

Méthode d'obtention et étude immunologique des protéines solubles de juvéniles d'une population naturelle de *Meloidogyne*

Jean-Claude BARON

Laboratoire de Nématologie, ORSTOM,
B.P. 1386, Dakar (Sénégal)

RÉSUMÉ

L'extrait protéique de *Meloidogyne* est obtenu à partir de juvéniles de deuxième stade récoltés dans un extracteur à brouillard. La désintégration est effectuée à la presse dans une cellule de French et l'extrait brut est concentré jusqu'à environ 3 mg/ml par dialyse sous vide dans des sacs de collodion.

L'extrait issu de juvéniles d'une population naturelle de *Meloidogyne* infestant des racines de Kénaf est étudié par immunodiffusion double en gélose à l'aide d'un immunosérum spécifique et d'un immunosérum obtenu contre des racines de tomates infestées. Des comparaisons sont effectuées avec des extraits d'autres nématodes et de racines de tomate.

Une forte communauté antigénique existe entre les trois espèces importantes de l'Afrique de l'Ouest *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* et *M. incognita*. Il n'a pas été mis en évidence d'antigène commun aux juvéniles de *Meloidogyne* et aux racines de tomate.

ABSTRACT

A protein extract of *Meloidogyne* is obtained from second stage juveniles collected in a mist chamber. Desintegration of the juveniles is carried out in a French cell and the crude extract is concentrated by vacuum dialysis in collodion bag.

The protein extract from juveniles of a natural population of *Meloidogyne* infesting roots of Kenaf has been studied by double immunodiffusion in agar with a specific antiserum as well as one obtained against tomato roots infested by *Meloidogyne*. Comparison has been made with protein extracts from other nematodes and tomato roots.

A strong antigenic relationship exist between three important root-knot nematodes from West Africa: *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* and *M. incognita*. No

evidence has been obtained of the existence of an antigenic relationship between *Meloidogyne* juveniles and tomato roots.

INTRODUCTION

La taxinomie du genre *Meloidogyne*, assez compliquée, est essentiellement fondée sur des caractères morphologiques et anatomiques comme l'aspect des plaques périnéales (CHITWOOD, 1949), des caractères caryologiques comme le nombre de chromosomes (TRANTAPHYLLOU, 1962, 1966) et des particularités biologiques (éventail des plantes-hôtes, notamment).

Une compilation des diverses méthodes utilisées dans l'étude des problèmes taxinomiques relatifs au genre *Meloidogyne* a été publiée récemment (TRANTAPHYLLOU et HUSSEY, 1973).

Une orientation récente de la recherche consiste à comparer les protéines des diverses espèces et souches (DICKSON *et al.*, 1970; ISHIBASHI, 1970; HUSSEY, 1971), ce qui pose le problème de leur extraction.

Celle-ci a lieu, en général, à partir de femelles prélevées à la main sur les racines. Nous avons mis au point une méthode (fig. 2) permettant d'obtenir des extraits protéiques à partir de juvéniles de deuxième stade obtenus en grand nombre dans un extracteur à brouillard (ou « asperseur ») de Seinhorst (1950). L'élevage des *Meloidogyne* en laboratoire est effectué sur tomates de la variété Roma ou Rossol cultivées dans de grands récipients partiellement couverts (poubelles ménagères, fig. 1).

Dans le but d'étudier ultérieurement les relations hôte-parasite nous avons également mis au point une méthode permettant l'obtention d'extraits de racines infestées par des *Meloidogyne* (fig. 3).

L'approche des problèmes relatifs aux nématodes parasites des plantes par les moyens sérologiques et



Fig. 1. — Culture des tomates en serre, dans de grands récipients partiellement couverts (poubelles ménagères)

immunologiques est récente. BIRD (1964) montre chez *Meloidogyne javanica* une antigénicité liée aux exsudats du stylet et du pore excréteur ainsi que, dans une moindre mesure, à la cuticule et à la « gelée » (ou « matrix ») produite par les glandes anales des femelles matures.

LEE (1965) obtient sur un lapin une réponse immunologique à l'injection d'extrait de femelles de *Meloidogyne incognita*. EL SHERIF et MAI (1968) démontrent une relation antigénique entre *Panagrellus redivivus* et *Diplogaster* sp. par immunodiffusion double en agar.

WEBSTER et HOOPER (1968) obtiennent des immunosérums contre des extraits d'*Heterodera* et de *Ditylenchus* dont la spécificité est d'ailleurs relative puisque des réactions croisées ont lieu à l'intérieur d'un même genre (*Heterodera*).

HUSSEY (1971 ; 1972) est le premier à donner des photographies d'immunodiffusion excellentes où est matérialisé un immunocomplexe antigène-anticorps propre à *Meloidogyne incognita* par rapport à *M. arenaria*, l'absorption de l'immunosérum anti-protéines solubles de *M. incognita* par l'extrait obtenu avec *M. arenaria* confirmant la réalité de cette différence. L'auteur a travaillé sur des femelles et ne donne pas d'indication sur la teneur en protéines de l'extrait obtenu et utilisé comme source d'antigènes.

SCOTT et RIGGS (1971) dépassent le stade de l'analyse par immunodiffusion double et appliquent à des extraits d'*Heterodera glycines* et *H. betulae* des analyses immuno-électrophorétiques montrant clairement que ces deux espèces sont différentes.

