Oostenbrink. Le temps de fonctionnement du mixer est des plus importants. En le faisant varier, l'auteur constate que l'optimum est de cinq secondes. A 30 secondes, le nombre de nématodes recueillis diminue de moitié. Ceci est dû au fait que, en accroissant le temps de passage au mixer, on augmente le nombre de nématodes tués par les lames de l'appareil, et que, seuls, les nématodes vivants peuvent, par la suite, traverser le filtre. Paradoxalement c'est en traitant des racines dures que le nombre de nématodes diminue le plus vite si l'on augmente le temps de passage au mixer. L'opération n'est pas instantanée puisque environ une semaine est nécessaire pour que la presque totalité des nématodes ait traversé le filtre, la moitié environ l'ayant fait pendant les premières 48 heures. Cette technique est cependant plus rapide que celle utilisant les asperseurs.

Pour extraire Rhadinaphelenchus cocophilus des tissus du cocotier, qui sont de textures très diverses et dont certaines parties sont très dures, Fenwick (1963) combine le passage au mixer, pendant deux minutes, et la sédimentation par une méthode semblable à celle de Seinhorst (1955).

Vilardebo et Guérout (comm. pers.) travaillant avec des racines de bananier et d'ananas, passent la suspension obtenue au mixer sur une batterie de tamis à mailles de différentes grosseurs.

L'utilisation du mixer présente deux inconvénients : elle est brutale et quelles que soient les précautions prises, une certaine proportion des nématodes est tuée. D'autre part elle fournit une suspension très trouble contenant de nombreux débris de racines dont il faut se débarrasser par un procédé ultérieur (filtre, sédimentation ou tamisage), cause d'erreurs supplémentaires.

Désintégration des tissus végétaux à l'aide d'enzymes ou d'agents chimiques.

Dropkin, Smith et Myers (1960) extraient les nématodes endoparasites contenus dans les racines de divers~~s~~ végétaux par désintégration des tissus en les soumettant à l'action d'un extrait de culture d'Ewinia carotovora sur fragments de pommes de terre. Des échantillons de racines de 0,1 g sont mis à macérer et constamment agités dans 20 cm³ de l'extrait de culture d'E. carotovora à pH 8, le temps de macération est de quelques heures et varie avec l'hôte. Certains enzymes vendus dans le commerce, sont actifs. Le meilleur est une pectinase vendue sous le nom de "Pectinol 59 L" (Rohm & Haas Co., Philadelphia Pa.) diluée deux à quatre fois dans l'eau distillée et agissant à pH 4.

Après macération, les racines sont agitées, pendant 30 minutes, dans un mixer dont l'hélice métallique est remplacée par des pales de caoutchouc ; la suspension résultant de cette opération est ensuite passée sur une batterie de tamis.

Les mêmes auteurs ont cherché à remplacer les enzymes par divers agents chimiques : Hcl normal, acide périodique (0,25-2 %), solution de Jeffrey (acide nitrique : 10 %, acide chromique : 10 %). Tous ces agents ont désintégré les racines mais tué les nématodes dont l'acide ~~de~~ chlorhydrique rompait même la cuticule.

C O M P T A G E

Quelle que soit la méthode employée pour extraire les nématodes du sol ou des tissus végétaux, on se trouve en présence, au moment de commencer les comptages, soit d'une population qui peut être numériquement importante et qui est contenue dans une assez grande quantité d'eau, soit d'un certain nombre de kystes d'Heterodera relativement peccs noyés dans une masse de débris végétaux, exuvies d'insectes, etc...

Dans les deux cas, le problème à résoudre, s'il est un peu différent, relève cependant des mêmes techniques. Le comptage des nématodes en suspension dans l'eau va, dans la presque totalité des cas, consister à examiner des parties aliquotes de la population totale. Si chaque partie aliquote contient un trop petit nombre d'animaux la variation sera grande d'un échantillon à l'autre et les échantillons ne seront pas représentatifs du total. Si elles en contiennent trop, les comptages seront longs, difficiles et entachés d'erreur. Il convient donc, tout d'abord, d'amener la suspension à une concentration optimale. En général, on considère que la concentration la plus convenable est d'environ 100 à 200 individus par centimètre cube. Pour aboutir à ces chiffres, on concentre au maximum la solution et, après un comptage préliminaire, on l'amène, par dilution, au taux convenable. Pour les kystes, le principal problème est de les débarrasser, au maximum, des débris végétaux et autres qui masquent leur présence et rendent les comptages aléatoires. Il s'agit donc bien, en plus, d'une véritable "concentration" qui, à l'inverse de celle des suspensions dans l'eau, est d'autant meilleure qu'elle est plus poussée.

Par la suite, la méthode de prise de parties aliquotes est banale et son application ne requiert que l'usage d'un appareillage simple et adapté à la taille des animaux.

CONCENTRATION DES SUSPENSIONS.

- De nématodes mobiles - La plus grande partie de l'eau, dans laquelle les nématodes sont en suspension est éliminée, soit par filtration ou tamisage, soit par sédimentation et décantation.

Feder et Feldmesser (1954) concentrent des suspensions, obtenues par une méthode d'extraction dérivée de celle de Baermann, en les filtrant sur un entonnoir de Büchner. Les animaux retenus sur la plaque de verre fritté sont lavés et recueillis à l'aide d'une petite quantité d'eau.

Zuckermann (1960) prélève des parties aliquotes de 10 à 15 cc, que les nématodes qu'elles contiennent en les chauffant à 60° pendant quelques minutes et les transfère dans une ampoule à décantation munie, à sa base, d'un tube de 1 mm d'ouverture. En ouvrant le robinet de l'ampoule, il fait passer lentement le contenu du tube à travers un tamis de 250 mailles à l'inch. Le tamis est ensuite retourné au dessus d'une lame porte-objet sur laquelle les nématodes sont entraînés par une goutte de fixateur. Cette méthode revient à inverser l'ordre habituel en prenant des parties aliquotes avant concentration et présente l'inconvénient de fournir, dans un très faible volume de liquide, des animaux morts donc difficilement déterminables à la loupe binoculaire.

Staniland (1954) arrive au même résultat sans l'aide d'aucun fixatif, en adaptant, à la base d'un entonnoir de Baermann, un tube capillaire fermé, dans le fond duquel les nématodes se rassemblent. En passant le capillaire, on les recueille dans quelques gouttes d'eau.

Esser (1957) transvase l'eau retirée de l'appareil de Baermann dans un tube à centrifuger. Après un certain temps les nématodes se retrouvent au fond du tube, dans la partie conique et, en plaçant celle-ci sous la loupe binoculaire, il est facile de les extraire dans un minimum d'eau en les aspirant avec une pipette.

Avec les suspensions provenant de l'extraction à l'élutriateur à l'asperseur, la méthode la plus couramment employée consiste à laisser les animaux sédimenter pendant plusieurs heures dans un tube ou une éprouvette graduée. L'eau est ensuite retirée par aspiration à l'aide d'une trompe à vide. On court, de cette façon, le risque d'avoir des turbulences qui souèvent les nématodes réunis dans le fond du tube et d'en aspirer ainsi une certaine proportion. On peut allier cet inconvénient en munissant le tube d'aspiration d'une extrémité en caoutchouc ou en matière plastique munie de deux encoches et aspirant de l'air en même temps que l'eau. De cette façon, seules les couches d'eau superficielles sont aspirées sans provoquer de remous en profondeur. Seinhorst (1962) recommande d'aspirer l'eau à travers un filtre en verre fritté retourné.

- De kystes -

Les kystes peuvent être séparés à sec des débris végétaux et animaux avec lesquels ils sont en mélange, en utilisant le fait qu'ils sont plus ou moins arrondis et roulent donc plus aisément sur une surface plane que les débris. Cette méthode est principalement utilisée pour H. rostochiensis dont les kystes sont subsphériques. Il est possible, également d'utiliser la propriété qu'ont les kystes de flotter sur des liquides dont le poids spécifique est inférieur à celui de l'eau.

D'après Goodey (1963) la séparation peut s'opérer en plaçant le mélange de débris et de kystes à l'extrémité supérieure d'un carton incliné qu'on soumet à de petites chocs répétés. De cette façon, on sépare en kystes le mélange recueilli au bas du carton. L'opération peut être répétée plusieurs fois. Cette méthode a été perfectionnée en remplaçant le carton par une bande de caoutchouc continue roulant continuellement et agitée périodiquement par un mécanisme de sonnette électrique (Hesling, cité par Goodey, 1963) ou par un plateau animé de rotations longitudinales et d'un mouvement lent vers l'avant et vers l'arrière suivi d'un retour rapide en sens inverse. (Cooper, 1955).

nsi, les kystes roulent vers une extrémité et les débris sont éliminés par l'autre. Dans l'un et l'autre cas, il convient de recouvrir les surfaces sur lesquelles roulent les kystes d'un produit anti-statique; à défaut, les kystes très secs, risquent de se charger d'électricité statique et d'adhérer au support.

Seinhorst (1964), utilisant le fait que les kystes ont un poids spécifique inférieur à celui des débris, a mis au point une méthode dérivée de celle de Buhr (1954). Le mélange de kystes et de débris est passé à travers un tamis à mailles de 2 mm et est recueilli dans un grand becher contenant un mélange de ^{trois} parties d'acétone pour une partie de tétrachlorure de carbone. Les parois verticales du becher sont tapissées par un papier filtre. La plupart des débris tombent au fond du récipient mais une certaine proportion de ceux-ci et la plupart des kystes flottent. En agitant circulairement le liquide, les kystes et les débris flottants viennent au contact du papier filtre. Le becher de diamètre inférieur est ensuite lentement enfoncé par la base dans le liquide dont le niveau monte. On enlève lentement le becher et le liquide, en redescendant, répartit les kystes et les débris sur une étroite zone de papier filtre qui est retiré et mis à sécher.

COMPTAGE DE PARTIES ALIQUOTES

A partir d'une suspension de nématodes dans l'eau soigneusement homogénéisée par agitation, ou, mieux, par circulation d'air sous pression, le problème de l'estimation de la population qu'elle contient revient à déterminer la taille des parties aliquotes sur lesquelles le comptage sera effectué et à disposer du matériel approprié pour qu'il se fasse le plus rapidement possible et avec un risque d'erreur minimum.

