

GENETIQUE FORMELLE D'UN LOCUS D'ISOENZYMES D'ESTERASES CHEZ *Aedes POLYNEISIENSIS* MARKS

par

A. J. SILBERSTEIN

Département de Zoologie Médicale, Institut de Médecine Tropicale,
Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique

Résumé — Différents écotypes larvaires de *Aedes polynesiensis* sont connus. Les zymogrammes d'isoenzymes d'estérase des larves pupes et imagos de *Aedes polynesiensis* « trou de rocher » ont été obtenus. La génétique formelle d'un des loci a été établie : l'*Est-2* est un locus autosomique à 2 allèles codominants codant 3 alloenzymes, *Est-2-0,69* et *Est-2-0,63*, qui se manifestent par 3 phénotypes (l'hétérozygote et les 2 homozygotes). Ces alloenzymes seront utilisés comme marqueurs dans des expériences comparatives et de croisements avec les autres écotypes.

KEYWORDS : *Aedes polynesiensis*; Isoenzymes; Genetics, Biochemical.

Introduction

L'application de nouvelles techniques d'investigations au cours de ces dernières décennies a montré que des espèces, que l'on considérait comme des entités bien définies, formaient en fait des complexes d'espèces. C'est le cas par exemple pour *Anopheles gambiae* et *Simulium damnosum*, des vecteurs très importants sur le plan médical. Les techniques, mises en œuvre pour séparer ces espèces jumelles, comprennent notamment la microscopie à balayage, la cytogénétique et les méthodes histobiochimiques. Parmi ces dernières, les plus utilisées sont les réactions immunologiques, les études par électrophorèse des protéines totales ou hémolymphatiques et les mises en évidence par électrophorèse des isoenzymes.

Dans une même espèce (animale ou végétale), il existe des enzymes dont la fonction est identique mais qui ont une constitution moléculaire protéiques différente. Le « Report Commission on Enzymes » (1961) a donné à ces enzymes le nom d'isoenzymes ou isozymes. Ces différentes protéines enzymatiques portent chacune une charge électrique nette différente qui est responsable du degré de rapidité de migration de cette protéine en milieu électrophorétique. Chacune de ces protéines enzymatiques (ou isoenzymes) est codée par un locus chromosomique. Un tel locus peut être bi-, tri-, multiallélisme. Si par exemple une espèce possède un locus formé de deux allèles codominants, les trois génotypes (les deux homozygotes et l'hétérozygote) coderont les trois phénotypes qui présenteront, en milieu électrophorétique, l'un ou l'autre ou les deux isoenzymes; les isoenzymes codés par les allèles d'un même locus sont appelés alloenzymes ou allozymes (Prakash *et al.*, 1969).

La présente étude est consacrée aux isoenzymes du groupe des estérases de *Aedes polynesiensis* Marks, 1951. Ce moustique est le principal vecteur (Bahr, 1912) de *Wuchereria bancrofti* dans les îles où il sévit (Belkin, 1962) et accessoirement de la dengue (Rosen *et al.*, 1954). Les

gîtes occupés par cette espèce sont très variés : trous de rocher, d'arbre et de crabe, récipients naturels et artificiels. Rosen et Rozeboom (1954) ont observé des variations dans la pilosité des larves en rapport avec le type de gîte examiné. En outre, ces écotypes ne s'élèvent pas tous avec la même facilité en laboratoire. L'on peut donc se demander si ces écotypes sympatriques ne représentent pas en fait des espèces différentes. C'est pour tenter de le démontrer que la présente recherche a été entreprise. Rappelons à cet égard que Scott et McClelland (1975), après une étude des isoenzymes de deux écotypes sympatriques de *Aedes aegypti* du Kenya, ont pu conclure qu'un processus de spéciation était en cours.

Le présent travail a permis d'établir la génétique formelle d'un locus d'isoenzymes d'estérases de *Aedes polynesiensis* écotype « trou de rocher ». Ces isoenzymes seront comparés dans un travail ultérieur avec ceux des autres écotypes afin de démontrer éventuellement l'existence d'un complexe d'espèces *Aedes polynesiensis*.

Les isoenzymes de *Aedes polynesiensis* sont encore peu connus. Trebatoski et Haynes (1969) ont étudié des isoenzymes d'espèces appartenant au groupe *scutellaris*, sous-genre *Aedes* (*Stegomyia*), auquel appartient *Aedes polynesiensis*, sans inclure cette dernière espèce. Townson (1969) et Townson *et al.* (1977) ont comparé les protéines et isoenzymes de *Aedes polynesiensis* avec des espèces du groupe *scutellaris*.