HUSSEY *et al.* (1972) mettent en évidence plus de dix arcs de précipitation chez *M. incognita* et *M. arenaria* par la même méthode sans toutefois en tirer plus de renseignements que lors de l'étude par immunodiffusion. Enfin, MISACHI et MC CLURE (1974) ont commencé des travaux identiques aux nôtres aux U.S.A. (Arizona) en s'intéressant aux trois espèces de *Meloidogyne* formant en Afrique de l'Ouest et au Sénégal en particulier, un groupement typique. Il s'agit de

M. incognita, *M. javanica*, et *M. arenaria* élevés sur piment (*Capsicum frutescens* L.) pour le premier et sur tomate pour les deux autres. Ces auteurs utilisent des extraits d'œufs mais aussi de juvéniles dans des réactions immunologiques et, si la communauté antigénique des trois espèces est évidente, une différenciation de chacune des espèces par la présence d'immunocomplexes spécifiques semble clairement démontrée après des absorptions croisées.

Le but poursuivi au cours de ces travaux récents est la différenciation par des moyens sérologiques des espèces étudiées et plus particulièrement des races ou des pathotypes. C'est un des buts que nous nous sommes fixés à propos des trois espèces *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*.

Une orientation différente peut être donnée à de telles recherches dans le cadre des interrelations hôte-parasite. On connaît depuis longtemps l'existence d'antigènes communs à des métazoaires ou protozoaires parasites d'animaux. Mais les relations antigéniques pouvant exister entre des métazoaires parasites de végétaux sont moins bien connues. Les *Meloidogyne* de ce point de vue offrent un intérêt particulier puisqu'ils sont endoparasites et induisent certaines cellules végétales hôtes transformées en *syncytia* (les « cellules géantes ») à produire la nourriture dont ils ont besoin. MC CLURE *et al.* (1973) démontrent l'existence d'une communauté antigénique entre un extrait d'œufs de *Meloidogyne incognita* et un extrait de racines de la plante-hôte (cotonnier et *Glycine max*). L'extrait de racine ne donnant pas de précipité avec un sérum de lapin normal mais seulement avec l'immunosérum anti-*Meloidogyne*, l'intervention d'une phytoprécipitine peut être écartée. De plus l'immunosérum anti-racine réagit avec les extraits d'œufs et de juvéniles de *Meloidogyne*.

Nous avons voulu dans ce travail préliminaire sur les *Meloidogyne*, mettre en évidence l'antigénicité d'extraits de juvéniles de deuxième stade, obtenir un immunosérum de référence contre une population naturelle de *Meloidogyne* spp., évaluer le nombre d'antigènes susceptibles d'être utilisés à l'intérieur du groupe *Meloidogyne*, obtenir un immunosérum contre des racines de tomate infestées par *Meloidogyne* et chercher les relations antigéniques possibles entre *Meloidogyne* et les variétés sensibles (Roma) et résistantes (Rossol) de tomate.

PREMIÈRE PARTIE

1. OBTENTION DES JUVÉNILES

1.1. Sortie des racines

Les juvéniles de deuxième stade (J_2) sont récoltés à l'asperseur. Les racines parasitées sont très soigneusement lavées au jet d'eau pour éliminer la terre, les

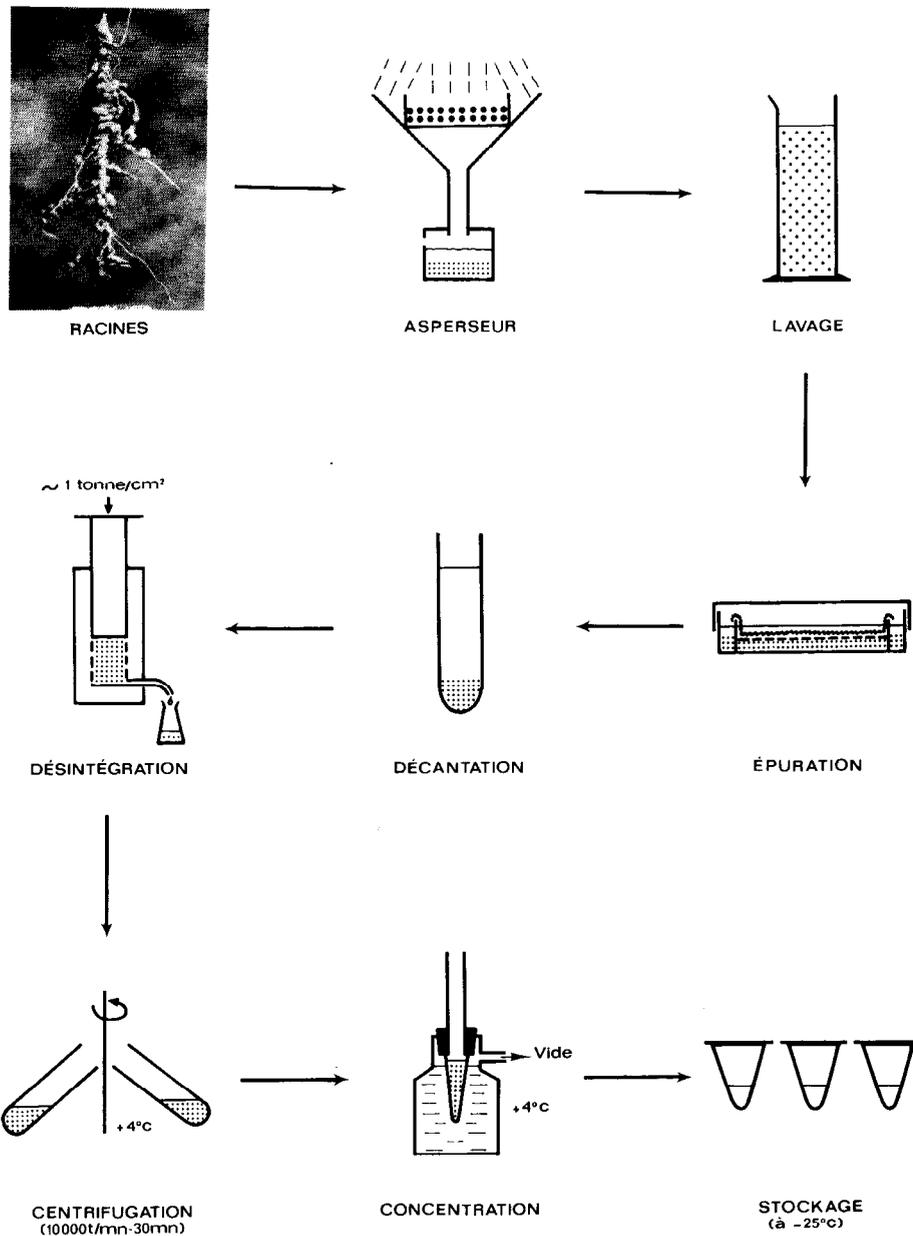


Fig. 2. — Représentation schématique de la méthode d'obtention d'extraits protéiques de juvéniles de *Meloidogyne* (à partir de racines infestées de Kénaf)