Peters (1952) met au point un modèle de lame permettant de compter des parties aliquotes de populations de Turbatrix aceti (nématode du vinaigre) et développe la théorie de la précision des comptages. Pour estimer la population dans un volume V , on compte le nombre de nématodes dans un volume v et on multiplie le résultat par $\frac{V}{v}$. La précision du comptage dépend du nombre d'animaux effectivement comptés. En théorie, la précision est d'autant plus forte que le nombre d'individus comptés est plus grand. En fait, au-dessus de 300 animaux par cm^3 , le comptage est lent et les erreurs deviennent plus fréquentes. Peters estime que l'optimum se situe entre 100 et 200 par cm^3 . Si 1 cm^3 représente environ le volume de 2 millions de nématodes (cas de Turbatrix aceti) avec un comptage moyen de 300 par cm^3 , la probabilité pour qu'un animal donné soit présent dans ce comptage (p) est $\frac{300}{2.000.000} = 0,00015$; la probabilité pour qu'il ne s'y trouve pas (q) est : $1 - 0,00015 = 0,99985$. Des comptages répétés doivent donc se distribuer selon les termes du développement de $(p + q)^n$ où $n = 2.000.000$, avec une moyenne $np = 300$ et une variance $npq = 299,955$. Comme, dans la loi de Poisson, pour une moyenne de 300 la variance doit être aussi égale à 300, on peut dire qu'il est théoriquement exact que les résultats de comptages répétés doivent se distribuer selon cette loi.

Peters utilise un appareil fondé sur le principe de l'hématimètre : une lame transparente est fixée, à la hauteur nécessaire, au-dessus d'une autre lame sur laquelle sont gravées des lignes perpendiculaires limitant une certaine aire divisée en 24 petits carrés. Les dimensions sont ajustées de telle sorte que, dans l'aire définie sur la lame inférieure, 1 cm^3 d'eau est contenu entre les deux lames (fig. 11).

Les résultats obtenus par cet auteur ont montré que, si l'on fait des séries de ^{quatre} comptages dans un échantillon de 20 cm^3 prélevé dans une population totale contenue dans 100 cm^3 , il y a une probabilité légèrement inférieure à 14 % pour que le χ^2 d'un groupe de quatre comptages soit supérieur à la limite permise pour qu'on puisse considérer que ceux-ci font bien partie de la même distribution de Poisson.

semble donc que la variabilité des résultats soit un peu supérieure à celle à laquelle on pouvait théoriquement s'attendre et qu'il soit souhaitable de faire plus de quatre comptages.

Diverses autres lames de comptage ont été réalisées, toutes fondées sur le même principe, parmi lesquelles on peut citer celle de Penwick (1951) dans laquelle cinq éléments assez semblables à la lame de Peters sont assemblés pour des comptages en série et celle de Williams et Winslow (1955) dans laquelle 32 cm³ de suspension sont introduits entre deux lames distantes de 3,2 mm, si bien que, sur chaque cm² de la lame inférieure, se trouve 1/100 de la population contenue dans les 32 cm³ introduits. Ces deux lames sont minutieusement décrites dans l'ouvrage de Goodey (1963).

Quand on veut examiner un échantillon brut, provenant d'un prélèvement en plein champ et contenant généralement, plusieurs genres et espèces et dans lequel on doit fréquemment prélever des individus pour les examiner au microscope, les appareils dans lesquels la suspension se trouve entre deux lames sont malcommodes. Les auteurs utilisent une plaque de comptage ouverte, d'une contenance totale de 5,4 cm³ fabriquée au laboratoire même. C'est un petit bac de plexiglass transparent, de 30 x 60 mm de côté et ayant une profondeur de 3 mm, dont le fond est divisé, par des lignes perpendiculaires, en carrés de 2 mm de côté (fig. 12). L'inconvénient de cette sorte de lame est que la surface de l'eau y forme un ménisque au contact des bords verticaux où les nématodes montrent justement une certaine tendance à se rassembler. On y remédie en donnant, à ces bords une légère inclinaison vers l'extérieur qui rend le ménisque négligeable. Cette lame permet de compter des parties aliquotes de 5 cm³.

Les kystes d'Heterodera, doivent être recherchés au milieu des débris végétaux et animaux qui n'ont pu être éliminés par les méthodes décrites ci-dessus. Ceci a amené certains auteurs à mettre au point des plateaux spécialement conçus pour cet usage. Celui de

rnwick (1940) mesure environ 7,5 x 5 cm et est divisé en bandes longitudinales par des fils métalliques soudés sur le fond. Johnson (1957), améliore le plateau de Fenwick en utilisant une matière plastique blanche dans laquelle les aires de comptage sont creusées à la règle. Shepherd (citée par Goodey, 1963) réalise un plateau similaire en duralumin dans lequel les aires de comptage sont peintes en blanc, le métal ayant pour effet d'éviter les charges électrostatiques. Lancaster (1962) enfin a imaginé un plateau rond dans lequel les bandes de comptage sont circulaires.

ECHANTILLONNAGE

En supposant qu'on soit en possession des techniques d'extraction et de comptage satisfaisantes l'évaluation de la population moyenne d'une ou plusieurs espèces existant dans un *périmètre donné*, pose un certain nombre de problèmes :

Le premier consiste à savoir comment exprimer cette population moyenne. On peut la rapporter à l'unité de volume ou à l'unité de poids, selon la manière dont les échantillons ont été mesurés, mais dire qu'il y a N nématodes de telle espèce par kilogramme ou par livre de sol n'a que peu de signification. Sur le plan agronomique, ce qui importe c'est le nombre de nématodes parasites au contact desquels le système racinaire d'une plante a des chances de se trouver. Sur le plan écologique, c'est l'importance relative des nématodes dans la classe des animaux vivants dans le sol. Dès lors, il convient que leur population soit exprimée de la même manière que celle des autres organismes vivant dans ce même périmètre.

Dans le cas des nématodes phytoparasites il importerait que leur population puisse être exprimée de la même façon que celle des végétaux qu'ils sont censés parasiter, c'est à dire, qu'elle soit rapportée à l'unité de surface du sol. Cependant, les techniques de prélèvement obligent à rapporter la population extraite au volume ou au poids du sol qui la contenait. Pour extrapoler, plus ou moins valablement, de l'un à l'autre concept, les prélèvements sont effectués dans la zone de développement racinaire maximum, c'est à dire, en général, dans les 30 premiers centimètres du sol. Cependant, si ceci peut être facilement réalisé pour des plantes annuelles à système racinaire relativement superficiel et concentré, cela ne l'est plus pour des cultures perennes et, en particulier, arbustives.

D'autre part, on ne peut évaluer la population existant pour une certaine surface qu'en étudiant des échantillons dont la somme ne contiendra qu'une infime proportion de la population totale et ceci d'autant plus que la surface étudiée sera plus importante. Le problème est donc de déterminer quel sera l'échantillonnage optimum et quelles seront les limites de confiance de la moyenne obtenue.

Enfin, si l'on doit effectuer les prélèvements sur une certaine profondeur, il est important de laisser, autant que possible, le sol en place et, si l'on veut étudier la répartition en profondeur de l'animal, de prélever séparément les différentes couches de sol. Selon la précision désirée, les techniques varieront et réclameront l'emploi d'appareils plus ou moins élaborés.

INSTRUMENTS UTILISES.

Pour une simple recherche exploratoire dont le seul but est de déceler la présence possible de nématodes, de dénombrer les espèces existantes et d'évaluer grossièrement leur importance relative, on se contente de prélèvements effectués dans la couche supérieure du sol, (0 à 30 cm), On opère alors, avec des instruments simples, tels que la gouge semi-cylindrique ou le déplantoir de jardinier.

Pour des prélèvements en profondeur ou de nombreux prélèvements de petite taille dans un espace restreint, on a recours à des instruments imaginés pour d'autres usages (étude du sol ou du système racinaire des plantes) ou conçus spécialement en vue du prélèvement nématologique.

La tarière de pédologue est souvent utilisée et permet de faire des prélèvements séparés en profondeur, tous les 15 ou 20 cm. Elle est difficile à utiliser dans certains types de sol, trop caillouteux, ou dans des sols inondés. Elle présente aussi l'inconvénient d'exercer de fortes pressions et torsions sur le sol prélevé, ce qui doit détruire une forte proportion des nématodes.

Hurst et Franklin (1937) utilisent une sonde cylindrique munie d'une charnière longitudinale permettant d'ouvrir l'appareil et de recueillir aisément le sol prélevé.

Lownsberry, Mitchell et Head (1959), prélèvent de nombreux échantillons jusqu'à une profondeur de 1 m environ, dans des vergers, au moyen d'une sonde mue par un moteur électrique. La sonde est enfoncée dans le sol à travers un trou ménagé au fond d'une cuvette en matière plastique. Quand on soulève la tarière, le sol tombe dans la cuvette ; si le sol adhère à la sonde, on le fait tomber avec le doigt. Cette méthode offre l'avantage de permettre d'effectuer un prélèvement en une minute (fig. 13).

Pour l'étude du système racinaire, Bonzon (1966) utilise une sonde très robuste comprenant un corps de sonde en acier dont le bord inférieur est muni de dents affûtées intérieurement. Ce corps de sonde, fermé par un bouchon cylindrique de 18 cm de long, est fixé à l'extrémité d'une tige de 20 mm de diamètre, longue de 1,30 m qui permet d'enfoncer le corps de sonde jusqu'à cette profondeur, soit en frappant le haut de la tige avec un maillet, soit à l'aide d'une masse cylindrique évidée de 12 kg qui coulisse le long de la tige et frappe le bouchon de sonde. Nous avons pu, avec profit, utiliser cette sonde pour étudier la répartition en profondeur d'un nématode phyto-parasite dans une rizière.

Quel que soit le type de sonde utilisé, le sol est toujours plus ou moins déplacé et il en résulte un mélange des diverses couches. Pour y remédier, Weischer (1961) a mis au point une méthode qui semble bien être actuellement la meilleure pour obtenir un profil, en profondeur, de la répartition des nématodes dans le sol : une tarière est enfoncée dans le sol où elle creuse un trou de 15 cm de diamètre et 30 cm de profondeur. Elle est retirée du trou très soigneusement pour éviter la chute du sol emprisonné dans ses spires. On enfonce ensuite, dans le trou ainsi ménagé, un appareil (fig. 14) composé d'un axe (A) portant un récipient (T) qui peut être fixé, sur l'axe, à la hauteur désirée et d'un grattoir (S) qui tourne autour de l'axe et gratte une couche de sol qui tombe dans le récipient.

Von Törne (1962) a décrit une sonde destinée aux prélèvements dans le fumier et le compost où de nombreux débris végétaux doivent être sectionnés. Elle se compose de deux tubes concentriques, serrés par frottement doux, dont les extrémités inférieures sont munies de dents dirigées en sens inverse. Le tube intérieur est fixe et le tube extérieur tourne autour de lui.

METHODES D'ECHANTILLONNAGE.

Comme c'est le cas dans de nombreux groupes animaux les nématodes du sol sont très inégalement répartis et l'étude d'un seul échantillon ne permet d'affirmer rien d'autre que la présence des espèces qu'on y trouve. Toute étude de population in situ doit donc comprendre l'analyse d'un certain nombre d'échantillons.

