

# Activité comparée des alloestérases du locus b de *Meloidogyne* : action de la température

Ahmed JANATI \*, Jean-Baptiste BERGÉ \*\*, Antoine DALMASSO \*\*  
et Jeanine ONILLON \*\*\*

\* Direction de la Recherche Agronomique, Station de Phylittarie, B.P. 415, Rabat, Maroc.

\*\* I.N.R.A., Station de Recherches sur les Nématodes, 123 boulevard Francis Meilland, 06602 Antibes, France.

\*\*\* I.N.R.A., Station de Zoologie et de Lutte Biologique, 37 boulevard du Cap, 06602 Antibes, France.

## RÉSUMÉ

L'examen de la seule position électrophorétique des bandes d'estérases b de *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita* et *M. hapla*, montre qu'il existe apparemment cinq allèles, ou électromorphes. Ce sont b 0.30, b 0.33, b 0.36, b 0.38 et b<sup>-</sup>. Quand on applique à ces différentes isoenzymes des critères, soit de thermostabilité, soit d'activation par la température, on augmente le nombre d'allèles pour chaque électromorphe. Ainsi, l'électromorphe b 0.30 présente un allèle très actif qui se trouve chez *M. incognita* et un autre moins actif chez *M. javanica*. Dans le cas de l'électromorphe b 0.36, il existe un allèle codant une protéine thermostensible chez *M. javanica* et un allèle codant une estérase thermostable chez *M. arenaria*. De plus, ces deux allèles peuvent se différencier par leur énergie d'activation par la température. Ainsi, ces critères permettent d'estimer avec plus de précision les différences génétiques qui existent au sein des espèces du genre *Meloidogyne*.

## SUMMARY

*Comparison of the alloesterase activities of the b locus of Meloidogyne : effect of temperature*

Electrophoretic studies on the position of single esterase b bands of *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita* and *M. hapla* have shown the existence of five electromorphs, namely b 0.30, b 0.33, b 0.36, b 0.38 and b<sup>-</sup>. The present study demonstrates that some electromorphs correspond to several alleles differing in their thermostability and thermal activation. The b 0.30 electromorph is a very active enzyme in *M. incognita* and a less active one in *M. javanica*. Within the b 0.36 electromorph a thermostable allele was present in *M. javanica* and a thermostable one in *M. arenaria*. Moreover these two last thermomorphs differ in their activation energy. Thus, criteria of thermostability and thermal activation allowed to better define the genetic diversity among the species of *Meloidogyne*.

Les données obtenues au sujet du polymorphisme biochimique chez *Meloidogyne* (Dalmasso & Bergé, 1978) ont montré qu'il est possible de caractériser, par électrophorèse, les espèces à reproduction parthénogénétique mitotique : *M. arenaria*, *M. javanica* et *M. incognita*. Parmi les loci permettant cette identification, celui codant pour l'estérase b (« Est. b ») est le plus pratique. Il code pour une bande exprimant une forme monoallélique « Est. b 0.30 » chez *M. incognita* et « Est. b 0.33 » chez *M. hapla*, où il existe, en outre, un allèle nul « Est. b<sup>-</sup> » (Bergé & Dalmasso, 1976). Les extraits de *M. arenaria* après électrophorèse sur gel cylindrique à 7% de polyacry-

lamide à pH 8,9 présentent deux bandes principales « Est. b 0.36 » et « Est. b 0.38 », alors que pour le même système *M. javanica* présente une bande supplémentaire « Est. b 0.30 » plus intense que les deux autres. « Est. b » est donc un bon marqueur, bien que certaines bandes soient communes à plusieurs espèces, quant à leur mobilités électrophorétiques. Cependant suivant le pH et la force ionique des gels on peut différencier deux de ces bandes (Janati, 1978 ; Janati *et al.*, 1982). De plus, des protéines à même mobilité électrophorétique peuvent être variables pour d'autres caractères. Diverses techniques ont été utilisées pour déceler d'éventuelles diffé-