débris végétaux, les algues et les nématodes saprophages. Après élimination des parties présentant un début de pourrissement, les racines sont coupées en morceaux, puis lavées par trempages successifs dans l'eau. Les morceaux de racines sont répartis dans des postes d'asperseurs dont les éléments (tamis, entonnoir, boîte de récupération) ont été soigneusement nettoyés à l'eau bouillante. Après deux jours l'eau

contenue dans les boîtes est jetée pour éliminer les derniers saprophages et débris de terre, puis le tamis est tapissé avec de l'ouate de cellulose (Kleenex). La récolte des juvéniles est ensuite effectuée tous les deux jours, pendant dix jours, sur tamis à ouverture de maille de 10 μ m, avec à chaque opération lavage des boîtes, des entonnoirs et des tamis, remplacement des Kleenex et lavage des racines au jet d'eau.

1.2. Lavage des juvéniles :

L'eau de récupération contenant les juvéniles de *Meloidogyne* est versée sur des tamis à ouvertures de 100 μm tapissés d'une double épaisseur de Kleenex et reposant dans des boîtes de Petri couvertes. Tamis et boîtes de Petri doivent être très propres. Cette opération a pour but d'éliminer les débris végétaux et les juvéniles morts, les juvéniles vivants traversant activement le Kleenex. Après 12 heures environ les juvéniles sont repris sur un tamis à ouvertures de 5 μm et lavés trois fois à l'eau déminéralisée dans une éprouvette en utilisant chaque fois un tamis à ouvertures de 5 μm . Les juvéniles sont ensuite concentrés sur le tamis et mis en suspension soit dans un tampon phosphate 0,05 M pH = 7 (annexe 1) soit dans de l'eau physiologique (9 g de NaCl par litre d'eau distillée). Un prélèvement de 1 ml est effectué à fin de procéder à un comptage permettant le titrage de la suspension.

1.3. Concentration des juvéniles par décantation

La suspension de juvéniles est mise à décanter dans un tube de 20 ml pendant deux heures au moins. Le surnageant est aspiré et le culot conservé au congélateur dans un flacon de 50 ml totalisant les cinq récoltes (une récolte tous les 2 jours pendant 10 jours).

2. OBTENTION DE L'EXTRAIT PROTÉIQUE DE JUVÉNILES DE *Meloidogyne* (fig. 2)

2.1. Désintégration à la presse

Après décongélation la suspension de juvéniles (environ 40 ml) est soumise à une pression statique d'environ 1 tonne par cm^2 dans une cellule de French préalablement conservée à + 4 °C.

2.2. Centrifugation

L'homogénat est immédiatement centrifugé à + 4 °C pendant 30 mn à 20 000 g et seul le surnageant est conservé.

2.3. Concentration

Le surnageant représentant l'extrait brut des protéines solubles est concentré en chambre froide par dialyse sous vide contre de l'eau physiologique (9 g de NaCl par l). On utilise un sac en collodion LMR (distribué par Labo Moderne, 35, rue Dombasles, Paris (15^e)) concentrant les protéines de poids moléculaire supérieur à 10 000 ou 25 000 selon le cas et ceci sans risque de dénaturation. L'extrait concentré est congelé à - 25 °C jusqu'au moment de son utilisation.

2.4. Evaluation de la teneur en protéines

Elle est effectuée selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951). L'extrait brut obtenu à partir d'un million de larves a une teneur de l'ordre de 0,2 mg de protéines par ml. Après concentration on obtient des valeurs de 3 à 4 mg/ml.

3. OBTENTION D'EXTRAIT DE RACINES INFESTÉES PAR *Meloidogyne* (fig. 3)

On utilise des racines de tomates infestées depuis quatre à cinq semaines au plus : ces racines sont blanches à ocrées et présentent des galles et des masses d'œufs bien propres.

Les parties des racines présentant le maximum de galles et de masses d'œufs sont prélevées puis lavées très soigneusement cinq fois à l'eau distillée.

3.1. Broyage

Les racines sont broyées à l'aide d'un mixer Waring Blendor dans environ 5 fois leur volume d'eau physiologique tamponnée (annexe 2). Un premier broyage de 45 s à vitesse moyenne (10 à 15 000 t/mn) est suivi de deux broyages de 30 s à grande vitesse (15 à 20 000 t/mn) la suspension étant écumée à chaque opération. La suspension est ensuite versée sur un tamis de 100 μm : le filtrat est conservé et le broyat est récupéré sur le tamis puis homogénéisé par petites quantités dans un mortier Potter-Elvehjem réfrigéré (5 mn à 450 t/mn). Ensuite l'ensemble est mélangé et congelé durant une nuit.

3.2. Désintégration et concentration

Après décongélation la suspension est centrifugée à 1 000 t/mn pendant 3 mn et le surnageant filtré sur un tamis à ouvertures de 100 μm puis passé à la presse afin de désintégrer complètement les cellules. La suspension est ensuite dialysée contre de l'eau physiologique tamponnée puis centrifugée et concentrée suivant le processus décrit plus haut.