Il est souvent indispensable, dans un but agronomique, d'avoir une idée assez précise de l'importance de la population de nématodes phytoparasites dans un champ. Des méthodes standardisées sont employées par les Services de Protection des Végétaux en Angleterre, en Allemagne et en Hollande, pour la lutte contre le nématode doré de la pomme de terre (Heterodera rostochiensis). Elles sont suffisantes pour déterminer si un champ peut, ou non, être considéré comme légalement indemne du parasite ou pour conseiller une rotation de culture. Elles sont, cependant, trop peu précises dans le cas d'une recherche biologique.

Méthode de l'échantillon global.

Cette méthode consiste à prendre, dans l'aire considérée, un grand nombre de petits échantillons et à les réunir en un échantillon global. Celui-ci est soigneusement homogénéisé et on y prélève des sous-échantillons de petite taille desquels les nématodes sont extraits puis comptés. C'est la méthode couramment employée dans les études agronomiques sur Heterodera rostochiensis.

En Allemagne on prélève, sur le champ, 400 échantillons élémentaires de 4-8 g par hectare, réunis ensuite en 8 échantillons globaux, soit, environ, 1 échantillon élémentaire pour 25 cm² (Goffart, 1962). En Hollande, 180 échantillons élémentaires à l'hectare sont réunis en 8 échantillons globaux (Oostenbrink, 1950). En Angleterre (Anscombe, 1950) les échantillons, d'après une conférence tenue en 1946, devaient être prélevés avec des gouges d'un diamètre de 2,5 - 4 cm jusqu'à une profondeur de 20 cm, à raison de 50 échantillons élémentaires pour les champs ≤ 4 ha. Après mélange, un sous-échantillon de 50 g était prélevé pour examen. D'après Widdowson (1962) cet échantillonnage est insuffisant.

Jones (1955) discute l'aspect statistique de cette procédure : si l'on prend des sous-échantillons dans un échantillon global bien homogénéisé, les comptages obtenus à partir de ces sous-échantillons devraient se répartir suivant la loi de Poisson. En pratique, la variance de l'erreur excède celle à laquelle on pourrait s'attendre dans le cas d'une distribution de Poisson et Jones attribue cette différence aux imperfections des techniques d'homogénéisation et d'extraction. Il considère, cependant, que cette différence est assez faible pour que la distribution observée soit assimilable à une distribution de Poisson. La variance étant alors égale à la moyenne, pour une série de comptages de sous-échantillons ayant fourni une moyenne \bar{x} , le coefficient de variation est égal à $\frac{\sqrt{\bar{x}} \times 100}{\bar{x}}$. Il ne dépend que de la moyenne et peut être calculé d'après des moyennes théoriques (Tableau 2).

TABLEAU 2

x	x	$\frac{\sqrt{\bar{x}} \times 100}{\bar{x}}$
1	1	100
25	5	20
100	10	10
1000	32	3

Ce n'est qu'à partir d'un comptage ayant fourni une moyenne ≥ 100 que le coefficient de variation prend une valeur assez faible. On en conclut qu'il faut faire varier la taille de l'échantillon jusqu'à obtenir des comptages ≥ 100 plutôt que de travailler avec des échantillons de taille fixe.

Ce principe n'est applicable que dans des champs où l'infestation est assez forte. Dans le cas d'un champ où l'infestation est faible, il faudrait traiter une trop grande quantité de sol pour obtenir des comptages ≥ 100 . Peters (1951) fait remarquer que dans un champ contenant 0,7 kystes pour 200 g de sol, les sous-échantillons de 200 g fourniraient des résultats égaux à 0 dans 50 % des cas. Il sera, alors, indispensable de traiter un certain nombre de ces sous-échantillons avant de pouvoir considérer le champ comme exempt du parasite. Hiddowson (1962), discutant le degré de précision de la méthode, donne un tableau théorique indiquant la probabilité d'obtenir des sous-échantillons de 200 g ne contenant aucun kyste en fonction de l'abondance de ceux-ci dans le champ examiné (Tableau 3)

TABLEAU 3

Nombre moyen de kystes			Probabilité de rencontrer des sous-échantil- lons sans kyste
par sous-échantillon	par g. de sol	par hectare (millions)	
5	0,025	62,5	0,01
3	0,015	37,5	0,05
2,5	0,0125	31,25	0,10
0,7	0,0035	8,75	0,50

Cette méthode de l'échantillon global, si elle peut être considérée comme suffisante pour une enquête effectuée dans un but agronomique, est trop imprécise pour des études écologiques. Si l'on veut en effet éviter des erreurs assez grossières dans le cas des populations faibles, il faudra examiner un nombre de sous-échantillons très important. D'autre part, comme le fait remarquer Jones (1955), elle ne tient pas compte des variations, parfois fort importantes, d'un point à l'autre de l'aire étudiée. Si l'on veut évaluer l'importance d'une population de nématodes en connaissant le degré de confiance qu'on peut faire au chiffre moyen tiré des comptages, comme c'est le cas, par exemple, quand on se propose de connaître l'infestation d'un terrain où l'on doit mettre en place des essais biologiques, il est nécessaire d'étudier séparément un certain nombre d'échantillons élémentaires.

Méthode des échantillons multiples

Widdowson (1962) donne les résultats d'une expérience effectuée à Rothamsted en 1956 au cours de laquelle une aire de 25 ares environ avait été divisée en 364 carrés de 91 cm de côté. Deux échantillons globaux de 150-200 g de sol avaient été prélevés dans chaque carré et, pour chacun de ces deux échantillons globaux, les kystes d'H. rostochiensis avaient été extraits d'un sous-échantillon de 100 g. Les calculs ont montré que la variance entre les 2 échantillons au sein de chaque carré correspondait à un coefficient de variation de 30 %, qui est 3,4 fois plus élevé que celui auquel on aurait pu s'attendre dans le cas d'une distribution de Poisson. Entre les différents carrés, la variance était encore plus importante et correspondait à un coefficient de variation de 155 %. A partir de ces données, il a été possible de calculer les effets combinés du nombre d'échantillons étudiés et du niveau de la population (Tableau 4).

TABLEAU 4

(coefficients de variation)

Nombre d'échantillons	Nombre de kystes comptés			
	4	25	100	400
1	178	161	157	155
4	85	65	61	60
25	56	30	21	21
100	52	23	11	11
400	50	21	7	7

Il est bien évident que :

1°) - Quelle que soit l'importance de la population, le chiffre fourni par le comptage d'un seul échantillon risque toujours d'être fortement erroné.

2°) - Le coefficient de variation diminue beaucoup si le nombre d'échantillons examinés augmente, et ceci, spécialement, pour les populations **importantes**.

3°) - Dans le cas des populations faibles, même en augmentant beaucoup le nombre des échantillons, le coefficient de variation reste toujours fort.

L'un des auteurs (G. Merny, 1966) cherchant à évaluer les populations de nématodes parasites présents dans les rizières de Côte d'Ivoire, a prélevé 100 échantillons de 250 cc dans une rizière d'une superficie d'environ 1 ha et compté les nématodes phytoparasites présents dans chaque échantillon. La figure 15 donne les diagrammes de fréquence de trois de ces espèces. Il est évident qu'on ne se trouve pas en présence de distributions de Poisson.

Pour ces trois espèces, l'ajustement à une loi binomiale négative est satisfaisant (test de Kolmogoroff-Smirnov positif au seuil %). Pour définir une population aussi variable, le seul énoncé de la moyenne des individus par échantillon est insuffisant et même, dans certains cas, de peu de signification. Les résultats peuvent être normalisés en opérant la transformation :

$$y = \log (x + x_0)$$

dans laquelle x_0 est un nombre variable de 0,1 à 20 qui doit être déterminé graphiquement pour chaque distribution. Parallèlement, des prélèvements de 10 échantillons ont été faits dans un certain nombre de rizières. Ces études ont montré que les résultats obtenus avec des populations très faibles n'étaient pas normalisables et qu'aucune estimation précise de la population ne pouvait être avancée dans ce cas. Pour des populations moyennes, l'intervalle de confiance de la moyenne obtenue est acceptable si un grand nombre d'échantillons est étudié (environ 100) à condition d'appliquer, aux résultats obtenus avec les données retransformées, le coefficient C de Neyman et Scott (1960). Enfin, des résultats satisfaisants peuvent être obtenus avec une dizaine d'échantillons dans le cas des populations importantes (Merny et Déjardin, sous presse).

Si l'étude de surfaces importantes, de l'ordre de l'hectare, amène toujours à obtenir des résultats hétérogènes, il n'en est pas toujours de même des surfaces plus restreintes. Andrassy (1962), étudiant, sur des aires de 6 x 6 cm, les populations de nématodes mobiles, tant phytophages que saprophages ou prédateurs, prélève des échantillons correspondant à une surface de sol de 1 cm² et constate que la moyenne obtenue est satisfaisante avec seulement 10 échantillons.

cas des endoparasites fixés.

Les méthodes d'échantillonnage ont surtout été étudiées pour Heterodera rostochiensis qui est, en fait, un endoparasite, mais le but, agronomique, des opérations était, non de connaître la répartition de l'animal sur le système racinaire de la plante-hôte mais de déterminer l'infestation du sol après récolte, le taux de cette infestation déterminant celui des attaques sur la culture suivante. Les kystes sont, dans ce cas, traités comme des nématodes ectoparasites libres.

Southey (1956), au cours d'une enquête portant sur l'infestation des champs d'avoine de Grande-Bretagne par Heterodera avenae, a utilisé concurremment deux méthodes ; la première consiste à prélever, en cours de végétation, des échantillons de sol, sans se soucier des nouveaux kystes en voie de formation sur les racines ; la seconde consiste à examiner, en fin de cycle, les kystes présents sur les racines. Il est à remarquer que la première méthode porte sur l'observation d'une population datant de l'année précédente et la seconde sur celle de l'année en cours, populations qui ont un certain nombre de chances de n'être pas équivalentes. Southey constate (Tableau 5) que la méthode de prélèvement du sol n'a pas permis la détection dans 17 champs où celle des prélèvements de racines l'avait réussie alors que l'inverse ne s'est produit que dans 3 champs.

TABLEAU 5

		S O L		
		DéTECTÉ	NON DÉTECTÉ	TOTAL
Racines	DéTECTÉ	43	17	60
	NON DÉTECTÉ	3	31	34
	TOTAL	46	48	94

L'examen des racines semble donc être sensiblement plus efficace que celui du sol. Il est à noter, toutefois, que Southey ne cherchait qu'à détecter la présence ou l'absence du parasite dans un champ donné et non à évaluer l'importance de la population.

Chitwood et Feldmesser (1948) évaluent l'infestation de plants de pommes de terre par Heterodera rostochiensis en examinant les racines soit en utilisant le nombre de nématodes observés par un opérateur dans un temps donné (1 minute), soit le nombre de femelles, rapporté à l'unité de poids de racines, qui se détachent de celles-ci si on les secoue vigoureusement dans l'eau. Dans les deux cas, il ne s'agit pas d'évaluer avec précision l'importance d'une population mais de comparer la sensibilité de plusieurs variétés de la plante-hôte ou l'efficacité de divers nématicides et les résultats obtenus, s'ils sont valables relativement les uns aux autres, n'ont pas de valeur absolue.

