

TRANSFORMATION DES RESERVES ENERGETIQUES DANS LES SITES TROPHIQUES INDUITS PAR *MELOIDOGYNE JAVANICA* SUR TUBERCULES DE POMME DE TERRE

W. Hlaoua et N. Horrigue-Raouani¹

*Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem, Laboratoire de Zoologie Agricole,
4042 Chott Mariem Sousse, Tunisie*

Résumé. Les nématodes à galles *Meloidogyne* spp. sont des ravageurs endoparasites obligatoires. Sur tubercules de pomme de terre, ils induisent la formation des sites trophiques spécifiques indispensables pour assurer leur cycle de développement. L'aspect des cellules nourricières et la composition de leur cytoplasme semblent être profondément modifiés. Une coloration spécifique au Lugol montre qu'elles sont moins riches en amidon que les cellules des tissus indemnes. Cette observation est confirmée par le dosage de la quantité d'amidon par gramme de matière sèche des tissus infestés. Dans ces tissus, le taux des sucres totaux est inversement proportionnel à celui de l'amidon. Les sucres dans les cellules nourricières ne sont pas des produits extracellulaires: ils résultent de l'action du nématode sur l'amidon stocké dans ces cellules au moins pendant une période du cycle du nématode.

Mot clés: Amidon, nématode à galles, *Solanum tuberosum*, sucres.

Summary. Transformation of energy reserves in the trophic sites induced by *Meloidogyne javanica* in potato tubers. Root knot nematodes *Meloidogyne* spp. are sedentary endoparasites. On tubers of potato they induce the formation of specific feeding sites essential for their development. Structure and cytoplasm content of nurse cells seem to be deeply modified. A specific coloration by the Lugol test shows that they are not as rich in starch as the adjacent unchallenged cells. This observation is confirmed by measurement of the concentration of starch per g of dry matter of infested tissue. The total sugar concentration was inversely proportional to that of starch in the feeding sites. Sugars in the nurse cells seem not to be extra cell products but the result of nematode trophic activity on the starch stored in these cells.

Key words: Root-knot nematode, *Solanum tuberosum*, starch, sugars.

La culture de pomme de terre est infestée par plusieurs espèces de *Meloidogyne* qui peuvent entraîner une importante réduction de la production et de la qualité des tubercules variable selon l'étage climatique (Vovlas *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2007; Hlaoua et Horrigue-Raouani, 2007). De Guiran et Netscher (1970) ont signalé que l'aspect extérieur n'est pas le seul à être déprécié par la présence de *Meloidogyne* mais la qualité organoleptique du produit peut être également affectée.

Les nématodes à galles *Meloidogyne* spp. induisent des sites trophiques spécifiques dans les tubercules de pomme de terre (Vovlas *et al.*, 2005). Sur racine, la juvénile infestante J2 migre et pénètre dans l'espace intercellulaire pour se fixer dans le cylindre central, percer une seule cellule par son stylet et y libérer des sécrétions enzymatiques (Williamson et Hussey, 1996). Dans les heures qui suivent, les cellules affectées de la plante commencent à s'hypertrophier. La vacuole se désintègre en plusieurs vésicules plus petites, les nucléoles s'élargissent et plusieurs organelles augmentent de nombre. Deux semaines à peu près après l'infection, le nématode

atteint le stade de maturité et est ainsi associé à un site trophique composé de cinq à sept cellules hypertrophiées (Wyss *et al.*, 1992). Durant la phase de sédentarisation, les J2s se différencient en mâle ou en femelle. Jusqu'ici peu de choses sont connues sur les facteurs qui influencent la détermination du sexe, mais la disponibilité et la composition des nutriments apparaissent comme étant deux facteurs déterminants (Gheysen et Fennoll, 2002; Grundler *et al.*, 1991).