rences entre de telles protéines. Certaines nécessitent de grandes quantités de protéines pures qu'il est difficile d'obtenir avec les *Meloidogyne*, il s'agit du «sequencing» partiel ou total, de l'analyse des peptides après digestion enzymatique ou chimique, ou de la sérologie. Pour des raisons identiques il est peu pratique de faire des analyses cinétiques (Km, Vm) de chaque alloenzyme. Cependant dans certains cas il est intéressant d'utiliser ce type de méthodologie quand la mobilité électrophorétique ne reflète pas une variabilité existant sur d'autres paramètres physico-chimiques (Godon & Popineau, 1981). On a montré que la chaleur pouvait agir différemment en dénaturant sélectivement des isoenzymes ayant la même mobilité électrophorétique (Somer, 1975 ; Moon, 1975 ; Edwards, Hopkinson & Harris, 1978). En outre, dans des limites compatibles avec la stabilité protéique, la température active les réactions enzymatiques, celle-ci pouvant permettre également une différenciation des protéines à activité enzymatique. Nous montrons ici que chez *Meloidogyne* certains électromorphes des estérases b peuvent se différencier par leur activité, leur thermostabilité, et également par la stimulation de l'activité en fonction de la température de révélation.

### Matériel et méthode

Les nématodes sont élevés sur tomate cv. Marmande, en serre, à 25°. *M. hapla* est originaire de Milly-la-Forêt (France), *M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica* proviennent respectivement de Côte d'Ivoire, de Suisse et d'Abu Dhabi. Les protéines sont obtenues selon Janati (1979). Dans les tests de dénaturation à la chaleur l'extrait est préparé à partir de deux femelles pour chaque tube d'électrophorèse et est mis à incuber au bain-marie pendant 30 minutes à 45, 48, 50, 52, 54, 56 et 58° puis centrifugé afin d'éliminer tout flocculat protéique ou autre. Dans les essais d'activation, les broyats proviennent d'un nombre élevé de femelles et on utilise un volume contenant 10 µg de protéines par tube (dosage en équivalent sérum-albumine bovine, Lowry *et al.*, 1951). Des mesures préliminaires ont montré qu'il existe dans cette zone de concentration une relation linéaire entre la quantité de protéines mises sur le gel et l'activité estérasiqne au niveau des différentes isoenzymes.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est réalisée en tubes à microhématocrite suivant la méthode d'Orstein modifiée (Bergé & Dalmasso, 1976). La coloration est faite à l' $\alpha$ -naphthyl acétate. On préincube les gels quinze minutes dans le tampon de révélation à la température désirée (4, 10, 15 ou 30°) et on les met ensuite dans la solution de révéla-

tion à la même température et pendant des temps variables (15, 30, 45 ou 60 minutes). La mesure sur gel de la quantité de substrat dégradé est faite suivant la méthode de Chiu, Tripathi & O'Brich, 1971.

Les données ont subi plusieurs traitements statistiques, analyse de variance à trois facteurs et comparaison des moyennes par le test de Tukey, analyse de variance à un facteur et comparaison des moyennes par le test T de Student. On a également vérifié l'ajustement des données expérimentales à la loi d'Arrhenius grâce à un programme de modélisation non linéaire, en comparant par le test du  $\chi^2$  la distribution du modèle obtenu avec celle des données expérimentales. Après transformation en droite nous avons vérifié par un test de parallélisme la signification des variations des pentes.

### Résultats

#### ACTIVITÉ GLOBALE DES ESTÉRASES DU LOCUS b (Tab. 1)

A 4° c'est *M. hapla* qui a l'activité la plus élevée, bien que cette activité ne soit pas significativement différente de celle de *M. javanica*. Les estérases b de cette dernière espèce sont plus actives que celles des autres espèces, quelle que soit la température ou le temps d'incubation. La bande estérasiqne unique de *M. incognita* présente une activité moyenne qui, sauf à 4°, est de même niveau que *M. hapla*. Les deux isoestérases b de *M. arenaria* ont ensemble, à faible température et pour des temps d'incubation relativement courts, une activité très inférieure à celle des trois autres espèces.

