

# Caractéristiques biochimiques de quelques populations de *Meloidogyne hapla* et *Meloidogyne* spp.

Jean-Baptiste BERGÉ et Antoine DALMASSO \*  
I.N.R.A., Station de Recherches sur les nématodes,  
B.P. 78, Antibes (France)

## RÉSUMÉ

Les analyses biochimiques de diverses populations de *Meloidogyne hapla* et de quelques-unes de *M. incognita*, *M. aranaria*, *M. javanica*, laissent apparaître une hétérogénéité tant au niveau intraspécifique qu'interspécifique lorsqu'on étudie les protéines solubles ou certaines isoenzymes (estérases, phosphatases acides). Par ailleurs, on relève certains indices de variation dans les isoenzymes selon la plante-hôte utilisée.

La caractérisation biochimique des races est délicate compte tenu de l'influence des facteurs écologiques et génétiques.

Une technique permettant une mesure semi quantitative de l'activité enzymatique globale de 19 enzymes hydrolysantes (système Apizym) a été testée sur ces populations. L'écart maximum entre *M. hapla* et le groupe mitotique paraît se situer pour ce test au niveau de la N acétyl  $\beta$  D glucosaminidase.

## ABSTRACT

Biochemical analysis of soluble proteins and some isozymes (esterases and acid phosphatases), on various populations of *Meloidogyne hapla* and of someones of *M. incognita*, *M. aranaria* and *M. javanica*, show a large intraspecific and interspecific heterogeneity. Plant host affects the isozymes pattern as well.

The biochemical characterisation of the races is not easy for the mixed influences of ecological and genetic factors.

The total enzymatic activity of 19 hydrolytic enzymes has been studied using the Apizym system. Differences between *M. hapla* and the mitotic group have mainly been found for the N acetyl  $\beta$  D glucosaminidase.

Les études d'ordre biochimique réalisées sur les nématodes et plus particulièrement sur les *Meloidogyne*, sont encore, soit globales, soit fragmentaires. Elles ont eu le plus souvent des motivations taxino-

miques, leurs auteurs cherchant à distinguer par ce biais certaines espèces ou races qui posent des problèmes d'identification.

Dans cette optique, l'effort principal a porté sur les spectres protéiniques et enzymatiques révélés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

ISHIBASHI (1970) observe que, dans le cas de *M. aranaria* et *M. incognita*, ces spectres varient au cours du développement du nématode et sont en même temps influencés par le végétal hôte. Ceci est valable, aussi bien pour les protéines totales, que pour plusieurs enzymes (estérases, phosphatases acides, lactate déshydrogénases).

Mais DICKSON *et al.* (1970 et 1971) ne relèvent pas d'écarts importants liés aux conditions de multiplication chez ces mêmes espèces et pour ces mêmes isoenzymes, alors qu'ils en constatent pour les peroxydases et l' $\alpha$  glycérophosphate déshydrogénases.

Ces quelques données suggèrent qu'il existe, pour chaque espèce de *Meloidogyne*, un fond de protéines et d'activités enzymatiques de base, mais que celui-ci s'exprime quelque peu différemment selon les conditions dans lesquelles est conduite l'expérience. Il y a, en outre, des inductions non négligeables qui s'estomperaient dans certaines conditions.

DICKSON *et al.* (1971) considèrent toutefois que différentes souches sélectionnées d'une même espèce présentent néanmoins des similitudes enzymologiques utilisables pour leur identification et dans l'étude phylogénique des groupes. Ils signalent aussi qu'il existe des différences entre les estérases de deux souches de *M. hapla*, par ailleurs identiques, quant aux autres enzymes révélées.

On peut donc se demander comment l'extrême diversité intraspécifique révélée surtout chez *M. hapla* par les gammes d'hôtes, les caryotypes, les processus de reproduction et même la morphologie (DALMASSO & BERGÉ, 1975), s'exprime au niveau des protéines totales ou du spectre enzymatique ; les travaux rap-

\* Collaboration technique de J.-M. BRIDE, M. BONGIOVANNI et M. C. MUNCK-CARDIN.

portés, ci-après, ont eu pour but d'apporter une contribution à la connaissance des variations de la composition protéinique et de la variabilité de quelques isoenzymes chez quelques *Meloidogyne* et chez différentes populations de ces espèces, en étudiant plus particulièrement *M. hapla*.

## I. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les populations étudiées ont été choisies d'après des critères biologiques (comportement d'agressivité) ou cytologiques (nombre de chromosomes) révélant déjà une variabilité au sein de *M. hapla*. Chacune est issue d'une larve quand la reproduction est méiotique et d'une masse d'œufs quand elle se multiplie par mitose. Nous avons ainsi testé douze populations de *M. hapla*, quatre de *M. arenaria*, deux de *M. javanica* et une de *M. incognita*, toujours obtenues sur des tomates (variété Marmande) cultivées dans des tubes à essai de 25 mm de diamètre et de 25 cm de hauteur, remplis de sol stérile dans des conditions aussi constantes que possible.

Les femelles sont extraites par dissection manuelle des racines ; puis rincées et broyées dans du tampon à pH 8 (TRUDGILL & CARPENTIER, 1970). Quand on travaille sur un nombre élevé de femelles (500), le broyage se fait dans des tubes de Potter et les protéines

sont récupérées après centrifugation à 10 000 t/mn pendant 10 mn dans des tubes Sorval de 15 cc. Quand le nombre de femelles est faible, le broyage est effectué dans une salière au milieu de laquelle on a creusé une petite cavité (PASSERA, *comm. pers.*), ce qui permet de travailler sous la loupe binoculaire avec 0,01 cc de tampon. Dans ce dernier cas le broyat, récupéré par capillarité au moyen d'une pipette Pasteur, est transféré dans un tube à microhématocrite pour être centrifugé à 9 000 t/mn pendant 10 mn ; après avoir écarté le surnageant blanchâtre, on récupère toujours par capillarité la solution protéinique avec laquelle on effectue l'électrophorèse.