Pour les parasites sédentaires obligatoires, le succès d'établissement d'un site trophique est l'unique source de nutriments pour ces nématodes à galles. Leur incidence sur les divers aspects du métabolisme des plantes est incontestable. Ils perturbent l'absorption et le transport de l'eau ainsi que des éléments minéraux et organiques, dérèglent le fonctionnement photosynthétique et modifient le métabolisme glucidique et protéique. Cependant, les recherches sur le sujet ne permettent pas encore de distinguer les effets directs de leurs conséquences; aucune loi générale ne peut donc être établie (Mateille, 1994). Hofmann *et al.* (2007) ont montré que la formation des sites trophiques est accompagnée par une importation massive des solutés dans les cellules nourricières permettant ainsi une augmentation de la concentration de leur cytoplasme et une pression osmotique élevée. En général, les cellules végétales font face à la quantité excessive des sucres par la formation des

¹ Authors' e-mails: bhlaoua@yahoo.fr ; naj.horrigue@yahoo.fr

granules d'amidon qui est la forme de stockage des carbohydrates dans les plantes (Hofmann *et al.*, 2008).

Ce travail décrira l'aspect des sites trophiques induits par les *Meloidogyne* dans les tubercules de pomme de terre pour leur richesse en carbohydrates. De même, nous étudierons l'importance du taux d'amidon dans ces sites et de son équilibre avec le taux des sucres dans ces cellules métaboliquement actives.

MATERIELS ET METHODES

Répartition des réserves en amidon dans les tubercules infestés. Des coupes transversales d'environ 20 à 25 µm d'épaisseur ont été réalisées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir sur des tubercules infestés par *M. javanica* (Treub) Citw. La technique a pour but la mise en évidence de la richesse des tissus en amidon.

Les coupes sont préalablement traitées pendant 15 à 20 minutes par une solution diluée (6%) d'hypochlorite de sodium. Le traitement a pour but de ne laisser subsister que la membrane squelettique et les inclusions cytoplasmiques. Les coupes sont par la suite lavées soigneusement par deux bains successifs d'eau distillée. Un troisième traitement constitué d'eau additionnée de quelques gouttes d'acide acétique sert à détruire les traces d'hypochlorite restantes et à faciliter la fixation ultérieure du colorant. La coloration est faite par le liquide de Lugol (Iodure de potassium, Iode, Eau distillée: 2 g : 1 g : 100 ml), pendant 10 à 15 minutes, puis les coupes sont rincées et montées dans une goutte de glycérine entre lame et lamelle (Deysson et Rollen, 1971). Un examen immédiat des coupes est fait à l'aide d'un microscope équipé d'un appareil photographique. Les granules d'amidon sont colorés en bleu. Les coupes sont observées aux différents grossissements et sont par la suite photographiées (Kallel *et al.*, 2005).

Détermination du taux d'amidon dans les tissus infestés et indemnes des tubercules infestés par M. javanica. La méthode utilisée est celle de Nielson (1943) modifiée par Hellali (1978) et citée par Hamada (1995). Elle est également basée sur la coloration bleue résultant de l'action de l'iode.

Les sites d'infestation et de développement des *Meloidogyne* sont facilement repérables dans la chair des tubercules infestés. Les taux d'amidon y sont mesurés ainsi que dans les tissus avoisinants indemnes d'un même tubercule. Pour les tissus indemnes et infestés, les échantillons prélevés sont séchés à l'étuve pendant 3 jours à 70 °C puis broyés.

Trois cents mg du broyat de matière sèche sont mis en suspension dans 20 ml d'alcool éthylique à 70% pendant 48 heures. Le volume de la préparation est ensuite ramené à 250 ml par de l'eau distillée. Le surnageant est éliminé et le culot est récupéré et séché à l'étuve à 60 °C. Cet extrait sec est ensuite pesé puis hydrolysé par l'acide perchlorique à 70% à raison de 5,7 ml pour 300 mg d'extrait

sec (le volume de l'acide perchlorique est recalculé en fonction du poids de l'extrait sec obtenu). Le volume de cette préparation est ajusté à 250 ml par de l'eau distillée. Après 48 heures, 7 ml de chaque solution sont mélangés dans un tube à essai avec 0,5 ml d'une solution d'iode préparée à raison de 0,1% de KI et 0,02% de KIO₃.

Au bout de 5 heures de réaction, la lecture de l'absorbance est effectuée au spectrophotomètre Bauch & Lamber (CAMSPEC M330) à la longueur d'onde $\lambda = 675$ nm. La quantité d'amidon est par la suite déterminée pour les deux types d'échantillons par rapport à la courbe étalon. Cette dernière est établie par le traitement de plusieurs quantités (entre 1 et 25 mg) d'amidon soluble pur avec 20 ml d'acide perchlorique à 70%. Le volume de la préparation est ensuite ramené à 250 ml par de l'eau distillée. Après 48 heures d'hydrolyse, 7 ml de chaque solution subissent la même démarche effectuée pour les échantillons étudiés et la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre ($\lambda = 675$ nm) est effectuée 5 heures après le début de la réaction.