4. DISCUSSION

4.1. Choix du stade du nématode (J_2)

L'essai d'extraction de stades ultérieurs renflés (J_3 , J_4 , femelles) à partir de racines par la méthode classique (broyage des racines, centrifugation avec du kaolin puis du sucrose et décantation) s'est révélé peu intéressant. A partir de 40 g de racines coupées en morceaux de 0,5 cm nous avons récupéré 5 mg de *Meloidogyne* sans pouvoir nous débarrasser totalement des débris végétaux.

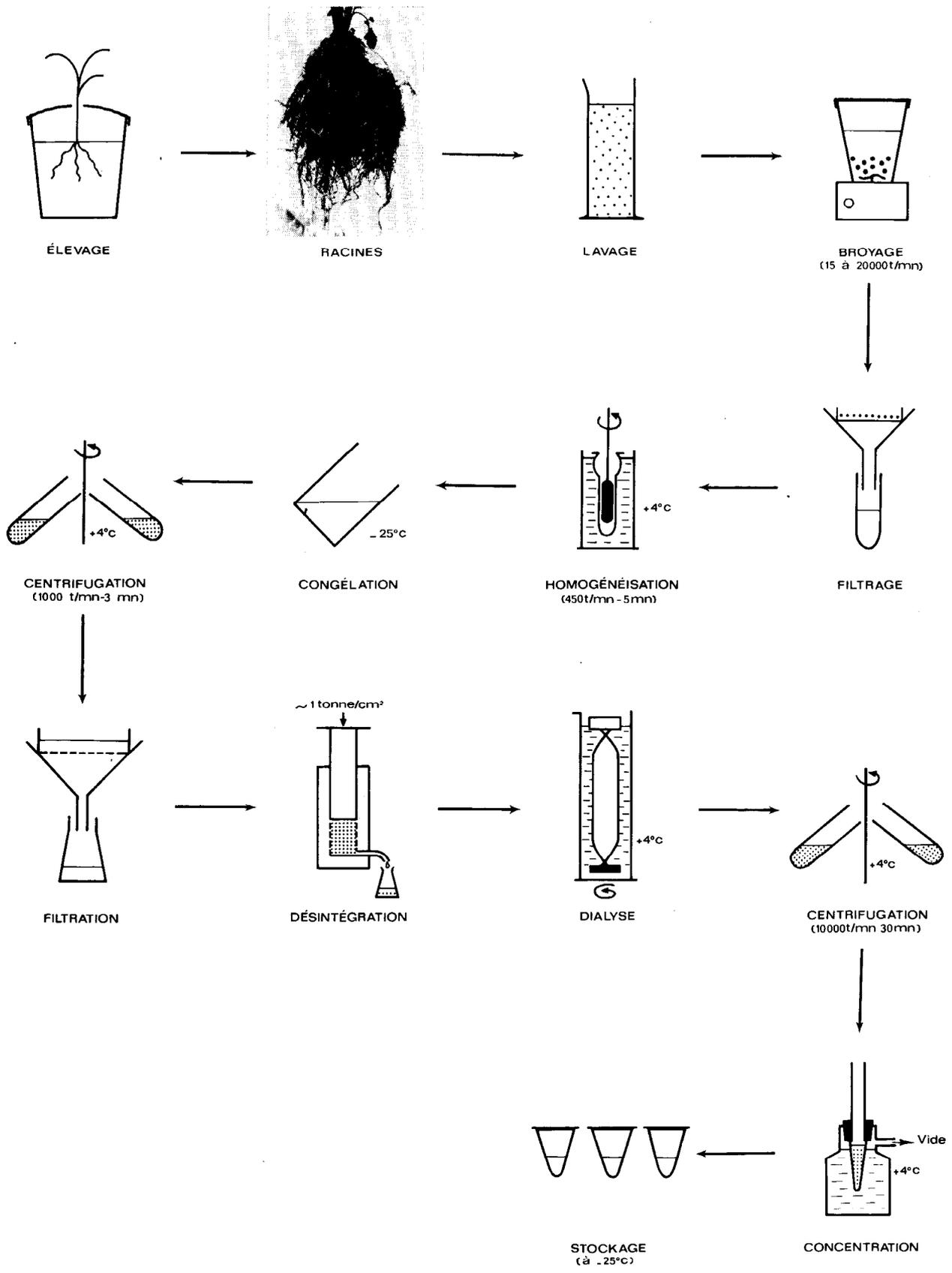


Fig. 3. — Représentation schématique de la méthode d'obtention d'extraits de racines infestées par des *Meloidogyne* (racines de tomate, variété Roma)

L'éclosion de juvéniles à partir de masses d'œufs prélevées sur des racines de tomates et stockées dans une solution de NaCl 0,3 M est plus intéressante car ce procédé élimine d'emblée les nématodes saprophytes et les débris végétaux. De plus, on obtient des éclosions groupées dans le temps donc un pourcentage plus important de juvéniles vivants. Cependant le nombre total de juvéniles récupérés est très insuffisant.

Le prélèvement direct, sous la loupe, des masses d'œufs se heurte lui à des problèmes de main-d'œuvre, eu égard à la grande quantité de matériel nécessaire. Nous essaierons ultérieurement la méthode de Mc CLURE *et al.* (1973) pour obtenir de grandes quantités d'œufs.

4.2. Concentration des suspensions de juvéniles.

La concentration rapide des suspensions des juvéniles sur filtre de papier par aspiration sur fiole Millipore permet de concentrer 3 à 4 millions de juvéniles par filtre en quelques minutes, celui-ci pouvant être ensuite stocké à -25°C . L'extraction entraîne cependant une perte de juvéniles lors du grattage du papier et l'introduction de fibres de cellulose avant la désintégration. Cette technique peut cependant être pratiquée lorsque de grandes quantités de juvéniles sont disponibles.