L'électrophorèse a lieu dans des gels de polyacrylamide selon la technique d'ORNSTEIN (1964). La différence du potentiel est de 40 V pendant une demi-heure et ensuite de 120 V jusqu'à ce que le marqueur (bleu de bromophénol) ait migré de 7 cm pour les tubes de 6 mm et de 3 mm, ou de 2 à 3 cm pour les gels de 2 mm de diamètre, utilisés dans les cas de faibles quantités de protéines enzymatiques.

La coloration des protéines est faite à l'amidoschwartz, à 7‰, dans l'acide acétique à 7%, la décoloration des gels s'effectue dans l'acide acétique à 7%.

Les gels de 6 mm nécessitent au minimum 200 femelles par gel, soit en moyenne 600 µg de protéines totales (dosage selon la technique de LOWRY *et al.*, 1951), si l'on veut obtenir de bonnes électrophoréogrammes protéiniques ; en utilisant des gels de 3 mm

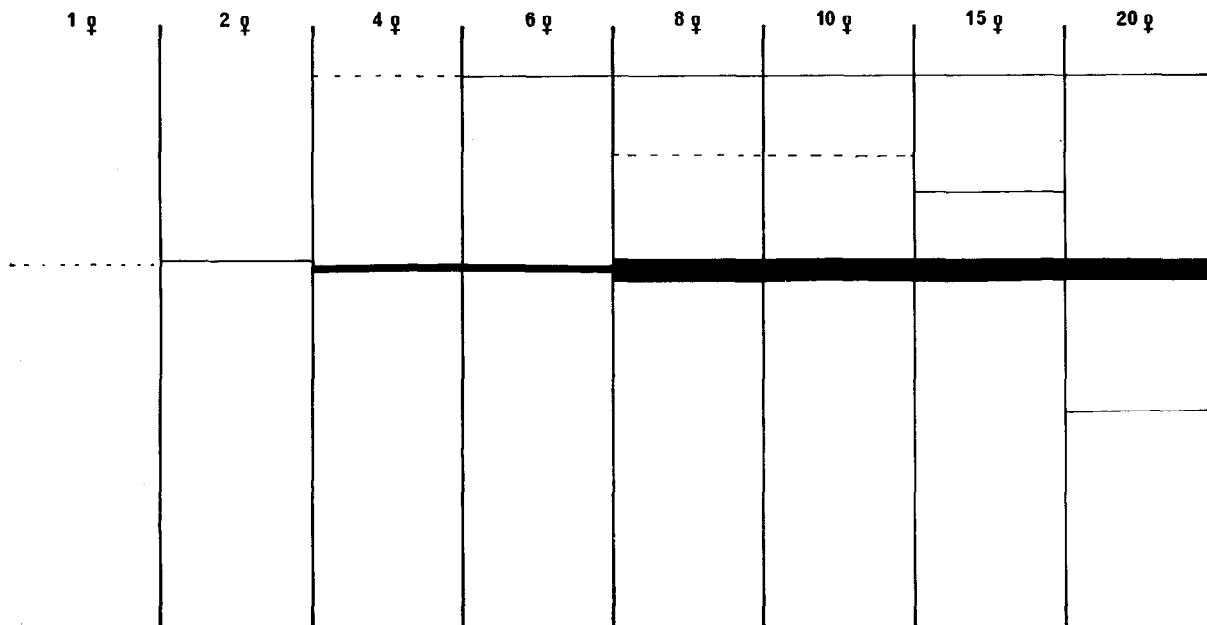


Fig. 1. — *M. hapla* (provenance Angers) Estérases, quantité minimale nécessaire de ♀. Révélation des isoestérases en fonction du nombre d'individus par gel de 2 mm de diamètre. L'épaisseur du trait rend compte de l'activité enzymatique. Les lots de 20 femelles ont été récupérés à partir de tomate d'un tube différent de celui sur lequel ont été récupérées les autres femelles, ce qui explique les variations

on peut avoir les mêmes résultats avec 80 femelles, soit 240 µg de protéines. L'enregistrement des gels se fait au chromoscan à 650 nm.

L'activité enzymatique est étudiée suivant la méthode de PLANTEVIN et NARDON (1972), MONGET (1975) par le système Apizym qui permet de révéler semi quantitativement 19 enzymes hydrolysantes et qui est normalement utilisé à des fins analytiques médicales. Pour cela 50 femelles sont broyées dans 2 cc d'eau distillée et le broyat est réparti dans les 20 cupules de la plaque. Le tout est mis à incuber pendant 20 h à 37 °C. Le naphthol libéré est ensuite coloré par couplage avec le Fast Blue BB. On élimine le fond de couleur dû au Fast Blue en excès, en exposant la plaque sous une lampe de 1 000 W à lumière blanche. On note ensuite l'activité enzymatique totale d'après l'intensité de coloration apparue dans les cupules.

Les isoenzymes sont révélées après électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 2 mm de diamètre. On observe déjà avec une seule femelle une légère activité

enzymatique (fig. 1). Avec 8 femelles par gel on obtient une révélation de plusieurs isoestérases, mais par mesure de sécurité on a cependant préféré travailler sur 20 individus qui représentent à peu près 10 µg de poids frais et 80 µg d'équivalent protéinique de sérum albumine bovine fraction V de Sigma.