#### CLASSEMENT GLOBAL DES DIFFÉRENTES ISOESTÉRASES

L'analyse statistique globale des moyennes des activités pour les différents temps et températures par un test de variance à un facteur, permet de classer les isoenzymes en quatre groupes de valeur et dans l'ordre suivant : b 0.33 *M. hapla*  $\equiv$  b 0.30 *M. incognita*  $\gg$  b 0.30 *M. javanica*  $\gg$  b 0.36 *M. javanica*  $\equiv$  b 0.38 *M. javanica*  $\equiv$  b 0.38 *M. arenaria* > b 0.36 *M. arenaria* ( $\leq$  : différences significatives à 1%, > : différences significatives à 5%). Cependant une telle analyse ne renseigne pas sur l'influence de la température sur l'activité des différentes isoenzymes. Comme pour toute réaction chimique l'action de la température sur la majorité des réactions enzymatiques se traduit par la relation d'Arrhenius :

Tableau 1  
 Comparaison de l'activité globale du locus b chez quatre espèces de *Meloidogyne*  
 Comparison of the whole esterase b activity in four species of *Meloidogyne*

Temps d'incubation (minutes)	Température d'incubation	Activité globale du locus b			
		M. hapla	M. incognita	M. javanica	M. arenaria
15	4°	4,8 ± 0,8	2,8 ± 0,7	4,4 ± 1,2	0,8 ± 0,1
	10°	5,2 ± 1,5	2,6 ± 0,4	5,8 ± 1,1	1,7 ± 0,1
	15°	7,1 ± 1,3	5,8 ± 1,2	7,8 ± 1,2	4,1 ± 1,6
	30°	9,3 ± 0,6	9,1 ± 2,6	12,4 ± 2,4	4,3 ± 1,7
30	4°	6,0 ± 0,9	3,9 ± 0,5	5,5 ± 1,7	1,7 ± 0,2
	10°	6,3 ± 0,8	6,3 ± 0,6	7,2 ± 1,5	2,3 ± 0,5
	15°	10,2 ± 1,7	10,5 ± 3,3	15,0 ± 2,3	7,7 ± 2,1
	30°	10,8 ± 1,3	12,9 ± 0,9	16,9 ± 0,9	8,4 ± 2,0
45	4°	8,2 ± 0,4	6,7 ± 0,9	6,8 ± 0,8	2,3 ± 0,6
	10°	8,8 ± 1,6	8,6 ± 0,4	10,5 ± 2,3	3,5 ± 1,0
	15°	12,8 ± 2,4	11,4 ± 1,5	17,2 ± 2,7	9,7 ± 2,0
	30°	13,4 ± 0,7	15,2 ± 2,0	21,3 ± 3,2	12,4 ± 2,0
60	4°	10,9 ± 1,0	7,1 ± 1,4	10,7 ± 1,5	3,0 ± 1,3
	10°	14,0 ± 2,3	9,1 ± 1,4	16,0 ± 3,2	4,4 ± 1,0
	15°	13,4 ± 2,0	13,5 ± 3,4	20,5 ± 2,3	13,0 ± 1,1
	30°	13,3 ± 1,0	15,2 ± 1,8	24,1 ± 1,4	13,6 ± 3,2

Tableau 2  
 Comparaison statistique de pentes des droites de régression de la fonction  $\log v = f\left(\frac{1}{T}\right)$   
 Statistical analysis of the slopes of linear regressions  $\log v = f\left(\frac{1}{T}\right)$