Détermination des sucres totaux dans les tissus infestés des tubercules. Comme précédemment, les sucres totaux sont comparés dans les sites d'infestation des *Meloidogyne* et dans les sites indemnes de la chair d'un même tubercule. Les mesures sont faites sur un tissu frais à l'aide d'un réfractomètre du type ATAGO P-1 (P-A 9104) présentant une échelle graduée en concentration massique de sucres exprimée en % (ou en Brix) et variant de 0 à 32%. En raison de sa très grande facilité d'emploi, la mesure réfractométrique est utilisée couramment dans l'industrie pour doser directement des solutions sucrées. Le réfractomètre est alors directement gradué en concentration de sucre (Anonyme, 2000). L'indice de réfraction de l'eau par rapport à l'air est 1,330 à 20 °C.

Les faces des 2 prismes étant parfaitement propres et sèches, il suffit d'introduire 1 ou 2 gouttes de la solution à doser entre les prismes. Après avoir ajusté la limite de séparation entre la zone claire et la zone sombre sur le réticule, on lit sur le cadran de l'oculaire la valeur de l'indice. Dans ce travail, nous avons utilisé quelques gouttes du jus des tissus infestés et indemnes des tubercules. Le calcul de la quantité des sucres est effectué selon la formule suivante: 1° Brix = 1 g sucre/100ml de solution (Anonyme, 2000). Ces résultats sont comparés à ceux d'une solution à 10% de glucose. La mesure est répétée sept fois pour assurer une analyse statistique.

Analyses statistiques. Les données obtenues ont subi le test d'égalité des variances de Bartlett et ont été traitées ensuite par l'analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel SPSS 10.0. Les moyennes ont été comparées à l'aide du test Duncan au seuil de 5%.

RESULTATS

Répartition qualitative des réserves en amidon dans les

tubercules infestés. Les coupes de tubercules infestés colorées au liquide de Lugol, colorant spécifique de l'amidon, ont montré une coloration claire des sites trophiques par rapport aux tissus indemnes. En revanche, la couleur bleu foncé de ces tissus confirme la grande ri-

chesse de ses cellules en molécules d'amidon (Fig. 1: A1, A2, A3). En fait, les cellules nourricières de *Meloidogyne* sont beaucoup moins riches en amidon que celles du tissu non infesté. Ces cellules ont seulement quelques granules d'amidon colorés en jaune brun, plus