Les estérases sont révélées par la technique de MEYER et RENORD (1969), les phosphatases acides par celle de ISHIBASHI (1970), les phosphatases alcalines par celle de LAWRENCE *et al.* (1960), les catalases par celle de WOODBURY *et al.* (1971), les peroxydases enfin, par celle de STAPLES et STAHMANN (1964). Dans ce dernier cas on utilise du pyrogallol à 3‰ et de l'eau oxygénée à 3‰.

## II. RÉSULTATS

### OBSERVATIONS RELATIVES AUX PROTÉINES TOTALES CHEZ *M. hapla*

TABLEAU I  
COMPARAISON DES PROTÉINES TOTALES POUR 9 POPULATIONS DE *M. HAPLA*

	Populations								
	Milly	Manziat	Aubenas	Saulcy	Angers	Saint-Laurent	La Môle	Saint-Emilion	Juan-les-Pins
Nombre de bandes protéiniques	19-23	19-22	18-24	19-25	17	23	24	23-24	16

Dans les conditions de l'expérience, on parvient difficilement à un nombre défini de bandes pour une population déterminée.

Le protéinogramme type révèle environ 22 protéines dont 17 communes à l'ensemble des populations se reconnaissent pas une certaine intensité ou leur bonne fréquence. On peut considérer qu'elles donnent un spectre caractéristique de l'espèce (tabl. I). Mais on remarque des variations non négligeables selon les origines (pour Milly et Saint-Emilion en particulier). Ainsi, pour les populations d'Aubenas : trois bandes précèdent la première « principale », alors que celle de Juan-les-Pins n'est précédée que par une seule. Il existe d'autres variations dans les protéinogrammes en fonction des populations, ainsi des bandes habituellement présentes manquent ou sont atténuées.

Dans certains protéinogrammes la bande principale se dédouble (Milly). Nous avons voulu vérifier, par immunoelectrophorèse effectuée sur *M. hapla* (Saulcy), si cette bande principale qui, dans ce cas, apparaît toujours simple après coloration des gels à l'amidoschwartz, en recouvre en réalité plusieurs. Le sérum est obtenu à partir de lapins auxquels on a fait des injections répétées de 2 000 femelles de *M. hapla* Saulcy. Les extraits protéiques de cette même population sont mis sur gel de polyacrylamide en tube.

Après l'électrophorèse habituelle les gels sont mis à tremper 20 h dans le sérum. On voit alors apparaître trois zones de précipitations antigène-anticorps. La première (Rf 0,03) est faible, les deux autres sont très proches (Rf 0,11) et se trouvent au niveau de la « principale » qui est donc formée, dans ce cas, par au moins deux protéines que la technique courante ne permettrait pas de différencier.

En considérant qu'ici chaque population est issue d'une même femelle et en supposant que le processus parthénogénétique impliqué a conservé le génotype intact entre le moment de la sélection et celui de l'analyse, on peut dire que ces différences ont eu même temps une valeur individuelle. On devrait pouvoir les retrouver juxtaposées ou imbriquées dans n'importe quelle localité.

### OBSERVATIONS RELATIVES A L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE GLOBALE

L'étude de l'activité enzymatique globale est faite sur les 19 enzymes hydrolysantes (tabl. II). Elles « travaillent », soit à pH basique 7,5 (estérases, lipases, leucine, valine et cysteine aminopeptidases et chymotrypsine), soit à pH basique 8,5 (trypsin et phosphatase).

tase alcaline), soit à pH acide 5,4 (phosphatase acide, phosphoamidase,  $\alpha$  et  $\beta$  galactosidases,  $\beta$  glucuronidase,  $\alpha$  et  $\beta$  glucosidases, N acétyl  $\beta$  D glucosaminidase,  $\alpha$  D mannosidase et  $\alpha$  L fucosidase). L'intérêt d'une telle révélation enzymatique est de permettre le choix des enzymes les plus actives pour les déterminer ensuite par électrophorèse. C'est ainsi que nous avons sélectionné les phosphatases acides et alcalines et les estérases. La N acétyl  $\beta$  D glucosaminidase a une très faible activité pour les populations des espèces mitotiques et une activité beaucoup plus grande pour le groupe *M. hapla*. Du point de vue estérasique on remarque que les *Meloidogyne* examinés sont aptes à hydrolyser les esters d'acides organiques à courte chaîne, l'hydrolyse à pH 7,5 des acides en C 14 est beaucoup plus difficile.

L'activité protéolytique et aminopeptidasique des *Meloidogyne* est assez faible en ce qui concerne la

leucine aminopeptidase, elle est quasiment inexistante pour les autres enzymes étudiés et en particulier pour celles à activités trypsique et chymotrypsique.

L'activité phosphatasique acide est beaucoup plus importante que l'alcaline, ce qui pourrait impliquer un appareil lysosomal important chez ce genre de nématode. La phosphoamidase est également particulièrement bien révélée.

Les glycosidases sont aussi très importantes chez les *Meloidogyne*, on remarque que pour les galactosidases et glucosidases celles qui hydrolysent les formes  $\alpha$  sont moins actives que celles libérant les formes  $\beta$  et que dans la majorité des cas les galactosidases sont plus actives que les glucosidases.

Enfin, l' $\alpha$  fucosidase a une activité qui est assez forte contrairement à l' $\alpha$  mannosidase et aux  $\alpha$  glycosidases testées ici.