Les mêmes auteurs ont étudié l'influence de la répartition des racines de l'hôte sur celle des nématodes dans le sol, toujours dans le cas du nématode doré de la pomme de terre : un plant fut sélectionné dans une aire gravement infestée et une tranchée creusée autour de la zone normale de distribution des racines (80 x 30 cm). Cette opération a laissé subsister un parallélépipède de sol au milieu duquel le plant se trouvait. Le sol a, alors, été prélevé par positions comme il est montré à la figure 16, la couche marquée D étant éliminée, et la densité des kystes appréciée dans chaque portion par des moyens classiques. Les kystes étaient les plus nombreux dans les portions 1 à 5, encore assez nombreux dans les portions 7 et 9, moins nombreux dans les portions 6, 8 et 10 et rares à inexistants dans les portions 11 à 27. L'hétérogénéité de la répartition des kystes dans le sol est donc liée, de façon très étroite, à celle de la répartition des racines.

CONCLUSION

Il semblerait, d'après ce qui précède, qu'un opérateur désirent extraire les nématodes d'un échantillon de sol ou de racines dispose d'un grand nombre de procédés. En fait, la méthode à employer dépendra essentiellement de la nature de l'échantillon et du type de nématode recherché. De ce fait le choix sera assez restreint.

S'il s'agit d'extraire les nématodes actifs d'un échantillon de sol, l'élutriation s'impose si l'échantillon est d'une taille assez importante et si l'on désire des résultats précis ; par contre si l'échantillon est de petite taille et si l'on désire seulement obtenir une appréciation sommaire de la population qu'il contient, la décantation peut suffire. La méthode par sédimentation peut être considérée comme suffisante dans un laboratoire de campagne où des élutriateurs encombrants, longs à mettre au point, ne peuvent être installés. Si l'on cherche des oeufs dans le sol, la centrifugation s'impose. L'examen direct est utile si l'on veut compter les nématodes fixés sur un système racinaire ; c'est le seul moyen d'examiner et de dénombrer les femelles adultes appartenant à certains genres, Tylenchulus et Rotylenchulus, en particulier.

L'entonnoir de Baermann a le mérite d'être l'ancêtre de toutes les méthodes d'extraction par mobilité mais on ne peut plus considérer les résultats qu'il donne comme valables pour exprimer la population contenue dans un échantillon. Caveness et Jensen (1955), dans un même échantillon, recueillent 165 animaux par la méthode de Baermann et 1.011 par centrifugation. Young (1954) extrait les nématodes dans des lots de racines contenant, a priori, la même population de Pratylenchus sp. et de Radopholus similis, 805 sont extraits en moyenne, au Baermann et 3.761 par incubation. Même si l'on tient compte de la variabilité entre les lots, il est certain que cette différence est significative.

Walker et Wilson (1960) comparent avec l'élutriateur de Seinhorst la méthode qu'ils ont mise au point et qui représente un progrès important sur celle de Baermann. Les nombres obtenus grâce à leur technique ne s'élèvent qu'à 16 % de ceux obtenus à l'élutriateur avec un sol limoneux, 60 % avec une terre organique et atteignent 100 % avec un sol argilo-limoneux.

Il est donc certain que les méthodes par gravité et spécialement l'élutration, doivent être utilisées chaque fois qu'il est possible.

Dans le cas de terreau ou de litière de forêt, la meilleure méthode à utiliser est celle d'Oostenbrink (1960) (Cottonwool filter method) sans décantation. Oostenbrink (1960) compare cette méthode avec la méthode complète, qui comprend une décantation préalable et obtient un nombre d'individus égal à 72 % de celui fourni par la méthode complète. Dans le cas des terreaux ou litières de forêt, où la décantation est impossible, cette méthode est un pis-aller très acceptable, représentant un gros progrès sur celle de Baermann qui, dans le même cas, n'a fourni que 12 % des individus.

Dans le cas d'endoparasites radiculaires, on a le choix entre l'incubation et l'aspersion, d'une part, et la désintégration des tissus des racines, de l'autre. Ce choix est difficile, peu de résultats ont été obtenus permettant de comparer les deux catégories de méthodes et ceux dont on dispose sont loin d'être concordants.

Stermerding (1963), extrayant Pratylenchus penetrans de racines de maïs, en recueille environ cinq fois plus par la méthode du "mixer" que par celle de l'aspersion. Vilardebo et Guérout (comm. pers.) extrayant Pratylenchus brachyurus de 100 g de racines d'ananas en recueillent 68.600 individus par passage au mixer pendant 10 secondes et tamisage, contre 10.600 à l'asperseur, au bout de deux semaines. Par contre, avec les racines

de bananier, 9.884 Radopholus similis pour 25 g de racines sont extraits à l'aspersion contre 10.009 par la méthode du mixer. Ces auteurs attribuent la différence observée au fait que la racine d'ananas est scléreuse et que le nématode n'y cause pas de lésions externes ; de ce fait les points de sortie possible du parasite sont très limités, alors que la racine du bananier est molle et que les lésions externes y sont nombreuses, ce qui facilite la sortie du parasite à l'aspersion. Les résultats obtenus à ce jour semblent donc favorables à la méthode de dilacération des tissus végétaux par un moyen mécanique, méthode qui présente l'avantage d'être rapide mais l'inconvénient de tuer environ 30 % des nématodes en les lésant parfois gravement, ce qui rend les comptages plus difficiles. Il est encore impossible de dire si cette méthode doit être systématiquement préférée à l'aspersion et de nombreuses comparaisons devront être faites avec des parasites et des hôtes divers.

Enfin, trop peu de renseignements sont encore disponibles sur les possibilités d'utilisation de la méthode de désintégration des tissus végétaux par les enzymes pour connaître ses possibilités d'utilisation.

En ce qui concerne le comptage les techniques sont suffisamment sûres et les modifications qui y sont apportées ne concernent que la légère amélioration des plaques et lames diverses.

Les procédés d'échantillonnage, par contre, s'ils sont au point pour l'évaluation des populations de kystes des différents Heterodera, dans le sol, et en vue d'une utilisation à but agronomique, ne semblent pas encore assez élaborés pour donner des résultats suffisamment précis concernant les recherches écologiques sur les populations de nématodes mobiles. Il faudra toujours avoir présent à l'esprit qu'un nombre d'échantillons assez important sera nécessaire ; ce nombre variera avec la valeur de la population, laquelle devrait être approchée par un échantillonnage préalable restreint.

Les différentes techniques quantitatives concernant les nématodes du sol et des plantes n'ont été mises au point que récemment. Les données nécessaires pour les comparer entre elles sont peu nombreuses. Il sera donc ~~nécessaire~~ ^{indispensable} pendant longtemps encore de perfectionner ces techniques tout en accumulant les résultats obtenus avec celles dont on dispose.

REFERENCES CITEES

- ANDRASSY, I. (1962). The problem of number and size of sampling unit in quantitative studies of soil nematoda. In : Progress in soil zoology, edited by P.W. Murphy. London, Butterworths. pp. 65-67.
- ANSCOMBE, F.J. (1950). Soil sampling for Potato root eelworm cysts. A report presented to the Conference of Advisory Entomologists. Ann. appl. Biol. 37, 286-295.
- BAERMANN, G. (1917). Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum - (Nematoden) - Larven in Erdproben. Meded. geneesk. Lab. Weltevr. pp. 41-47.
- BONZON, B. (1966). Etude méthodologique du système radicellaire d'Ananas comosus (L.) Merr. variété Cayenne lisse. Diplôme d'Etudes Supérieures, Univ. Paris, 137pp.
- BUHR, H.A. (1954). Untersuchungen über den Kartoffelnematoden I. Die "Papierstreifenmethode" ein vereinfachtes Verfahren zur Untersuchung von Bodenproben auf ihren Besatz mit Nematodenzysten. Nachr. Bl. Dtsch. PflSchDienst, Berl. 8, 45-48.
- CAVENESS, F.E. & JENSEN, H.J. (1955). Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. Proc. helm. Soc. Wash. 22, 87-89.
- CHITWOOD, B.G. & FELDMESSER, J. (1948). Golden nematode population studies. Proc. helm. Soc. Wash. 15, 43-55.
- CHRISTIE, J.R. & PERRY, V.G. (1951). Removing nematodes from soil. Proc. helm. Soc. Wash. 18, 106-108.

- COBB, N.A. (1918). Estimating the nema population of the soil. Agric. Tech. Circ. I, Bur. Plant Industr., U.S. Dept. Agric. 48pp.
- COOPER, B.A. (1955). A mechanical device for concentrating Heterodera cysts (Nematoda). In : Soil Zoology, edited by D.K. McE. KEVAN. London, Butterworths pp. 385-389.
- DONCASTER, C.C. (1962). A counting dish for nematodes. Nematologica 7, 334-337.
- DROPKIN, V.H., SMITH Jr., W.L. & MYERS, R.F. (1960). Recovery of nematodes from infected roots by maceration. Nematologica 5, 285-288.
- ESSER, R.P. (1957). An improved post-Baermann funnel technique. Plant Dis. Repr 41, 269-270.
- FAUST, E.C. et al. (1938). A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Amer. J. trop. Med. 18, 169.
- FEDER, W.A. & FELDMESSER, J. (1954). The Büchner funnel as an aid in collecting and concentrating nematode populations. Plant Dis. Repr 38, 805-806.
- FENWICK, D.W. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of Heterodera schachtii from soil. J. Helm. 18, 155-172.
- FENWICK, D.W. (1951). A new modification of the McMaster slide for use in potato-root eelworm investigations. J. Helm. 25, 173-176.
- FENWICK, D.W. (1963). Recovery of Rhadinaphelenchus cocophilus (Cobb, 1919) Goodey, 1960 from coconut tissues. J. Helm. 37, 11-14.
- FANKLIN, M.T. (1949). A quick method of demonstrating nematodes of the genus Aphelenchoides in leaves. J. Helm. 23, 91-93.
- FANKLIN, M.T. & GOODEY, J.B. (1949). A cotton blue lactophenol technique for mounting plant parasitic nematodes. J. Helm. 23, 175-178.