4.3. Désintégration des cellules

L'utilisation d'un homogénéiseur Potter Elvehjem n'a pas donné de meilleurs résultats que ceux obtenus avec la cellule de French à la presse. Les juvéniles de *Meloidogyne* en suspension dans du tampon phosphate sont broyés dans un mortier maintenu dans une enceinte réfrigérée par de la glace. Le pilon est actionné pendant 5 à 10 mn à 900 t/mn. Pour obtenir un bon rendement les juvéniles doivent être très concentrés dans un petit volume de tampon (1 ml) alors qu'avec la presse les résultats sont bons avec un volume allant jusqu'à 40 ml ; les pertes par rinçage sont donc plus importantes avec l'homogénéiseur. Un bon procédé serait une désintégration à l'aide d'ultra-sons.

4.4. Concentration de l'extrait brut

Nous avons effectué des essais de concentration par lyophilisation qui ont donné de bons résultats. Cependant un risque de dénaturation existe pour certaines catégories de protéines et en particulier pour certaines enzymes ; ceci nous a conduit à choisir la concentration par dialyse sous vide en attendant de pouvoir utiliser un nouveau procédé de concentration de petites quantités sur membranes Diaflo (Amicon¹).

¹ Distribué par Mecavigor, 88, rue de la Folie-Méricourt, Paris (11^e).

DEUXIÈME PARTIE

1. OBTENTION DES IMMUNSÉRUMS

1.1. Immunsérum de lapin anti-protéines solubles de juvéniles de *Meloidogyne* spp.

Les *Meloidogyne* utilisés proviennent d'une population naturelle (S_6) récoltée sur des racines de Kénaf (*Hibiscus cannabinus* L., variété BG 5271) et multipliée sur tomate de la variété Roma. D'après les « périal patterns » cette population est composée principalement de *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* et de types intermédiaires entre ces deux espèces. L'extrait protéique obtenu selon la technique précédente a une teneur en protéines de 3,3 mg/ml. La quantité d'extrait nécessaire à l'immunisation des lapins a été stérilisée sur filtre Millipore de $0,45\ \mu\text{m}$ et stockée à 25°C jusqu'au moment de l'emploi selon le protocole d'immunisation (annexe 4).

1.2. Immunsérum de lapin anti racines de tomates infestées par *Meloidogyne* spp.

L'extrait utilisé a été obtenu à partir de racines de tomates sensibles (variété Roma) infestées par la population naturelle de *Meloidogyne* spp. (S_6). Cet extrait a une teneur en protéines animales faible, le rapport poids des racines/poids des *Meloidogyne* étant élevé. Le protocole d'immunisation précédent n'a pas été suffisant pour obtenir un immunsérum utilisable et a dû être prolongé par trois rappels successifs consistant, le premier en une injection sous-cutanée avec adjuvant de Freund et les deux autres en des injections intra-veineuses de 1 ml d'extrait concentré pur.

2. IMMUNODIFFUSION DOUBLE EN GEL D'AGAR

2.1. Préparation des gels

Dans un Erlenmeyer de 250 ml, dissoudre au bain-marie 2,1 g d'agar dans 150 ml d'eau physiologique tamponnée (annexe 3). Ajouter 1,5 ml de Merseptyl à 1% comme antibiotique. Sur des plaques de verre (9×7 cm) nettoyées à l'alcool et placées sur un plan horizontal couler 9 ml d'agar à 1,4% par plaque et laisser refroidir 1 h en chambre humide, puis 1 h au frigidaire. Pour une boîte de Petri de 9 cm de diamètre, couler 25 ml d'agar.

Découper ensuite à l'emporte-pièce des puits selon le schéma désiré et sceller le fond de chaque puits par une goutte d'agar fondu.

2.2. Réactifs utilisés

Dans les diverses expériences effectuées nous avons

utilisé l'immunsérum de lapin anti protéines solubles de juvéniles de *Meloidogyne spp.* (I.S. anti S_6) pur ou dilué et l'immunsérum de lapin anti racines de tomates infestées par *Meloidogyne spp.* (I.S. anti Roma- S_6) pur. Les solutions antigéniques utilisées, pures ou diluées, sont les suivantes : extrait de protéines solubles de juvéniles de *Meloidogyne spp.* (S_6 , M_1 , M_2), *M. javanica* (TR₁ et 11 310) et de mélanges de divers nématodes phytoparasites et saprophages ainsi que des extraits de racines de tomates infestées par des *Meloidogyne* (Roma- S_6 , Roma- M_1 , Rossol- S_6) et des extraits de racines de tomates saines cultivées stérilement en boîte de Petri (Roma, Rossol)

2.3. Protocole d'immunodiffusion

Les schémas d'immunodiffusion utilisés consistent en un puits central contenant généralement l'immunsérum entouré par six puits contenant les extraits à étudier. Dans la macrotechnique les puits sont espacés de 1 cm et dans la microtechnique de 6 mm.

La diffusion des antigènes et des anticorps dans le gel s'opère pendant 2 à 5 jours en chambre humide ; les premiers précipités apparaissant au bout de 12 à 24 h. Les plaques sont ensuite lavées à l'eau physiologique tamponnée pendant trois jours en chambre froide dans un bac à balancement en renouvelant souvent l'eau de lavage.

Après un dernier lavage à l'eau distillée les puits sont obturés par de l'agar et la plaque est séchée aux rayons infrarouges puis colorée au noir amide 10B, décolorée et stockée. Une photographie et un relevé des précipités sont effectués.