TABLEAU II  
RÉVÉLATION SEMIQUANTITATIVE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE GLOBALE  
DE 19 ENZYMES HYDROLYSANTES CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES ET SOUCHES DE *MELOIDOGYNE*  
(— : très faible activité)

Cupules	Enzymes	Genre <i>Meloidogyne</i>									
		Espèces									
		<i>hapla</i>								<i>arenaria</i>	<i>javanica</i>
		Provenance									
	Milly	Saint-Emilion	La Môle	Juan-les-Pins	Lyon (B)	Aubenas	Manziat	Saulcy	Grau-du-Roi	Cagnes-sur-Mer	
1	Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	Phosphatase alc.	1	1	1	1	—	3	2	2	2	
3	Estérase non spécifique (chaîne en C 4)	3	3	3	3	3	3	4	2	3	
4	Estérase non spécifique (chaîne en C 8)	3	5	4	4	3	2	4	2	4	
5	Lipase (chaîne en C 14)	—	3	1	1	—	—	2	3	3	
6	Leucine aminopeptidase	—	2	1	2	—	1	1	1	1	
7	Valine aminopeptidase	0	—	0	—	0	0	0	1	0	
8	Cystéine aminopeptidase	0	0	0	—	0	0	0	0	0	
9	Trypsine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	Chimotrypsine	—	—	—	—	—	1	1	0	—	
11	Phosphatase ac.	4	5	5	4	5	4	5	1	4	
12	Phosphoamidase	4	5	4	4	5	3	5	4	4	
13	$\alpha$ Galactosidase	—	2	2	1	2	2	2	3	3	
14	$\beta$ Galactosidase	2	4	3	3	4	3	2	2	4	
15	$\beta$ Glucuronidase	0	2	—	1	—	0	2	4	0	
16	$\alpha$ Glucosidase	0	0	0	1	0	0	—	1	—	
17	$\beta$ Glucosidase	—	2	—	1	—	1	2	2	1	
18	N Acetylglucosaminidase	2	4	2	4	4	3	5	4	1	
19	$\alpha$ Mannosidase	0	0	0	—	0	0	—	—	—	
20	$\alpha$ Fucosidase	1	3	2	3	3	2	3	3	3	

L'équipement enzymatique des nématodes peut donc être facilement étudié par cette méthode qui présente cependant un inconvénient majeur du fait que les substrats sont artificiels et ne permettent pas

d'indiquer de façon précise dans quelle chaîne métabolique interviennent tous ces enzymes.

Si on compare l'activité enzymatique globale des différentes souches ou espèces, on s'aperçoit qu'il est

très difficile de fractionner ainsi l'ensemble en plusieurs sous-ensembles du fait de la variation continue au sein d'une même espèce, aussi bien qu'entre les espèces. Ceci peut avoir plusieurs origines. En premier lieu, on peut penser que comme pour les gammes d'hôtes (DALMASSO et BERGE, 1975) il y a une mosaïque de souches biochimiques à l'intérieur d'une population. On peut également penser que l'unité arbitraire choisie est trop limitée, car des lots de 50 individus peuvent en définitive montrer une activité enzymatique hétérogène suivant l'état physiologique dans lequel se trouvent un petit pourcentage d'entre eux (microbiotopes différents). Il est possible que ces deux hypothèses jouent aussi simultanément.

Une seule enzyme permet une différenciation discontinue, c'est la N acetyl glucosaminidase précédemment mentionnée.

OBSERVATIONS RELATIVES AUX ISOENZYMES

Les isoestérases (fig. 2)

Comme l'ont fait DICKSON *et al.* (1971), on peut montrer, grâce aux isoestérases, des différences aussi bien entre espèces qu'entre populations d'une même espèce. Les variations interspécifiques sont nombreuses, ainsi *M. incognita* type *acrita* a une isoestérase principale qui migre moyennement par rapport au marqueur et une autre qui se déplace très peu et qui correspond à une molécule plus grosse. Cette dernière

se retrouve dans toutes les espèces du groupe à reproduction mitotique et dans un *M. hapla* à reproduction méiotique (Cogolin : isolat à 17 chromosomes). *M. arenaria* possède en supplément de cette isoestérase deux autres estérases qui se déplacent à vitesse moyenne, tandis que *M. javanica* en possède trois. Ces bandes semblent être caractéristiques de ces espèces, tout au moins pour *M. arenaria* et *M. javanica* chez lesquelles nous avons pu étudier plusieurs populations, contrairement à *M. incognita* où nous n'avons pu obtenir qu'une population suffisamment « typique ». Si chez *M. javanica* l'intensité des trois bandes principales est à peu près identique à celle de *M. incognita*, chez *M. arenaria* les deux iso-enzymes ont une activité un peu plus faible. En supplément il y a chez ces espèces d'autres bandes d'estérases moins importantes dont une se retrouve dans l'ensemble des populations testées et une autre est commune à certaines populations de *M. arenaria* et *M. incognita*. La population à 56 chromosomes de Monteux à empreinte périnéale mal définie (type *incognita-arenaria*), se rattache sous cet aspect comme sous celui de la caryologie à *M. arenaria* (DALMASSO et BERGÉ, 1975).

Pour *M. hapla*, il semble, à première vue, que l'hétérogénéité intraspécifique soit plus grande, mais le nombre de populations testées est plus élevé que pour les autres espèces. Il est aussi possible que la méiose et les possibilités d'amphimixie entretiennent une hétérogénéité au moins phénotypique.