Estérases comparées	Temps d'incubation (mn)	Variance		Signification de la comparaison	F calculé	F table	Parallélisme
		Théorique	Calculée				
0.38 <i>M. javanica</i> <i>M. arenaria</i>	15	2,2	2,6	Valable	1,55	4,11	Admis
	30	1,8	2,6	Valable	0,28	4,11	Admis
	45	2,8	2,6	*Non valable	2,79	4,11	Admis
	60	4,8	2,6	Non valable	—	—	—
0.36 <i>M. javanica</i> <i>M. arenaria</i>	15	5,8	2,6	Non valable	—	—	—
	30	2,2	2,6	Valable	4,91	4,11	Rejeté
	45	2,3	2,6	Valable	8,77	4,11	Rejeté
	60	13,7	2,6	Non valable	—	—	—
0.30 <i>M. javanica</i> <i>M. arenaria</i>	15	3,0	2,6	*Non valable	4,63	4,11	Rejeté
	30	1,0	2,6	Valable	—	—	Admis
	45	6,0	2,6	Non valable	—	—	—
	60	1,3	2,6	Valable	0,70	4,11	Admis

\* Comparaison à la limite de la validité.

$$\log v = \log A - b \frac{\Delta G}{T}$$

où  $v$  représente la vitesse d'hydrolyse du substrat,  $A$  est la constante de fréquence,  $\Delta G$  est l'énergie libre minimum,  $T$  est la température absolue avec :

$$b = \frac{I}{2,303 \times R}$$

ou  $R$  la constante des gaz parfaits, égale à 1,98 calories degrés<sup>-1</sup>, donc  $b = 0.219$ . Un test d'ajustement des valeurs expérimentales à cette loi nous a permis de constater que toutes les données expérimentales s'y ajustent parfaitement. La comparaison des droites de la forme :

$$\log v = f \left( \frac{I}{T} \right)$$

par un test de parallélisme, permet de comparer les pentes des droites (Tab. 2) de chaque électromorphe. Etant donnée la dispersion des points expérimentaux, ces comparaisons n'ont pu être effectuées pour toutes les expérimentations. Il ressort clairement de ce tableau que l'électromorphe  $b 0.38$  de *M. javanica* et celui de *M. arenaria* ont un  $\Delta G$  identique; par contre  $b 0.36$ , chez ces mêmes espèces, n'est pas identique, le  $\Delta G$  de *M. arenaria* étant significativement supérieur à celui de *M. javanica*. Pour les électromorphes  $b 0.30$  on ne peut pas comparer les données à 45 minutes d'incubation. Mais à 30 et 60 minutes d'incubation, ces deux protéines ont un  $\Delta G$  dont les variations ne sont pas significatives, alors qu'elles sont à la limite de la signification à 15 minutes d'incubation.

Cette analyse doit être complétée par une comparaison de la valeur absolue de l'activité (Tabl. 3). Celle-ci sera faite pour chaque électromorphe, c'est-à-dire entre  $b 0.30$  de *M. javanica* et *M. incognita* et entre  $b 0.36$  et  $b 0.38$  de *M. javanica* et *M. arenaria*. Pour  $b 0.30$ , à 15 minutes d'incubation, les différences ne sont significatives qu'à 30°; pour des incubations plus longues les différences significatives s'observent dès 15°. Dans tous les cas  $b 0.30$  de *M. incognita* est plus actif que  $b 0.30$  de *M. javanica*. Pour les isoenzymes  $b 0.36$  de *M. javanica* et *M. arenaria* il n'existe aucune différence significative quand on fait la comparaison cas à cas. Cependant on observe que  $b 0.36$  de *M. javanica* est toujours plus actif que celui de *M. arenaria*, ce qui fait que lors de l'analyse globale il y a une différence significative (cf. supra). Les isoestérases  $b 0.38$  n'ont pas d'activités différentes les unes des autres. Pour les autres comparaisons on peut observer que l'activité de  $b 0.30$  de *M. javanica* est toujours supérieure aux deux autres électromorphes présentes chez cette espèce, mais la signification statistique de ces différences dépend des conditions expérimentales. C'est du fait de la

variation de coloration des bandes d'un gel à l'autre que le test statistique de variance à trois facteurs ne montre aucune différence entre  $b 0.36$  et  $b 0.38$  des deux espèces présentant ces bandes. Cependant on observe dans tous les cas que  $b 0.38$  de *M. arenaria* est toujours un peu mieux colorée que  $b 0.36$  de cette même espèce; si les différences ne sont pas significatives dans les comparaisons cas à cas elles le deviennent quand on les compare dans l'ensemble. Ceci ne s'observe pas pour les deux isoenzymes les plus rapides de *M. javanica*.