3. RÉSULTATS

Comme le montre la figure 4 alors qu'il n'y a aucune réaction entre la solution antigénique (S_6) et le sérum de lapin normal on constate l'apparition d'immunoprécipités nets avec l'immunsérum au vingt-neuvième jour d'immunisation et des précipités plus nombreux et plus nets avec l'immunsérum final. L'extrait soluble de juvéniles de *Meloidogyne* tel que nous l'obtenons est donc bien antigénique et le protocole d'immunisation entraîne la formation de nombreux anticorps. Une dizaine d'immunocomplexes apparaissent au cours de la diffusion et les meilleurs résultats sont obtenus avec l'immunsérum pur et la solution antigénique pure (3,3 mg de protéines par ml).

L'immunsérum anti- S_6 réagit aussi avec des extraits de *Meloidogyne* (M_1 et M_2) différents de S_6 mais constitués en partie par des espèces communes (M_1 est un mélange de races pures de *Meloidogyne javanica* et *incognita*) et avec des extraits de *Meloidogyne* contenant d'autres nématodes phytoparasites et saprophages (fig. 5).

La réaction est très influencée par la concentration des extraits examinés et évolue au cours du temps, ainsi l'extrait « divers 1 » (environ 4 mg de protéines par ml) réagit le premier et voit son premier arc de précipitation, le plus dense, se subdiviser par la suite, en 1a, 1b et 1c. L'extrait M_1 (3,1 mg de protéines par ml) réagit bien avec l'immunsérum anti- S_6 alors que les extraits peu chargés en protéines (0,03 mg/ml) de chacune des races de *Meloidogyne* qui le composent ne donnent pas lieu à la formation de précipités. Il est donc nécessaire d'utiliser des extraits titrant environ

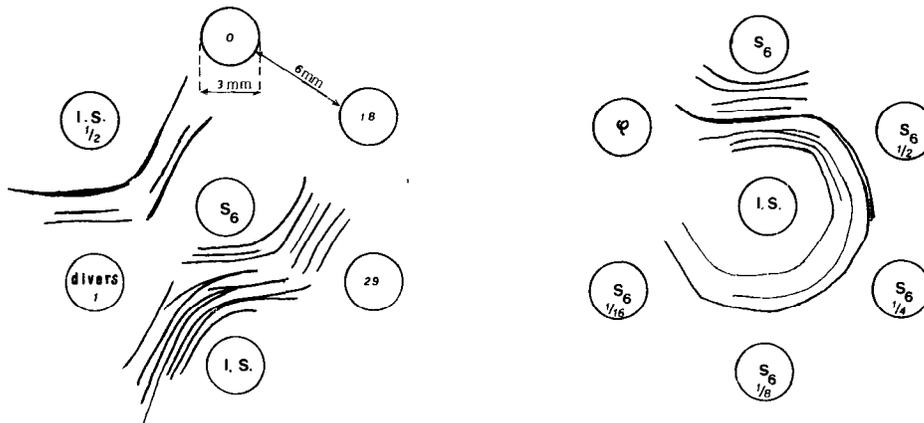


Fig. 4. — Immunodiffusion double en gel d'agar noble Difco à 1,4% en eau physiologique tamponnée. Microtechnique, durée 70 heures. Les immunsérums et solutions antigéniques sont employés purs ou dilués (1/2-1/16)

S_6 : extrait de juvéniles de *Meloidogyne* de la population S_6 .

0-18-29 : sérum de lapin avant immunisation puis aux 18^e et 29^e jours d'immunisation.

I.S. : immunsérum homologue contre les juvéniles de S_6 (57^e jour d'immunisation).

Divers 1 : extrait très concentré d'un mélange de juvéniles de *Meloidogyne*, d'autres nématodes phytoparasites (*Rotylenchulus*) et de nématodes saprophages.

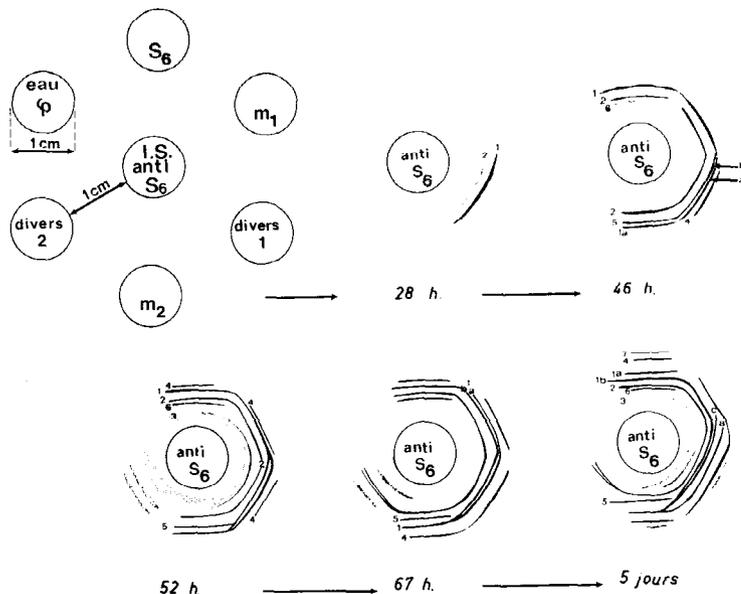


Fig. 5. — Immunodiffusion double en gel d'agar noble Difco à 1,4% en eau physiologique tamponnée. Macrotechnique. L'évolution des précipités est suivie pendant 5 jours, les premiers précipités apparaissant au bout de 28 heures

S₆ : extrait de juvéniles de *Meloidogyne* de la population S₆.

I.S. anti S₆ : immunosérum homologue contre les juvéniles de S₆.

M₁ : extrait d'un mélange de juvéniles de plusieurs races connues de *Meloidogyne* (TR₁, 11310 : *javanica* et 11304 *incognita*).

M₂ : extrait d'un mélange de juvéniles de *Meloidogyne* spp.