- RODFREY, G.H. (1935). The demonstration of plant-parasitic nematodes in host tissues. Phytopathology 25, 1026-1030.
- ROFFART, H. (1962). Sampling and extraction methods for cyst-forming nematodes of the genus Heterodera. In : Progress in Soil Zoology, edited by P.W. Murphy. London, Butterworths pp. 268-278.
- ROODEY, J.B. (1963). Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Tech. Bull. n°2 Minist. Agric. 4th edition. London, H.M.S.O., 72pp.
- ROODEY, T. (1937). Two methods for staining nematodes in plant tissues. J. Helm. 15, 137-144.
- RO GUIRAN, G. (1966a). Coloration des nématodes dans les tissus végétaux par le bleu coton à froid. Nematologica 12, 646.
- RO GUIRAN, G. (1966b). Infestation actuelle et infestation potentielle du sol par les nématodes phytoparasites du genre Meloidogyne. C.-r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris. 262, 1754-1756.
- ROURST, R.H. & FRANKLIN, M.T. (1937). Field experiments in Lincolnshire on the chemical treatment of soil infected with Heterodera schachtii. J. Helm. 15, 9-20.
- ROHNSON, R.F.C. (1957). An improved cyst-counting tray. Plant Path. 6, 75.
- RONES, F.G.W. (1955). Quantitative methods for the estimation of cyst-forming nematodes (Heterodera spp.) in soil. In : Soil Zoology edited by D.K. McE. Kevan. London, Butterworths. pp. 394-402.
- ROUNSBERY, B.F., MITCHELL, J.T. & HEAD, E.E. (1959). An electric auger for nematological soil sampling in orchards. Plant Dis. Reprtr 43, 918-919.
- ROERNY, G. (1966). Les nématodes parasites du riz irrigué en Côte d'Ivoire. (Rapport préliminaire), multigraph. ORSTOM Abidjan, 94pp.
- ROERNY, G. & DEJARDIN, J. (). Estimation de l'importance des populations de nématodes phytoparasites dans les rizières de Côte d'Ivoire. (sous presse).

- WINDERMAN, G. (1956). New techniques for counting and isolating free-living nematodes from small soil samples and from oak forest litter. Nematologica 1, 216-226.
- WEYMAN, J. & SCOTT, E. (1960). Correction for bias introduced by a transformation of variables. Ann. Math. Stat. 31, 643-655.
- WOSTENBRINK, M. (1950). Het aardappelaaltje (H. rostochiensis Wollenweber) een gevaarlijke parasiet voor de eenzijdige aardappelcultuur. Versl. PlZiekt. Dienst. Wageningen 115, 230pp.
- WOSTENBRINK, M. (1954). Een doelmatige methode voor het toetsen van aaltjesbestrijdings-middelen in grond met Hoplolaimus uniformis als proefdier. Meded. LandbHoogesch. Gent 19, 377-408.
- WOSTENBRINK, M. (1960). Estimating nematode populations by some selected methods. In : Nematology, edited by Sasser J.N. & Jenkins, W.R. The University of North Carolina Press, Chapel Hill. pp. 85-102.
- PETERS, B.G. (1951). The term "Eelworm-free soil", in plant quarantine regulations. Nature, Lond. 167, 368.
- PETERS, B.G. (1952). Toxicity tests with vinegar eelworm : 1. Counting and culturing. J. Helm. 26, 97-110.
- SEINHORST, J.W. (1950). De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aanstasting door het stengelaaltje (Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev) Tijdschr. Pl. Ziekt. 56, 291-349.
- SEINHORST, J.W. (1955). Een eenvoudige methode voor het afscheiden van aaltjes uit grond. Tijdschr. Pl. Ziekt. 61, 188-190.
- SEINHORST, J.W. (1956). Quantitative extraction of nematodes from soil. Nematologica 1, 249-267.

- SEINHORST, J.W. (1962a). Extraction methods for nematodes inhabiting soil. In : Progress in Soil Zoology, edited by P.W. Murphy. London, Butterworths, pp. 243-256.
- SEINHORST, J.W. (1962b). Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. Nematologica 8, 117-128.
- SEINHORST, J.W. (1964). Methods for the extraction of Heterodera cysts from not previously dried soil samples. Nematologica 10, 87-94.
- SOUTHEY, J.F. (1956). National survey work for cereal root eelworm (Heterodera major (O. Schmidt) Franklin). Nematologica 1, 64-71.
- STANILAND, L.N. (1954). A modification of the Baermann funnel technique for the collection of nematodes from plant material. J. Helm. 28, 115-117.
- STEMERDING, S. (1963). Een mixer-wattenfilter methode om vrijbewegelijke endoparasitaire nematoden uit wortels te verzamelen. Versl. PlZiekt. Dienst Wageningen 141, 6pp.
- STOCKLI, A. (1943). Uber Methoden zur quantitativen Bestimmung der im boden freilebenden Nematoden. Ber-Schweiz. bot. Ges. 53A, 160-174.
- TARJAN, A.C., SIMANTON, W.A. & RUSSEL, E.E. (1956). A labor-saving device for the collection of nematodes. Phytopathology 46, 641-644.
- VON TORNE, E. (1962). A cylindrical tool for sampling manure and compost. In : Progress in Soil Zoology, edited by P.W. Murphy. London, Butterworths, pp. 240-242.
- WALKER, J.T. & WILSON, J.D. (1960). The separation of nematodes from soil by a modified Baermann funnel technique. Plant Dis. Repr 44, 94-97.

- WEISCHER, B. (1961). Methoden und Ergebnisse neuerer nematologischer Untersuchungen in Weinbergen. Wein-Wissensch. 16, 105-111.
- WIDDOWSON, E. (1962). The estimation of soil populations of Heterodera rostochiensis Woll. In : Progress in Soil Zoology, edited by P.W. Murphy. London, Butterworths, pp. 59-64.
- WILLIAMS, T.D. & WINSLOW, R.D. (1955). A synopsis of some laboratory techniques used in the quantitative recovery of cyst forming and other nematodes from soil. In : Soil Zoology, edited by D.K. McE. Kevan. London, Butterworths, pp. 375-384.
- YOUNG, T.W. (1954). An incubation method for collecting migratory endoparasitic nematodes. Plant Dis. Repr 38, 794-795.
- ZUCKERMAN, B.M. (1960). A method for the concentration of nematodes for mounting from the Baermann apparatus. Proc. helm. Soc. Wash. 27, 37-39.
-

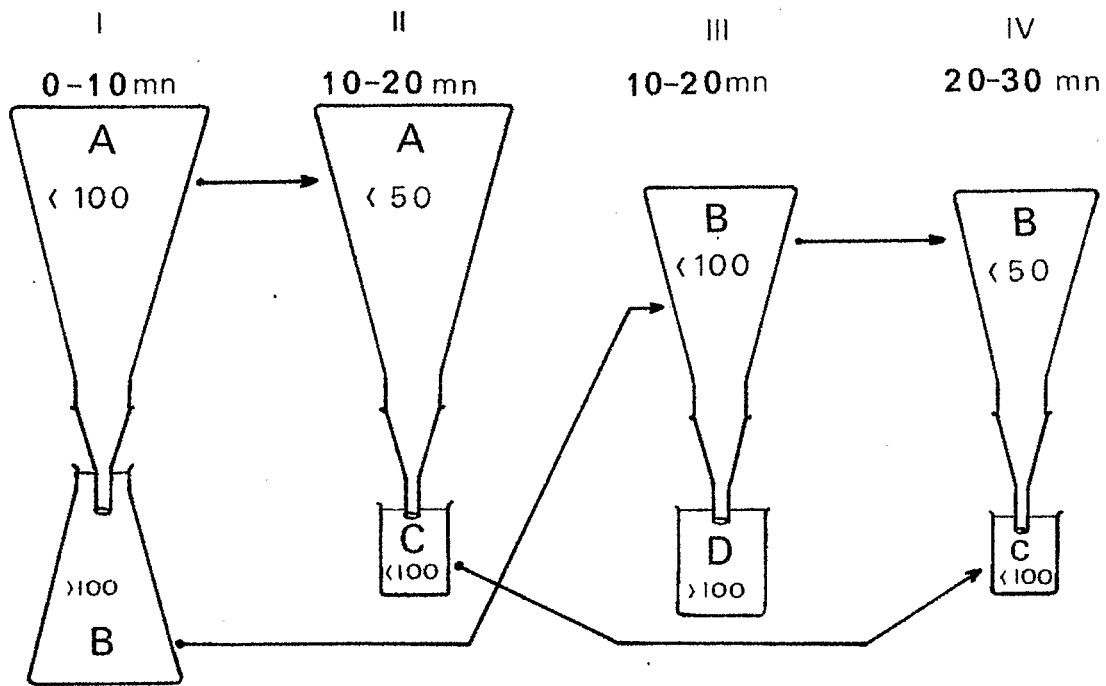


fig. 1 - Méthode des deux fioles d'Erlenmeyer de Seinhorst.
 (d'après Seinhorst : Tijdschrift over Plantenziekten
 61, p.189).

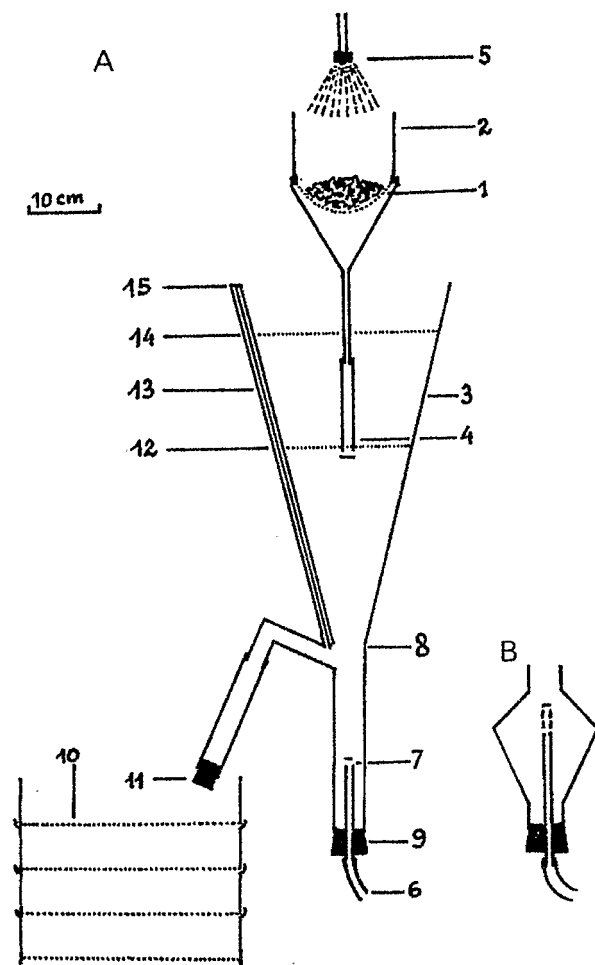


Fig. 2 - Elutriateur d'Oostenbrink. (d'après Oostenbrink.
in : Sasser & Jenkins : Nematology. fig. 6, p. 88).

