

Méthodes pour la mesure de la consommation d'oxygène des nématodes par la technique du ludion

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

RÉSUMÉ

On décrit un nouveau modèle de ludion à bouchon de verre dont le volume gazeux courant est compris entre 2,5 et 20 μ l. La méthode de fabrication décrite permet d'obtenir rapidement des séries de ludions identiques, ce qui rend possible dans les meilleures conditions des mesures simultanées avec plusieurs répétitions. On décrit par ailleurs l'appareillage impliqué dans la manipulation de ce ludion. Ce modèle de ludion révèle une excellente stabilité au moins sur 24 heures au cours de mesures à blanc. L'utilisation de ce ludion pour la mesure de la consommation d'oxygène de petits invertébrés est décrite. On précise la conduite de la mesure et les calculs.

A titre d'exemple d'application de la méthode, sont donnés des résultats de la mesure de la consommation d'oxygène des juvéniles du nématode *Heterodera oryzae*. La discussion de ces résultats permet d'évaluer la précision de la méthode et révèle quelles sont les contraintes exercées par la méthode sur la physiologie des animaux étudiés.

ABSTRACT

A new type of glass stoppered cartesian diver is described. Its gaseous volume is in the range of 2,5 to 20 μ l. The method for making the diver easily allows to obtain several identical ones, which makes possible in the better way simultaneous measurements of several replications. The equipment for handling the diver and the measurement apparatus are described. This diver shows a very good stability in blank assay, at least during 24 hours. The use of this diver for measurement of oxygen consumption of small invertebrates is described. The run of the measurement and calculations are developed.

As an utilization example, are given results of measurement of the oxygen consumption of second stage larvae of the nematode *Heterodera oryzae*. From these results are discussed the accuracy of the method and the physiological stresses which affect the animals during the measurement.

1. INTRODUCTION

L'intérêt présenté par la connaissance de la consommation d'oxygène des nématodes phytoparasites a été récemment souligné par ROHDE (1971). Parmi les techniques utilisées pour mesurer la consommation d'oxygène des nématodes, le ludion (BOELL, 1960) est une des plus employées (OVERGAARD-NIELSEN, 1949 ; ROHDE, 1960 ; WALLACE & GREET, 1964 ; BHATT & ROHDE, 1970).

Une première caractéristique de cette technique est sa sensibilité élevée. En effet, avec un ludion d'un volume gazeux de 10 μ l, volume facilement atteint avec cette technique, une mesure d'une bonne précision peut être effectuée avec moins de 100 nématodes. Cet effectif réduit permet un dénombrement précis des animaux étudiés. Il permet de plus de procéder à des mesures même à partir d'un élevage quantitativement réduit.

Une autre caractéristique de cette technique est que le ludion lui-même est fabriqué par son utilisateur. Ce dernier est donc en mesure d'adapter exactement la forme de l'instrument au but qu'il se propose. Ceci explique l'existence des nombreux modèles de ludions cités par HOLTER & ZEUTHEN (1966).

Dans le but de mesurer la consommation d'oxygène de nématodes à l'aide de cet instrument, nous avons donc été conduits à fabriquer notre propre ludion. Ce dernier s'inspire de modèles déjà décrits et répond à deux exigences.

La première exigence est de pouvoir introduire dans le ludion des objets relativement encombrants tels que des pipettes permettant la manipulation des nématodes en groupe ou des formes biologiques plus volumineuses tels que des kystes ou des masses d'œufs. Dans ces conditions, le diamètre requis pour le ludion est de l'ordre de 1 mm.

La seconde exigence est de pouvoir disposer d'un instrument dont la mise en œuvre soit rapide. Dans cette perspective, le ludion standard (HOLTER & ZEUTHEN, 1966), modèle employé par les auteurs cités plus haut, nous paraissait d'une manipulation trop

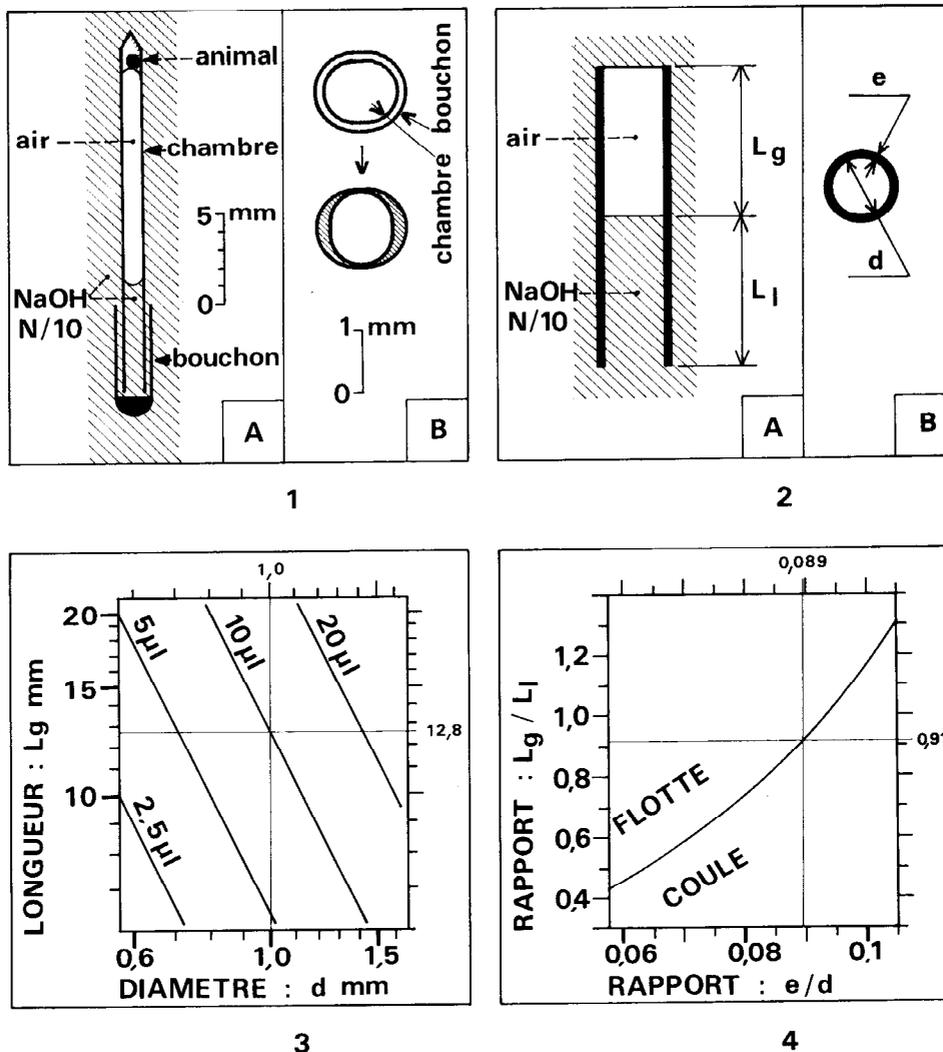


Fig. 1. — A : ludion de 10 μ l, chargé d'un animal, en équilibre dans le liquide de flottaison (soude décimormale). B : vue en bout de la fermeture du ludion. (L'ovalisation des sections est volontairement exagérée)

Fig. 2. — Le modèle théorique simplifié du ludion
A : coupe longitudinale. B : coupe transversale

Fig. 3. — Volume gazeux du modèle théorique simplifié
(voir également le texte et la relation (2))

Fig. 4. — Flottabilité du modèle théorique simplifié
(voir également le texte et la relation (6) avec $D_v = 2,224 \text{ mg}/\mu\text{l}$ et $D_s = 1,000 \text{ mg}/\mu\text{l}$)

délicate en regard du but poursuivi. Nous nous sommes donc inspirés de modèles plus simples tels que ceux de ZEUTHEN (1950) et de NICON & FOURCHE (1958).

Au cours de cet article, nous verrons donc les descriptions du ludion, de sa fabrication, de son utilisation et de l'appareillage impliqué. Les performances obtenues seront jugées et discutées à deux niveaux.

Le premier niveau concerne les limitations propres à l'appareillage mis au point : fidélité au cours des mesures à blanc, délais de mise en œuvre, facilités de manipulation.

Le second niveau concerne les résultats obtenus lors d'un exemple d'application de la méthode à la mesure de la consommation d'oxygène d'un nématode phytoparasite. Le matériel biologique choisi est cons-

titué par des juvéniles du second stade d'*Heterodera oryzae* LUC & BERDON, 1961. Ce genre de matériel offre l'avantage d'être homogène ou tout au moins de présenter une hétérogénéité faible et que l'on peut raisonnablement évaluer. Ceci permet, en ce qui concerne la précision des résultats obtenus, de différencier l'erreur imputable à la méthodologie de celle imputable au matériel biologique. On s'efforcera par ailleurs de préciser, à l'occasion de cet exemple d'application, l'impact des contraintes inévitables que les méthodes exercent sur la physiologie des animaux étudiés au cours de la mesure.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. LE LUDION ET LE PRINCIPE DE SA FABRICATION

2.1.1. Description du ludion et de son modèle théorique simplifié

La figure 1-A représente le ludion chargé d'un animal en équilibre dans le liquide de flottaison. Celui-ci est constitué par de la soude décinormale (NaOH, N/10), qui absorbe le gaz carbonique émis par l'animal.

Le ludion est formé de deux pièces cylindriques en pyrex, dont l'une, la chambre respiratoire, qui supporte l'animal, pénètre dans l'autre, le bouchon. L'extrémité supérieure de la chambre respiratoire se termine par un cône fermé. L'extrémité inférieure du bouchon est obturée par une masse de pyrex soudée qui sert également de contrepois.

La section de chacune des deux pièces est légèrement ovalisée. De cette façon, après pénétration, une rotation de la chambre respiratoire la rend mécaniquement solidaire du bouchon (fig. 1-B).

Le contact entre les deux pièces n'est donc pas hermétique : il subsiste un passage (hachuré sur la figure 1-B) pour le liquide de flottaison. Ce dernier, en circulant, peut comprimer ou détendre la bulle d'air, conformément au principe du ludion.