Pour les principales isoestérases de *M. hapla*, on peut noter que huit populations sur douze ont une

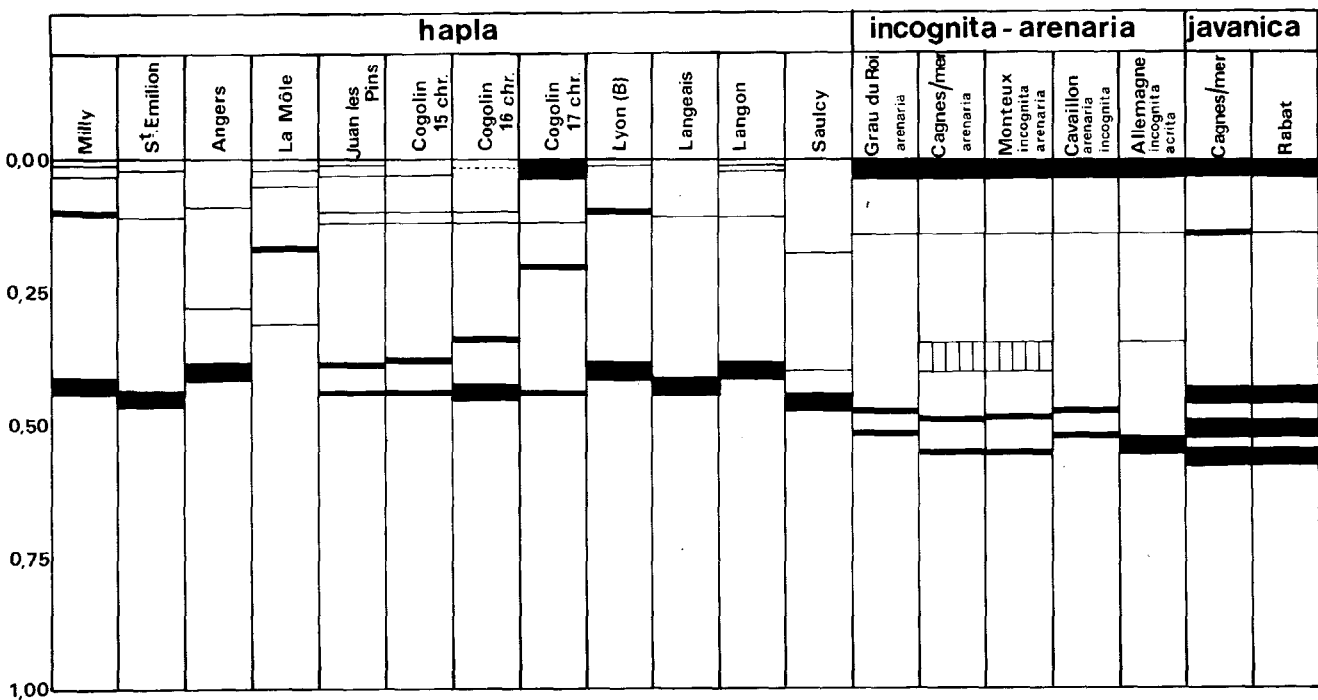


Fig. 2. — Position et intensité des bandes d'isoestérases pour diverses populations et espèces de *Meloidogyne*

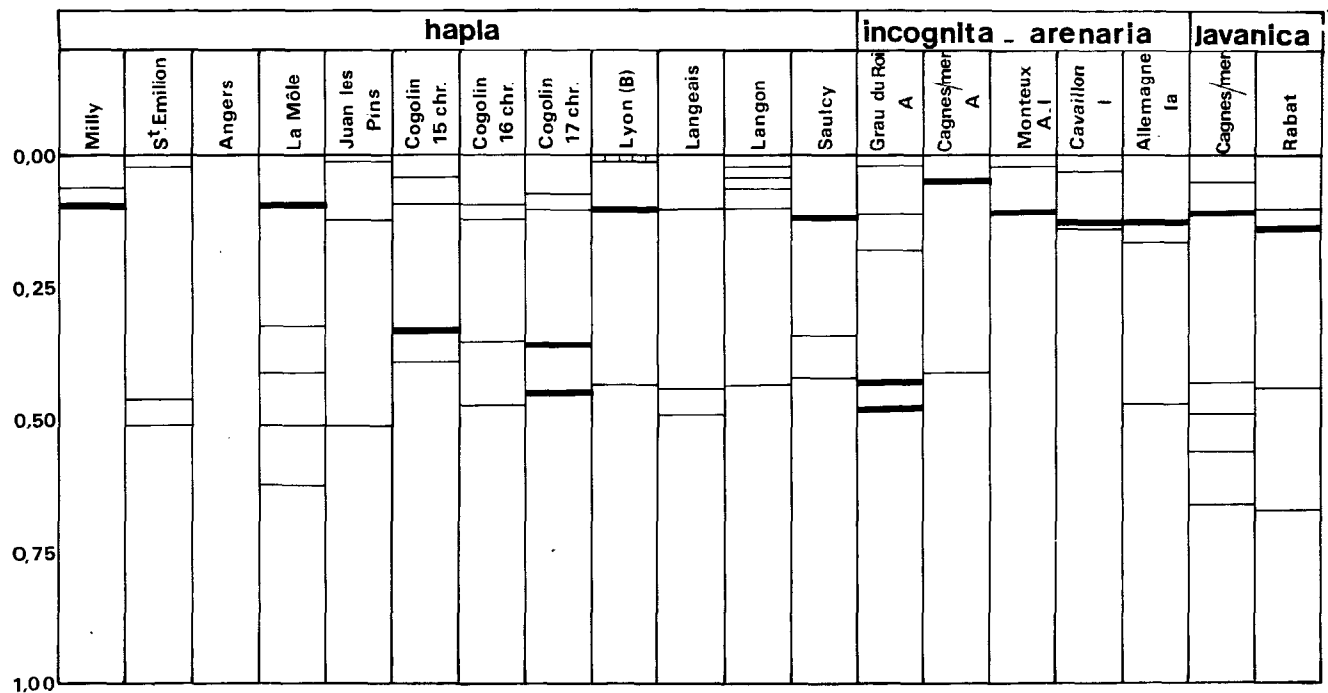


Fig. 3. — Position et intensité des bandes d'isophosphatases pour diverses populations et espèces de *Meloidogyne*

bande très active qui migre avec un Rf de 0,5 environ et, parmi celles-ci, trois ont une bande moins colorée qui migre entre 0,25 et 0,40. Juan-les-Pins, Cogolin (15 et 17 chromosomes) ont une estérase à activité moyenne aux environs de 0,5, qui est double pour Juan-les-Pins et Cogolin 15 chromosomes et simple pour Cogolin 17 chromosomes.