Matériel et méthodes

Des œufs de *Aedes polynesiensis* « trou de rocher » ont été envoyés de Paea (Tahiti) au centre O. R. S. T. O. M. de Bondy* et l'élevage qui en émergea (souche PAEA 1) fut poursuivi à l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers. Les larves des quatre stades, les pupes, les imagos femelles et mâles sont homogénéisés individuellement ou par groupe de trois à cinq, dans une goutte d'eau désionisée. Les couples parentaux et leurs descendance ont également été étudiés. Chaque homogénat est absorbé par un morceau de papier-filtre Whatman n° 3 et ceux-ci placés dans une fente pratiquée au travers d'un gel d'amidon (Smithies, 1955) de 11 à 12 p. cent. Les solutions tampons (Selander *et al.*, 1971) pour la dilution de l'amidon (laboratoire Connaught) et ceux dans les bacs des électrodes sont constitués de TRIS-base (Sigma) et d'acide citrique. Un courant de 5 volts par cm de gel est maintenu pendant 6 heures. Du bleu de bromophénol témoigne de la progression du front de migration. Le gel est ensuite (Pasteur et Sinègre, 1975) préincubé 25 minutes dans une solution tampon 0,1 M de phosphate disodique et phosphate monopotassique, qui est renouvelée avant l'addition du substrat de l'enzyme, composé d'une solution de 0,5 p. cent d'alpha- et de 0,5 p. cent de bêta-naphtyl-acétate (laboratoire Serva) en acétone et eau. Après 15 minutes, le gel est saupoudré de 150 mg de Fast Garnett GBC salt (Serva). Après 45 à 60 minutes de coloration, le gel est fixé par une solution de méthanol (50 p. cent) et d'acide acétique glacial (10 p. cent). Du sulfate d'éserine (Sigma) et du chlorpyrifos (un insecticide organophosphoré de Dow Chemical, Procida) ont été utilisés pour essayer de classer les estérases mises en évidence.

(*) Entomologie médico-vétérinaire. Office de la Recherche scientifique et technique d'Outre-Mer, 70-74 Route d'Aulnay, F-93140 Bondy (France).

Résultats et discussion

52 gels comportant 504 migrations d'homogénats individuels et 90 migrations d'homogénats de multiples individus ont été réalisés. Ils montrèrent plusieurs groupes d'isoenzymes d'estérases, tous à migration anodique; ils sont schématisés dans la figure 1 avec une tentative de numérotation par locus, le locus *Est-1* étant le plus rapide, donc le plus éloigné de la fente d'insertion des homogénats. Les distances de migrations sont exprimées en Rf, c'est-à-dire le rapport de la distance parcourue par l'isoenzyme sur la distance du front de migration (bleu de bromophénol). Certains de ces loci sont simples (*Est-4-0,38* et *Est-5-0,31*), d'autres complexes (*Est-1-0,89* et *0,83*, *Est-2-0,69* et *0,63*, *Est-3-0,50*, *0,47* et *0,44*).

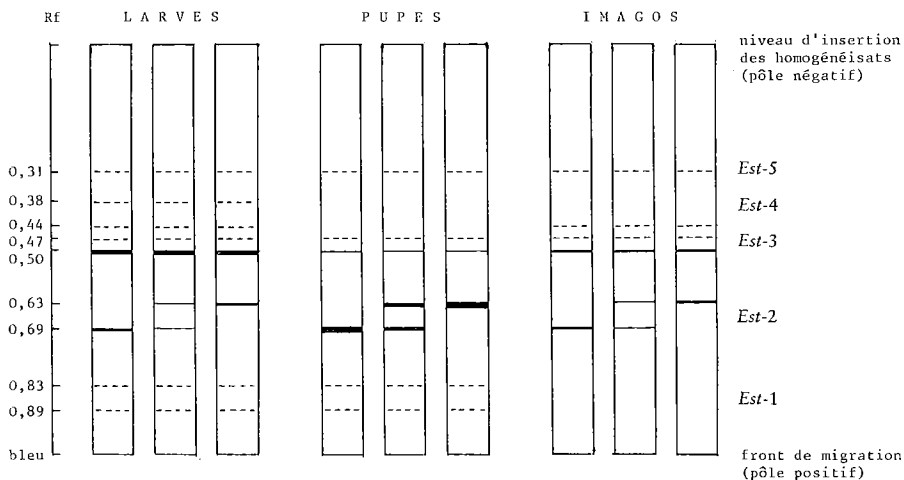


Figure 1

Les isoenzymes estérasiques de *Aedes polynesiensis* « trou de rocher » sont schématisés pour chacun des stades de développement. Notez les trois phénotypes des alloenzymes *Est-2*. Les bandes inconstantes sont en pointillés.