Dans cette position d'équilibre, la masse du liquide déplacé compense la masse du ludion (m). Celle-ci, le volume de la bulle d'air (V_g) et les masses volumiques du pyrex (D_v) et du liquide de flottaison (D_s) sont alors liés par la relation (1) :

$$m = \frac{D_v \cdot D_s}{(D_v - D_s)} \cdot V_g \quad (1)$$

Avec les matériaux que nous avons employés (A 28 °C, $D_v = 2,224$ mg/ μ l et $D_s = 1,000$ mg/ μ l), un ludion de 10 μ l pèse 18,17 mg.

La mise au point de la méthode de fabrication de ce ludion nécessitait la connaissance de certaines propriétés physiques de celui-ci. La formulation de ces

propriétés à partir des paramètres de construction du ludion décrit (fig. 1-A) était trop complexe. Ces propriétés ont donc été étudiées sur un modèle théorique simplifié, représenté par la figure 2.

On considère un tronçon de capillaire cylindrique en pyrex, de diamètre interne (d) et d'épaisseur (e) uniformes, immergé dans du liquide de flottaison. Une partie de ce tronçon est occupée par une bulle d'air de longueur L_g et de volume V_g , tandis que le reste de longueur L_I est rempli de liquide de flottaison. Les ménisques sont supposés plans.

2.1.2. Etude des propriétés du modèle théorique simplifié

A partir des deux paramètres d et L_g on peut calculer le volume gazeux V_g , donné par la relation (2) :

$$V_g = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot L_g \quad (2)$$

D'après cette relation (2), pour un volume gazeux donné, la représentation graphique de L_g en fonction de d se traduit en coordonnées logarithmiques par une droite. Le graphique de la figure 3 représente ces droites pour quatre valeurs de V_g .

Par exemple, d'après ce graphique, dans un capillaire de 1 mm de diamètre interne, une bulle gazeuse de 10 μ l de volume aurait une longueur de 12,8 mm.

A partir des quatre paramètres d , e , L_g et L_I , on peut calculer le volume du pyrex V_v , constituant le modèle théorique simplifié, donné par la relation (3) :

$$V_v = \pi \cdot e \cdot (e + d) \cdot (L_g + L_I) \quad (3)$$

Ce volume de pyrex et la masse du ludion sont liés par la relation (4) :

$$m = V_v \cdot D_v \quad (4)$$

Le modèle théorique simplifié flotte si la masse du liquide déplacé est supérieure à la masse du ludion ; cette situation est traduite par la relation (5) :

$$D_s \cdot (V_v + V_g) > m \quad (5)$$

Après remplacement de V_g , V_v et m par leurs valeurs données respectivement par les relations (2), (3) et (4) la résolution de cette relation (5) conduit à la relation (6).

$$\frac{L_g}{L_I} > \frac{4 \cdot \frac{e}{d} \cdot \left(1 + \frac{e}{d}\right) (D_v - D_s)}{D_s - 4 \cdot \frac{e}{d} \cdot \left(1 + \frac{e}{d}\right) (D_v - D_s)} \quad (6)$$

D'après cette relation (6), la représentation graphique du rapport limite Lg/LI au fonction du rapport e/d se traduit par la courbe de la figure 4. Sur cette figure, l'ensemble des paramètres d'un modèle théorique simplifié est représenté par un point d'abscisse égale à e/d et d'ordonnée égale à Lg/LI . Si ce point est situé au-dessus de la courbe, le modèle flotte et le modèle coule si ce point est situé en dessous de la courbe.

Pour reprendre l'exemple chiffré précédent ($d = 1$ mm, $Vg = 10$ μ l et $Lg = 12,8$ mm) nous fixerons la valeur de LI à 14 mm, valeur qui sera justifiée et utilisée par la suite. Le rapport Lg/LI est alors égal à 0,915. Sur le graphique de la figure 4, on trace l'horizontale d'ordonnée Lg/LI égale à 0,915 qui coupe la courbe en un point d'abscisse égale à 0,089. Cette valeur est appelée *rapport critique*. Pour que le modèle théorique simplifié flotte, il faut que son rapport e/d soit inférieur au rapport critique.

2.1.3. Principe de la fabrication du ludion

Les calculs précédents sont adaptables au modèle décrit en considérant la longueur LI comme équivalente à la somme de la longueur de liquide de flottaison dans la chambre respiratoire et de la longueur du bouchon.

Outre ce premier paramètre LI fixé par la fabrication, deux autres paramètres sont à choisir. L'un, le volume gazeux Vg est choisi en fonction de l'intensité respiratoire à mesurer. Nos essais ont cependant été limités à des volumes compris entre 2,5 μ l et 20 μ l. L'autre, le diamètre interne du ludion, d , est choisi en fonction de l'encombrement de l'animal étudié ou des dispositifs qui permettent l'introduction de l'animal étudié dans la chambre respiratoire. On s'impose un diamètre, mais avec une certaine tolérance, par exemple de 0,95 à 1,05 mm. Les ludions d'une série présentant le même volume gazeux sont d'autant plus semblables que cette tolérance est faible.

Une fois fixés ces trois paramètres LI , Vg et d , les figures 3 et 4 permettent de déterminer respectivement la longueur de la bulle gazeuse et le rapport critique. La fabrication d'un ludion se déroule alors en deux étapes successives.

— *Fabrication d'un assemblage capillaire* : on découpe dans un capillaire deux tronçons dont l'un peut pénétrer dans l'autre et s'y bloquer par rotation (fig. 1-B). La partie mâle de l'assemblage constituera la chambre respiratoire du ludion, et la partie femelle constituera le bouchon du ludion. On vérifie que le diamètre d convient et que le rapport e/d est inférieur au rapport critique.

— *Finition du ludion* : chacun des deux tronçons de l'assemblage est façonné jusqu'à sa forme définitive et la masse de l'ensemble est ajustée à la valeur m (relation (1)).

2.2. FABRICATION DU LUDION

On décrira la fabrication du ludion correspondant à l'exemple chiffré précédent ($LI = 14$ mm, $Vg = 10$ μ l, $Lg = 12,8$ mm, arrondi à 13 mm, $0,95 < d < 1,05$ mm, rapport critique = 0,089, $m = 18,17$ mg).

2.2.1. Fabrication d'un assemblage capillaire

Un tube de pyrex (diamètre interne 14-15 mm, épaisseur 1,5-1,8 mm) est étiré au chalumeau. Après un chauffage uniforme par rotation, le tube est immobilisé 1 à 2 secondes dans la flamme. Cette surchauffe dissymétrique ovalise la section. Le tube est alors sorti de la flamme, étiré, et le produit de l'étirage est coupé en son centre et à ses deux extrémités : on obtient deux capillaires légèrement coniques.

La recherche de l'assemblage capillaire est représentée par la figure 5.

Un des capillaires précédemment obtenus est coupé, à l'aide d'un cristal de carborundum, en tronçons consécutifs de 30 mm (fig. 5-A). Chaque tronçon étant conique, on mesure le plus petit de ses diamètres internes d et l'épaisseur correspondante e (fig. 5-B). Pour cela on utilise une loupe binoculaire, munie d'un micromètre oculaire étalonné, sous laquelle chaque tronçon est présenté verticalement.

Si aucun des tronçons ne présente le diamètre requis, (de 0,95 à 1,05 mm) le tout est éliminé. Si l'un d'eux convient, on calcule son rapport e/d que l'on compare au rapport critique (0,089). Si le rapport trouvé est supérieur au rapport critique, le tout est éliminé. Si le rapport trouvé est inférieur au rapport critique, le tronçon est considéré désormais comme la future chambre respiratoire du ludion.

On cherche alors (fig. 5-C) parmi les autres tronçons du même capillaire, celui qui peut constituer le bouchon. Il est parfois nécessaire de fractionner ce deuxième tronçon pour y trouver la portion la plus apte à réaliser le bouchon.

Un morceau du même tube qui a servi à fabriquer les capillaires, est chauffé au chalumeau jusqu'à formation d'une masse homogène, puis étiré. La tige obtenue est coupée en baguettes de 50 mm. Chacune est pesée et rangée selon sa masse (de mg en mg). Une pince à ongles permet à l'aide d'un papier millimétré de couper des morceaux de 0,5 mm de ces baguettes, soit 1/100 de la masse initiale. Ces baguettes serviront ultérieurement à ajuster la masse du ludion.

2.2.2. Finition du ludion

La figure 6 représente les six opérations qui constituent la finition du ludion.

a) *Traçage*. Sur le tronçon mâle de l'assemblage (future chambre respiratoire) on trace un repère à l'encre à une distance égale à $Lg + 6$ à partir de l'extrémité entrante (soit à $13 + 6 = 19$ mm). Sur

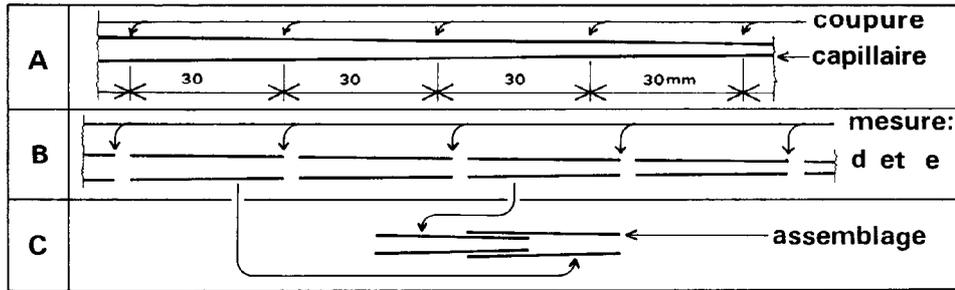


Fig. 5. — Recherche d'un assemblage capillaire

(Les étapes A, B et C sont commentées dans le texte. La conicité du capillaire représenté est volontairement exagérée)

le tronçon femelle de l'assemblage (futur bouchon), on trace un repère à l'encre à une distance de 8 mm à partir de l'extrémité pénétrée. La somme de ces longueurs fixes (6 mm pour la chambre respiratoire et 8 mm pour le bouchon) représente la valeur du paramètre LI égale à 14 mm.

b) *Finition de la chambre respiratoire.* A l'aide d'un microchalumeau, le tronçon mâle de l'assemblage est étiré au niveau du repère, puis la partie excédentaire est coupée et éliminée. L'extrémité de la chambre respiratoire est fermée soigneusement à l'aide du microchalumeau.

c) *Coupure du bouchon.* A l'aide d'un cristal de carborundum, le tronçon femelle de l'assemblage est coupé au niveau du repère et la partie excédentaire est éliminée.