La population de la Môle est la plus originale en ce sens qu'elle ne possède pas de bandes à forte ou moyenne activité aux environs de 0,5.

Pour toutes ces souches il existe en plus un certain nombre de petites bandes ayant des Rf variant de 0 à 0,5 et qui montrent les possibilités de variation chez cette espèce.

L'exemple le plus remarquable d'hétérogénéité est donné par la population de Cogolin, d'où trois lignées caryotypiques ont été tirées. Chacune a montré des caractères propres, tant dans le nombre que dans la position des bandes.

Les plus grosses variations sont enregistrées pour les populations méditerranéennes (La Môle, Juan-les-Pins, Cogolin). Cela n'est peut être qu'une coïncidence, à moins qu'il ne s'agisse d'un effet de bordure d'aire.

#### Les phosphatases

Deux types de phosphatases peuvent être révélés sur les gels, celles qui hydrolysent le naphtyl-phos-

phate en milieu acide et celles qui le font en milieu alcalin.

Comme nous l'avons déjà noté, les phosphatases alcalines ont une activité globale très faible, qui se révèle très mal sur les gels, c'est pourquoi nous n'avons étudié, de ce point de vue, que quatre populations de *M. hapla* très différentes, soit par leur nombre de chromosomes, soit par leurs estérases (Milly, Saint-Emilion, La Môle, Sautcy). Elles possèdent toutes une bande faible dont le déplacement varie de 0,9 à 0,11 et qui est le même pour les quatre souches.

Les phosphatases acides d'après DICKSON (1971) ne présentent, pour les différentes espèces, qu'une seule bande qui se trouve au même niveau que les phosphatases alcalines. En fait, pour des gels de 2 mm de diamètre, il est facile de changer rapidement le pH du gel par trempage dans une solution tamponnée à pH acide, en évitant ainsi toute diffusion de protéines. Nous avons, pour notre part, révélé par ce moyen plusieurs phosphatases acides (fig. 3). Il est vrai que pour la majorité des populations et pour toutes les espèces, on trouve une activité phosphatasique acide aux environs de 0,9, qui n'est pas sans rappeler la phosphatase alcaline révélée comme on l'a vu précédemment chez *M. hapla*. Mis à part cette bande quasiment identique, il est très difficile de trouver d'autres caractères communs inter ou intraspécifiques pour cette enzyme. Dans ce cas l'hétérogénéité apparaît aussi bien dans le groupe à reproduction méiotique que dans celui à reproduction mitotique.

*Les catalases*

Sur les gels de polyacrylamide ces enzymes se révèlent par une bande jaune sur fond bleu. Il n'y en a qu'une qui a une vitesse de migration identique ( $R_f = 0,18$ ) pour *M. hapla* (isolats Aubenas et Juanles-Pins), pour *M. arenaria* (isolat Grau-du-Roi) et *M. javanica* (isolat Cagnes-sur-Mer).

*Les peroxydases*

L'utilisation du pyrogallol comme accepteur d'oxygène à partir de ces enzymes n'est peut-être pas un choix judicieux. En effet, quelque temps après la révélation, on observe que presque toutes les protéines ont la possibilité d'oxyder le pyrogallol et donnent des dépôts brunâtres sur les gels.

Au moment de la révélation la distribution des peroxydases est donnée par le tableau III. Les isolats testés appartiennent tous à *M. hapla*.

TABLEAU III

Milly-la-Forêt	Saint-Emilion	Saulcy	Manziat	Aubenas
0 à 0,08 +++	0,05 ++		0,05 ++	0,07 ++
		0 à 0,23		
0,15 à 0,20 +++	0,13 à 0,20 +++		0,14 à 0,21 +++	0,14 +++
0,31 +++	0,32 ++		0,32 ++	0,32
0,42 ++	0,32 ++	0,41 ++	0,40 ++	0,42
0,53 ++	0,52 ++	0,54 ++	0,52 ++	0,51