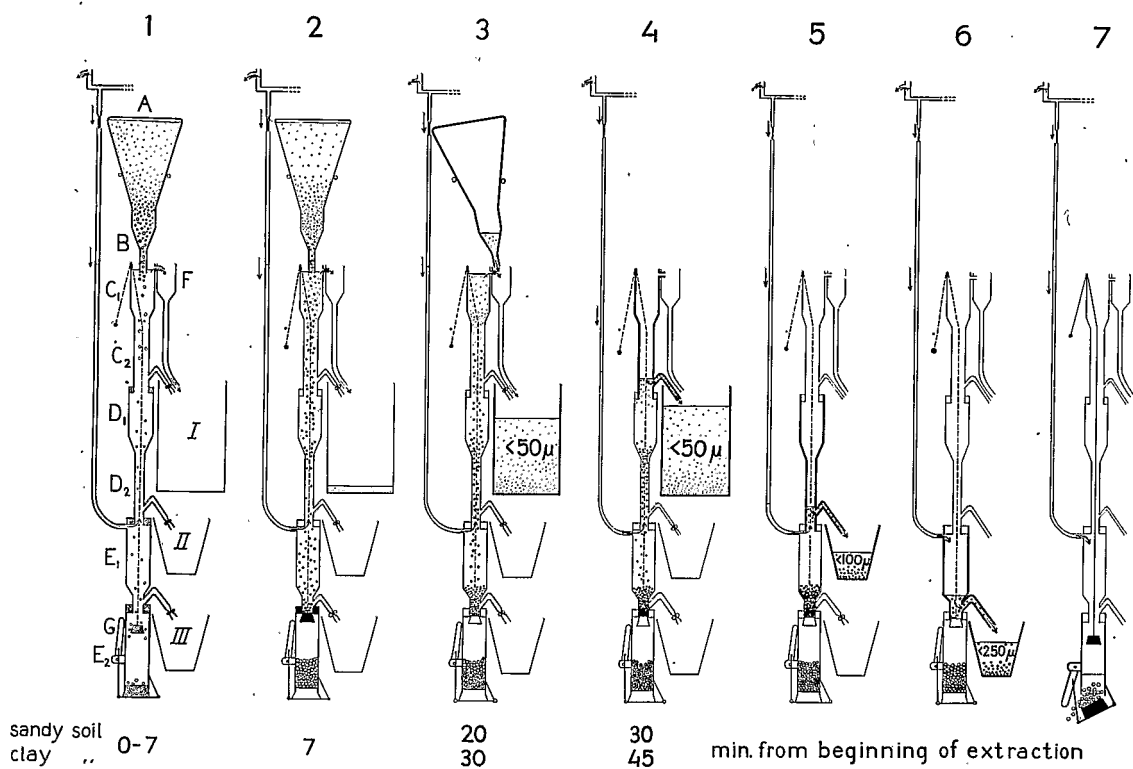


Fig. 3 - Elutriateur de Seinhorst et son fonctionnement.
(d'après Seinhorst, Nematologica 8 p.123).

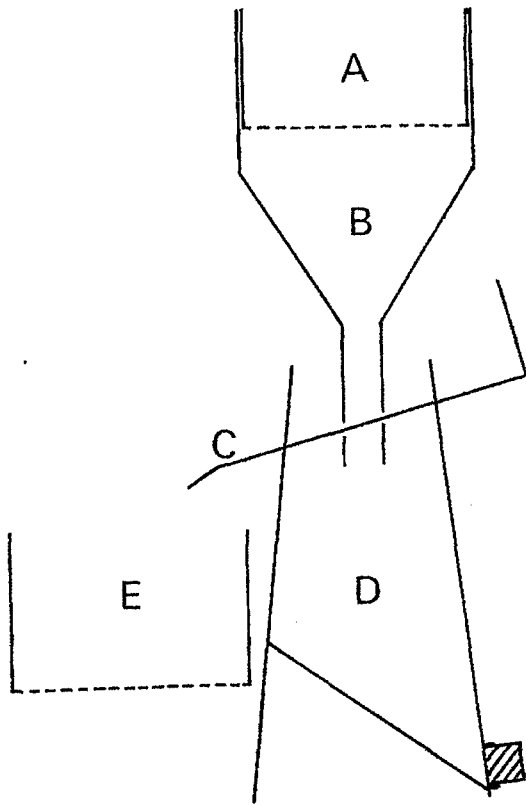


Fig. 4 - Appareil de Fenwick, modifié par Oostenbrink. pour l'extraction des kystes dans le sol préalablement séché. (d'après Goodey, Laboratory methods for work with plant and soil nematodes.fig. 6, p. 13).

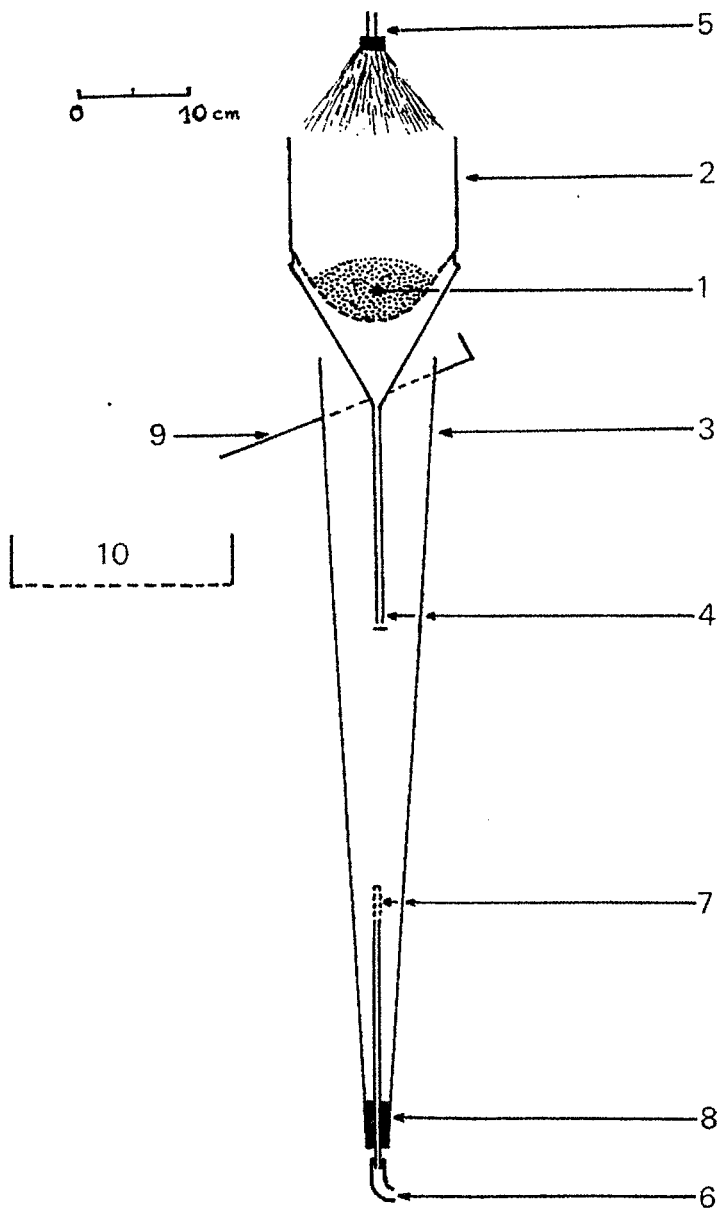


Fig. 5 - Appareil d'Oostenbrink pour l'extraction des kystes dans le sol humide (d'après Oostenbrink, in : Sasser & Jenkins : Nematology, fig. 16 - p.92).

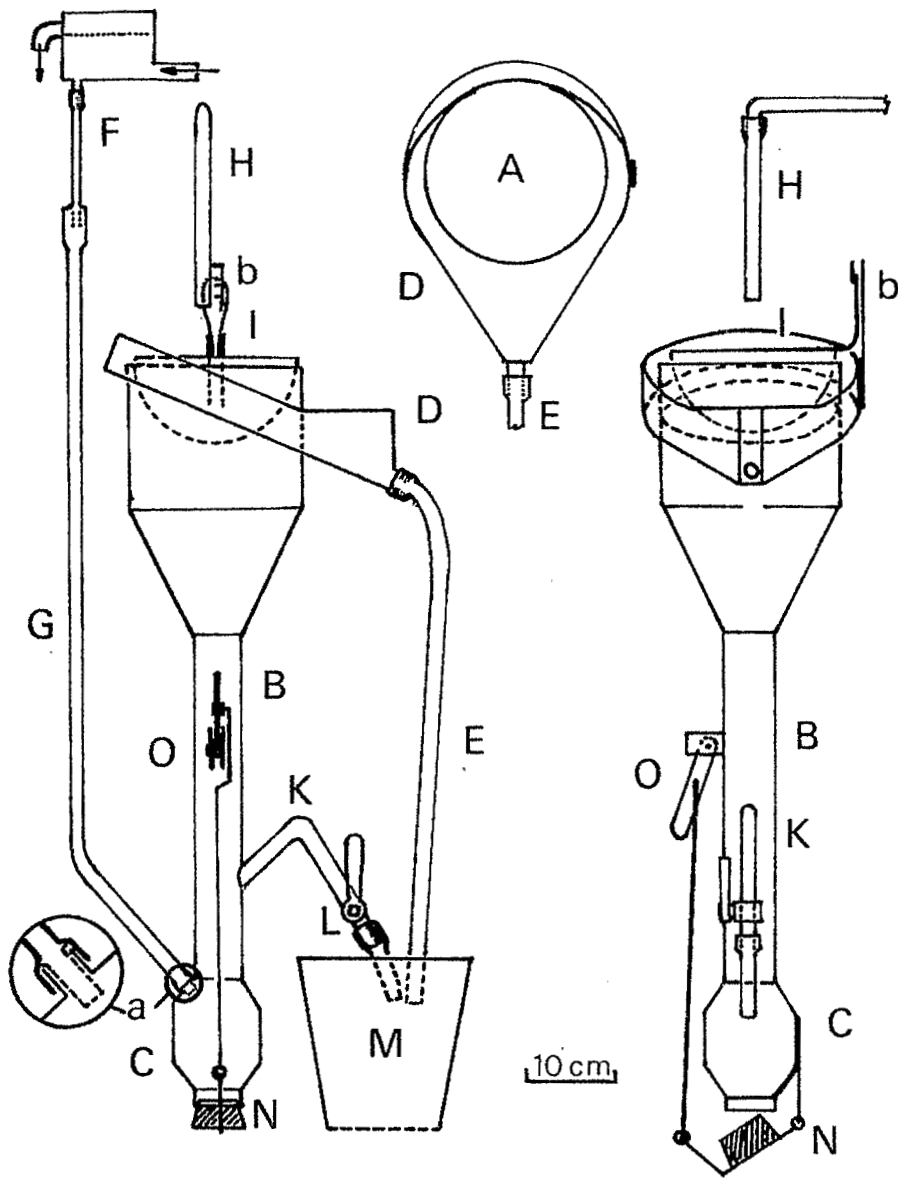


Fig. 6 - Appareil de Seinhorst pour l'extraction des kystes dans le sol humide. (d'après Seinhorst, *Nematologica* 10. p. 88).