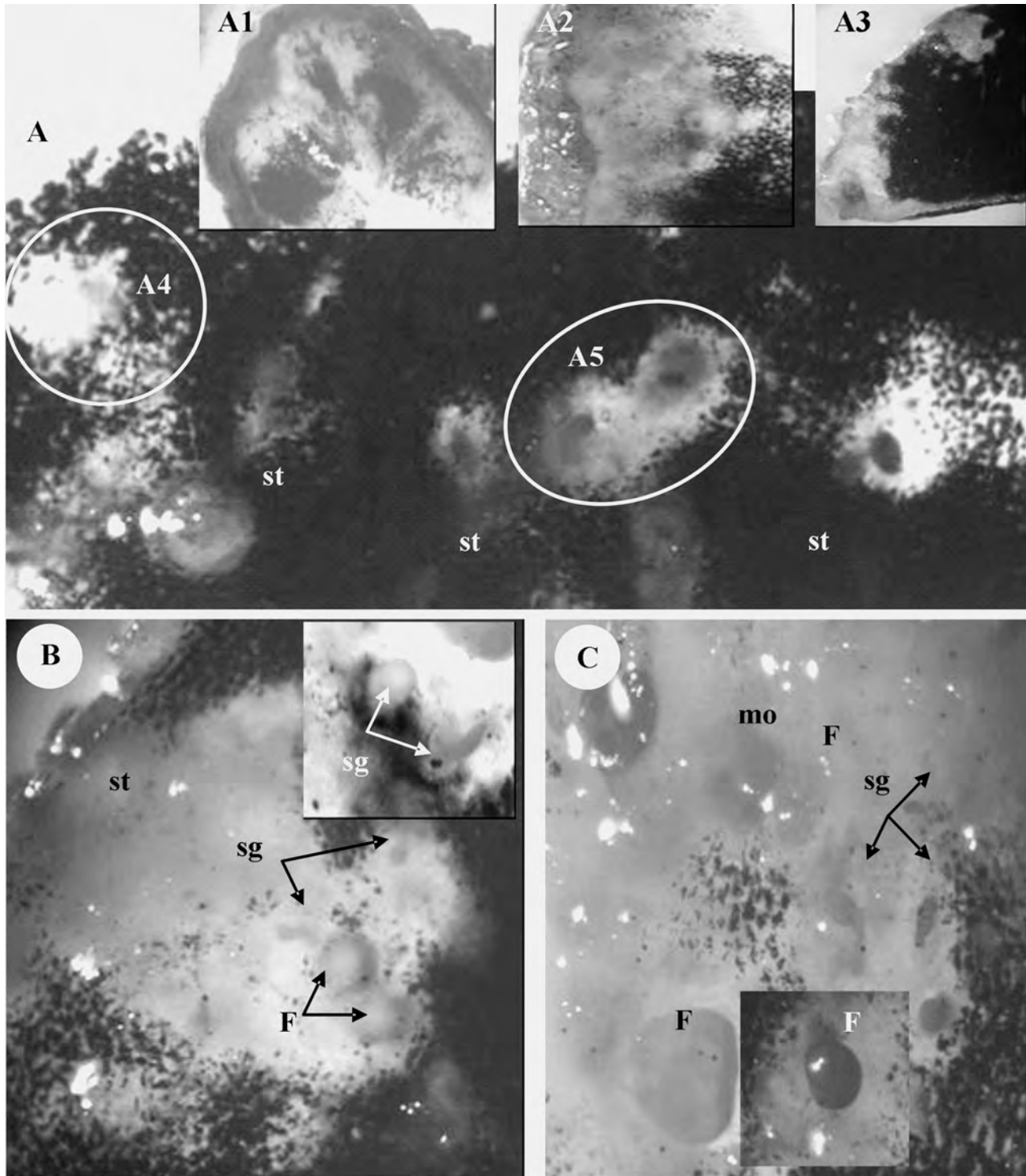


Fig. 1. Coloration au liquide de Lugol des sites trophiques de *Meloidogyne javanica* dans les tissus de tubercules de pomme de terre. A: Sites trophiques (st) induits dans les tissus infestés. Les sites trophiques sont clairs par rapport au reste des tissus sombres résultant de l'effet du Lugol sur l'amidon. Ces sites sont localisés dans le cortex (A1 A2 et A3) (Echelle 1/25) ou à l'intérieur du tubercule (A4 et A5) (Echelle 1/40). B: Grossissement de (A2) montrant le site d'infestation avec deux femelles (F) et plusieurs stades gonflés (sg) (Echelle 1/40). C: Grossissement de (A4) montrant le site d'infestation avec plusieurs femelles (F), stades gonflés (sg) et masses d'œufs (mo) (Echelle 1/50).

ou moins intense (Fig. 1: A4, A5, B). La structure interne de ces cellules et leurs limites ne sont pas visibles. Cependant, la présence des différents stades de développement de *M. javanica* et des masses d'œufs au niveau de ces sites fait supposer que le développement des juvéniles des générations ultérieures se fait dans les cellules voisines du (ou -adjacentes au-) site trophique (Fig. 1: B, C).

Étalonnage du spectrophotomètre. Les valeurs d'absorbance relatives aux différentes quantités d'amidon (entre 1 et 25 mg) ont permis d'étalonner le spectrophotomètre pour évaluer la quantité d'amidon de l'échantillon tout en tenant compte de la valeur de la longueur d'onde observée (Fig. 2).

