



HAL
open science

Identification des espèces de Meloidogyne par électrophorèse d'estérases

Ariane Fazari, Marc Bailly-Bechet, Yann Frenedo, Caroline Djian-Caporalino

► To cite this version:

Ariane Fazari, Marc Bailly-Bechet, Yann Frenedo, Caroline Djian-Caporalino. Identification des espèces de Meloidogyne par électrophorèse d'estérases. Cahier des Techniques de l'INRA, 2019, 97, pp.1-14. <hal-04628071>

HAL Id: hal-04628071

<https://hal.science/hal-04628071v1>

Submitted on 28 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-SA 4.0 - Attribution - ShareAlike - International License

Identification des espèces de *Meloidogyne* par électrophorèse d'estérases

Ariane Fazari¹, Marc Bailly-Bechet, Yann Frenedo et Caroline Djian-Caporalino

Résumé :

Cet article présente un protocole simplifié de détermination d'espèces des nématodes à galles du genre *Meloidogyne*. Il a été modifié et amélioré dans le but d'optimiser l'expérimentation et de réduire le temps de travail consacré à ces déterminations d'espèces. Une étude biochimique a montré que ces espèces de nématodes sont différenciables par leurs phénotypes enzymatiques notamment grâce aux isoestérases. Cette méthode d'identification est fiable. Elle est basée sur la migration différentielle par électrophorèse de ces enzymes dans un gel réticulé suivi d'une révélation de leur migration pour obtenir des profils électrophorétiques différents pour chaque espèce.

Mots clés : électrophorèse, estérase, *Meloidogyne*, nématode à galles des racines, taxonomie.

Abstract :

This article shows a simplified protocol for the identification of root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.). A biochemical study sets out that the species of these nematodes can be differentiated by their enzyme phenotype and in particular with their esterases. This identification method is reliable. It is based on the differential electrophoretic migration by electrophoresis of the esterases in a cross-linked gel. The revelation of this migration shows a different pattern for each species.

Keywords : electrophoresis, esterases, *Meloidogyne*, root-knot nematode, taxonomy

Introduction

Les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sont des ravageurs telluriques extrêmement polyphages. Certaines espèces (*M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. enterolobi*) sont des organismes nuisibles de quarantaine soumis à la réglementation européenne. L'interdiction ou les restrictions d'emploi des nématicides chimiques font que les problèmes liés à ces microorganismes deviennent de plus en plus préoccupants. Des méthodes alternatives doivent être utilisées comme l'exploitation de la résistance naturelle des plantes. Cette alternative est propre, efficace et durable. Elle consiste à utiliser les gènes de résistance des plantes à bon escient. Ils ont des spectres d'actions plus ou moins larges c'est-à-dire que ces gènes contrôlent une ou parfois plusieurs espèces de *Meloidogyne*. La détermination d'espèce de ces parasites microscopiques est donc une nécessité qui n'est pas simple à réaliser en routine. Elle a longtemps été basée sur des critères morphologiques (type de figure périnéale, stylet des femelles), mais ces études sont chronophages et réservées à des spécialistes aguerris. D'autres méthodes d'identification d'espèces existent comme les diagnostics moléculaires basés sur l'amplification *in vitro* de régions d'ADN caractéristiques des espèces (Randig et al., 2002 ; Zijlstra, 2000 ; Zijlstra et al., 2000).

¹ INRA, Université Côte d'Azur, CNRS, Institut Sophia Agrobiotech, 400 route des Chappes, F-06903 Sophia Antipolis Cedex
ariane.fazari@inra.fr

Dans le cadre du projet INRA SMaCH 'Gedunem' (2012-2016), de nombreuses identifications d'espèces de *Meloidogyne* ont dû être réalisées. Des diagnostics moléculaires et biochimiques ont été utilisés pour identifier les populations naturelles prélevées sur différents sites expérimentaux. Cette expérience a montré que l'approche moléculaire ne permettait pas ce diagnostic pour tous les échantillons. En effet, il semblerait que dans certains cas, les amorces spécifiques ne permettent pas toujours l'amplification des séquences d'ADN de l'espèce correspondante. Ceci pourrait s'expliquer par la forte capacité de mutation du génome des *Meloidogyne* (Blanc-Mathieu et al., 2017) pouvant empêcher parfois l'identification d'espèces issues de populations naturelles en utilisant ces amorces qui ne peuvent s'apparier que si la séquence d'ADN correspondante n'est pas modifiée. Pour cette raison, le diagnostic biochimique basé sur l'électrophorèse d'estérases de femelles, enzymes catalysant l'hydrolyse d'une liaison ester (Dalmaso & Bergé, 1978 ; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985) a été privilégié : en effet, chaque espèce de *Meloidogyne* possède soit un seul type, soit plusieurs types d'estérase, de masses molaires et de structures légèrement différentes et ces enzymes sont stables pour une espèce de *Meloidogyne* mais polymorphes entre les espèces. L'électrophorèse d'estérases consiste à faire migrer les estérases dans un gel réticulé, puis à révéler leurs migrations afin d'obtenir les profils électrophorétiques des différentes espèces. L'analyse des échantillons issus de prélèvements sur trois parcelles expérimentales suivies sur 4 ans a permis de valider le fait que cette méthode biochimique est plus fiable, plus performante et donne de meilleurs résultats que l'identification moléculaire pour déterminer les espèces de nématodes à galles.

Le protocole d'identification biochimique des espèces a également été amélioré dans le but de i/ simplifier sa mise en œuvre, ii/ réduire le temps de travail pour réaliser ce diagnostic, iii/ proposer une aide (mathématique) permettant de déterminer l'effectif à tester (nombre de femelles) en fonction de l'objectif visé (contrôle de la pureté d'une espèce en collection ou analyse d'un échantillon inconnu), et iv/ tester la sensibilité de la technique pour optimiser (diminuer) le nombre de gels à réaliser.

Ce protocole simplifié de détermination d'espèces des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* est actuellement utilisé dans le cadre de différents projets pour suivre l'évolution des espèces de nématodes en fonction des rotations de cultures et des pratiques culturales mais également pour contrôler la pureté des souches en collection à l'Inra de Sophia-Antipolis.