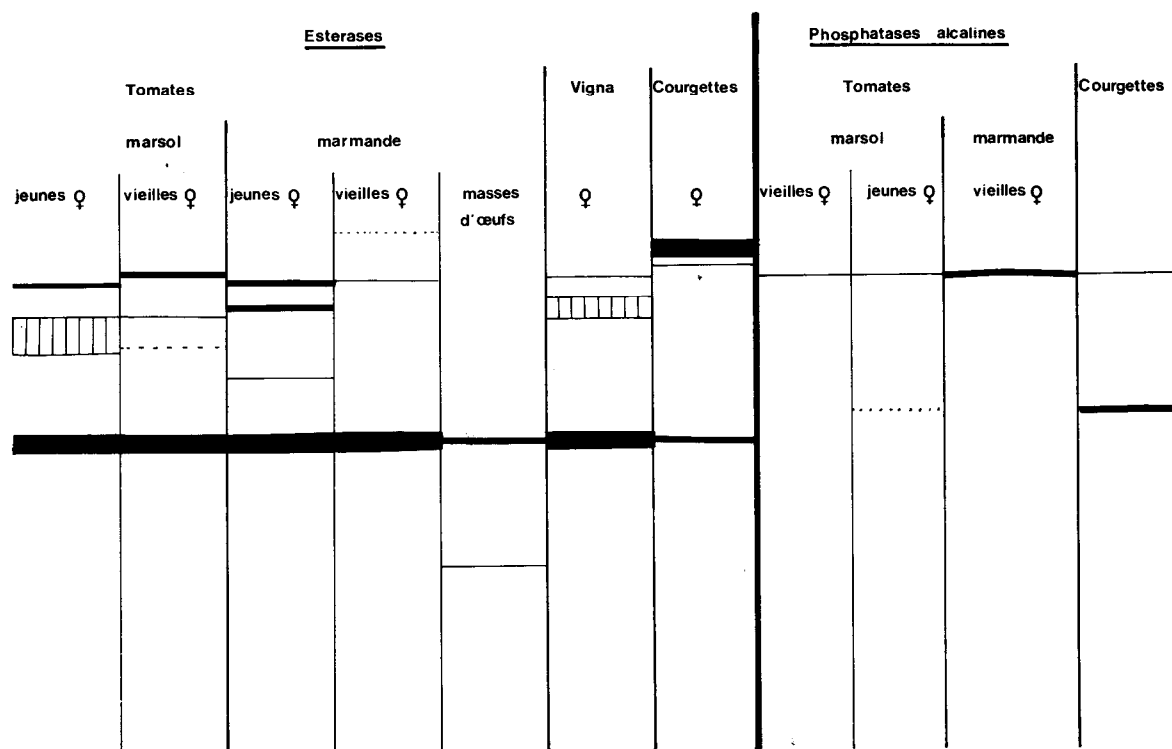


Fig. 4. — *M. hapla* (origine Aubenas). Variations des isoestérases et isophosphatases en fonction du stade de développement, de l'âge des femelles et de l'hôte

## INFLUENCE DU PLANT DE TOMATE SUR LES ISOESTÉRASES

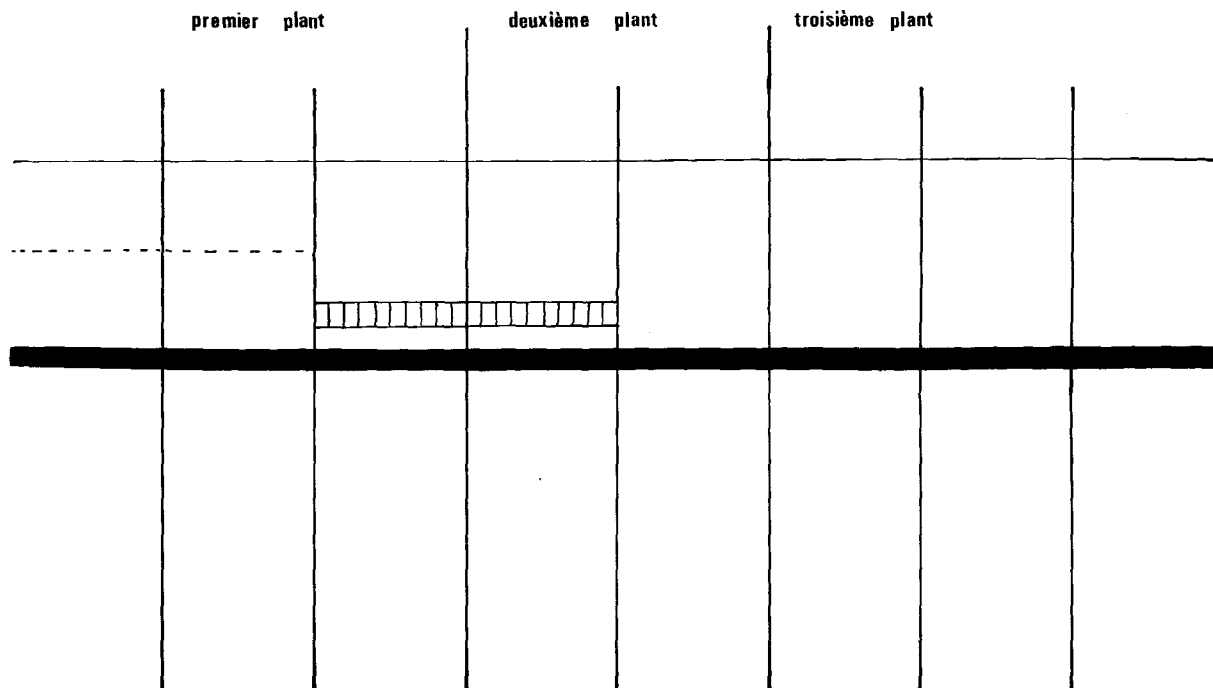


Fig. 5. — *M. hapla* (Angers). Influence du plant de tomate sur les isoestérases. Variations des estérases pour des broyats globaux de 20 femelles prélevées au hasard dans trois plants différents. Origine de la population Angers sauvage — 8 répétitions

Il y aurait donc au moins 3 isopéroxydases chez *M. hapla*. Elles sont assez voisines pour toutes ces souches. La population de Saulcy possède une bande ayant un Rf allant de 0 à 0,23 qui pourrait en réalité représenter un assemblage des deux bandes séparées dans les autres isolats. De même nous n'avons pas trouvé pour cette souche de bande à 0,32.

### Influence de l'âge de la femelle et de l'hôte

L'âge de la femelle et l'hôte affectent les spectres isoenzymatiques de façon évidente (ISHIBASHI, 1970). Cela s'est confirmé ici et explique les difficultés d'interprétations de l'ensemble des données biochimiques réunies pour l'instant.

La lignée d'Aubenas a fait l'objet de recherches dans cette voie : 50 jours après l'infestation l'écart est à peine notable entre les jeunes femelles élevées en chambre climatisée à 20° sur tomate Marmande, sur Marsol (variété voisine, mais avec gène Mi) ou sur *Vigna sinensis*, mais il est important quand elles ont été élevées sur courgette, var. ronde de Nice (fig. 4). Cet écart qui se retrouve pour les phosphatases alcalines est sans doute lié à la qualité de l'hôte.