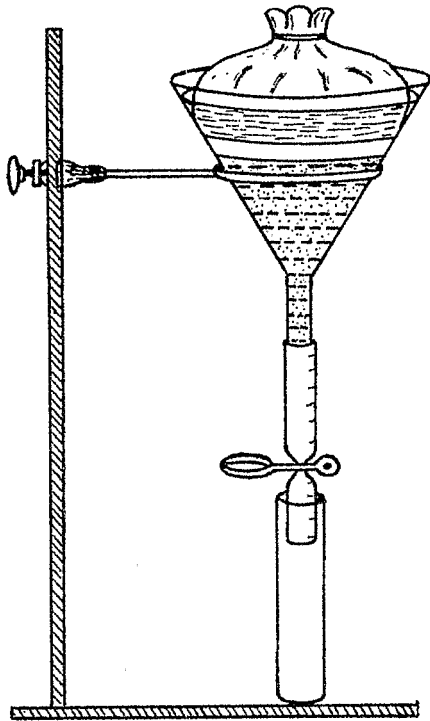


Fig. 7 - Entonnoir de Baermann (d'après Peters, in : McE.Kevan : Soil Zoology, fig. 91, p. 373).

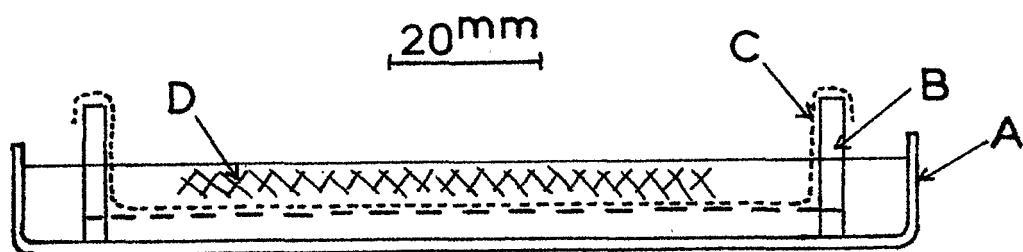


Fig. 8 - Technique de Schindler modifiée (en usage au laboratoire de Nématologie de l'O.R.S.T.O.M. Adiopodoumé, Côte d'Ivoire). A : boîte de Pétri, B : tamis, C : papier kleenex, D : débris végétaux.

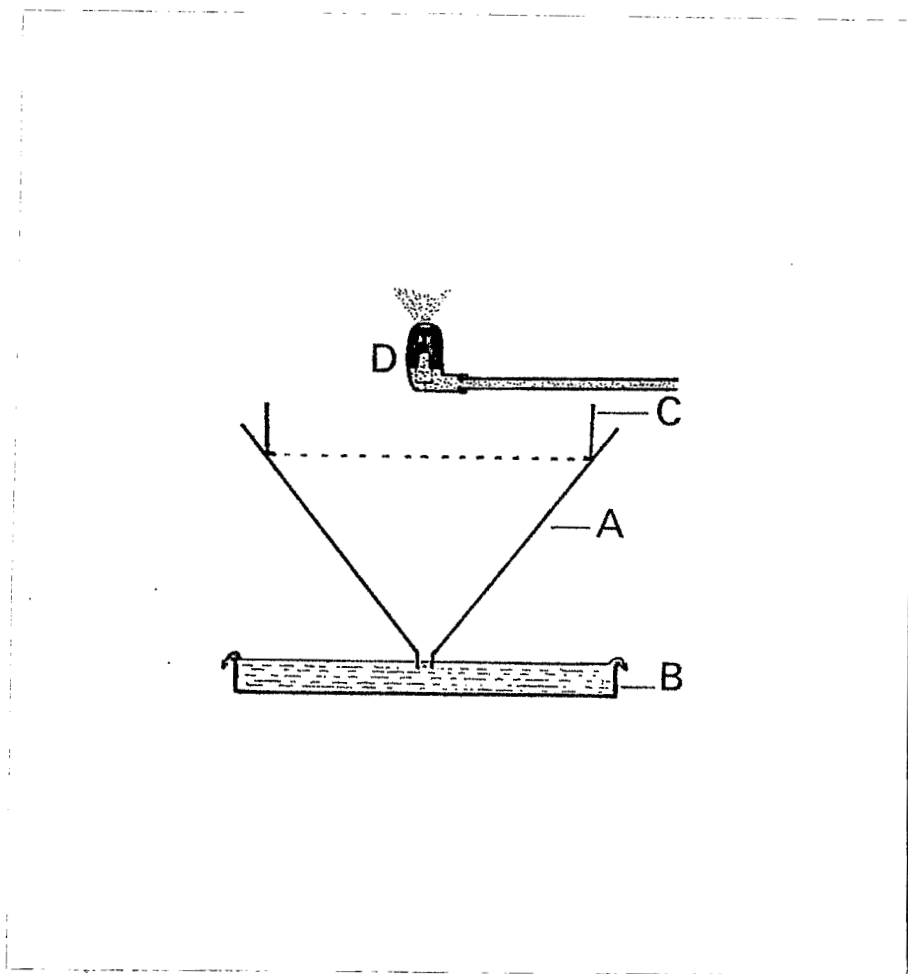


Fig. 9 - Asperseur de Seinhorst. L'eau sous pression est amenée par le tube ~~///~~ et le brouillard est produit en D. (d'après Seinhorst, Tijdschrift over Plantenziekten 56, p.310). ==

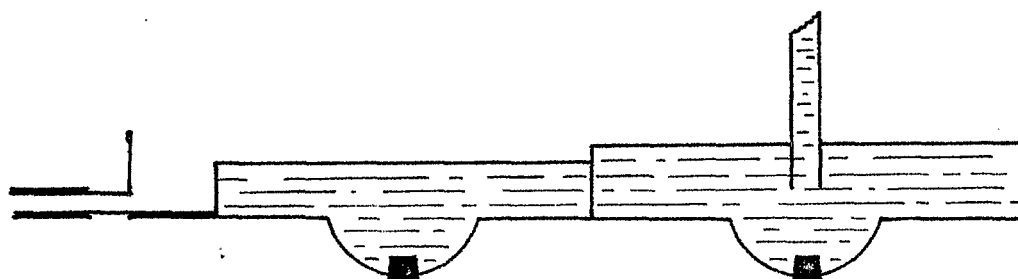


Fig. 10 - Récipient de Peters à double trop-plein pour recueillir les nématodes sortant de l'asperseur.
(d'après Goodey, Laboratory methods for work with plant and soil nematodes, fig. 1, p.3).

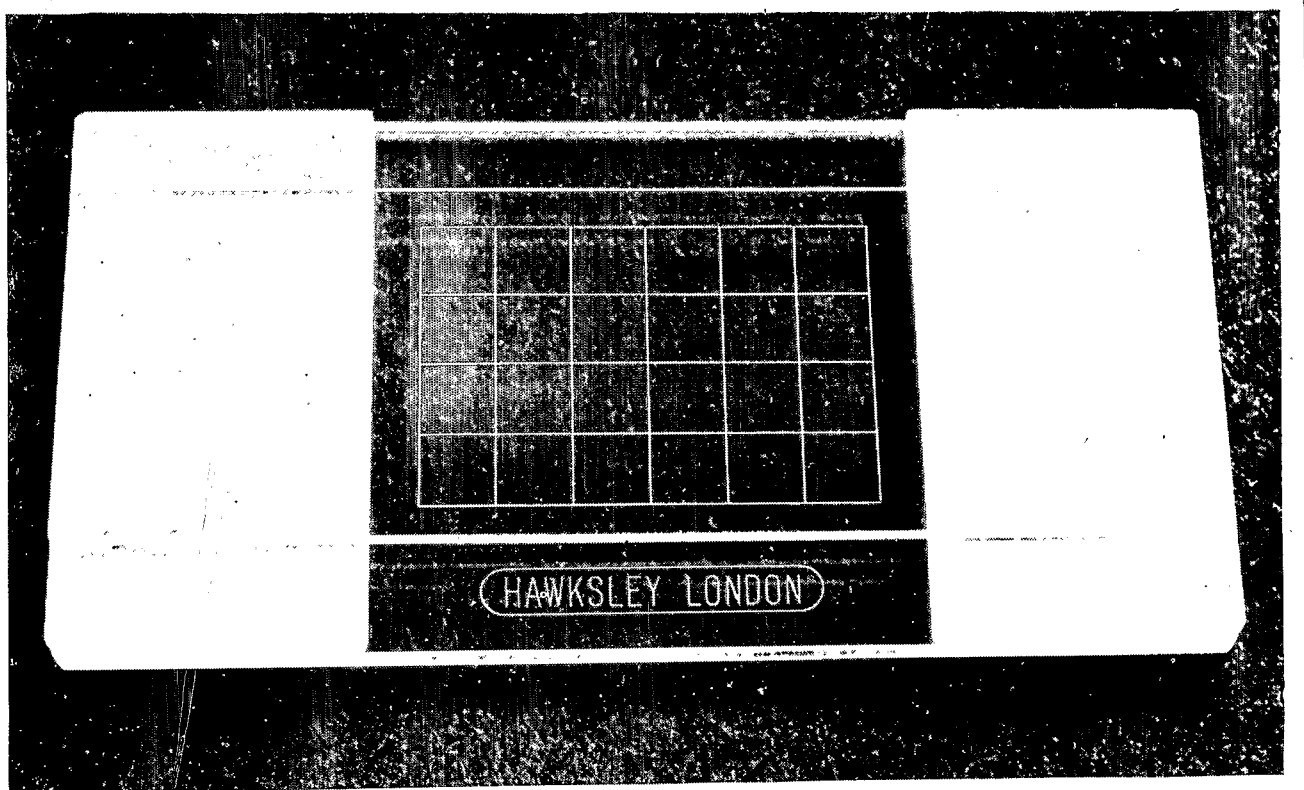


Fig. 11 - Lame à comptage de Peters. (d'après Goodey, Laboratory methods for work with plant and soil nematodes, plate IX).