Matériel et méthodes

1. Préparation du matériel

- Un pinceau pour prélever les femelles.
- Une petite spatule ou un scalpel pour écraser les femelles.
- Une plaque de verre quadrillée pour isoler et broyer les femelles
- Fond/feuille sombre à placer sous la plaque de verre pour bien visualiser les femelles blanches
- Un béccher rempli d'alcool pour désinfecter le matériel entre chaque dépôt
- Du papier essuie-tout pour essuyer le matériel et éliminer toute trace d'alcool.
- Une pipette 20 µl pour les dépôts sur gels
- Des coupelles en verre pour stocker les femelles prélevées
- Un tampon d'extraction estérases (cf composition ci-dessous)
- Des tampons d'électrophorèse (cf composition ci-dessous)
- Un matériel d'électrophorèse verticale (pour gel de 13 cm de hauteur à minima)
- Deux ou quatre plaques de verre (environ 20X20cm)

2. Hygiène et Sécurité

Pour la manipulation de l'acrylamide (cancérogène), le port des gants est obligatoire et l'utilisation de gants en nitrile est préconisée.

Le Temed, l'acétone et l'APS sont inflammables et irritants pour la peau et le système respiratoire.

Il est nécessaire de récupérer tous les déchets.

3. Préparation des solutions

a. Tampon d'extraction des estérases

A aliquoter par 500 µl environ (stocker les tubes à -20°C) :

- Saccharose 20 % soit 2 g
- Nonidet P40 0.1 % soit 100 µL
- qsp 10 ml eau distillée

Bleu de charge :

- Bleu de Bromophénol 1 mg/mL

b. Solutions pour électrophorèse

Solution mère d'acrylamide:

- Acrylamide/Bis-acrylamide, 30 % solution, 37.5:1
(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3699?lang=fr®ion=FR>)
- Tétraméthyléthylènediamine (Temed) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/17919>

1.5 M tris pH8.8 :

- tris : 18.1 g
- qsp eau : 100 mL
- pH ajusté à 8.8

0.5 M tris pH6.8:

- tris : 6 g
- qsp eau : 100 mL
- pH ajusté à 6.8

APS 10 % :

- Persulfate d'ammonium : 1 g
- qsp H₂O : 10 mL

Tampon phosphate 0.1 M pH7.2 :

- NaH₂PO₄ 0.1 M (soit 3.9 g/250 mL) : 48 mL
- Na₂HPO₄ 0.1 M (soit 8.9 g/500 mL) : 152 mL

Colorant :

- tampon phosphate 0.1 M pH7.2 : 10 mL
- Fast Blue RR : 300 mg

Substrat :

- acétone : 10 mL
- 1-naphtyl acétate : 400 mg

Tampon cuve 10X (pH ajusté à 8.3) :

- tris : 6 g
- glycine : 28.8 g
- qsp eau 1 litre

4. Détermination de l'effectif à tester (nombre de femelles à identifier)

Avant de mettre en œuvre le protocole d'identification des espèces de *Meloidogyne* par électrophorèse d'estérases, il est indispensable pour les raisons décrites ci-dessous de se poser la question du nombre de femelles à tester. Il faut que les résultats obtenus soient statistiquement robustes mais il faut en même temps trouver un compromis entre fiabilité des résultats et faisabilité de l'expérimentation. Bien sûr, plus le nombre de femelles testées est élevé et plus fiable sera le résultat. La seule limite est « technique », il faut que la charge de travail soit acceptable et réalisable. Selon la nature de l'échantillon et l'objectif recherché (vérification d'une collection ou analyse d'un échantillon inconnu), le nombre de femelles à identifier est variable, pour faciliter la détermination de ce nombre, deux cas de figures concrets sont proposés ci-dessous, appuyés par des formules statistiques à personnaliser en fonction des besoins.

a/ Cas N°1 : Vérification de la pureté d'une collection

Dans le cas de la vérification de la pureté d'une collection, on peut considérer que l'apparition d'une contamination est un événement rare. On cherche à savoir quelle quantité n de femelles doivent être identifiées afin de détecter avec une bonne confiance une contamination dans une collection. Pour cela deux paramètres entrent en jeu :

- E , le taux d'erreur acceptable, c'est-à-dire la proportion des cas dans laquelle on accepte de ne pas détecter la contamination.
- p , le pourcentage de contamination, c'est-à-dire le pourcentage de femelles dans notre échantillon provenant d'une souche autre que la souche de référence testée.

La probabilité de ne pas détecter une contamination est $(1 - p)^n$. On veut donc $(1 - p)^n < E$, ce qui donne :

$$n > \frac{\log(E)}{\log(1 - p)^n}$$

En prenant pour exemple $E = 0.01$ et $p = 0.01$ on obtient $n \approx 459$ échantillons à tester. Dans ces conditions, on aura au plus 1 % de contaminant en acceptant un risque d'erreur de 1 %. Ce risque de voir *apparaître* un contaminant est acceptable compte tenu du fait que les collections sont contrôlées régulièrement (1 fois par an minimum).

Exemple : Pour vérifier la pureté d'une souche de collection, broyer et déposer 20 femelles par puits et faire 2 gels de 12 puits. On aura au total : $20 \times 12 \times 2 = 480$ femelles testées. Cette vérification est facilement réalisable techniquement et les résultats seront représentatifs de la pureté de la souche testée dans la collection.

On peut remarquer que modifier E ne change pas fondamentalement n : avec $E=0.05$ et $p=0.01$, on obtient $n=299$ femelles à tester. Par contre, accepter de ne détecter que des contaminations plus importantes a un effet significatif : avec $E=0.01$ et $p=0.05$, on obtient $n=90$.

Si le protocole donné en exemple est trop ambitieux (par exemple, pour une collection comportant un très grand nombre de souches), il est envisageable de ne faire qu'un seul gel. Dans ce cas, avec $n=240$, et en supposant toujours $p=0.01$, on a $E=0.09$, un risque plus élevé mais potentiellement acceptable si les vérifications sont régulières.

On peut également noter que ce même protocole peut s'appliquer au cas d'un inventaire d'espèces en champ. Il permettra de détecter avec une bonne confiance toutes les espèces présentes en proportion supérieure à p . Toutefois, dans cette situation, l'hétérogénéité des femelles testées dans chaque puits pourra conduire à des confusions, comme dans le cas de *M. incognita* qui pourra ne pas être détecté s'il est en mélange avec *M. javanica* (cf 11. Interprétation des profils estérasiques).

b/ Cas N°2 : Suivi d'espèce(s) présente(s) dans un échantillon inconnu

Dans le cas de prélèvement sur le terrain, on ne connaît pas à l'avance le nombre d'espèce(s) présente(s). A-t-on une seule espèce, un mélange d'espèces, si oui dans quelle proportion ? Pour répondre à ces questions, on peut se rapporter à une méthode de sondage. On cherche à estimer la proportion P de chaque espèce présente dans l'échantillon. Si on fait n prélèvements, on peut calculer la marge d'erreur e sur l'estimation de ces proportions en se servant d'un intervalle de confiance sur P .