#### THERMORÉSISTANCE DES ÉLECTROMORPHES DU LOCUS $b$ (Tabl. 4)

Comme critère de thermorésistance nous avons choisi la température pour laquelle on n'observe plus aucune coloration. L'alloestérase la plus sensible est « Est.  $b 0.36$  » de *M. javanica* qui ne montre plus du tout d'activité à 52°, alors que c'est à 58° qu'on ne voit plus de coloration pour « Est.  $b 0.36$  » de *M. arenaria*. La bande « Est.  $b 0.30$  » de *M. javanica* se dénature également assez vite à la chaleur, car elle disparaît complètement à 54°, alors que c'est à 58° qu'on n'observe plus d'« Est.  $b 0.30$  » chez *M. incognita*. Cette dernière a un comportement identique à « Est.  $b 0.36$  » et «  $b 0.38$  » de *M. arenaria*, « Est.  $b 0.38$  » de *M. javanica* et « Est.  $b 0.33$  » de *M. hapla*.

#### Conclusions

Pour montrer que l'évolution du polymorphisme biochimique est due à la sélection et n'est pas neutre, Harris (1971) se base sur le fait que différentes allozymes ont des activités variables. Si on suppose que chez *Meloidogyne* les estérases  $b$  sont des formes allozymiques, nous pouvons intégrer nos résultats à ceux cités par Harris et ajouter un argument de plus à la théorie sélectionniste du polymorphisme. Ceci suppose toutefois, comme le note Harris (1971), que ces variations d'activité globale aient une signification biologique et que chaque alloenzyme « Est.  $b$  » ne soit constituée effectivement que d'une seule protéine (Dalmasso & Bergé, 1978). Cependant, dans le cas des *Meloidogyne* le problème est peut-être un peu plus complexe, car non seulement il existe des populations de *M. hapla* viables et parfaitement adaptées semble-t-il, qui ont un allèle  $b$  nul à l'état homozygote (Dalmasso & Bergé, 1978), mais encore, si l'on considère l'individu et non plus les différents alloenzymes isolés, les variations quantitatives sont palliées par une apparition d'hétérozygotes permanents ou en tout cas par une multi-

Tableau 3

Comparaison de l'activité de chaque isoestérase pour une température et un temps donnés  
*Comparison of each isoesterase activity at varying temperature and time*