Divers 1 : extrait très concentré d'un mélange de juvéniles de *Meloidogyne*, d'autres nématodes phytoparasites (*Rotylenchulus*) et de nématodes saprophages.

Divers 2 : extrait conservé 9 mois à - 25 °C et peu concentré d'un mélange analogue au précédent.

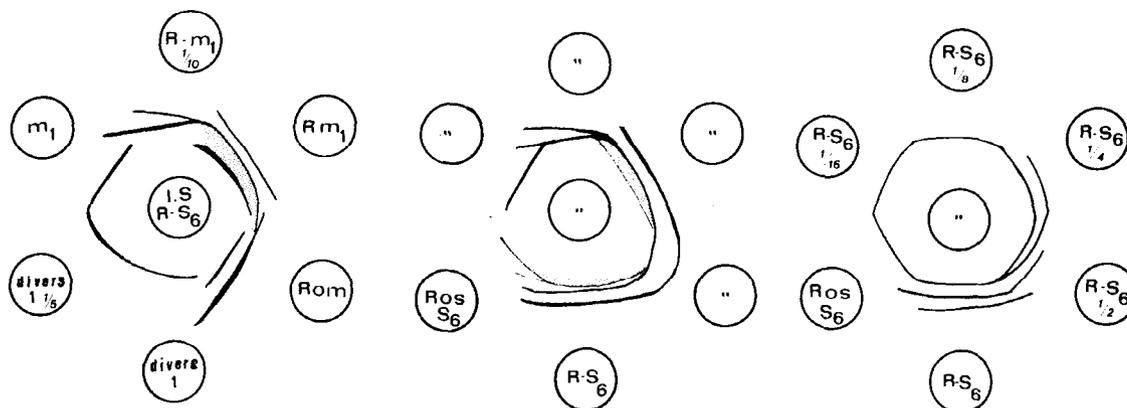


Fig. 6. — Immunodiffusion double en gel d'agar noble Difco à 1,4% en eau physiologique tamponnée. Microtechnique, durée 48 heures

R-S₆ : extrait de racines de tomates Roma infestées par la population S₆.

I.S. R-S₆ : immunosérum anti R-S₆.

ROS-S₆ : extrait peu concentré de racines de tomate Rossol infestées par la population S₆.

R-m₁ : extrait de racines de tomates Roma infestées par un mélange de plusieurs races de *Meloidogyne*.

Rom : extrait de racines de tomates Roma saines cultivées sur boîtes de Pétri.

Divers 1 : extrait d'un mélange de juvéniles de *Meloidogyne*, d'autres nématodes phytoparasites (*Rotylenchulus*) et de nématodes saprophages.

3 mg/ml de protéines pour que les réactions d'immuno-diffusion soient valables et comparables.

L'extrait de juvéniles de la population S_6 (*M. incognita* et *M. arenaria*) se différencie des autres extraits de *Meloidogyne* et en particulier de l'extrait M_1 par la formation du précipité n° 6 (fig. 5) cependant, il possède des antigènes communs avec les juvéniles de *M. javanica*, race TR_1 (fig. 7). Il est donc nécessaire de faire appel à des techniques d'absorption si l'on veut reconnaître les différentes races d'une population naturelle de *Meloidogyne*.

Nous n'avons pas constaté la présence d'antigène commun aux racines de tomate (variété Roma) et aux juvéniles de *Meloidogyne* de la population infestante S_6 . En effet, aucun précipité antigène-anticorps n'a été obtenu entre l'immunsérum anti- S_6 et l'extrait de racines de tomate Roma cultivées en boîte de Petri. Par contre, un précipité a été obtenu avec l'extrait de racines de tomates infestées par des femelles et des masses d'œufs de la population S_6 démontrant un antigène commun avec les juvéniles de cette population (fig. 7).

L'immunsérum anti Roma- S_6 donne un précipité non spécifique avec divers extraits de juvéniles de *Meloidogyne* en réponse à la présence d'antigènes communs aux différentes races comme cela a déjà été

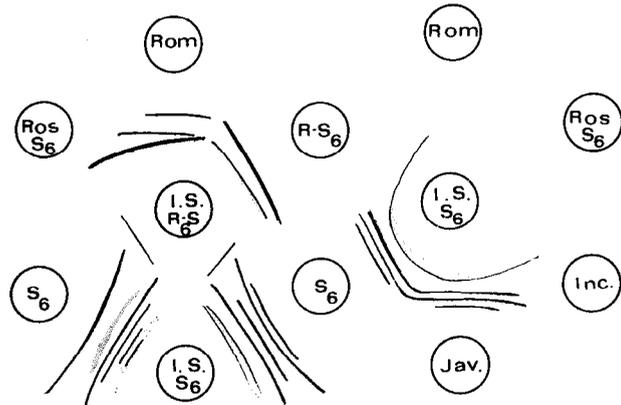


Fig. 7. — Immunodiffusion double en gel d'agar noble Difco à 1,4% en eau physiologique tamponnée. Microtechnique, durée 46 heures. Les immunsérums et solutions antigéniques sont employés purs

$R-S_6$: extrait de racines de tomates Roma infestées par la population S_6 .

I.S.R.- S_6 : immunsérum anti $R-S_6$.

I.S.- S_6 : immunsérum anti S_6 .

Rom : extrait de racines de tomates Roma saines cultivées en boîtes de Pétri.

ROS- S_6 : extrait peu concentré de racines de tomates Rossol infestées par la population S_6 .

Jav. : extrait de juvéniles de *M. javanica* de la race TR_1 .

Inc. : extrait peu concentré de juvéniles de *M. incognita* de la race 11304.

montré par les réactions de l'immunsérum anti- S_6 avec les extraits S_6 , M_1 , Divers, TR_1 (fig. 2 et 7). On obtient deux précipités propres à la tomate et un précipité propre aux *Meloidogyne*.