La formule reliant P , n et e est donc :
$$1,96 \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} = e$$

On a choisi une confiance à 95 %, ce qui détermine le coefficient 1.96 dans la formule ci-dessus. « P » étant a priori inconnu, on choisit pour le calcul le pire des cas en terme d'incertitude absolue, à savoir $P=0.5$ (toute proportion plus faible ou plus élevée sera estimée avec plus de précision absolue, mais pas relative).

Exemple : Pour déterminer la ou les espèces présentes dans un échantillon inconnu, broyer et déposer 2 femelles par puits et faire 2 gels de 12 puits. On aura au total : $2 \times 12 \times 2 = 48$ femelles testées.

Avec $e = 1,96 \sqrt{\frac{0.25}{48}} = 0.141$ $n=48$, on obtient 0.141 soit une erreur de l'ordre de 14 %.

Cette vérification est facilement réalisable techniquement et les résultats donneront une idée représentative des espèces présentes dans l'échantillon inconnu. Toutefois, l'erreur de 14 % indique que dans le cas d'un suivi temporel, une variation de l'ordre de 14 % ou moins ne sera souvent pas détectée par ce protocole.

Si on quadruple n , on obtient $e = 1,96 \sqrt{\frac{0.25}{192}} = 0.07$. On voit que pour diviser e par deux, il faut multiplier n par quatre, ce qui rend techniquement complexes les suivis de grande précision.

Si on veut savoir quelle est la probabilité de détecter une espèce rare avec ce protocole (sans se poser la question de la précision de l'estimation de sa proportion, mais simplement en voulant savoir si elle va être détectée au moins une fois), on doit se rapporter aux calculs du protocole précédent : une espèce représentant 1 % de la population totale serait détectée dans seulement 38.3 % des cas, et une espèce représentant 5 % de la population totale serait détectée dans 91 % des cas. Comme expliqué dans 4 a/, l'hétérogénéité des femelles en mélange dans chaque puits pourra conduire à des confusions en fonction des espèces présentes en mélange. Pour l'interprétation des profils estérasiqes se référer au point 11.

5. Prélèvement des femelles à identifier

L'identification des espèces est réalisée à partir de femelles de nématodes prélevées sur les racines des plantes infectées. Les femelles de nématodes en forme de poire sont relativement faciles à localiser car elles sont situées à l'intérieur des galls. Il faut dans un premier temps bien nettoyer les racines à l'eau pour éliminer le sol et l'humus. Un contrôle à la loupe binoculaire permettra de confirmer la présence de galls (début des pontes pour avoir de très jeunes femelles à extraire). Pour faciliter la dissection des racines et le prélèvement des femelles, il est conseillé :

- soit de congeler les racines à -20°C pendant 1 heure minimum et de les décongeler à température ambiante, ceci aura pour conséquence de fragiliser les tissus racinaires et permettra de « décrocher » plus facilement les femelles de nématodes (Figure 1) ;
- soit d'incuber les racines dans un mélange pectinex/celluclast à 30 % dans un tube de 50 mL une nuit à 20°C sous agitation (pas d'agitateur magnétique). Cette étape optionnelle est surtout recommandée lorsque le nombre de femelles à prélever est important. En effet, il permet la digestion des tissus végétaux et donc la « libération » des femelles coincées dans les racines. Le prélèvement des nématodes se fera en versant le contenu du tube dans une grande boîte de pétri et en les « pêchant » directement avec un pinceau.

Préparation du mélange Pectinex/Celluclast:

- Pectinex 20 % soit 20 mL
- Celluclast 40 % soit 40 mL
- qsp eau distillée 100 mL
- ajuster à pH 5,8
- conserver à 4°C

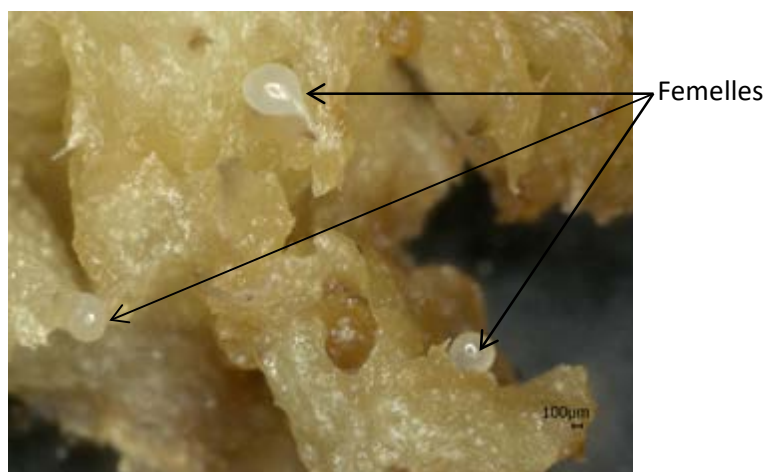


Figure 1 Dissection d'une racine de tomate pour récolter les femelles de *Meloidogyne* et identifier l'espèce

6. Préparation des échantillons

a/ Ancienne méthodologie

Les premières étapes du protocole décrites dans les publications de Dalmasso & Bergé (1978) et Esbenshade & Triantaphyllou (1985) consistaient :

- 1/ à déposer à l'aide d'une seringue et au fond d'un tube à hématocrite de diamètre 1.1 mm quelques microlitres d'un tampon constitué de sucre et d'un peu de détergent ;
- 2/ à prélever les femelles de nématodes ;
- 3/ à les déposer au fond du tube à hématocrite de très faible diamètre (cette manipulation est techniquement difficile et présente un grand risque d'endommager les femelles). Les tubes à hématocrite ainsi préparés (Figure 2) pouvaient être stockés plusieurs semaines à -20°C.

Cette première étape de récolte et de conservation des femelles était extrêmement délicate, chronophage et nécessitait un tour de main spécifique.