Les *Est-5-0,31* et *Est-3-0,47* se manifestent de façon inconstante mais à tous les stades; *Est-4-0,38* n'a été observé que chez les larves; le complexe *Est-1* n'a pas été mis en évidence chez les imagos tandis que l'*Est-3-0,44* est absente chez les pupes. L'isoenzyme *Est-3-0,50* est constamment présent et à tous les stades, avec cependant une intensité de coloration plus forte chez les larves chez qui, après 1 à 5 minutes, apparaît une bande pourpre, témoin de l'action hydrolytique de l'enzyme aussi bien pour l'alpha-naphtyl-acétate (produit de l'hydrolyse coloré en bleu) que pour le bêta-naphtyl-acétate (produit rouge). Chez les pupes, cette coloration est rouge-pourpre et chez les imagos, chez qui elle n'apparaît qu'après 15 à 20 minutes, rouge.

A tous les stades de développement et également de façon constante sont apparus trois phénotypes (figure 2) au niveau du locus *Est-2* : deux phénotypes avec une bande (*Est-2-0,69* ou *Est-2-0,63*) et un phénotype avec ces deux bandes, toujours colorées en bleu (hydrolyse préférentielle de l'alpha-naphtyl-acétate). Une telle image fut décrite et discutée pour la première fois chez un moustique par Bianchi (1968).

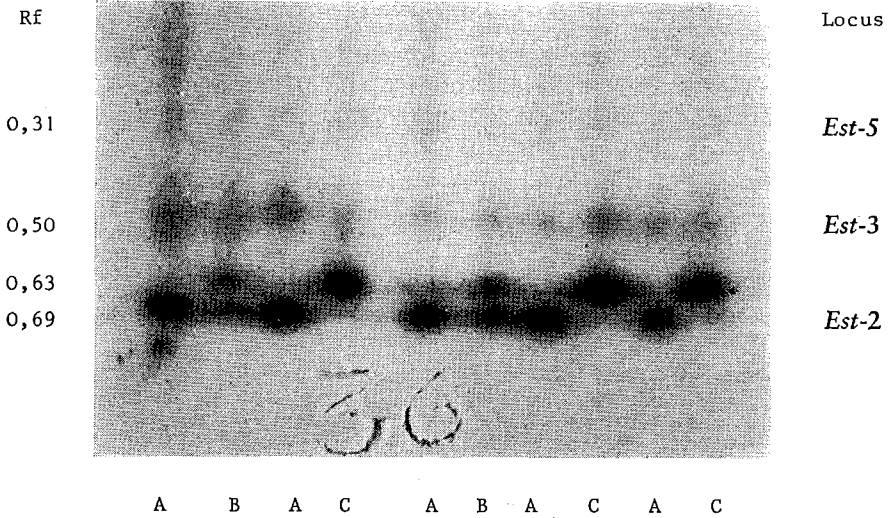


Figure 2

Les trois phénotypes pupaux pour le locus *Est-2* :

A : homozygotes *Est-2-0,69*;

B : hétérozygotes;

C : homozygotes *Est-2-0,63*.

Notez la différence d'intensité de coloration entre une bande homozygote et son homologue chez l'hétérozygote

Pour vérifier l'hypothèse d'un locus biallélique d'estérases chez la présente population de *Aedes polynesiensis* « trou de rocher », des couples furent réunis et les parents et leurs descendances, une partie à chaque stade de développement, étudiés (tableau 1). Tous les isoenzymes des mâles et femelles sont qualitativement identiques; les bandes des mâles sont légèrement moins intensément colorées que celles des femelles (de taille plus grande que les mâles). Les résultats des croisements entre les individus des trois phénotypes montrent une disjonction mendélienne des isoenzymes *Est-2-0,69* et *Est-2-0,63*. Il s'agit donc de deux alloenzymes codés par un seul locus autosomique (*Est-2*) à deux allèles codominants.

Cette conclusion est renforcée par la constatation quantitative suivante : l'intensité de coloration de chaque bande homozygote est la même; les deux bandes de l'hétérozygote ont également la même intensité de coloration mais l'intensité d'une des deux bandes est moindre que celle d'une bande homozygote (voir figures 1 et 2). Cette différence est due au fait que chaque alloenzyme chez l'hétérozygote est synthétisé à une dose tandis que chaque alloenzyme d'homozygote l'est à double dose. Une telle situation a été décrite par Wright (1963) chez *Drosophila melanogaster*.