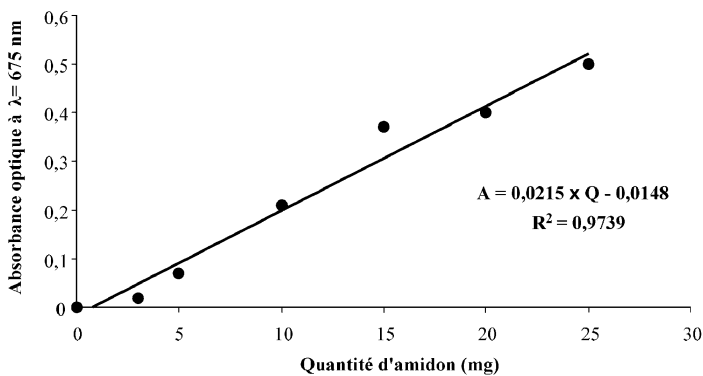


Fig. 2. Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre. A: absorbance optique à $\lambda = 675$ nm; Q: Quantité d'amidon.

Quantification du taux d'amidon dans les tissus infestés et indemnes des tubercules Elle est faite pour évaluer l'effet de l'infestation de *M. javanica* sur la répartition et l'évolution de l'amidon dans les différents tissus des tubercules. La mesure de la quantité d'amidon dans les tissus infestés et indemnes des tubercules montre une

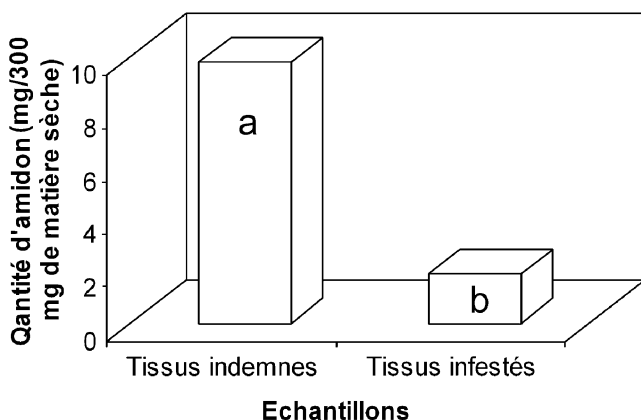


Fig. 3. Infestation de tubercules de pomme de terre par *Meloidogyne javanica*: comparaison de la quantité d'amidon dans les tissus infestés et les tissus indemnes.

différence significative dans la quantité d'amidon entre ces deux types d'échantillons (Fig. 3). Cette quantification confirme les observations qualitatives présentées précédemment (Planche 1) où les sites d'infestation ne présentent pas la couleur bleue caractéristique de l'amidon en présence de l'iode.

Quantification du taux de sucres dans les tissus infestés des tubercules. Les différents échantillons de tissus infestés ont présenté un taux de sucre significativement plus élevé que celui observé dans les tissus indemnes (Fig. 4).

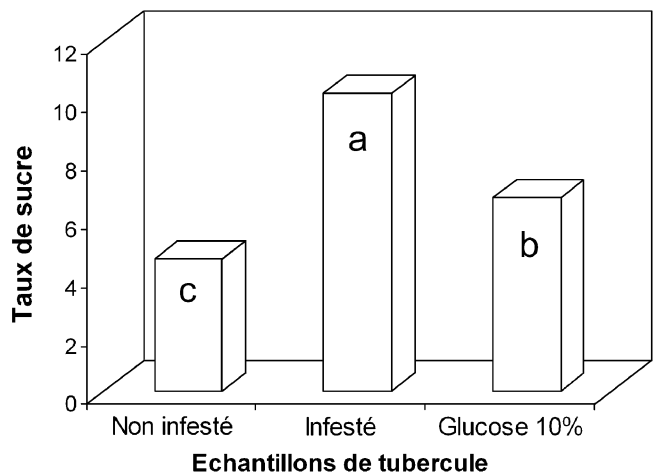


Fig. 4. Infestation de tubercules de pomme de terre par *Meloidogyne javanica*: Différence des taux de sucres dans les tissus infestés et indemnes, comparée à une solution de glucose (10%).