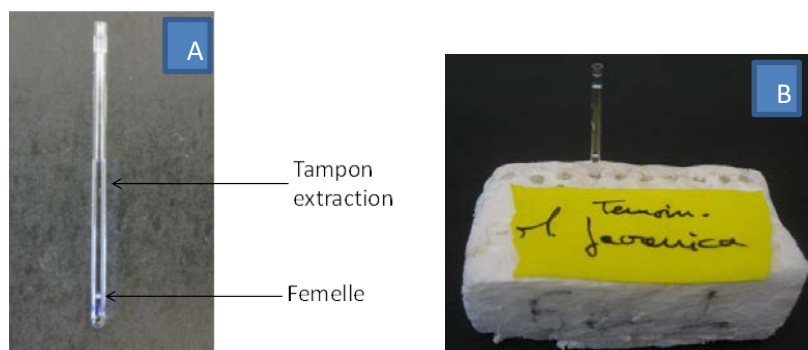


Figure 2 A/ Tube à hématocrite dans lequel ont été déposés 12µl de tampon d'extraction et 1 femelle de *Meloidogyne*. B/ Tube à hématocrite sur support en polystyrène pour stockage à -20°C

b/ Nouvelle méthodologie « simplifiée »

Les trois étapes fastidieuses et délicates de l'ancienne méthode peuvent être évitées grâce à ce nouveau protocole qui permet d'alléger l'expérimentation afin de gagner un temps précieux. Parmi les femelles visibles dans l'échantillon, il est important de prélever les femelles blanches car ce sont de jeunes femelles riches en matériel enzymatique. Il est important d'éviter de prélever les femelles translucides qui sont vidées de leur contenu et qui ne donneront pas de profil électrophorétique. Les femelles sont extrêmement petites (diamètre inférieur à 0.5 mm). Pour faciliter leur manipulation, il est conseillé de placer sous la coupelle, capsule ou la plaque de verre, un fond noir de manière à bien visualiser les petites femelles blanches. En fonction du « timing » de l'expérimentation et du moment à laquelle sera réalisée l'électrophorèse, les nématodes seront « pêchés » et déposés :

- soit dans une petite capsule ou coupelle en verre contenant quelques centaines de microlitres d'eau (si l'électrophorèse n'est pas réalisée dans la même demi-journée que les prélèvements de femelles). A ce stade, la capsule/coupelle en verre contenant les femelles peut être recouverte de parafilm pour être stockée au congélateur à -20°C pendant quelques semaines (Figure 3) ;
- soit sur une plaque en verre d'environ 20X20cm de manière à avoir suffisamment de places pour broyer chaque femelle(s) et pour que tous les dépôts soient bien isolés (au verso de la plaque, faire un quadrillage avec un marqueur fin pour individualiser de manière claire les différents échantillons) (Figure 4). Les femelles seront alors déposées dans une goutte d'eau suffisamment importante pour qu'à aucun moment les femelles ne puissent se dessécher.

Il est conseillé de prévoir des femelles de *Meloidogyne javanica* comme témoin positif.

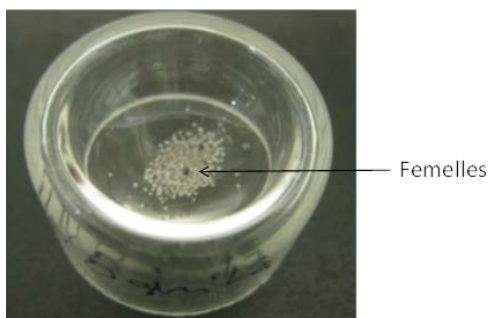


Figure 3 Coupelle en verre contenant de l'eau dans laquelle ont été déposées de nombreuses femelles de *Meloidogyne* (congélation possible des échantillons à ce stade)



Figure 4 Plaque de verre quadrillée pour dépôts et broyage rapide des femelles

7. Préparation des gels de polyacrylamide

Préparer le tampon d'extraction des estérases dans lequel seront broyées les femelles.

Préparer les gels d'acrylamide suivants (le volume final de gel est à ajuster en fonction de la taille des gels) :

a/ Gel de migration à 7.5% acrylamide

Pour 2 gels de 15x15 cm, 55 mL au total :

| | |
|--------------------------------|----------|
| - solution mère d'acrylamide : | 13.75 mL |
| - eau : | 27.5 mL |
| - 1.5 M tris pH8.8 (sol A) : | 13.75 mL |
| - APS 10% : | 220 µL |
| - Temed : | 50 µL |

Couler le gel de migration jusqu'en dessous du bas des dents du peigne et recouvrir le gel d'une pellicule d'eau pour obtenir un front de migration bien droit.

NB: le front du gel a toujours tendance à baisser lors de sa polymérisation il faut donc en tenir compte et couler le gel 2 à 3 mm de plus pour anticiper sa « rétractation ». Laisser polymériser pendant 30 min environ.

b/ Gel de concentration à 3% acrylamide

Pour 2 gels de 15x15 cm, 16 ml au total :

| | |
|--------------------------------|---------|
| - solution mère d'acrylamide : | 1.7 mL |
| - eau : | 10.3 mL |
| - 0.5 M tris pH6.8 (sol B) : | 4 mL |
| - APS 10% : | 65 µL |
| - Temed : | 24 µL |

Éliminer l'eau de la phase supérieure du gel par retournement et si besoin en utilisant un papier absorbant. Couler le gel de migration et glisser un peigne entre les plaques. Compter 30 min à 1h de polymérisation. Retirer les peignes. Positionner les plaques dans la cuve remplie de tampon cuve 1X (Figure 5).