Temps d'incuba- tion (mn)	Température d'incubation	Classement des isoestérases d'après leur activité décroissante							
		Isoestérases (a) Activité (b) Signification (c)	1+	2+	3+	4+	5+	6+	
15	4°		4,8 ± 0,8 a*	2,8 ± 0,7 ab	2,2 ± 0,3 ab	1,3 ± 0,4 b	0,7 ± 0,6 b	0,4 ± 0,1 b	
		10°	a	1	3	2	4	5	7
			b	5,2 ± 1,5 a	2,6 ± 0,4 ab	3,4 ± 0,4 ab	1,5 ± 0,3 b	1,4 ± 0,4 b	0,8 ± 0,1 b
	c								
	15°	a	1	2	3	7	4	5	
		b	7,1 ± 1,3 a	5,8 ± 1,2 ab	4,1 ± 0,6 bc	2,4 ± 1,0 c	1,9 ± 0,3 c	1,8 ± 0,3 c	
		c							
	30°	a	1	2	3	4	5	7	
		b	9,3 ± 0,6 a	9,1 ± 2,6 a	5,8 ± 1,1 b	3,5 ± 0,7 bc	3,1 ± 0,6 bc	2,3 ± 1,2 c	
		c							
	0	4°	a	1	2	3	4	5	7
			b	6,0 ± 0,9 a	3,9 ± 0,5 ab	2,7 ± 0,3 bc	1,4 ± 0,6 bc	1,4 ± 0,8 bc	1,1 ± 0,1 bc
c									
10°		a	1	2	3	5	4	7	
		b	6,3 ± 0,8 a	6,3 ± 0,6 a	3,4 ± 0,5 a	1,9 ± 0,5 b	1,9 ± 0,5 b	1,6 ± 0,2 b	
		c							
15°		a	2	1	3	7	4	5	
		b	10,5 ± 3,3 a	10,2 ± 1,7 a	7,2 ± 0,9 b	4,7 ± 1,5 bc	4,2 ± 0,5 c	3,6 ± 0,9 c	
		c							
30°		a	2	1	3	4	5	7	
		b	12,9 ± 0,9 a	10,8 ± 1,3 a	7,8 ± 0,5 b	4,8 ± 0,2 c	4,3 ± 0,2 c	4,3 ± 1,2 c	
		c							
45	4°	a	1	2	3	4	5	7	
		b	8,2 ± 0,4 a	6,7 ± 0,9 a	3,1 ± 0,1 b	1,9 ± 0,3 b	1,9 ± 0,3 b	1,4 ± 0,4 b	
		c							
	10°	a	1	2	3	4	5	7	
		b	8,8 ± 1,6 a	8,6 ± 0,4 a	4,9 ± 1,0 b	3,2 ± 0,9 bc	2,4 ± 0,4 bc	2,4 ± 1,0 bc	
		c							
	15°	a	1	2	3	7	5	4	
		b	12,8 ± 2,4 a	11,4 ± 1,5 ab	7,9 ± 0,4 bc	5,4 ± 1,3 cd	4,7 ± 1,2 d	4,6 ± 1,1 d	
		c							
	30°	a	2	1	3	7	4	5	
		b	15,2 ± 1,0 a	13,4 ± 0,7 a	9,1 ± 1,0 b	6,6 ± 1,3 bc	6,2 ± 0,9 c	6,0 ± 1,3 c	
		c							
60	4°	a	1	2	3	4	5	7	
		b	10,9 ± 1 a	7,1 ± 1,4 b	5,1 ± 0,9 bc	3,1 ± 0,8 cd	2,6 ± 0,4 cd	1,9 ± 0,6 d	
		c							
	10°	a	1	2	3	5	4	7	
		b	14,0 ± 2,3 a	9,1 ± 1,4 b	7,1 ± 1,2 bc	4,5 ± 1,2 cd	4,4 ± 0,8 cd	2,7 ± 1,0 d	
		c							
	15°	a	2	1	3	7	4	6	
		b	13,5 ± 3,4 a	13,4 ± 2,0 a	9,5 ± 0,9 b	7,6 ± 0,6 bc	5,6 ± 0,6 c	5,5 ± 0,5 c	
		c							
	30°	a	2	1	3	5	7	4	
		b	15,2 ± 1,8 a	13,3 ± 1,0 a	9,9 ± 0,6 b	7,2 ± 0,4 bc	7,2 ± 1,0 bc	7,0 ± 0,4 c	
		c							

\* Les activités portant des lettres identiques ne sont pas statistiquement différentes.

+ Correspondance entre les nomenclatures des allèles : 1 = « Est. b 0.33 » *M. hapla* ; 2 = « Est. b 0.30 » *M. incognita* ; 3 = « Est. b 0.30 » *M. javanica* ; 4 = « Est. b 0.36 » *M. javanica* ; 5 = « Est. b 0.38 » *M. javanica* ; 6 = « Est. b 0.36 » *M. arenaria* 7 = « Est. b 0.38 » *M. arenaria*.