Des essais de réactions d'inhibitions des estérases ont été faites en ajoutant, à la solution tampon de préincubation et coloration, $2,5 \times 10^{-2}$ M de chlorpyrifos d'une part, 10^{-3} M de sulfate d'ésérine d'autre part. Aucune inhibition ne fut obtenue à aucun des loci : les isoenzymes d'estérases mis en évidence ne sont donc pas des aliestérases (ni des cholinestérases).

Conclusion

Les deux alloenzymes *Est-2-0,69* et *Est-2-0,63* de *Aedes polynesiensis* écotype « trou de rocher », codés par un locus autosomique à deux allèles codominants, sont utilisables comme marqueurs dans des expériences comparatives et de croisements avec les autres écotypes.

Formal genetics of a locus of esterase isoenzymes in *Aedes polynesiensis* Marks.

Summary — Different larval ecotypes of *Aedes polynesiensis* are known. Zymograms of esterase isoenzymes of larvae, pupae and adults of *Aedes polynesiensis* ecotype « rock-hole » were obtained. The formal genetics of one of the loci were determined: *Est-2* is an autosomic locus with 2 codominant alleles coding 2 alloenzymes, *Est-2-0,69*, and *Est-2-0,63*, which appear as 3 phenotypes (the heterozygote and the 2 homozygotes). These alloenzymes will be used as markers in comparative and intercrossing experiments with the other ecotypes.

Formele genetica van een locus van esterase isoenzymen bij *Aedes polynesiensis* Marks.

Samenvatting — Verschillende larve ecotypen van *Aedes polynesiensis* zijn gekend. Zymogrammen van esterase isoenzymen van larven, poppen en volwassenen van *Aedes polynesiensis* ecotype « rotsholte » werden bekomen. De formele genetica van één der loci werd opgesteld: de *Est-2* is een autosomisch locus met 2 codominante allelen die 2 alloenzymen codeert: de *Est-2-0,69* en de *Est-2-0,63*, die onder de vorm van 3 fenotypen verschijnen (de heterozygoot en de 2 homozygoten). Deze alloenzymen zullen benut worden als aanduiders in vergelijkende en kruisingsexperimenten met de andere ecotypen.

Reçu pour publication le 31 octobre 1977.

REFERENCES

- Bahr, P. H. (1912) : Researches in Fiji, 1910 : 1 : Filariasis and elephantiasis in Fiji. J. London School trop. Med., Suppl. No. 1, 1-192.
- Belkin, J. N. (1962) : The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, 2, 311.
- Bianchi, U. (1968) : Genetica formale di una proteina dotata di attività catalitica esterasica in *Anopheles stephensi*. Acc. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sc. Fis. Mat. Nat., 45, 192-194.
- Marks, E. N. (1951) : The vector of filariasis in Polynesia : a change in nomenclature. Ann. trop. Med. Parasitol., 45, 137-140.
- Pasteur, N. et Sinègre, G. (1975) : Esterase polymorphism and sensitivity to *Dusban* organophosphorus insecticide in *Culex pipiens pipiens* populations. Biochemical Genetics, 13, 789-803.
- Prakash, S., Lewontin, R. C. et Hubby, J. L. (1969) : A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics, 61, 841-858.
- Report Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, Oxford, 1961.
- Rosen, L. et Rozeboom, L. E. (1954) : Morphologic variations of larvae of the *scutellaris* group of *Aedes* (Diptera, Culicidae) in Polynesia. Amer. J. trop. Med. Hyg., 3, 529-538.
- Rosen, L., Rozeboom, L. E., Sweet, B. H. et Sabin, A. B. (1954) : The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. Amer. J. trop. Med. Hyg., 3, 878-882.
- Scott, J. A. et McClelland G. A. H. (1975) : Electrophoretic differences between sympatric ecotypes. Nature, 256, 405-406.
- Selander, R. K., Smith, M. H., Yang, S. Y., Johnson, W. E. et Gentry J. B. (1971) : Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in Genetics, VI, Univ. Texas Publ. 7103, 49-90.
- Smithies, O. (1955) : Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J., 61, 629-641.
- Townson, H. (1969) : Electrophoretic identification of strains of *Aedes aegypti*. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 63, 19-20.
- Townson, H., Meredith, S. E. O. et Thomas, K. (1977) : Studies of enzymes in the *Aedes scutellaris* group. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 71, 110.
- Trebatoski, A. M. et Haynes, J. F. (1969) : Comparison of enzymes of twelve species of mosquitoes. Ann. ent. Soc. Am., 62, 327-335.
- Whright, T. R. F. (1963) : The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 48, 1717-1726.