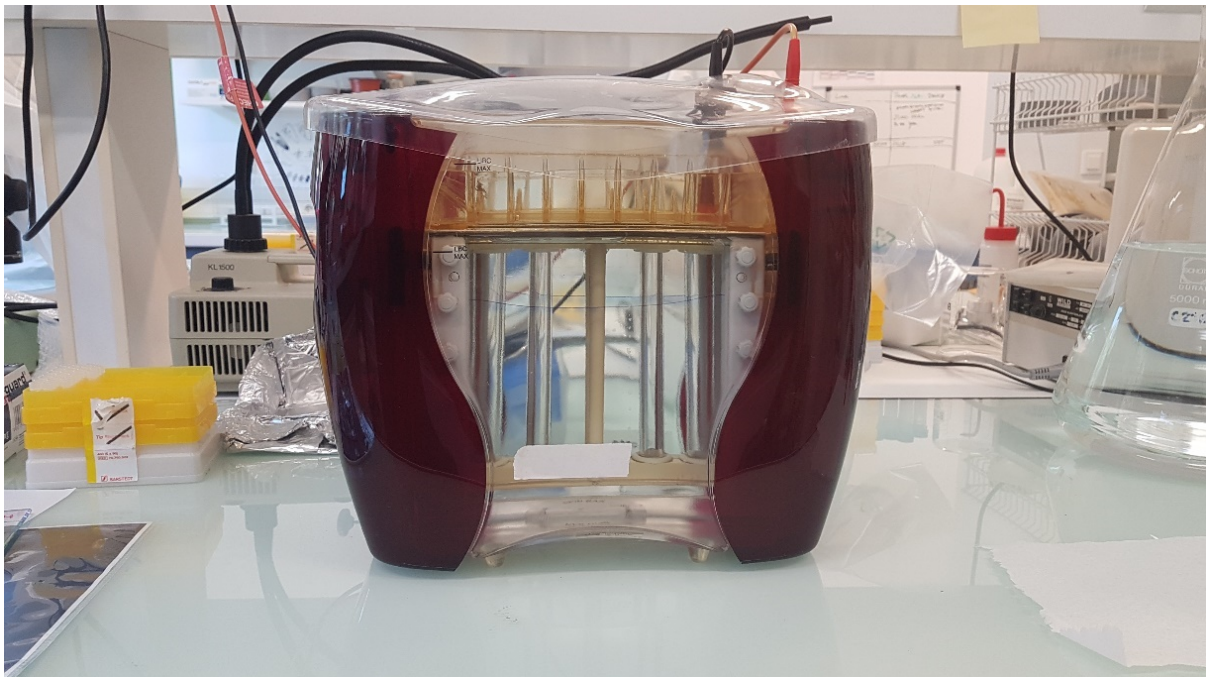


Figure 5 Cuve à électrophorèses verticales Bio-Rad pour grands gels

8. Dépôt des échantillons

Une bonne organisation est nécessaire avant de commencer les dépôts. Il faut avant tout préparer le matériel : pinceau pour prélever les femelles, petites spatules pour les broyer, béccher rempli d'alcool pour nettoyer les spatules entre chaque dépôt, essuie-tout pour sécher les spatules, micro-pipette de 20 μ L pour déposer le tampon d'extraction mélangé au bleu de bromophénol (1mg/mL), plaque de verre quadrillée placée sur un fond noir, les femelles de *Meloidogyne* à déterminer et les femelles de *Meloidogyne javanica* (témoin facultatif). Préparer une solution de tampon d'extraction + bleu de bromophénol (environ 500 μ L de tampon d'extraction + 50 μ L de bleu). Sur la grande plaque de verre, déposer la femelle de nématode à déterminer accompagnée d'une micro-goutte d'eau souvent présente sur le pinceau (pour éviter que la femelle ne sèche et que les enzymes se dégradent). Prélever 12 μ L du mélange tampon d'extraction + bleu de bromophénol dans le cône de la micro-pipette. Le volume de tampon peut être augmenté, il est limité au volume de tampon que peut contenir un puits du gel. Eliminer l'eau autour de la femelle (s'il en reste) et broyer la 1^{ère} femelle, déposer immédiatement sur la femelle broyée le mélange tampon + bleu, bien mélanger à la pipette par quelques aspirations et relargage du mix. Prélever la totalité de ce broyat et charger le tout dans le 1^{er} puits du gel d'acrylamide. Rincer la spatule à l'alcool entre chaque femelle broyée et bien la sécher. Procéder de la sorte pour tous les puits du gel sans oublier de noter l'ordre des dépôts et de déposer quelques femelles de *M.javanica* (témoin recommandé pour faciliter l'interprétation du gel).

9. Migration sur gel d'électrophorèse

La migration sur gel d'électrophorèse est réalisée dans du tampon cuve 1X (500 mL de tampon 10X pour 5 litres d'eau). Le voltage est fixé à 130 Volts durant 30 minutes puis à 400 volts pour le reste de la période de séparation. L'électrophorèse doit être stoppée lorsque le bleu de bromophénol a migré sur une distance de 10 cm (prévoir entre 3 à 4 h de migration).

NB : La migration peut éventuellement être raccourcie (distance de migration du bleu de bromophénol inférieure à 10 cm). Dans ce cas, le **témoin *M. javanica*** n'est plus optionnel, il devient **obligatoire** pour permettre l'interprétation des résultats par comparaison des profils obtenus avec les 3 bandes spécifiques de *M.javanica*

10. Révélation des profils estérasiques

En fin de migration, décoller les plaques de verre et immerger le gel dans du tampon de révélation composé de :

| | |
|----------------------------------|--------|
| - tampon phosphate 0.1 M pH7.2 : | 192 ml |
| - colorant : | 4 ml |
| - substrat : | 4 ml |

(pour 2 gels).

La qualité de la coloration est meilleure en procédant en 2 étapes (sous sorbonne de préférence car émanations d'acétone) :

1/ mettre la moitié du colorant, recouvrir le récipient d'une feuille de papier aluminium et placer le tout sous agitation rotative. Lorsqu'un dépôt noir se forme à la surface, éliminer le colorant. Rincer délicatement les gels à l'eau courante.

2/ bien éliminer l'eau de rinçage puis verser la deuxième partie du colorant. Après révélation des phénotypes estérasiques, rincer délicatement les gels avec l'eau du robinet. Pour conserver les gels, les laisser tremper dans une solution (3/1 de glycérol + eau distillée). Après 24h de trempage environ, placer les gels entre 2 transparents. Scotcher sur les côtés hermétiquement.

Pour comparer les phénotypes estérasiques, on se base sur le ratio de migration relative (RM) par rapport au front du bleu de bromophénol (Tableau 1 et Figure 6).

Tableau 1 : Rm (cm) des différentes bandes (Pais, 1989; Esbenshade, 1985)

| N° bande | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N |
|----------|------|-----|------|---|------|-----|-----|-----|------|---|------|------|------|------|
| Rm (cm) | 2,99 | 3,7 | 3,77 | 4 | 4,16 | 4,2 | 4,6 | 4,7 | 4,94 | 5 | 5,33 | 5,45 | 5,63 | 5,89 |