DISCUSSION

Les molécules d'amidon sont des polymères de glucose, résultant de l'assimilation photosynthétique, et liés par des liaisons ADP (ADP-Glc). Généralement, les plantes réagissent à la production excessive de ces sucres en les stockant sous forme d'amidon dans certains organes comme les tubercules, les bulbes et les semences (Hofmann *et al.*, 2008). Hormis cette fonction, l'accumulation de l'amidon peut être une réponse de la plante à une agression quelconque. Carol *et al.* (1999) ont observé qu'une attaque de cicadelles (*Empoasca fabae* Harris; Homoptera: Cicadellidae) entraîne un affaiblissement des cellules du phloème des tiges de l'alfalfa (*Medicago sativa* L.), une accélération de la maturation des chloroplastes et la formation de granules d'amidon. Alan et Bird (1961) ont montré que le cytoplasme des cellules nourricières des nématodes à galles contient des taux importants de carbohydrates et des traces d'acides gras. De même, la concentration d'amidon augmente dans les cellules nourricières de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb sur bigaradier et elle est positivement corrélée au nombre des femelles dans les racines (Kallel *et al.*, 2005). En étudiant le métabolisme de l'amidon, Hof-

mann *et al.* (2008) ont montré que les syncytia d'*Heterodera schachtii* Schmidt sur *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. présentent anormalement des quantités importantes de carbohydrates sous forme d'amidon. De même, les granules d'amidon ont été précocement observés dans les syncytia induits par *Nacobbus* sp. sur les racines de tomate (Jones et Payne, 1977).

Les métabolismes de l'amidon et des sucres ne peuvent pas être étudiés séparément puisque le premier produit provient du second et réciproquement; d'ailleurs, plusieurs auteurs ont montré que la dégradation de l'amidon dans les cellules végétales sont réglées par la synthèse des sucres (Zeeman *et al.*, 2002; Dumez *et al.*, 2006). Les carbohydrates solubles sont en outre la source essentielle d'énergie des nématodes. De ce fait, les cellules nourricières doivent contenir des niveaux élevés de sucres (Hofmann *et al.*, 2007). Pour Dennis et Blakeley (2000), ces sucres résultent de la dégradation des molécules d'amidon de réserve, par plusieurs enzymes spécifiques, à l'intérieur des cellules. Cependant, Hofmann *et al.* (2007) ont montré qu'un transfert massif de sucres se produit à partir du phloème de la plante hôte dans le syncytium pour répondre aux besoins du nématode pendant ses différentes phases de développement. L'importation des sucres a été démontrée via des transporteurs durant la phase précoce de formation du syncytium puis par les plasmodesmes à une étape plus tardive (Hofmann et Grundler, 2006, 2007). L'apport des sucres aux syncytia induits par les nématodes a été aussi vérifié par Jones et Payne (1977). Selon Hofmann *et al.* (2008), le surplus des sucres non utilisé par les nématodes est stocké dans ces cellules nourricières sous forme d'amidon comme le font normalement les cellules végétales.

Par contre, les résultats de notre travail montrent que les sucres au niveau des sites d'infestation de *M. javanica* dans les tubercules de pomme de terre, ne sont pas un produit extracellulaire des cellules nourricières. D'une part, parce que la quasi totalité des réserves des tubercules se présente sous forme d'amidon; d'autre part, parce que la formation des sites trophiques dans les tubercules est indépendante de l'emplacement des tissus conducteurs qui perdent leurs fonctions au fur et à mesure du vieillissement du tubercule alors que l'infestation par les J2 continue pendant l'entreposage (Hlaoua, 2004).

Certains auteurs tels qu'Hofmann *et al.* (2007) ont écarté l'hypothèse de la synthèse des sucres dans les syncytia comme source nutritive exclusive des nématodes. Dans nos résultats, la présence de sucres dans les sites trophiques résulte vraisemblablement de la transformation directe de l'amidon dans les cellules nourricières par des enzymes de dégradation issues des nématodes. Cela expliquerait l'importante concentration de ces sucres en corrélation avec la réduction de l'amidon dans les sites d'infestation induits par *M. javanica* sur tubercules de pomme de terre.