Tableau 4

Thermorésistance des électromorphes du locus b (l'analyse est semi quantitative, le nombre de croix indique l'intensité des bandes, « 0 » indique une disparition d'activité)  
*Thermal stability of the locus b electromorphs (semi quantitative analysis was carried out, the sign + indicates the intensity of the band, "0" shows a loss of activity)*

Espèces	Alloestérase	Température d'incubation des extraits						
		45°	48°	50°	52°	54°	56°	58°
<i>M. hapla</i>	b 0.33	++++	++++	++++	+++	++	+	0
<i>M. incognita</i>	b 0.30	++++	++++	++++	+++	++	+	0
<i>M. javanica</i>	b 0.30	++++	++++	++++	++	0	0	0
	b 0.36	++	++	+	0	0	0	0
	b 0.38	++	++	++	++	+	+	0
<i>M. arenaria</i>	b 0.36	++	++	++	++	+	+	0
	b 0.38	+++	+++	+++	++	++	+	0

plication du nombre d'isoestérases b. Il n'en reste pas moins que même dans ce cas il existe des variations quantitatives des activités globales et individuelles spécifiques des électromorphes du locus b. A n'en pas douter ceci provient de mutations subies par les différents allèles produisant ces protéines, ou de mutations au niveau des gènes en régulant la synthèse. Nos expériences concernent uniquement l'activité spécifique, il serait peut-être intéressant de savoir si la quantité synthétisée par individu varie ou reste stable suivant les espèces et les populations.

L'étude de l'activation par la température montre qu'il existe également des différences significatives entre plusieurs électromorphes. Ce critère permet de montrer que deux bandes qui ont la même mobilité électrophorétique ne sont pas forcément identiques. L'utilisation systématique d'une telle méthode pourrait donc permettre d'avoir une idée bien plus exacte du degré de polymorphisme biochimique d'un locus donné (Bernstein, Throckmorton & Hubby, 1973).

Les premières expériences montrant que la thermostabilité des alloenzymes pouvait révéler un polymorphisme caché datent d'une quinzaine d'années (Wright & McIntyre, 1965). Elles ont surtout porté sur la drosophile. Ce type de caractérisation a permis de montrer que le locus codant pour la xanthine déshydrogénase a un nombre d'allèles multiplié par 1,74 par rapport au nombre d'allèles révélés par simple électrophorèse (Bernstein, Throckmorton & Hubby, 1973; Singh, Hubby & Lewontin, 1974; Singh, Hubby & Throckmorton, 1975.)

Dans notre cas il est évident que les caractéristiques de thermostabilité augmentent le taux de polymorphisme du locus b puisque deux électromorphes b 0.30 et b 0.36 se trouvent sous des états différents suivant les populations dans lesquelles on les teste. Ce critère n'est, évolutivement parlant, peut-être pas valable au niveau spécifique, car il n'a été analysé qu'une population par espèce.

En conclusion, les premières électrophorèses effectuées chez *Meloidogyne* ont montré qu'il existait un locus b possédant cinq allèles (ou électromorphes) différant qualitativement; en tenant compte des variations quantitatives et de l'action de la température le nombre d'allèles de ce même locus est de sept, puisque b 0.36 de *M. arenaria* et *M. javanica* se différencient par leur thermostabilité et leur énergie d'activation et que b 0.30 de *M. incognita* et *M. javanica* se distinguent à la fois par leur activité et peut-être par leur énergie d'activation (à la limite de la signification statistique). Il faut noter que des récents travaux ont permis de montrer que les électromorphes « Est. b 0.36 » et « Est. b 0.38 » de *M. arenaria* sont différents de « Est. b 0.36 » et « Est. b 0.38 » de *M. javanica*, si on change de conditions électrophorétiques (Janati *et al.*, 1982). Il en résulte que si lors des premiers travaux on pensait qu'il existait des allèles communs entre les espèces de *Meloidogyne* que nous avons étudiées, une étude plus approfondie montre que cette identité n'est qu'apparente. De toute façon cette augmentation du polymorphisme ne tend pas toujours à éloigner

génétiqnement des populations (Cochrane, 1976).

L'analyse semi-quantitative de la dénaturation peut entraîner des erreurs d'interprétations (Bewley, 1978) si les isoenzymes sont en quantités variables dans les échantillons ; ceci n'est probablement pas le cas chez *Meloidogyne* car nous avons utilisé un même nombre de femelles, de plus l'activité des bandes sur le gel n'est pas très différente et les écarts de températures de dénaturation varient entre 4° (« Est. b 0.30 ») et 8° (« Est. b 0.36 »).