d) *Premier ajustement de la masse.* Les deux pièces sont pesées ensemble. Si leur masse dépasse m (18,17 mg), l'ébauche est éliminée. Si leur masse est inférieure à m , on choisit une baguette (préparée au 2.2.1.) de masse convenable que l'on pèse avec les deux pièces. Puis la baguette est réduite par coupures successives jusqu'à ce que la masse totale des deux pièces et de la baguette soit comprise entre m et $m + 0,1$ mg (de 18,17 à 18,27 mg).

e) *Finition du bouchon.* A l'aide du microchalumeau la baguette est fondue et incorporée au bouchon de façon à le fermer et la longueur est amenée à 6 mm.

f) *Ajustement fin de la masse.* Le ludion est pesé à nouveau. Si sa masse est supérieure à m (18,17 mg), le contrepois du bouchon est utilisé par frottement sur une toile émeri fine. La masse du ludion est ainsi

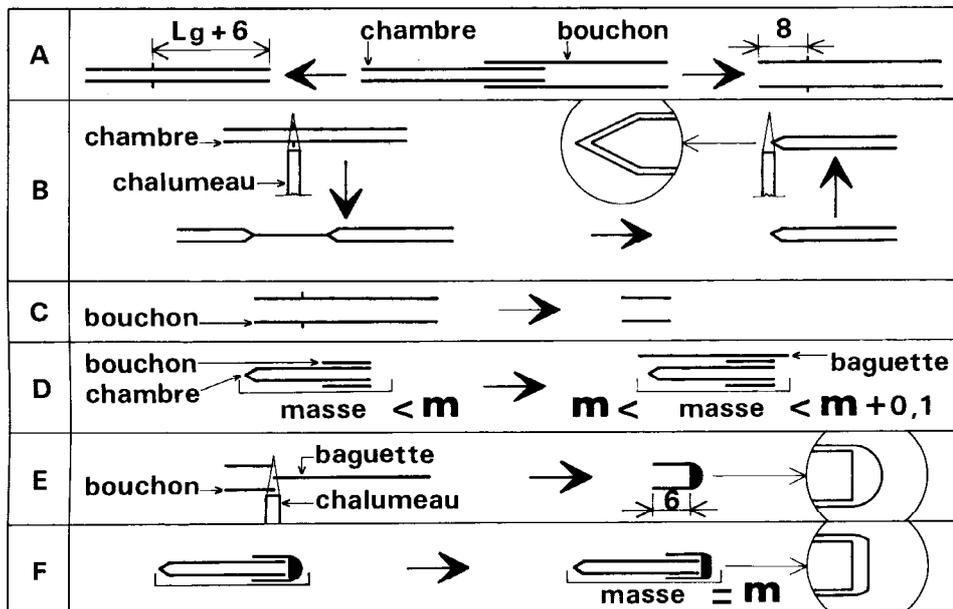


Fig. 6. — Finition du ludion

(Les étapes A, B, C, D, E et F sont commentées dans le texte)

amenée à $m \pm 0,05$ mg (de 18,12 à 18,22 mg). Si la masse est inférieure à m , on incorpore, à l'aide du microchalumeau, un morceau de baguette de masse convenable au contrepois du bouchon et l'on est ramené au problème précédent.

2.3. GARNITURE DU LUDION

2.3.1. Introduction des animaux dans le ludion

Le ludion est nettoyé par le mélange sulfochromique à chaud puis rincé à l'eau courante. On le manipule dès lors directement avec les doigts, dégraissés fréquemment à l'alcool à 95°.

Une *pipette de rinçage* (fig. 7-A), stérilisée à l'autoclave est garnie de *tampon standard* : tampon phosphate pH 7,50 mM, stérilisé par filtration sur filtre Millipore. On rince abondamment la chambre respiratoire (fig. 7-B) à l'aide de cette pipette de rinçage et la chambre respiratoire est laissée remplie de tampon. L'usage d'un tampon s'imposait à la place de l'eau déminéralisée afin de pallier d'éventuelles variations de pH dues à la présence des animaux eux-mêmes.

La chambre respiratoire peut alors être garnie avec les animaux à étudier. Trois problèmes se posent. Le premier problème concerne l'aptitude des animaux étudiés à supporter l'immersion jusqu'à ce que l'air soit introduit à son tour dans la chambre respiratoire, lors de l'opération suivante. Cette aptitude est le fait de la plupart des petits invertébrés du sol, susceptibles d'être étudiés par cette technique, en particulier des nématodes. Le second problème est posé par la contamination des animaux étudiés par des microorganismes, dont la consommation d'oxygène propre fausserait les résultats de la mesure. La solution de ce problème dépend des possibilités que l'on a de pouvoir obtenir les animaux à étudier dépourvus de contaminants ; nous verrons plus loin que dans le cas d'un groupe particulier de nématodes, ce problème a pu recevoir une solution satisfaisante. Le troisième problème

concerne l'introduction des animaux dans la chambre respiratoire. Pour un animal unique, le dépôt peut se faire directement dans la chambre respiratoire remplie de tampon et maintenue verticalement, l'ouverture vers le haut. Pour des animaux en groupe, on a recours à la sédimentation, dont une technique, adaptée aux nématodes, sera exposée plus loin.

ZUCKERMAN (1971) a donné une revue des techniques permettant d'obtenir des nématodes phytoparasites dépourvus de contaminants. Ceci est particulièrement aisé dans le cas des Tylenchoidea, dont le tractus digestif n'est pas naturellement contaminé. Il suffit dans ce cas de stériliser superficiellement les animaux à l'aide d'un antibiotique. Une fois ces nématodes stériles obtenus, il convient de les mettre en place dans la chambre respiratoire par sédimentation.

Le matériel nécessaire à cette mise en place est constitué par une *pipette à sédimentation* et un *tube à sédimentation* (fig. 8), stérilisés à l'autoclave. Leur utilisation est schématisée par la figure 9.

La chambre respiratoire, remplie de tampon standard dans le tube à sédimentation garni de 13 cm³ de tampon standard (fig. 9-A).

Le récipient, contenant les nématodes stériles en suspension dans du tampon standard, est vidé dans une boîte de Pétri stérile, dans laquelle sont ajoutés 50 cm³ de tampon standard. Dans la pipette à sédimentation sont aspirés, sous la loupe binoculaire, de 50 à 100 nématodes actifs dans un faible volume de tampon. L'extrémité supérieure de la pipette est alors bouchée avec le doigt pour empêcher l'écoulement de la suspension (fig. 9-B).

Tout en maintenant le bouchage, la pipette à sédimentation est engagée dans le tube à sédimentation et sa partie effilée est introduite dans la chambre respiratoire. Il faut alors que le niveau de tampon dans le tube soit supérieur au niveau de tampon dans la pipette (fig. 9-C).

On cesse alors de boucher la pipette : les niveaux de tampon de la pipette et du tube s'équilibrent. Le

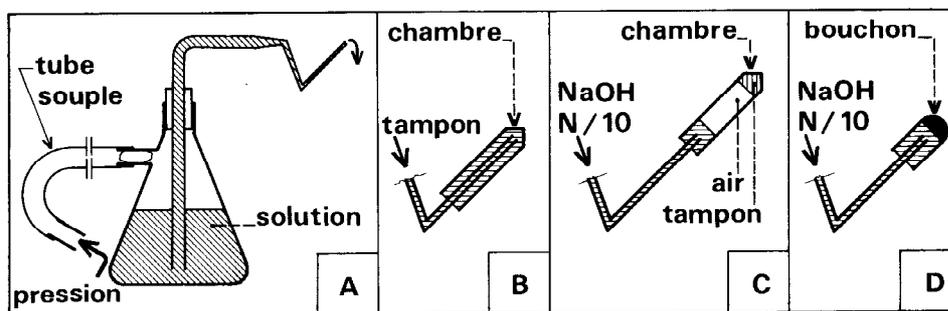


Fig. 7. — Rinçage du ludion

A : pipette de rinçage. B : rinçage de la chambre respiratoire. C : rinçage du col de la chambre respiratoire. D : rinçage du bouchon

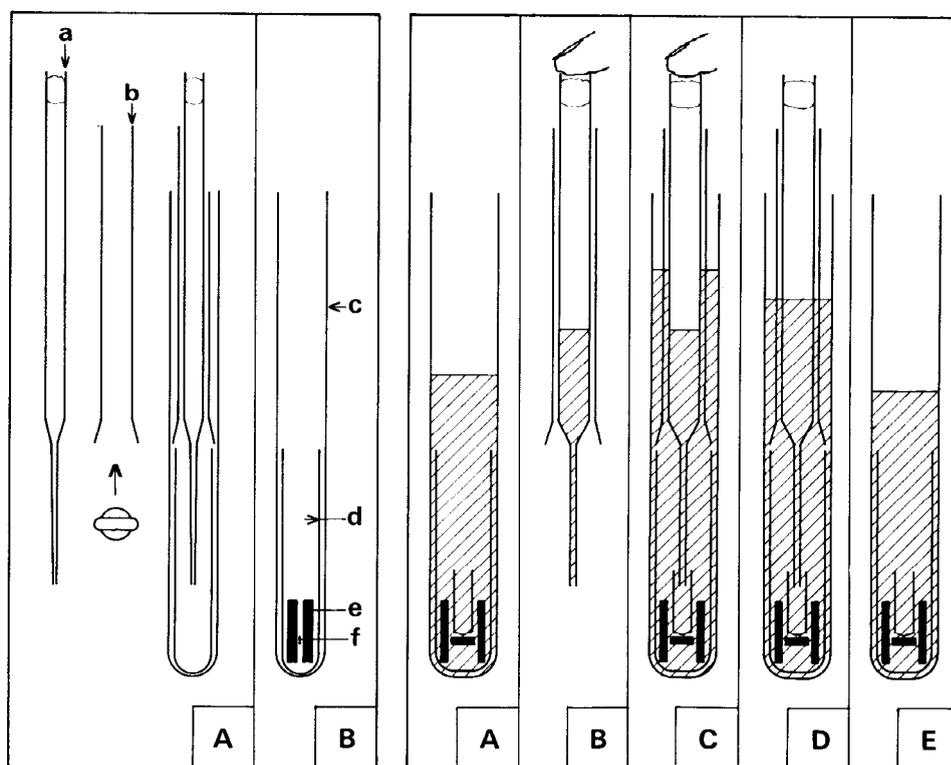


Fig. 8. — A : pipette à sédimentation (en pyrex). B : tube à sédimentation (en pyrex)
 a : tube effilé (diamètre 6 mm) ; b : support, diamètre 10 mm, avec l'extrémité aplatie (à chaud), de façon à pouvoir retenir la pièce a ;
 c : tube à essai de 16 × 160 ; d : tube à essai de 12 × 75 ; e : support (capillaire : diamètre interne 2 mm, diamètre externe 8 mm) ; f : fil
 d'acier inoxydable, destiné à retenir la chambre respiratoire du ludion

Fig. 9. — Mise en place des nématodes dans la chambre respiratoire du ludion. (Les opérations A, B, C, D et E sont décrites dans le
 texte : 2.3.1. Afin de faciliter la compréhension des manipulations, les dimensions horizontales des instruments ont été volontairement
 modifiées)

tube est alors placé sur un support vibrant à 28 °C pendant deux heures. Les nématodes sédimentent à l'extrémité de la chambre respiratoire (fig. 9-D).