LITERATURE CITÉE

- Alan F. et Bird Ph.D., 1961. The ultrastructure and histochemistry of a nematode induced giant cell. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 11: 701-715.
- Anonyme, 2000. Sucre de raisin. Codex Œnologique international, Résolution Oeno 47/2000, 15 pp.
- Carol L., Zhou E. et Backus E.A., 1999. Phloem injury and repair following potato leafhopper feeding on alfalfa stems. *Canadian Journal of Botany*, 77: 537-547
- De Guiran G. et Netscher C., 1970. Les nématodes du genre *Meloidogyne* parasites des cultures tropicales. *Cahier ORSTOM, Série Biologie*, 11: 151-184.
- Dennis D.T et Blakeley S.D., 2000. Carbohydrate metabolism. Pp. 630-675. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Ed 1 (Buchanan B.B., Gruissem W. and Jones R.L., eds). American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA.
- Deysson G. et Rollen A., 1971. *Guide de travaux pratiques de Botanique. Nouvelle édition revue et corrigée*. Paris: Société d'édition d'enseignement supérieur, 1971 (Impr. Soulas Paris, France), 96 pp.
- Dumez S., Wattedled F., Dauvillee D., Delvalle D., Planchot V., Ball S.G. et D'Hulst C., 2006. Mutants of *Arabidopsis* lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation. *Plant Cell*, 18: 2694-2709.
- Gheysen G. et Fenoll C., 2002. Gene expression in nematodes feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 191-21
- Grundler F.M.W., Betka M. et Wyss U., 1991. Influence of changes in the nurse cell system (syncytium) on sex determination and development of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: total amounts of proteins and amino acids. *Phytopathology*, 81: 70-74.
- Hamada M.B., 1995. Possibilité de retarder la maturation des Orangers Maltaise (*Citrus Sinensis* OSBEK) cv. Demi sanguine par pulvérisations foliaires de GA₃ et d'urée permettant l'échelonnement de leur récolte. *Mémoire de 3^{ème} Cycle de Spécialisation Horticulture-Arbiculture*. INAT, Tunisie, 152 pp.
- Hlaoua W., 2004. Contribution à l'étude de la relation *Meloidogyne spp.* (Tylenchida : Meloidogynidae), pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). DEA. Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Élevage de Chott Mariem, Sousse, Tunisie, 70 pp.
- Hlaoua W. et Horrigue Raouani N., 2007. Effet de *Meloidogyne incognita* sur la culture de pomme de terre. *Nematologia Mediterranea*, 35: 213-220.
- Hofmann J. et Grundler F.M.W., 2006. Females and males of root-parasitic cyst nematodes induce different symplasmic connections between their syncytial feeding cells and the phloem in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 430-433.
- Hofmann J. et Grundler F.M.W., 2007. How do nematodes get their sweets: solute supply to sedentary plant parasitic nematodes. *Nematology*, 9: 451-458.
- Hofmann J., Szakasits D., Blöchl A., Sobczak M., Daxböck-Horvath S., Golinowski W., Bohlmann H. and Grundler F.M.W., 2008. Starch serves as carbohydrate storage in nematode-induced syncytia. *Plant Physiology*, 146: 228-235.
- Hofmann J., Wiczorek K., Blöchl A. et Grundler F.M.W., 2007. Sucrose supply to nematode-induced syncytia depends on the apoplasmic and the symplasmic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 58: 1591-1601.

- Jones M.G.K. et Payne H.L., 1977. The structure of syncytia induced by the phytoparasitic nematode *Nacobbus aberrans* in tomato roots, and the possible role of plasmodesmata in their nutrition. *Journal of Cell Sciences*, 23: 299-313.
- Kallel S., Louhichi, A., B'Chir M.M. et Van Oostveldt P., 2005. Structure du site trophique induit par *Tylenchulus semipenetrans* sur Bigaradier observé en microscopie photonique, confocale et électronique à transmission. *Nematologia Mediterranea*, 33: 171-178.
- Mateille T., 1994. Biologie de la relation plante nématodes. Perturbations physiologiques et mécanismes de défense des plantes. *Nematologica*, 40: 276-311.
- Russo G., Greco N., D'Errico F.P. et Brandonisio A., 2007. Impact of the root knot nematode *Meloidogyne incognita* on potato during two different growing seasons. *Nematologia Mediterranea*, 35: 29-34.
- Vovlas N., Mifsud D., Landa B.B. et Castillo P., 2005. Pathogenicity of the root knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant pathology*, 54: 657-664.
- Williamson V.M. et Hussey R.S., 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, 8: 1735-1745.
- Wyss U., Grundler F.M.W. et Munch A.M., 1992. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, 38: 98-111.
- Zeman S.C., Tiessen A., Pilling E., Kato K.L., Donald A.M. et Smith A.M., 2002. Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant Physiology*, 129: 516-529.