Ces variations de thermostabilité doivent être assez fréquentes car pour de nombreuses protéines les liaisons qui sont à l'origine des structures secondaires et tertiaires sont parfois très peu nombreuses et généralement faibles (Perutz, 1965). Ainsi, on sait que la thermostabilité du lysozyme d'un mutant du bactériophage T4 est due au remplacement d'une molécule d'arginine dans le type sauvage thermosensible par une molécule d'histidine (Grutter, Hawkes & Matthews, 1979), c'est-à-dire à une mutation ponctuelle.

#### RÉFÉRENCES

- BERGÉ, J.B. & DALMASSO, A. (1976). Variations génétiques associées à un double mode de reproduction parthénogénétique et amphimictique chez le nématode *Meloidogyne hapla*. *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris, Sér. D*, 282 : 2087-2090.
- BERNSTEIN, S.C., THROCKMORTON, L.H. & HUBBY J.L. (1973). Still more variability in natural populations. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 70 : 3928-3931.
- BEWLEY, G.C. (1978). Heat stability studies at the  $\alpha$  glycerophosphate dehydrogenase locus in populations of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 16 : 769-775.
- CHIU, Y.C., TRIPATHI, R.K. & O'BRIEN, R.D. (1972). A gel scanning method for kinetic studies on an acetylcholinesterase isozyme. *An. Biochem.*, 451 : 480-487.
- COCHRANE, B.J. (1976). Heat stability variants of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. *Nature Lond.*, 263 : 131-132.
- DALMASSO, A. & BERGÉ, J.B. (1978). Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp. : Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *J. Nematol.*, 4 : 323-332.
- EDWARDS, Y.H., HOPKINSON, D.A. & HARRIS, H. (1978). Dissociation of hybrid isozymes on electrophoresis. *Nature Lond.*, 271 : 84-87.
- GODON, P. & POPINEAU, Y. (1981). Différences d'hydrophobicité de surface des gliadines de deux variétés de blé dur de bonne et de mauvaise qualité. *Agronomie*, 1 : 77-82.
- GRUTTER, M.G., HAWKES, R.B. & MATTHEWS, B.W. (1979). Molecular basis of thermostability in the lysozyme from bacteriophage T4. *Nature Lond.*, 277 : 667-669.
- HARRIS, H. (1971). Polymorphism and protein evolution : The neutral mutation random drift hypothesis. *J. Med. Genet.*, 8 : 444-452.
- JANATI, A. (1979). Contribution à l'étude des estérases chez *Meloidogyne*. *Thèse 3<sup>e</sup> Cycle Univ. Sci. Tech. Languedoc*, Montpellier, 84 p.
- JANATI, A., BERGÉ, J.B., TRIANTAPHYLLOU, A.C. & DALMASSO, A. (1982). Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. *Revue Nématol.*, 5 : 147-154.
- LOWRY, P.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDAL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- PERUTZ, M.F. (1965). Structure of hemoglobin. *J. mol. Biol.*, 13 : 646-668.
- SINGH, R.S., HUBBY, J.L. & LEWONTIN, R.C. (1974). Molecular heterosis for heat sensitive enzyme alleles. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 71 : 1808-1810.
- SINGH, R.S., HUBBY, J.L. & THROCKMORTON, L.H. (1975). A study of genetic variation by electrophoretic and heat denaturation techniques at the octanol dehydrogenase locus in members of the *Drosophila virilis* group. *Genetics*, 80 : 637-642.
- SINGH, R.S., LEWONTIN, R.C. & FELTON, A.A. (1976). Genetic heterogeneity within electrophoretic alleles of Xanthine dehydrogenase in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 84 : 609-614.
- WRIGHT, T.R.F. & Mc INTYRE, R.J. (1965). Heat stable and heat labile esterase 6 enzymes in *Drosophila melanogaster* produced by different Est. 6F alleles. *J. Elisha Mitchell scient. Soc.*, 81 : 17-19.

Accepté pour publication le 8 mars 1982.