Le tube est alors retiré du support vibrant et la pipette à sédimentation est enlevée (fig. 9-E).

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

2.3.2. Introduction de l'air dans le ludion

On dispose d'une pipette à air représentée par la figure 10. Le volume compris entre l'extrémité et le repère du capillaire de cette pipette à air a été jaugé

par pesée de mercure et présente un volume V_p inférieur à V_g . Juste avant la manipulation, le capillaire est lavé au Cetavlon à 5% puis rincé à l'eau stérile.

La mise en place de la bulle à air dans la chambre respiratoire du ludion est schématisée par la figure 11.

De petites gouttes de tampon standard séparées par de petites bulles d'air sont aspirées dans le capillaire de la pipette à air. Elles sont destinées à ralentir les mouvements des fluides dans le capillaire. Puis on introduit une colonne de tampon d'environ 20 mm de long (croquis A de la figure 11).

L'extrémité distale de cette colonne est amenée à ΔL mm du repère (croquis B de la figure 11). Cette longueur ΔL est donnée par la relation (7) :

$$\Delta L = 65 \left(R \cdot \frac{V_g}{V_p} - 1 \right) \quad (7)$$

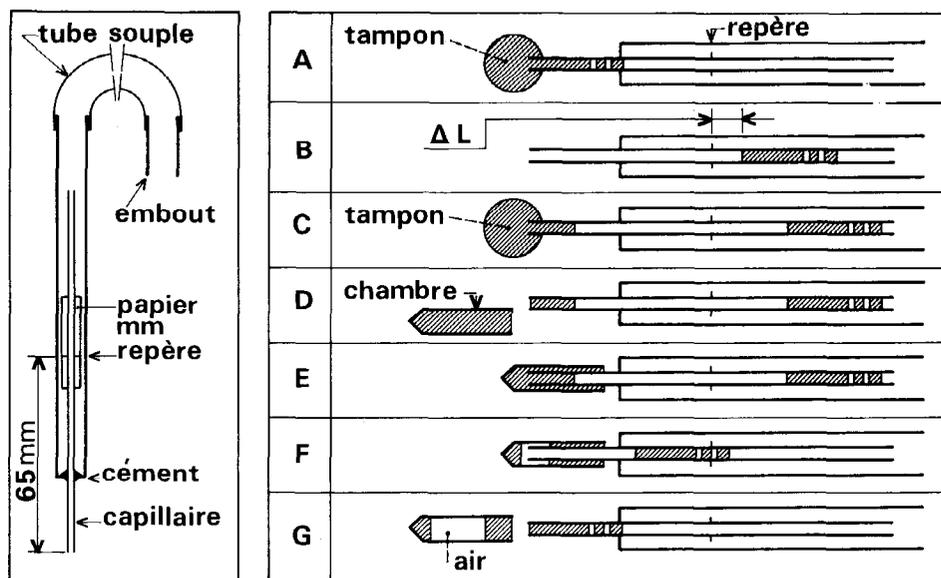


Fig. 10 — Pipette à air

Fig. 11 — Remplissage en air du ludion
(Les étapes A, B, C, D, E, F et G sont commentées dans le texte)

R est un coefficient calculé qui tient compte des différences de pression et de température entre l'ambiance et l'intérieur de l'appareil de mesures (REVERSAT, 1971). Sa valeur est ici de 1,04.

Une seconde colonne de tampon standard est alors introduite dans le capillaire (croquis C de la figure 11).

La chambre respiratoire, remplie de tampon standard, et contenant les nématodes réunis sous forme d'un culot à son extrémité, est alors engagée sur le capillaire de la pipette à air (croquis D et E de la figure 11).

La bulle d'air contenue dans le capillaire de la pipette à air est alors progressivement chassée dans la chambre respiratoire (croquis F de la figure 11).

Lorsque la totalité de l'air est passée dans la chambre respiratoire, cette dernière est dégagée (croquis G de la figure 11).

A l'aide d'une pipette de rinçage garnie de liquide de flottaison (Na OH, N/10), le col de la chambre respiratoire et le bouchon sont rincés (croquis C et D de la figure 7). Les deux pièces sont assemblées et le ludion est introduit dans l'appareil de mesure.

2.4. L'APPAREIL DE MESURE

Le principe de l'appareil est rappelé par la figure 12

et l'appareil réalisé est représenté par les photos 1 et 2. Les éléments mentionnés en italique dans le texte ci-dessous sont repérés sur au moins une de ces trois illustrations. L'appareil comprend trois parties.

2.4.1. Bain thermostaté

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

2.4.2. Système manométrique

Un manomètre à lecture monobranche (NIGON et FOURCHE, 1968) est fixé sur une planche verticale. Son *capillaire*, vertical, est placé sur un réglé métal-

¹ Fabricant : HAAKE Gebrüder, Berlin.

lique de 1 m gradué au 1/2 mm. Son réservoir contient 80 cm³ d'éthanol à 95% coloré à l'éosine.

La branche gauche du manomètre (réservoir) est reliée au régulateur de pression et au robinet 1. Le régulateur est constitué par un tuyau souple que l'on peut pincer progressivement entre un support fixe et un sabot mobile à l'aide d'une vis. La deuxième sortie de ce robinet 1 est à l'air libre. La troisième sortie de ce robinet est reliée par le tube 1 à une série de dix robinets plats. Chacun de ces robinets plats donne accès par un tube souple à un flacon de flottaison immergé dans l'eau de l'aquarium. Chaque flacon contient 15 cm³ de liquide de flottaison (NaOH N/10) saturé en air à la pression normale et à la température de 28 °C.

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

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

2.4.3. Système optique

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

2.5. LA MESURE

2.5.1. Relevé de la pression d'équilibre du ludion

Le ludion garni (voir 2.3.) est déposé dans un flacon de flottaison : il flotte à la surface du liquide (fig. 13-A).

Le flacon de flottaison est refermé et les robinets 1 et 2 sont placés de façon à isoler le système de l'extérieur. En agissant sur le régulateur on augmente la pression dans le tube 1 et le niveau d'alcool monte dans le capillaire du manomètre. Ce niveau est amené à 1 000 m sur le réglelet. Au cours de cette manœuvre le ludion coule au fond du flacon : on dit alors qu'il est au repos (fig. 13-B).

Deux heures après cette mise en place, le viseur est amené en face du flacon. À l'aide du régulateur, la pression d'air du tube 1 est diminuée jusqu'à ce que le ludion quitte le fond du flacon et vienne s'immobiliser en face du réticule du viseur. On dit que le ludion est en équilibre (fig. 12). Au cours de cette manœuvre le niveau d'alcool dans le capillaire a baissé par rapport au niveau de repos. Cette nouvelle valeur, notée H, est la pression manométrique d'équilibre du ludion.

Cette mesure de la pression d'équilibre du ludion est ensuite répétée plusieurs fois à des intervalles de

plusieurs heures. Entre deux mesures successives, le ludion est laissé au repos.

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

Lorsque le ludion est garni d'animaux, on effectue deux mesures successives de la pression d'équilibre du ludion, destinées au calcul de la consommation d'oxygène. La première mesure, de valeur H₁ est faite au temps t₁, deux heures après la mise en place du ludion dans le flacon de flottaison. La seconde mesure, de valeur H₂ est faite au temps t₂, plusieurs heures après la première. Entre ces deux mesures principales peuvent être effectuées plusieurs autres mesures. Celles-ci n'interviennent pas dans le calcul de la consommation d'oxygène, mais sont destinées à apprécier la régularité de cette consommation.

2.5.2. Comptage des nématodes après la mesure

Après la dernière mesure H₂, le ludion est récupéré et son bouchon enlevé. À l'aide d'une pipette de rinçage garnie d'eau déminéralisée, le col de la chambre respiratoire est rincé, puis le contenu du ludion est entraîné dans un verre de syracuse.

Quelques heures après leur récupération, les nématodes sont comptés sous la loupe binoculaire. On dénombre N nématodes pour le ludion.

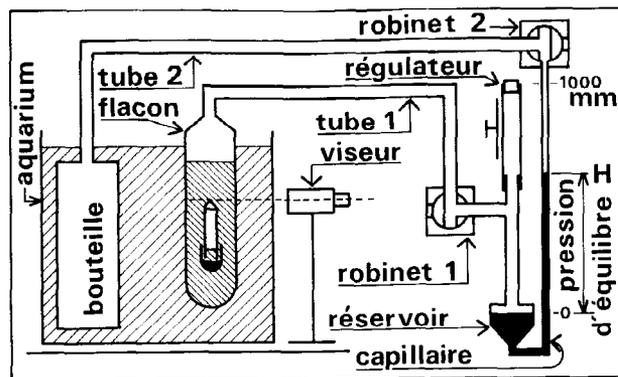
La mesure directe du poids sec du lot de nématodes étudiés à l'aide d'un ludion est impossible pour des raisons de sensibilité. Il est par contre possible d'évaluer ce poids sec du lot étudié à l'aide du nombre de nématodes N, déterminé précédemment, et du poids sec moyen, déterminé à partir d'un échantillon plus important par la méthode suivante.

Un filtre Millipore (maille 8 μ) est séché pendant vingt-quatre heures à 20 °C sur silicagel puis pesé. Une aliquote de la suspension initiale, contenant un nombre connu de nématodes (de l'ordre de 10⁵) est passé sur ce filtre. Le filtre est alors séché pendant quarante-huit heures dans les mêmes conditions puis repesé.