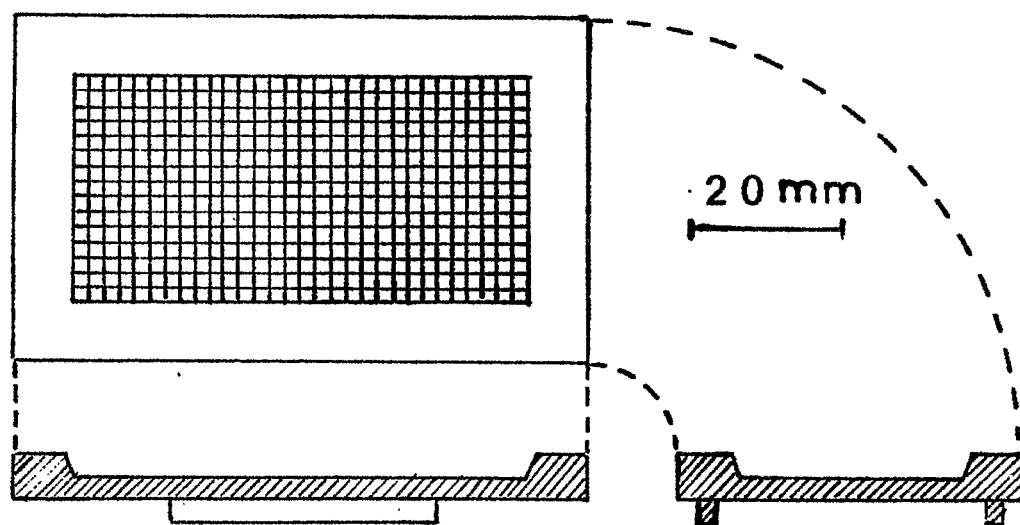


Fig. 12 - Lame ouverte pour comptage de parties aliquotes de 5 cc, en usage au laboratoire de Nématologie de l'O.R.S.T.O.M., Adiopodoumé, Côte d'Ivoire.



Fig. 13 - Sonde électrique de Lownsbery, Mitchell et Head
(d'après Lownsbery et all., Plant Disease Reporter
43, fig. 3 p. 919. Cliché aimablement fourni par
le Dr. Lownsbery).

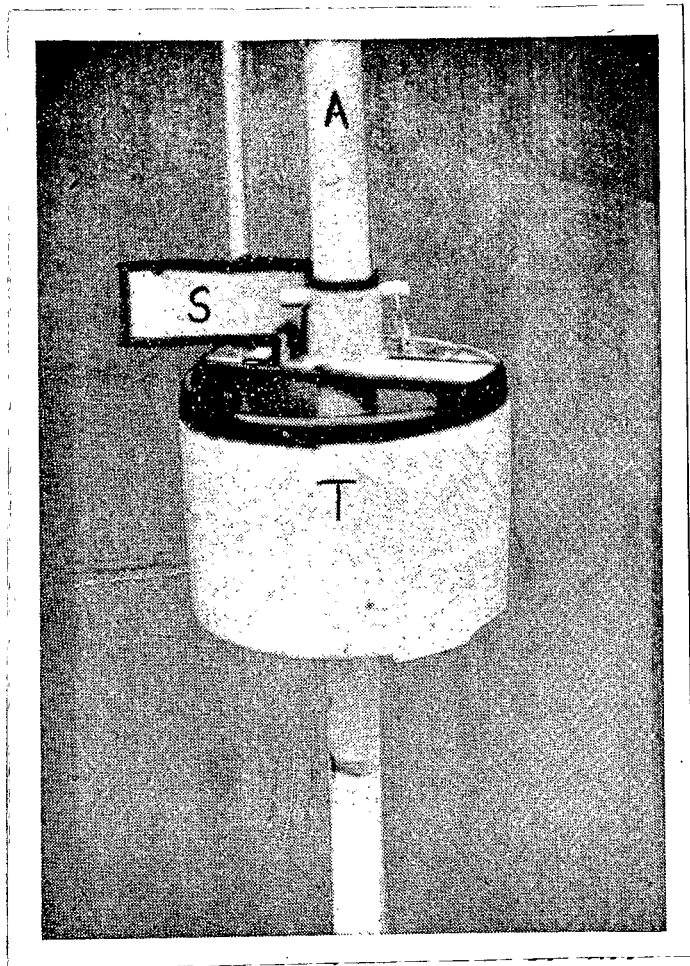


Fig. 14 - Appareil à prélèvements de sol de Weischer
(d'après Weischer, Wein-Wissenschaft 16, fig. 2
p.107).

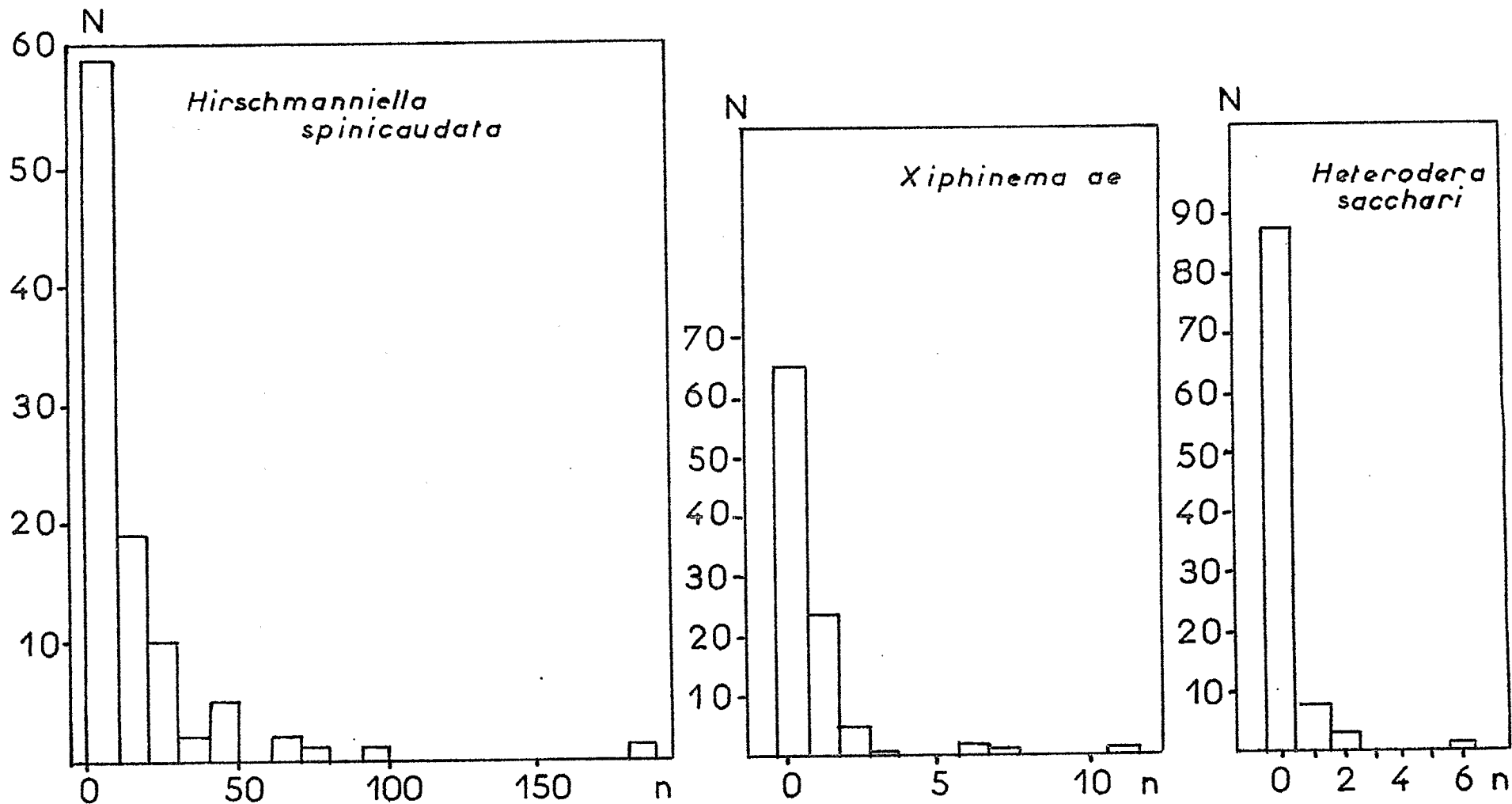


Fig. 15 - Distribution de trois espèces dans 100 échantillons prélevés dans une rizière de Côte d'Ivoire (Merny, 1966).

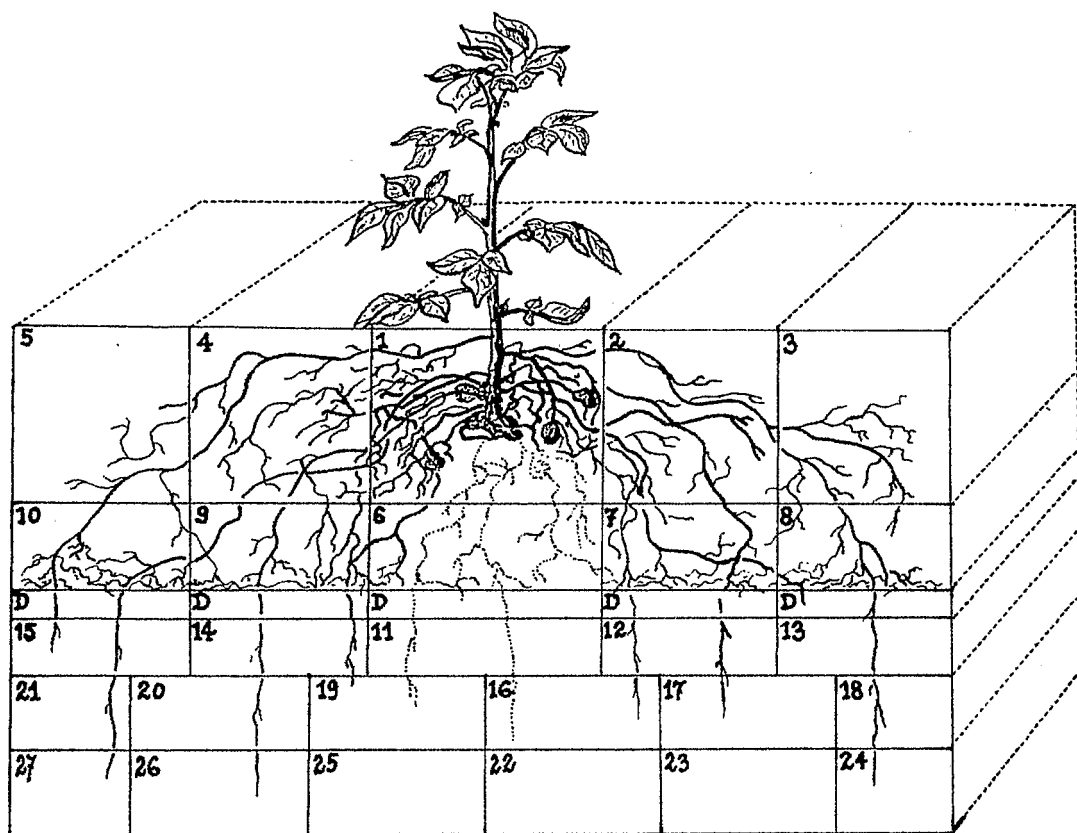


Fig. 16 - Dispositif expérimental pour l'étude de l'influence de la répartition des racines dans le sol sur celle des kystes d'*Heterodera rostochiensis*. (d'après Chitwood & Feldmesser, Proceedings of the helminthological Society of Washington 15, fig. 3, p. 49)