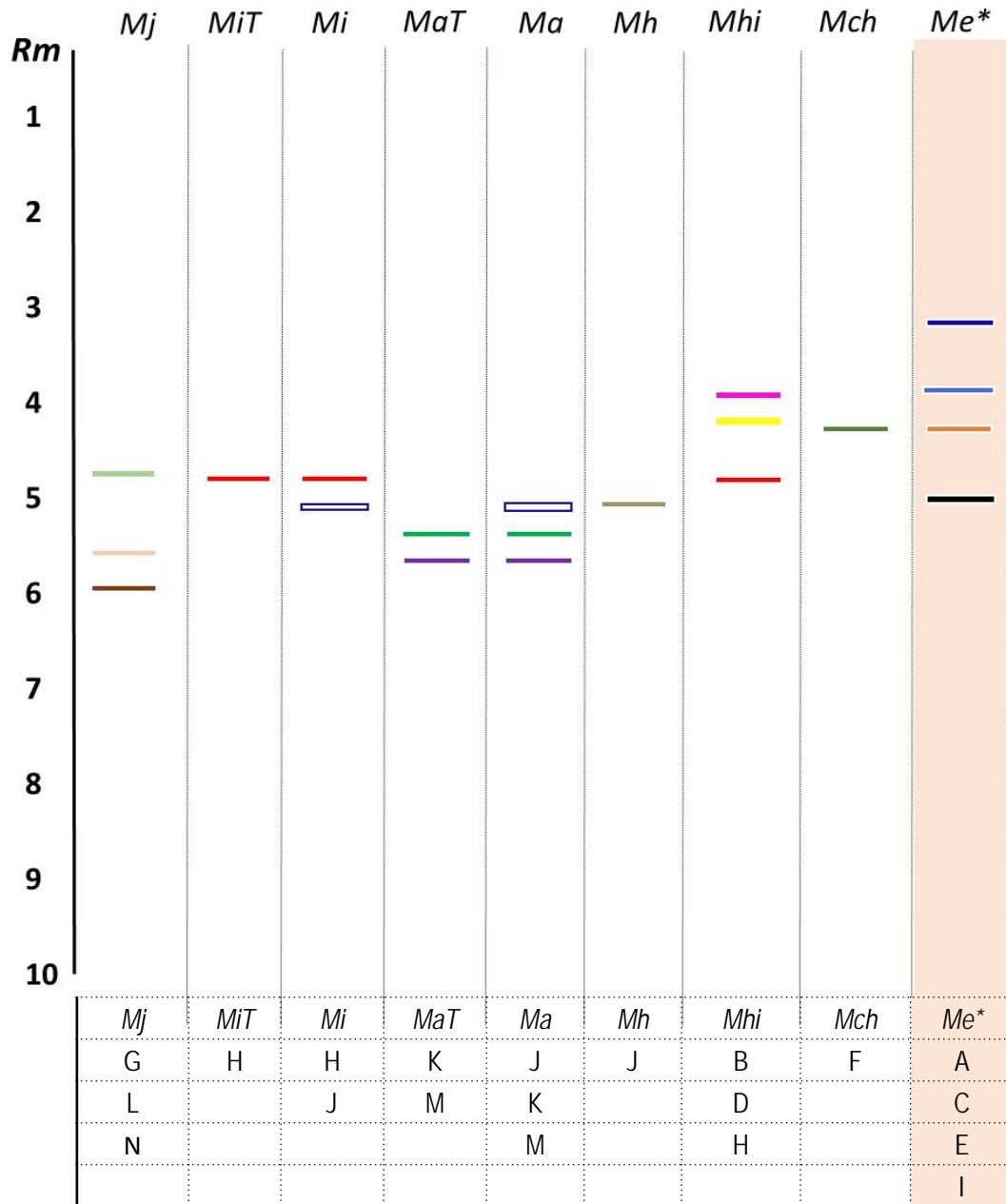


Figure 6 Représentation schématique des phénotypes estérasiques de *Meloidogyne*. *Mj* = *M. javanica*, *MiT* = *M. incognita* type, *Mi* = *M. incognita*, *MaT* = *M. arenaria* type, *Ma* = *M. arenaria*, *Mh* = *M. hapla*, *Me* = *M. enterolobii*, *Mch* = *M. chitwoodi*, *Mhi* = *M. hispanica*; *Mi** et *Ma** ont en commun la bande facultative J (Rm=5) qui est peu spécifique et absente chez *MiT* et *MaT*; *Me**: Dans Ibrahim (1993), le front de migration du bleu de bromophénol est inférieur aux 10 cm de migration qui permettent de déterminer le Rm. Sur cette figure, la position des bandes de *M. enterolobii* a donc été recalculée pour les localiser dans la figure à l'échelle correcte.

: Bande plus faible et/ou optionnelle

11. Interprétation des profils estérasiqes

Comme expliqué précédemment, pour comparer les phénotypes estérasiqes, on se base sur le ratio de migration relative (Rm) par rapport au front du bleu de bromophénol (Tableau 1 et Figure 6). En fonction des espèces présentes en mélange, il faut vérifier que les profils estérasiqes puissent se superposer et ne soient pas masqués par les bandes d'un autre profil. En effet, l'interprétation des profils estérasiqes peut être faussée lorsque :

- *M. incognita* est en mélange avec *M. javanica* et/ou avec *M. hispanica* : la bande spécifique de *M. incognita* (bande H, Rm : 4.7) serait masquée par la ou les bandes de *M. javanica* (bande G, Rm : 4.6) et/ou de *M. hispanica* (bande H, Rm : 4.7) ;
- *M. hapla* est en mélange avec *M. arenaria* et/ou *M. incognita* : la bande spécifique de *M. hapla* (bande J, Rm : 5.0) pourrait être masquée par la bande (facultative) de *M. arenaria* et/ou par la bande (facultative) de *M. incognita* (bande J, Rm : 5.0).
- *M. chitwoodi* est en mélange avec *M. hispanica* et/ou *M. enterolobii* : la bande spécifique de *M. chitwoodi* (bande F, Rm : 4.2) serait masquée par la ou les bandes de *M. hispanica* (bande D, Rm : 4.0) et/ou *M. enterolobii* (bande E Rm : 4.16).

Si l'échantillon testé est susceptible de contenir un mélange entre ces différentes espèces de *Meloidogyne* et si après vérification les profils peuvent se superposer, il est alors nécessaire de déposer 1 seule femelle par puits. En testant individuellement les femelles, le nombre de gels à réaliser sera plus important et l'expérimentation sera donc plus longue, mais les résultats seront fiables et représentatifs des espèces de *Meloidogyne* présentes en mélange dans l'échantillon.

Résultats et exemple d'application

La détermination d'espèces de *Meloidogyne* par révélation des profils estérasiqes a longtemps été effectuée en testant **individuellement** les femelles de nématodes. Le nouveau protocole a tout d'abord été testé de cette façon (Figure 7) : le broyat d'une femelle de *Meloidogyne* a été déposé dans chaque puits pour valider les profils estérasiqes de *M. javanica*, *M. arenaria* et *M. incognita*. Les résultats obtenus sont conformes aux attentes puisque :

- le phénotype de *M. javanica* est constitué des 3 bandes G,L,N (Rm : 4.6 ; 5.45 et 5.89) ;
- le phénotype de *M. arenaria* est constitué des 2 bandes K et M (Rm : 5.33 et 5.63). A noter sur ce gel l'absence de la bande facultative J (Rm : 5.0) qui est parfois liée au phénotype de *M. arenaria* ;
- le phénotype de *M. incognita* est constitué d'une bande majeure et spécifique (H) et d'une bande de faible intensité parfois présente chez certains *M. incognita* (J) (Rm : 4.7 et 5.0).