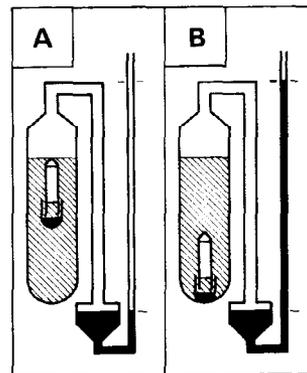
2.6. LES CALCULS

2.6.1. Calcul de la constante du ludion

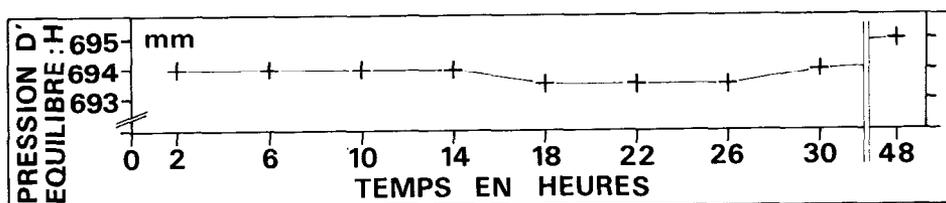
Selon BOELL (1960) on peut définir une constante du ludion à l'aide de la formule employée pour les



12



13



14

Fig. 12. — Schéma de principe de l'appareil de mesure : ludion à l'équilibre

Fig. 13. — Mise en place du ludion dans l'appareil de mesures
A : Introduction du ludion dans le flacon. B : ludion au repos

Fig. 14. — Mesure à blanc d'un ludion de 10 µl

respiromètres à volume constant tels que le warburg (UMBREIT *et al.*, 1966). Cette constante, k , est donnée par la relation (8).

$$k = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P_0} \quad (8)$$

V_g est le volume gazeux égal à 10 µl. V_f est le volume total de liquide situé à l'intérieur du ludion : sa valeur est de 4 µl. α , coefficient de solubilité de l'oxygène dans l'eau à 28 °C est égal à 0,027 mm³ par mm³. T est la température absolue de l'expérience égale à 28 °C, soit 301 °K. P_0 pression atmosphérique normale est égale à 76 cm de mercure soit 12 660 mm d'éthanol à 95% à 21 °C.

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

2.6.2. Correction de la constante du ludion

Du temps t_1 au temps t_2 , la chute de la pression d'équilibre du ludion est égale à $H_1 - H_2$. Ce chiffre brut devrait subir une correction avant de pouvoir être utilisé pour le calcul de la consommation d'oxygène. Cette correction est faite en le multipliant par un facteur correctif constant. On peut donc reporter la correction sur la constante du ludion. La nouvelle constante k' est alors donnée en fonction de k par la relation (9) :

$$k' = k \cdot \left(1 + \frac{P_0 \cdot S_c}{V_b} + \frac{S_c}{S_r} \right) \quad (9)$$

Le premier terme du facteur correctif est égal à 1.

Le second terme du facteur correctif a été calculé par LINDERSTROM-LANG (1943). Il tient compte du fait que le liquide en descendant dans le capillaire du manomètre, détend l'air contenu dans la bouteille de référence. P_0 est la pression normale définie p plus haut. S_c est la section du capillaire du manomètre

égale à $3,14 \text{ mm}^2$. Vb est le volume de la bouteille de référence égal à $5 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$. Dans ces conditions, ce terme a une valeur égale à $8,2 \cdot 10^{-3}$.

Le troisième terme du facteur correctif a été indiqué par NIGON et FOURCHE (1958). Il tient compte du fait que lorsque le niveau de liquide baisse dans le capillaire du manomètre, le niveau du même liquide augmente dans le réservoir. Sc est la section du capillaire égale à $3,14 \text{ mm}^2$. Sr est la section du réservoir du manomètre égale à $1\,300 \text{ mm}^2$. Dans ces conditions ce terme a une valeur égale à $2,4 \cdot 10^{-3}$.

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

2.6.3. Calcul de la consommation d'oxygène

Ramenée aux conditions normales de température et de pression (0 °C et 76 cm de mercure), la consommation d'oxygène est donnée par la relation (10). Le résultat, Q_{O_2} , est exprimé en picolitres d'oxygène par nématode par heure.

$$Q_{O_2} = \frac{k' \cdot (H_1 - H_2)}{N \cdot (t_2 - t_1)} \quad (10)$$

k' est la constante corrigée du ludion (voir 2.6.2.) égale à 733 picolitres par mm de liquide manométrique. $H_1 - H_2$ est la chute brute de la pression manométrique d'équilibre du ludion, du temps t_1 au temps t_2 , en mm de liquide manométrique. N est le nombre de nématodes comptés après la mesure (voir 2.5.2.). $t_2 - t_1$ est le temps écoulé entre les deux mesures, en heures.

3. PERFORMANCES

3.1. LES LIMITATIONS DE L'APPAREILLAGE

3.1.1. Les délais de mise en œuvre de la technique

Les délais de mise en œuvre sont conditionnés par le temps requis pour la fabrication du ludion et le temps nécessaire à sa mise en place dans le flacon.

Le temps de fabrication d'une série de dix ludions de caractéristiques choisies précédemment ($V_g = 10 \mu\text{l}$, $0,95 < d < 1,05$) est d'environ huit heures. La durée de vie moyenne d'un ludion est d'environ dix manipulations. Le temps de fabrication représente donc une servitude minime pour l'utilisation de ce modèle.

La mise en place de dix ludions de $10 \mu\text{l}$ pour une mesure à blanc demande environ une heure. Pour des mesures effectuées avec un animal ce délai n'est pas augmenté si la manipulation est facile, comme dans le cas d'un animal unique. Dans le cas de la mani-

pulation d'animaux en groupe, il convient d'ajouter à ces délais, toujours pour dix ludions, ceux de la collecte dans les pipettes (1 heure), ceux de la sédimentation (2 heures) et enfin ceux du comptage (1 heure).

3.1.2. Mesures à blanc

Nous avons vu précédemment (2.5.1.) pour quelles raisons on attend qu'au cours d'une mesure à blanc, la pression d'équilibre du ludion demeure constante.

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

Nos ludions présentent une faible dérive négative. La figure 14 montre le relevé type d'une mesure à blanc d'un ludion de $10 \mu\text{l}$. On a convenu de ne garder que les ludions dont la dérive négative est inférieure à 1 mm d'éthanol en 24 heures et d'éliminer les autres.

3.2. EXEMPLE D'APPLICATION : MESURE DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES JUVÉNILES DU NÉMATODE HETERODERA ORYZAE LUC & BERDON 1961

3.2.1. Préparation des nématodes

Les juvéniles d'*Heterodera oryzae* sont obtenues en plaçant des masses d'œufs à éclore dans l'eau déminéralisée pendant trois jours à la température ambiante. La suspension de nématodes obtenue est déposée sur un filtre en cellulose selon la méthode d'OOSTENBRINK (1960). Les juvéniles actifs qui ont traversé le filtre sont recueillis deux heures après. Cette sélection des juvéniles actifs augmente l'efficacité de la stérilisation, qui est décrite plus loin, vraisemblablement en éliminant les juvéniles morts envahis par les microorganismes.

Immédiatement après cette sélection, à l'aide d'une centrifugeuse et de tubes stériles, environ 5 000 de ces juvéniles actifs sont soumis aux traitements suivants. Ils sont tout d'abord lavés pendant cinq minutes par un détergent, le Cétavlon à 0,1%, puis ils sont rincés à l'eau stérile plusieurs fois. On les met alors en suspension dans une solution d'antibiotiques composée de 2-éthoxyéthylmercure à 5 ppm et de sulfate de streptomycine à 0,1%. Les nématodes sont laissés dans cette solution pendant cinq heures avec une aération par bullage d'air filtré sur coton stérile.

Après cette stérilisation, les juvéniles sont rincés plusieurs fois à l'eau stérile, puis, en suspension dans un faible volume du même liquide (5 cm^3), sont placés dans un erlenmeyer de 100 cm^3 stérile bouché. L'erlenmeyer est laissé à 28 °C à l'obscurité jusqu'au lendemain (16 heures environ).

Afin de contrôler l'efficacité de la stérilisation, des

prélèvements aseptiques d'environ 0,1 cm³ du contenu de l'erlenmeyer sont déposés dans des tubes témoins. Ces tubes contiennent 10 cm³ d'un milieu complet stérile, en l'occurrence du milieu de FUJIWARA et OJIMA (1954). Ces tubes maintenus à 28 °C sont examinés tous les jours.

On obtient de 0 à 8% de contaminations dans les tubes témoins et ces contaminations se révèlent en deux jours au minimum.

Les juvéniles d'*Heterodera oryzae* traités aux antibiotiques et inoculés sur des plants de riz s'y développent normalement et présentent une descendance normale.

3.2.2. Les résultats

On emploie des ludions de 10 µl. Chacun d'eux est garni à l'aide de 80 juvéniles.

Le ludion, garni de nématodes, est représenté par la figure 15. Par gravité, les nématodes sédimentent et se répartissent au contact du ménisque qui sépare leur milieu de la bulle d'air.

Un relevé type de la pression d'équilibre d'un ludion dans ces conditions, au cours d'une mesure de vingt heures, est représenté par la figure 16. Les points correspondant aux mesures secondaires sont toujours situés en dessous de la droite qui joint les deux points correspondant aux mesures principales H 1 et H 2.

L'intensité de la consommation d'oxygène diminue

donc au cours d'une expérience. (De l'ordre de 5 à 20% suivant l'expérience.)

Les conditions de la manipulation décrite précédemment sont considérées comme standards. Les résultats d'une manipulation type portant sur dix mesures simultanées réalisées dans ces conditions standards sont donnés par le tableau I. (La mesure est faite sur vingt heures.)