Les immunsérums sont donc actifs contre des extraits de juvéniles de *Meloidogyne* spp. et des extraits de racines de tomate infestées. Les expériences indiquent une communauté antigénique importante entre les trois espèces *M. javanica*, *incognita* et *arenaria* et la possibilité de reconnaître la présence de protéines de *Meloidogyne* dans un extrait de racines de tomates.

Manuscrit reçu au S.C.D. de l'ORSTOM le 29 juillet 1975.

BIBLIOGRAPHIE

- BIRD (A. F.) – 1964 – Serological studies on the plant parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. *Experim. Parasit.* 15, 350-60.
- CHITWOOD (B. G.) – 1949 – Root-knot nematodes. Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi 1887. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 16, 90-104.
- MC CLURE (M. A.), KRUK (T. H.), MISAGHI (I.) – 1973 – A method for obtaining quantities of clean *Meloidogyne* eggs. *J. Nematol.* 5, 230.
- MC CLURE (M. A.), MISAGHI (I.), NIGH (E. L.) – 1973 – Shared antigens of parasitic nematodes and host plants. *Nature* 244, 306-307.
- DICKSON (D. W.), SASSER (J. N.), HUISINGH (D.) – 1970 – Comparative disc-electrophoretic protein analysis of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. *J. Nematol.* 2, 286-293.
- EL SHERIF (M.), MAI (W. F.) – 1968 – The use of immunodiffusion in nematode identification. *Nematologica* 14, 593-595.
- HUSSEY (R. S.) – 1971 – A technique for obtaining quantities of living *Meloidogyne* females. *J. Nematol.* 3, 99-100.
- HUSSEY (R. S.) – 1971 – Serological relationship in root-knot (*Meloidogyne* spp.) nematodes. *J. Nematol.* 3, 314.
- HUSSEY (R. S.) – 1972 – Serological relationship of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *J. Nematol.* 4, 101-104.
- HUSSEY (R. S.), SASSER (J. N.), HUISINGH (D.) – 1972 – Disc electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *J. Nematol.* 4, 183-189.
- ISHIBASHI (N.) – 1970 – Variations of the Electrophoretic Protein Patterns of Heteroderidae (Nematodea : Tylenchida) Depending on the Developmental stages of the Nematode and on the growing conditions of the host plants. *Appl. Ent. Zool.* 5, 23-32.

- LEE (S. H.) - 1965 - Attempts to use immunodiffusion for species identification of *Meloidogyne*. *Nematologica* 11, 41.
- LOWRY (P. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.), RANDALL (R. J.) - 1951 - Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MISACHI (I.), MC CLURE (M. A.) - 1974 - Antigenic relationship of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. *Phytopathology* 64, 698-701.
- SCOTT (H. A.), RIGGS (R. D.) - 1971 - Immunoelectrophoretic comparisons of three plant parasitic nematodes. *Phytopathology* 61, 751-752.
- SEINHORST (J. W.) - 1959 - De betekenis van de toestand von de grand voor het optreden van aanstasting door het stengelaaltje. *Tijdschr. Pl. Ziekt.* 56, 291-349.
- TRIANANTAPHYLLOU (A. C.) - 1962 - Oögenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 7, 105-13.
- TRIANANTAPHYLLOU (A. C.) - 1966 - Polyploidy and reproductive patterns in the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *J. Morph.* 118, 403-413.
- TRIANANTAPHYLLOU (A. C.), HUSSEY (R. S.) - 1973 - Modern approaches in the study of relationships in the genus *Meloidogyne*. *Bull. OEPP* 9, 61-66.
- WEBSTER (J. M.), HOOPER (D. J.) - 1968 - Serological and morphological studies on the inter and intraspecific differences of the plant parasitic nematode *Heterodera* and *Ditylenchus*. *Parasitology* 58, 879-891.

ANNEXES

1) TAMPON PHOSPHATE 0,05 M, pH = 7 :

Solutions stock 0,2 M :

solution A : KH_2PO_4 , 27, 22 g dans 1 l d'eau distillée

solution B : K_2HPO_4 , 34, 84 g dans 1 l d'eau distillée

Solutions tampon 0,05 M :

solution A : 39 ml

solution B : 61 ml

eau distillée : 300 ml

Ajouter 0,1 g de $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et ajuster à pH = 7 avec la solution B.

2) EAU PHYSIOLOGIQUE TAMPONNÉE pour broyage des racines : NaCl 25 g + KH_2PO_4 0,19 g + Na_2HPO_4 0,75 g dans un l d'eau distillée.

3) EAU PHYSIOLOGIQUE TAMPONNÉE pour immunodiffusion en gel d'agar : NaCl 9 g + Trishydroxyméthylaminométhane 1,21 g, dans 1 l d'eau distillée.

4) PROTOCOLE D'IMMUNISATION : L'immunisation a été effectuée sur deux lapins de 10 mois en utilisant l'adjuvant complet de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA) et selon le protocole suivant :

1^{er} jour : injection sous-cutanée sur le flanc droit de 1 ml de mélange à parties égales de solution antigénique et d'adjuvant.

10^e jour : injection identique sur le flanc gauche.

18^e jour : injection intraveineuse de 1 ml de solution antigénique pure fraîchement préparée.

21^e jour : injection intraveineuse de 0,3 ml de solution antigénique pure et concentrée.

29^e jour : prise d'essai — Ring test positif. Repos pendant trois semaines.

50^e jour : injection intraveineuse de rappel, 1 ml de solution antigénique pure fraîchement préparée et concentrée.

57^e jour : saignée totale.

Les deux immunosérums ont été mélangés pour donner un immunosérum final anti « souche S_6 de *Meloidogyne* » (I.S. anti S_6).