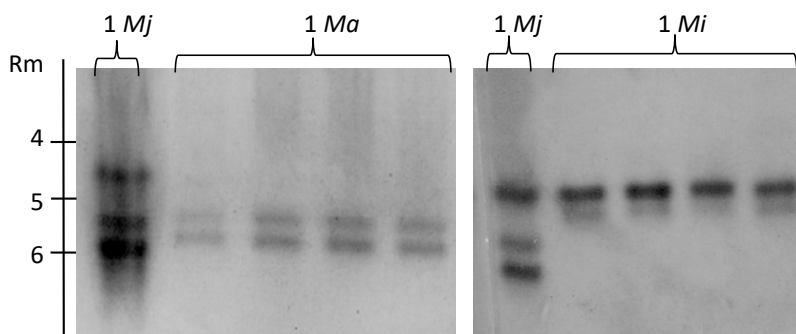


Figure 7 Profils estérasiqes de *M. javanica* (Mj), *M. arenaria* (Ma) et *M. incognita* (Mi) provenant de la collection de l'INRA de Sophia-Antipolis. Broyage et dépôt d'une femelle de nématode par puits.

Le gel de la figure 8 illustre la **différence de profils estérasiques** entre les espèces de *M. incognita* et *M. hapla* :

- les deux premiers échantillons sont des témoins *M. javanica*. Ils sont conformes au profil attendu pour cette espèce (3 bandes Rm : 4.6 ; 5.45 et 5.89).
- suivent ensuite 8 dépôts de femelles de *Meloidogyne* prélevées sur salades dans un site expérimental et testées individuellement. Le profil phénotypique est celui de *M. incognita* : 1 bande majoritaire spécifique à Rm : 4.7 et une très légère bande visible à Rm : 5.0.
- les dépôts suivants correspondent aux dépôts de femelles provenant de la collection de l'INRA de Sophia-Antipolis. *M. incognita* avec Rm : 4.7 (majoritaire) et 5.0 (faible intensité) en alternance avec *M. hapla* bien identifiable avec une bande spécifique et unique à Rm : 5.0.

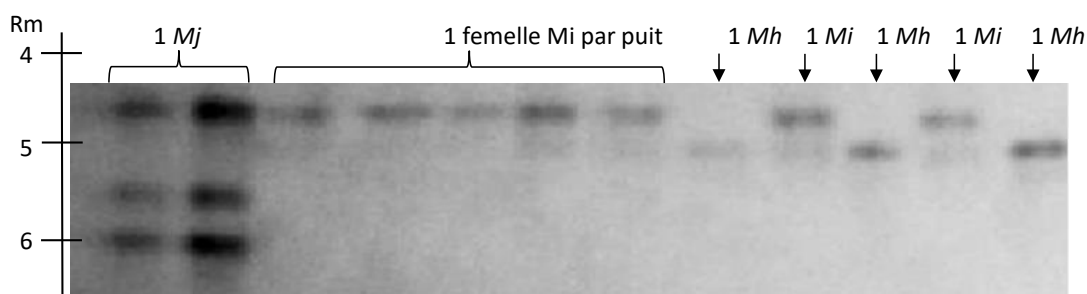


Figure 8 Profils estérasiques de femelles de *Meloidogyne* provenant de salades d'un site expérimental. Témoin *M. javanica* (Mj), *M. hapla* (Mh), *M. incognita* (Mi) provenant de la collection INRA Sophia. Broyage et dépôt d'une femelle de nématode par puits.

Pour tester la **sensibilité de la technique** de détermination d'espèces de *Meloidogyne* par révélation des estérases, **des femelles de *M. arenaria* et *M. incognita* ont été mélangées dans différentes proportions** :

- le premier puits du gel de la figure 9 correspond au témoin *M. javanica*. Les 3 bandes révélées G,L,N sont à la taille attendue Rm : 4.6 ; 5.45 et 5.89.
- le mélange du broyat d'une femelle de *M. arenaria* et d'une femelle de *M. incognita* a été déposé dans les deux puits suivants, on observe les deux bandes K et M (Rm : 5.33 et 5.63) spécifiques de *M. arenaria* et la bande H spécifique de *M. incognita* à Rm : 4.7 apparaît très légèrement. Cet exemple dans lequel la bande de *M. incognita* est très faible permet d'illustrer le fait qu'il est important de choisir des femelles jeunes et de bonne qualité (femelles bien blanches et bien pleines) pour que les enzymes révélées soient riches et qu'une bande intense apparaisse sur le gel.
- dans les deux puits suivants, le mélange du broyat d'une femelle de *M. arenaria* et de cinq femelles de *M. incognita* a été déposé dans chaque puits. On observe les deux bandes K et M (Rm : 5.33 et 5.63) spécifiques de *M. arenaria* et la bande H de *M. incognita* à Rm : 4.7 apparaît nettement.
- dans le puits suivant a été déposé le mélange du broyat d'une femelle de *M. arenaria* et de dix femelles de *M. incognita*. On observe clairement les bandes K et M (Rm : 5.33 et 5.63) spécifiques de *M. arenaria* et la bande H de *M. incognita* à Rm : 4.7.
- le test de sensibilité a été poursuivi en déposant dans les deux puits suivants le mélange du broyat d'une femelle de *M. arenaria* et de quinze femelles de *M. incognita*. On observe la présence des même bandes K et M (Rm : 5.33 et 5.63) spécifiques de *M. arenaria* et la bande H de *M. incognita* à Rm : 4.7.
- dans les deux derniers puits du gel, le mélange du broyat d'une femelle de *M. arenaria* et de vingt femelles de *M. incognita* a été déposé. On observe les deux bandes K et M (Rm : 5.33 et 5.63) spécifiques de *M. arenaria* et la bande H de *M. incognita* à Rm : 4.7. On peut noter une nette différence d'intensité entre les profils estérasiques de *M. arenaria*. Les bandes L et N sont plus ou moins intenses mais elles apparaissent cependant

à chaque fois malgré le fait qu'elles soient très « diluées » dans le mélange (1 seule femelle de *M. arenaria* dans un mélange de 21 femelles au total). Comme expliqué précédemment, cette différence d'intensité est liée à la « qualité » des enzymes présentes dans chaque femelle.