TABLEAU I
EXEMPLE D'APPLICATION :
CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES JUVÉNILES
DU NÉMATODE *HETERODERA ORYZAE*

Paramètre	Poids sec par juvénile	Consommation d'oxygène par juvénile	Consommation d'oxygène par unité de poids sec
Unité	nano-gramme = 10 ⁻⁹ g	picolitre par heure	l/h par kilo
Nombre de répétitions	5	10	—
Moyenne	23,7	60,0	2,5
Ecart type	2,9	2,6	—
Intervalle de confiance à 5%	23,7 ± 2	60 ± 1,6	2,5 ± 0,25

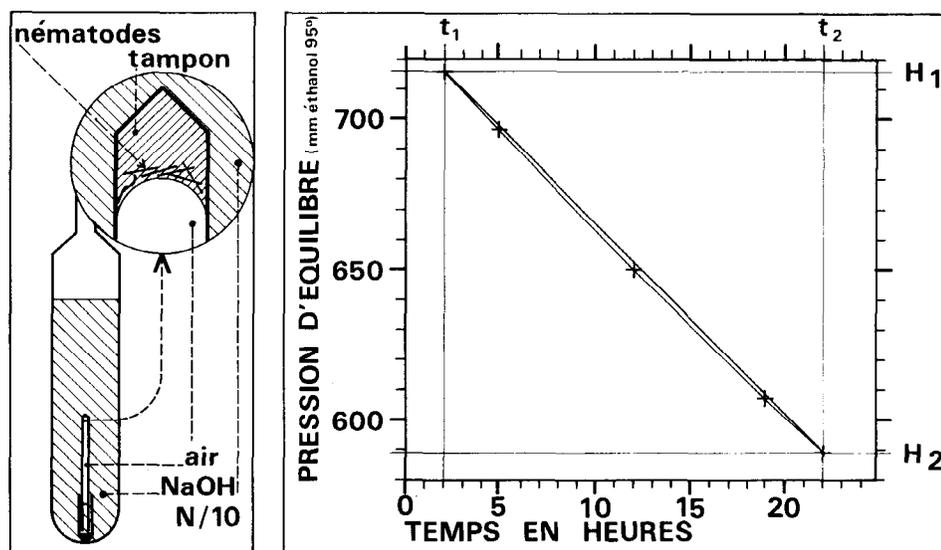


Fig. 15. — Ludion de 10 µl garni de nématodes, au repos dans le flacon de flottaison

Fig. 16. — Exemple d'application : relevé en fonction du temps de la pression d'équilibre d'un ludion de 10 µl garni de 80 juvéniles du nématode *Heterodera oryzae* (température : 28 °C. Mesures principales à 2 h et 22 h, mesures secondaires à 5 h, 12 h et 19 h)

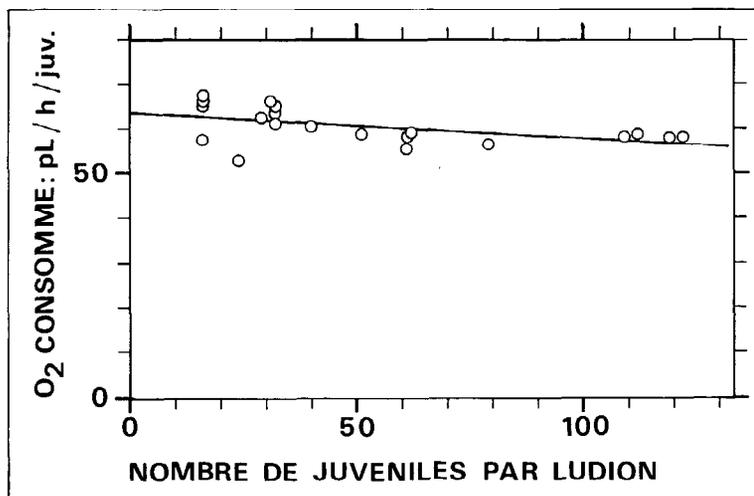


Fig. 17. — Exemple de contrainte physiologique liée aux méthodes : effet de groupe sur la consommation d'oxygène des juvéniles du nématode *Heterodera oryzae*. (Chaque cercle représente le résultat obtenu à l'aide d'un ludion)
Equation de la droite de régression, avec y pour les ordonnées et x pour les abscisses :
 $y = 63,2 - 0,05x$

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

Pour cela on a réalisé une expérience avec 20 ludions manipulés simultanément (on utilise alors deux appareils de mesure). On place dans chaque ludion un nombre différent de juvéniles. La mesure est faite sur vingt heures. Les résultats de cette expérience sont donnés par la figure 17. Le coefficient de corrélation est de 0,49 : l'effet du nombre de juvéniles dans le ludion est significatif avec un risque d'erreur compris entre 2 et 5%.

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

La pipette à sédimentation n'est garnie que de juvéniles actifs d'*Heterodera oryzae*. Cependant dès la première mesure (H 1), la plupart des juvéniles contenus dans le ludion sont inactifs et présentent un habitus droit semblable à celui des juvéniles morts. Cette situation se maintient pendant toute la durée de l'expérience. Une heure après leur récupération, à la fin de l'expérience, tous les juvéniles sont actifs.

4. ÉTUDE CRITIQUE

4.1. LA FABRICATION DU LUDION

4.1.1. L'assemblage capillaire

La mesure du rapport e/d de chaque assemblage

capillaire pourrait être évitée par l'emploi systématique de capillaires tels que ce rapport soit très inférieur au rapport critique. De tels capillaires sont obtenus par étirage de tubes à parois plus fines ($d = 14-15 \mu\text{m}$, $e = 1,0-1,3 \mu\text{m}$).

Deux éléments s'opposent à cette simplification de la méthode de fabrication du ludion. D'une part, un ludion se révèle, à l'usage, d'autant plus fragile que son rapport e/d est plus faible. On a donc intérêt à utiliser des capillaires dont le rapport e/d soit maximal, bien qu'inférieur au rapport critique, afin d'augmenter la durée de vie des ludions. D'autre part, à partir d'un même tube, le rapport e/d des capillaires obtenus varie beaucoup d'un étirage à l'autre.

Une mesure du rapport e/d est donc nécessaire pour chaque assemblage.

4.1.2. Le calibrage du ludion

Dans le bouchon du ludion de ZEUTHEN (1950) est enfermé définitivement par soudure un certain volume d'air.

Le fait que ce volume n'ait pas une valeur déterminée oblige à calibrer empiriquement le ludion. Pour cela de petites quantités d'air sont ajoutées progressivement dans la chambre respiratoire jusqu'à ce que le ludion flotte. Puis la quantité d'air ainsi ajoutée est évaluée à l'aide d'une micropipette. Ce procédé est long, peu précis et sauf hasard ce calibrage varie d'un ludion à l'autre.

Par contre, le ludion simple (NICON et FOURCHE, 1958) et notre modèle sont calibrés directement par pesée. Le procédé est rapide et précis (erreur relative de l'ordre de 0,3%). De plus les ludions d'une série

ayant la même masse ont nécessairement le même volume (voir la relation 1).

4.1.3. La sensibilité du ludion

La sensibilité d'un ludion est inversement proportionnelle à son volume gazeux. Dans ce domaine, notre ludion est limité par rapport aux modèles dont il dérive. En effet la fabrication de notre modèle avec un volume inférieur à 2 μ l devient techniquement difficile alors que le ludion de NIGON et FOURCHE (1958) peut atteindre 0,25 μ l et que le volume de ludion de ZEUTHEN (1950) peut être théoriquement aussi faible qu'on le désire.

4.2. LA MANIPULATION DU LUDION

4.2.1. Le remplissage du ludion

Notre ludion et ceux de Zeuthen (1950) et de Nigon et Fourche (1958) n'utilisent que deux solutions : le milieu de suspension de l'animal et le milieu de flottaison du ludion. Ces deux solutions se retrouvent également dans le ludion standard (HOLTER et ZEUTHEN 1966), mais deux autres viennent alors s'y ajouter : l'alcali absorbant et l'huile. L'introduction de ces quatre solutions dans le ludion standard nécessite un appareil spécial (BOELL 1960) d'une manipulation délicate.

Du ludion standard aux trois ludions simplifiés, les modifications ont été d'inclure l'alcali absorbant dans le liquide de flottaison et de supprimer l'huile. La simplification des accessoires suit celle du ludion : l'appareil spécial est remplacé par des pipettes de fabrication facile (fig. 7-A et 10).

4.2.2. L'appareil de mesures

Par rapport à l'appareil de mesures classiques (GLICK, 1961 ; HOLTER et ZEUTHEN, 1966) notre appareil comporte quatre modifications qui simplifient la manipulation.

La première modification a été introduite et discutée par NIGON et FOURCHE (1958) : il s'agit du manomètre monobranche. Deux autres modifications ont été apportées par J. FOURCHE (Communication personnelle) : la calorifugation de l'aquarium et la régulation thermique par Unitherm. La calorifugation diminue et régularise la déperdition thermique de la masse d'eau. La sollicitation du chauffage est alors faible et régulière : il n'y a pas de microvariation cyclique de la température pouvant influencer la pression d'équilibre des ludions. La dernière modification est propre à notre appareil : le banc d'optique. Elle assure la reproductibilité de la position du viseur par rapport à un ludion donné d'une mesure à l'autre.

4.3. LE COMPORTEMENT DU LUDION AU COURS DES MESURES A BLANC

4.3.1. La diffusion de l'air

LINDERSTROM-LANG et HOLTER (1942) ont montré que la bulle d'air d'un ludion perd par diffusion une quantité d'air proportionnelle au rapport de la section de diffusion à la longueur de diffusion. Cette perte provoque une dérive négative du ludion.

La valeur de ce rapport pour le ludion de Nigon et Fourche (1958) est telle que cette dérive n'est pas sensible, mais dans ce cas le diamètre du ludion est de 0,5 mm et l'expérience ne dure qu'une heure. Le calcul prévoit et l'expérience prouve que la dérive devient importante pour un diamètre de 1 mm et des durées de 24 heures. En fait, le ludion simple est pratiquement limité à un diamètre de 0,5 mm.

Dans le ludion de Zeuthen (1950) et notre ludion la section de diffusion est distincte de la section d'introduction de l'animal. Pour un ludion d'un diamètre de 1 mm, la section de diffusion est réduite à une étroite couronne circulaire (hachurée sur la figure 1-B) équivalente à la section de diffusion d'un ludion simple de 0,25 mm de diamètre.

4.3.2. La dérive

Nos ludions sélectionnés donnent des mesures à blanc satisfaisantes : la dérive négative observée est inférieure à 0,04 mm d'éthanol par heure. Cette dérive est en fait la résultante de deux dérives opposées : l'une négative, l'autre positive.