Il convient donc, pour les études de ce type, de

connaître avec une extrême précision les conditions de milieu et le matériel utilisé, génétiquement variable. Dans certains cas il faudrait avoir recours à une multiplication monoxénique à densité de population limitée.

La figure 5 fait ressortir une nouvelle fois l'hétérogénéité liée à l'hôte des populations naturelles puisqu'il y a déjà des variations sur les analyses globales de 20 femelles prélevées au hasard dans une population sauvage (origine Angers) multipliée au laboratoire sur Marmande. Ces variations apparaissent d'ailleurs chez un même plant.

Des tests effectués sur une seule femelle devraient permettre de montrer cette fois directement l'hétérogénéité naturelle. On devrait alors aussi prendre en considération la dimension des galls dont elles proviennent, le nombre de femelles qu'elles contiennent même quand il s'agit de la première génération produite et la position de la galle sur le système racinaire.

## II. DISCUSSION

La recherche de différences dans les protéines de constitution conduit souvent à mettre en évidence des



variations minimales dans un protéinogramme qui, dans son ensemble, montre une grande homogénéité pour une même espèce. En fait, les différences que l'on peut observer peuvent être de plusieurs ordres. Si on travaille toujours sur un même extrait, les protéinogrammes sont constants pour une même souche. Par contre, si on effectue des extraits différents dans le temps, les protéinogrammes changent pour les bandes qui ne sont pas caractéristiques de l'espèce. Il est donc illusoire de vouloir comparer des souches à des références provenant de plusieurs extraits. Ceci, ajouté au fait que le nombre de protéines révélées est assez élevé, rend très difficile la comparaison de souches de *Meloidogyne* et à plus forte raison leur identification au moyen de l'analyse des protéines non spécifiques.

Au niveau enzymatique les études sont guidées par l'utilisation d'une méthode standard permettant de connaître, par un micro-système global de révélation, les substances intéressantes. Ce système seul ne permet pas d'obtenir des informations utiles quant au fonctionnement métabolique des molécules mises en évidence pour plusieurs raisons dont la plus importante est le choix d'un substrat artificiel différent des métabolites et nutriments offerts habituellement aux nématodes.

Les isoenzymes peuvent être classées en deux catégories, celles qui varient suivant les souches et la biologie des nématodes (estérases, phosphatases acides) et celles qui sont constantes (phosphatases alcalines, peroxydases, catalases). Dans le premier cas les variations peuvent avoir plusieurs origines, soit des différences de génome entre espèces ou pour une même espèce entre isolats, soit des variations induites par les biotopes. En général, ces dernières se répercutent sur des bandes peu ou moyennement actives, mais épargnent certaines isoenzymes que l'on peut donc considérer comme caractéristiques de la souche.

On constate que l'activité enzymatique liée au génome n'est habituellement pas affectée par les variations du caryotype. Il existe en effet autant de différences et quelquefois davantage entre plusieurs populations à 17 chromosomes qu'entre celles-ci et d'autres populations à 45, 14, 15 ou 16 chromosomes.

Ce travail préliminaire souligne les difficultés rencontrées dès que l'on essaie de caractériser le matériel par voie biochimique, mais il laisse apparaître une variabilité inter et intraspécifique intéressante qui nécessite de miniaturiser la technique afin d'étudier le stock enzymatique individuel pour reconnaître dans ces variations, ce qui est dû à l'individu et ce qui est propre à la population.

Manuscrit reçu au S.C.D. de l'ORSTOM le 31 juillet 1975.

## BIBLIOGRAPHIE

- DALMASSO (A.), BERGE (J. B.) - 1975 - Variabilité génétique chez les *Meloidogyne* et plus particulièrement chez *M. hapla*. *Cah. ORSTOM, sér. Biol.* vol. X, n° 3 : 233-238.
- DICKSON (D. W.) - 1969 - The application of disc electrophoresis on studying the taxonomy of species of *Meloidogyne* and other nematode genera. *These Ph. D. Fac. Caroline Nord Raleigh*, 100 p. *multigr.*
- ISHIBASHI (N.) - 1970 - Variations of the electrophoretic protein patterns of Heteroderidae (Nematodea : Tylenchida) depending on the developmental stages of the nematodes and on the growing conditions of the host plants. *Appl. Ent. Zool.* 5, 23-32.
- LAUWRENCE (S. H.) *et al.* - 1960 - A species comparison of serum proteins and enzymes by starch gel electrophoresis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 105, 572-575.
- LOWRY (P. H.) *et al.* - 1951 - Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MEYER (J. A.), RENORD (J. L.) - 1969 - Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 59, 1409-1411.
- MONGET (D.) - 1975 - Comparaison des profils enzymatiques de deux lignées cellulaires d'insectes : *Antheraea eucalypti* et *Malacosoma disstria* (Lepidoptera). *C.R. Acad. Sc., Série D*, 280 (sous presse).
- ORNSTEIN (L.) - 1964 - Disc electrophoresis I Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321-349.
- PLANTEVIN (G.), NARDON (P.) - 1972 - Utilisation d'une microméthode de détection (Auxotab) pour la recherche qualitative d'activités enzymatiques dans les tissus d'insectes. *Ann. Zool. Ecol. anim.* 4, 229-248.
- STAPLES (R. C.), STAHMANN (M. A.) - 1964 - Change in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology* 54, 760-764.
- TRUDGILL (D. L.), CARPENTER (J. M.) - 1971 - Disc electrophoresis of proteins of *Heterodera* species and pathotypes of *H. rostochiensis*. *Ann. appl. Biol.* 69, 35-41.
- WOODBURY (W.) *et al.* - 1971 - An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44, 301-305.