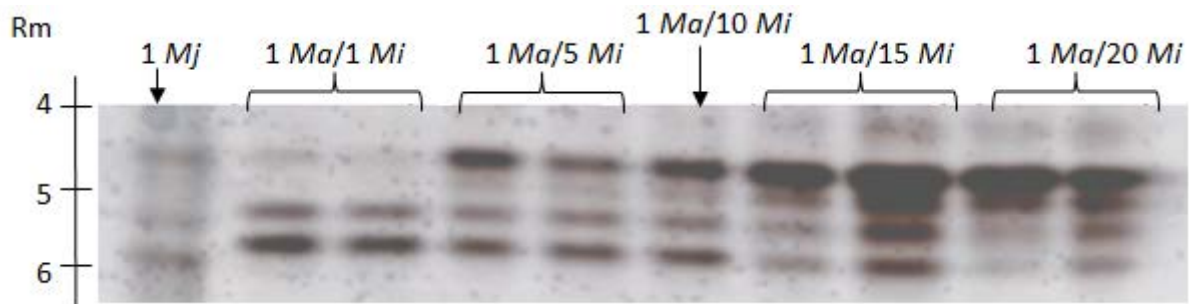


Figure 9 Test de la sensibilité de la technique des électrophorèses d'estérases de nématodes. Une femelle de *M. arenaria* a été déposée dans chaque puits en mélange avec un ou plusieurs *M. incognita*. Le ratio 1 Ma/1 Mi correspond à 1 femelle de *M. arenaria* avec 1 femelle *M. incognita* ; les suivants correspondent aux ratios 1 Ma/5 Mi, 1 Ma/10 Mi, 1 Ma/15 Mi et 1 Ma/20 Mi. Témoin *M. javanica* (Mj) provenant de la collection INRA Sophia.

Conclusion et perspectives

Le protocole d'identification des espèces de *Meloidogyne* par électrophorèse d'estérases décrit dans cet article est nettement **plus simple et plus rapide** à mettre en œuvre que celui précédemment décrit par Dalmasso & Bergé (1978) et Esbenshade & Triantaphyllou (1985).

Pour **optimiser cette technique**, il est important de définir le cadre et l'objectif de l'expérimentation :

- a-t-on une idée de l'espèce recherchée ?
- est-elle la seule espèce « attendue » (vérification de collection) ou peut-elle être en mélange (échantillon du terrain) ?
- si des espèces sont en mélange, l'objectif est-il de poursuivre l'identification pour évaluer les proportions entre chaque espèce afin d'étudier (par exemple) l'évolution des proportions du mélange en fonction des itinéraires techniques et/ou des rotations culturales ?
- quelle est la précision attendue : vérification de la pureté d'une collection (cas 1) ou détermination d'espèces dans un échantillon inconnu (cas 2) ? Ces deux cas sont différents et la démarche aussi : dans un cas l'objectif est de tester un effectif important pour tenter de mettre en évidence un évènement rare (un nématode « contaminant »). Dans l'autre cas, il s'agit de tester un effectif plus petit pour avoir une idée plus « approximative » sur l'espèce présente ou les espèces en mélange.

Nous avons montré dans cet article que la technique d'identification des espèces de *Meloidogyne* par électrophorèse d'estérases est **suffisamment sensible pour révéler une femelle « contaminante » dans un mélange de 21 femelles au total**. Lorsqu'elle peut être appliquée, elle permet donc de tester un effectif important sans avoir à multiplier le nombre d'électrophorèses à réaliser. Avant sa mise en œuvre, cette stratégie doit cependant être « réfléchie » : il faut vérifier que les profils estérasiques puissent se superposer sans masquer le profil d'une autre espèce de *Meloidogyne*.

D'autres expérimentations, réalisées dans le cadre du projet Gedunem (Métaprogramme SMACH), ont permis de valider l'utilisation d'une autre stratégie pour suivre l'évolution spatio-temporelle de deux espèces de nématodes présentes en mélange dans un site expérimental. L'objectif était d'étudier sur plusieurs années i/ l'évolution des proportions du mélange d'espèces entre *M. incognita* et *M. arenaria* ; ii/ l'effet des rotations culturales sur les

proportions de ce mélange d'espèces. Pour limiter le nombre d'électrophorèses à réaliser, deux femelles ont été déposées dans chaque puit. L'interprétation des profils consistait à observer puits par puits les profils estérasiques :

- s'il correspondait uniquement à celui de *M. incognita* : 2 femelles de *M. incognita* étaient comptabilisées dans l'interprétation ;
- s'il correspondait uniquement à celui de *M. arenaria* : 2 femelles de *M. arenaria* étaient comptabilisées.
- s'il correspondait à la superposition des profils estérasiques de *M. incognita* et *M. arenaria*, 1 femelle de chaque espèce était comptabilisée ;

Cette stratégie s'est révélée efficace et a donc permis d'optimiser le nombre de dépôts sur gel en testant deux fois plus d'individus dans un même nombre de puits.

A noter cependant que si l'échantillon est totalement inconnu, il est conseillé dans un 1^{er} temps de déterminer le profil estérasique d'1 seule femelle déposée dans chaque puits pour identifier les profils et observer s'ils peuvent ou non être étudiés en mélange. Dans tous les cas de figure, les modifications de la procédure décrites dans cet article permettront de gagner un temps précieux. En effet, l'ancien protocole était chronophage et nécessitait beaucoup de patience et de technicité.

Références bibliographiques

Blanc-Mathieu R, Perfus-Barbeoch L, Aury J-M, Da Rocha M, Gouzy J, Sallet E, et al. (2017) Hybridization and polyploidy enable genomic plasticity without sex in the most devastating plant-parasitic nematodes. *PLoS Genetics* **13**(6): e1006777. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006777>

Dalmasso A, Bergé JB (1978) Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. *Journal of Nematology* **10**(4): 323-332.

Esbenshade PR, Triantaphyllou AC (1985) Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* **17**(1): 6-20.

Esbenshade PR, Triantaphyllou AC (1987) Enzymatic relationships and evolution in the genus *Meloidogyne*. *Journal of Nematology* **19** (1): 8-18.

Pais CS, Abrantes IM (1989) Esterase and malate dehydrogenase phenotypes in Portuguese populations of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* **21**(3): 342-346.

Randig O, Bongiovanni M, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P (2002) Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR marker specific for the coffee damaging species. *Genome* **45**(5): 862-870.

Said KI, Perry RN (1993) Use of esterase patterns of females and galls roots for the identification of species of *Meloidogyne*. *Fundamental and Applied Nematology* **16**(2): 187-191

Zijlstra C (2000) Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology* **106**(3): 283-290.

Zijlstra C, Donkers-Venne T H M, Fargette M (2000) Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* **2**(8): 847-853.