L'origine de la dérive négative vient d'être discutée : il s'agit de la diffusion de l'air.

La dérive positive est due à l'allègement du ludion par dissolution du pyrex qui le constitue dans le milieu de flottaison (REVERSAT, 1971). Cette dérive est proportionnelle à la surface de contact entre le ludion et le liquide de flottaison.

Les paramètres de construction de notre modèle de 10 μ l sont tels que ces dérives se compensent à peu près pour des durées de manipulation allant jusqu'à 24 heures. Au-delà de cette durée la dérive due à la diffusion devient très faible parce que le liquide du tube de flottaison se sature en air à la pression de repos du ludion. Dès lors, la dérive due à la dissolution l'emporte (point à 48 heures de la figure 14). Pour continuer à tirer parti de la compensation des deux dérives au-delà de 24 heures, il serait nécessaire de modifier la technique en empêchant cette solubilisation de l'air dans le liquide du flacon de flottaison.

La compensation des deux dérives n'est réalisée que pour certaines valeurs particulières des paramètres de construction du ludion. Les valeurs de ces paramètres ont été données pour un volume de 10 μ l. Pour d'autres volumes on recherchera cette compensation en modifiant la longueur du bouchon (voir fig. 6-E) qui est aussi la longueur de diffusion.

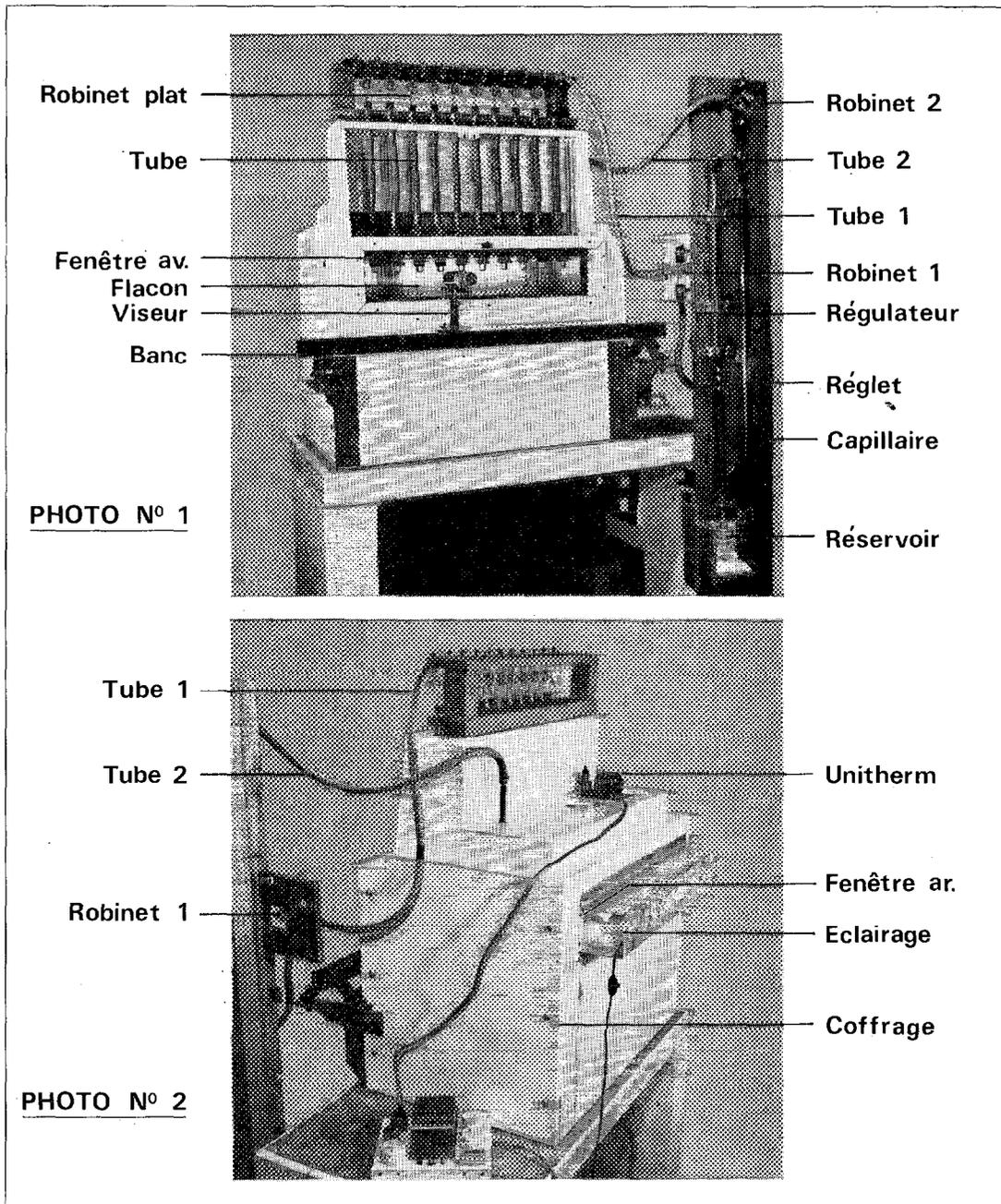


Photo n° 1. — Vue de face de l'appareil de mesure

Photo n° 2. — Vue de 3/4 arrière de l'appareil de mesure

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

4.4. LES CONTRAINTES PHYSIOLOGIQUES LIÉES AUX MÉTHODES

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

4.4.1. L'immobilisation réversible des juvéniles

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

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

Comme dans ce cas, le volume d'air est très important (50 cm³) en regard de celui du ludion (10 μ l), l'immobilisation ne peut pas être due à une baisse de la pression partielle d'oxygène consécutive à la respiration des juvéniles.

De la même façon, le volume de tampon étant très important (5 cm³) en regard de celui du ludion (1,5 μ l), l'immobilisation ne peut être due à une autointoxication provoquée par d'éventuels produits d'excrétion des juvéniles.

Nous sommes conduits à admettre que l'immobilisation est provoquée par l'absence de gaz carbonique ambiant, consécutive à l'action de la soude. Ce phénomène a été observé par SEARLE et REINER (1940) chez certains trypanosomes.

4.4.2. La diminution de la consommation d'oxygène

La diminution de la consommation d'oxygène au cours des mesures respirométriques est un phénomène déjà rapporté chez les nématodes phytoparasites : ROHDE (1960), SEMBDNER *et al.* (1961).

Dans notre cas cette diminution présente deux caractéristiques : d'une part sa valeur est irrégulière (de 5 à 20%) et d'autre part par elle n'est jamais nulle (au moins 5%). Ceci permet de penser que cette diminution est due à deux groupes de contraintes : l'un permanent, d'effet faible et constant, l'autre accidentel, d'effet plus important et variable.

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

Les contraintes accidentelles se produisent, à notre avis, au cours des manipulations des animaux qui précèdent la mesure elle-même. Il s'agit alors d'un changement rapide et important de la valeur d'un paramètre externe tels que la température ou la pression partielle d'oxygène. WILSON (1965) et BARRETT (1969) ont montré dans ces deux derniers cas qu'il se produit une hyperconsommation suivie d'un long retour progressif vers une consommation normale. La diminution de la consommation observée au cours de nos mesures correspondrait à ce retour vers une consommation normale.

4.4.3. L'effet de groupe sur la consommation d'oxygène

L'effet de groupe observé est quantitativement faible et l'erreur introduite par un effectif faible (68 au lieu de 80), de l'ordre de 10⁻², peut être négligée.

Il se pose néanmoins la question de l'origine de cet effet de groupe. Deux hypothèses, d'ailleurs compatibles peuvent être émises à ce sujet.

Nous avons déjà mentionné la première des hypothèses : l'excrétion par les juvéniles d'une substance inhibant leur respiration. Dans ce cas, la concentration et l'effet de la substance augmenteraient progressivement avec le nombre de juvéniles présents dans le ludion.

L'autre hypothèse suppose une insuffisance de l'approvisionnement en oxygène des animaux. Les nématodes dans le ludion (voir fig. 15) sont alimentés en oxygène par diffusion à travers le tampon qui les sépare de la bulle d'air. LINDERSTROMLANG (1943) a montré que dans ces conditions un équilibre s'établit et présente les caractéristiques suivantes. Tout d'abord la pression partielle d'oxygène existant au contact des animaux est inférieure à la pression partielle d'oxygène de la bulle d'air du ludion. Ensuite cet écart des pressions partielles est d'autant plus important que les animaux sont plus nombreux. Or nous avons déjà mentionné que la consommation d'oxygène de certains nématodes baisse progressivement lors d'une diminution de la pression partielle du même gaz (BAIR, 1955). Dans ce cas, dans un ludion plus l'effectif est important, plus la pression partielle d'oxygène serait faible et plus la consommation d'oxygène serait faible.

4.5. LA PRÉCISION DES RÉSULTATS

4.5.1. Etude comparative des résultats

La comparaison sera limitée aux résultats obtenus par d'autres auteurs sur des formes biologiquement très voisines de l'objet de notre étude, telles que les juvéniles d'*Heterodera rostochiensis* (SEMBDNER *et al.* 1961) ou les juvéniles de *Meloidogyne javanica* (VAN GUNDY *et al.*, 1967). Ces deux études présentent de plus l'avantage de rendre compte de l'effet de l'âge sur la consommation d'oxygène des animaux.

Dans la présente étude, les juvéniles d'*Heterodera oryzae* sont recueillis après trois jours d'éclosion et la mesure commence 24 heures après la fin de l'éclosion. La consommation d'oxygène à 28 °C est alors d'environ 63 pl/J/h (2,6 µl/mg) et elle n'est plus que de 58 pl/J/h (2,4 µl/mg) 20 heures après.

Dans le cas d'*Heterodera rostochiensis* (SEMBDNER *et al.*, 1961), les juvéniles sont recueillis après deux jours d'éclosion et la mesure commence tout de suite. La consommation d'oxygène à 24 °C est alors d'environ 100 pl/J/h et elle n'est plus que de 50 pl/J/h 60 heures après.

Dans le cas de *Meloidogyne javanica* (VAN GUNDY *et al.*, 1967), les juvéniles sont recueillis après un jour d'éclosion et la mesure commence tout de suite. La consommation d'oxygène à 28 °C est alors, d'environ 7,8 µl/mg et elle n'est plus que d'environ 2,6 µl/mg 96 heures après.

Compte tenu des différences spécifiques et expérimentales, ces trois séries de chiffres sont comparables. Il apparaît cependant que la valeur de nos résultats est plus faible que pour les deux autres espèces.

4.5.2. La variabilité

L'efficacité de la stérilisation superficielle des juvéniles par les antibiotiques (3.2.1.) est à l'origine d'une

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

La variabilité des résultats peut être caractérisée par le coefficient de variation relative égal au quotient de l'écart type par la moyenne. Ce coefficient est de 4,3% pour la consommation d'oxygène rapportée par juvénile (voir tabl. I). Ce chiffre est faible et la précision ainsi obtenue est acceptable pour des mesures courantes. Il n'est cependant pas inutile de rechercher les origines possibles de cette variabilité afin de déterminer si la méthode est perfectible en ce qui concerne la précision.

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

Pour exprimer la consommation d'oxygène des nématodes il est courant de rapporter les chiffres au poids frais (ROHDE, 1960). Pour cela, on détermine par la méthode d'ANDRASSY (1956), le volume du nématode et on le multiplie par une masse volumique fixe. Ce faisant, on admet que la consommation d'oxygène de l'unité de volume du nématode est constante. La variabilité individuelle de la consommation d'oxygène tire alors son origine de la variabilité individuelle du volume des nématodes. Le tableau II donne les volumes minimum et maximum des juvéniles d'*Heterodera oryzae* calculés à partir des données de LUC à BERDON (1961) par la méthode d'ANDRASSY (1956). On admet que le volume suit une loi normale et que les deux valeurs calculées bornent 95% des valeurs. L'écart entre les deux valeurs calculées est donc égal à quatre fois l'écart type. Dans ces conditions le volume moyen est de 86 569 µm³ et l'écart type est de 13 417 µm³. Le coefficient de variation relative est alors de 15%.

TABLEAU II

VARIABILITÉ DU VOLUME DES JUVÉNILES D'*HETERODERA ORYZAE*

(* données de LUC et BERDON 1961, ** formule d'ANDRASSY 1956)

Paramètre	Valeur		
	Symbole	Minimum	Maximum
Longueur µm	L*	373	507
Largeur µm	l*	16,5	19,5
Volume µm ³	l ² · L/1,7 **	59 735	113 404

D'après les observations faites précédemment (4.4.2.) on peut estimer que la consommation d'oxygène des juvéniles d'*Heterodera oryzae* baisse au maximum de 5% par 24 heures. Du fait de l'étalement des éclosions sur trois jours, l'âge moyen des juvéniles est connu à ± 36 heures. Le coefficient de variation relative dû à ce facteur est donc de 15%.

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

La seconde source de variabilité est d'origine instrumentale. Les erreurs portent sur les facteurs de la relation (10). L'erreur sur k' , identique à l'erreur sur la relation (1) est en fait celle faite sur la détermination de la masse du ludion, sa valeur est de $\pm 0,05/18,17 = 0,3 \cdot 10^{-2}$. L'erreur sur N est nulle. L'erreur sur $t_2 - t_1$ est de ± 15 secondes sur 20 heures soit $0,02 \cdot 10^{-2}$. D'après NIGON et FOURCHE (1958) l'erreur standard dans la mesure d'une différence de pression est de 0,6 mm pour le manomètre monobranché à alcool. L'erreur relative sur $H_1 - H_2$ serait alors de $0,6/120$ soit $0,5 \cdot 10^{-2}$. Au total l'erreur relative d'origine instrumentale serait de $0,8 \cdot 10^{-2}$.

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

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

L'effet de l'augmentation du nombre de juvéniles dans le ludion sur la dispersion des résultats est sensible sur le graphique de la figure 17.

5. CONCLUSION

La méthodologie décrite donne toute satisfaction sur le plan technique : rapidité de mise en œuvre et fidélité du comportement du ludion au cours des mesures à blanc.

L'étude de la précision des résultats obtenus révèle que l'erreur d'origine instrumentale est très inférieure à l'erreur d'origine biologique. Dans la mesure où l'on envisagerait d'améliorer la précision des résultats

l'effort devrait donc porter surtout sur la rigueur apportée à la préparation des animaux. Les principaux facteurs à considérer seraient alors l'homogénéité d'âge des animaux, leur homogénéité génétique et le maintien, aux cours des manipulations qui précèdent la mesure, de la constance des paramètres physicochimiques auxquels sont soumis les animaux.

La précision actuellement obtenue est cependant très largement suffisante pour envisager favorablement l'exploitation de la méthode. Cette exploitation actuellement en cours, vise à rechercher des sources de variations de la consommation d'oxygène parmi différents facteurs contrôlés : écologiques, physiologiques ou génétiques.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime toute sa gratitude à M. FOURCHE qui lui a enseigné la méthode du ludion et qui a prodigué ses conseils lors de la réalisation de l'appareil de mesure. L'auteur remercie vivement M. le Professeur NIGON, qui a dirigé ce travail, et MM. LUC et MERNY qui ont bien voulu revoir le texte.

Manuscrit reçu au S.C.D. de l'ORSTOM le 30 juillet 1974

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDRASSY (I.) - 1956 - Die Rauminhalts- und Gewichtsbestimmung der Fadenwürmer (Nematoden). *Acta Zoologica Acad. Scient. Hungarica*, 2 : 1-15.
- BAIR (T. D.) - 1955 - The oxygen consumption of *Rhabditis strongyloides* and other nematodes related to oxygen tension. *J. Parasitol.*, 41 : 613-623.
- BARRETT (J.) - 1969 - The effect of physical factors on the rate of respiration of the infective larvae of *Strongyloides ratti* Sandground 1925. *Parasitol.*, 59 : 859-975.
- BHATT (B. D.) and ROHDE (R. A.) - 1970 - The influence of environmental factors on the respiration of plant parasitic nematodes. *J. Nematol.* 2 : 277-285.
- BOELL (E. J.) - 1960 - The cartesian diver technique in respirometry and enzyme assay. In : *Nematology fundamentals and recent advances*. Sasser J. N. and Jenkins W. R., editors. The University of North Carolina Press, Chapel Hill, USA, 109-121.
- FUJIWARA (A.) and OJIMA (K.) - 1954 - Physiological studies of plant roots. I. Influence of some environmental conditions on the growth of isolated roots of rice plant and wheat. *Tohoku J. Agric. Research*, 5 : 53-61.

- GLICK (D.) - 1961 - Gasometric techniques in : *Quantitative chemical techniques of Histo- and Cytochemistry*, vol. 1 : 123-289. Wiley (Interscience) New York.
- GUNDY (S. D.) VAN, BIRD (A. F.) and WALLACE (H. R.) - 1967 - Aging and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology*, 57 : 559-571.
- HOLTER (H.) and ZEUTHEN (E.) - 1966 - Manometric techniques for single cells. In : *Physical techniques in biological research*, Pollister A. N. edit., Academic Press, vol. III A, 251-317.
- LINDERSTROM-LANG (K.) - 1943 - On the theory of the cartesian diver microrespirometer. *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, ser. Chim.* 24 : 333-398.
- LINDERSTROM-LANG (K.) and HOLTER (H.) - 1942 - Diffusion of gases through protective seals of oil or flotation medium in the cartesian diver. *Compt. Rend. trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim.*, 24 : 105-138.
- LUC (M.) et BERDON-BRIZUELA (R.) - 1961 - *Heterodera oryzae*, n. sp. (Nematoda : Tylenchoidea) parasite du riz en Côte d'Ivoire. *Nematologica*, 6 : 272-279.
- NETSCHER (C.) et PERNES (J.) - 1971 - Etude concernant l'influence de la constitution génétique sur la longueur des larves d'*Heterodera oryzae*. *Nematologica*, 17 : 336-346.
- NIGON (V.) et FOURCHE (J.) - 1958 - La précision des mesures respirométriques réalisées à l'aide du ludion. *Bull. biol. France et Belg.*, 17 : 36-54.
- OOSTENBRINK (M.) - 1960 - Estimating nematode populations by some selected methods. In : *Nematology fundamentals and recent advances* Sasser J. N. and Jenkins W. R., editors. The University of North Carolina Press, Chapel Hill, USA, 85-102.
- OVERGAARD-NIELSEN (G.) - 1949 - Studies on the soil microfauna. II. The soil inhabiting nematodes. *Nat. Jutland.*, 2 : 1-131.
- REVERSAT (G.) - 1971 - *Contribution à l'étude de la biologie d'un nématode phytoparasite : Heterodera oryzae*. Thèse de Docteur-Ingénieur. Université Claude Bernard de Lyon, 52 p.
- ROHDE (R. A.) - 1960 - The influence of carbon dioxide on respiration of certain plant parasitic nematodes. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 27 : 160-164.
- ROHDE (R. A.) - 1971 - Respiration, in : *Plant parasitic nematodes*. Edited by B. M. Zuckerman, W. F. Mai and R. A. Rohde. Academic Press, New York and London. Vol. II, Chapter 23, 235-246.
- SEARLE (D. S.) and REINER (L.) - 1940 - Effect of carbon dioxide on glucose metabolism of trypanosomes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 43 : 80-82.
- SEMBDNER (G.), OSSKE (G.) and SCHREIBER (K.) - 1961 - Untersuchungen zur Atmung des Kartoffelnematoden *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Biol. Zblt.*, 80 : 551-561.
- UMBREIT (W. W.) BURRIS (R. H.) and STAUFFER (J. F.) - 1966 - *Manometric techniques*. Burgess Publishing Co, Minneapolis, USA, 338 p.
- WALLACE (H. R.) and GREET (D. N.) - 1964 - Observations on the taxonomy and biology of *Tylenchorhynchus macrurus* (Goodey 1932) Filipjev 1936 and *Tylenchorhynchus icarus* sp. nov. *Parasitol.*, 54 : 129-144.
- WILSON (P. A. G.) - 1965 - The effect of temperature change on the oxygen uptake of the infective larvae of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Expl. Parasitol.*, 17 : 318-325.
- ZEUTHEN (E.) - 1950 - Cartesian diver respirometer. *Biol. Bull.* 98 : 139-143.
- ZUCKERMAN (B. M.) - 1971 - Gnotobiology, in : *Plant parasitic nematodes*. Edited by B. M. Zuckerman, W. F. Mai and R. A. Rohde. Academic Press, New York and London. Vol. II, Chapter 20, 159-184.