

Les isoenzymes et l'Entomologie médicale

Michel TIBAYRENC *

RÉSUMÉ

L'auteur fait le point de nos connaissances actuelles sur les isoenzymes : définition, classification et applications dans le domaine de la zoologie, en particulier en ce qui concerne l'entomologie médicale et la parasitologie, c'est-à-dire les vecteurs et les parasites.

MOTS-CLÉS : Isoenzymes - Electrophorèse - Vecteurs - Parasites - Taxonomie - Systématique.

ABSTRACT

ISOENZYMOLGY AND MEDICAL ENTOMOLOGY

The author gives an account of our actual knowledge of isoenzymes : definition and classification. The use of isoenzymes in zoology, especially in medical entomology and parasitology - i.e. vectors and parasites of human and animal diseases - is emphasized.

KEY WORDS : Isoenzymes - Electrophoresis - Vectors - Parasites - Taxonomy - Systematic.

A peu près inconnues dans notre spécialité il y a 5 ans, les techniques enzymatiques sont maintenant omniprésentes. Elles semblent une nouvelle panacée, à même de trancher en dernier ressort dans une quantité de problèmes délicats. En fait, phénomène souvent observé pour les techniques « à la mode », les bases théoriques du problème ne sont pas toujours abordées avec suffisamment de rigueur, et on voit le champ d'applications soit surestimé, soit sousestimé. Il n'est donc pas inutile de faire le point, bilan tout provisoire, car les choses vont vite dans ce domaine nouveau.

Cette astuce technique a permis la découverte des « isoenzymes », ou « isozymes » (Markert et Møller 1959) : enzymes de même fonction, migrant différemment à l'électrophorèse.

On s'est ensuite aperçu qu'une bonne part de ces isozymes subissait une ségrégation mendélienne simple : ce sont les « alloenzymes », ou « allozymes » (Prakash, Lewontin et Hubby 1969) : isoenzymes codées par des allèles différents d'un même gène. Cette découverte a été une véritable aubaine pour les généticiens des populations et les taxonomistes.

HISTORIQUE

L'électrophorèse des protéines se pratique depuis l'entre-deux-guerres. Le développement de la technique doit beaucoup à la recherche médicale (étude de sérums de malades).

Hunter et Markert (1957) ont appliqué pour la première fois à l'électrophorèse des enzymes les méthodes de coloration histochimique. Ils ont baptisé cette technique : « zymogramme ».

RAPPELS SUR L'ÉLECTROPHORÈSE, ET SON APPLICATION À L'ÉTUDE DES PROTÉINES

Par l'électrophorèse, on étudie la structure chimique d'un corps (ici, d'une protéine) en mesurant sa vitesse de migration dans un milieu-support (amidon, polyacrylamide, agarose, acétate de cellulose) entre les extrémités duquel on a établi une différence de potentiel. Après un temps de migration donné, on révèle la présence de la protéine en faisant intervenir une réaction de coloration

* Entomologiste médical ORSTOM (adresse actuelle : ORSTOM, 70 route d'Aulnay, 93140 Bondy, France).

histochimique. Dans le cas où la protéine étudiée est une enzyme, la réaction spécifique fait appel au substrat propre de l'enzyme (par exemple, le sorbitol pour la sorbitol-déshydrogénase) en même temps qu'à une technique de coloration.

Trois facteurs interviennent dans la vitesse de migration d'un corps : la taille des molécules, leur forme (effet de filtre des mailles du support de migration), mais surtout, charge électrique globale.

La charge électrique globale d'une protéine est la résultante de la charge individuelle des différents acides aminés qui constituent sa séquence de base ou structure primaire. Si deux protéines ont une vitesse de migration électrophorétique différente, cela signifie qu'elles diffèrent par au moins un acide aminé (dans quelques cas, cependant, ce sont les structures tertiaires ou quaternaires qui sont en cause : voir plus loin).

Le dogme de colinéarité des séquences acide aminé-ADN implique que ces deux protéines sont codées par des séquences d'ADN (des gènes) différant par au moins une paire de bases. Ainsi, l'électrophorèse donne des renseignements indirects assez précis sur le génome lui-même. On ne peut imaginer que deux approches plus fines :

- démembrement de la séquence des acides aminés,
- structure de l'acide désoxyribonucléique lui-même.

mais elles sont infiniment plus délicates et coûteuses.

Dans cette perspective d'étude du génome, les carences de l'électrophorèse des enzymes sont les suivantes :

(a) Mutations « muettes »

Certaines modifications nucléotidiques ne se traduisent pas par un changement d'acide aminé. Ces mutations « muettes », cependant, ne sont pas forcément neutres face à la sélection naturelle. On peut imaginer, par exemple, qu'elles fassent le lit d'une mutation « parlante ».

(b) Changements d'acides aminés muets à l'électrophorèse

Shaw (1970) estime que l'électrophorèse ne détecte que 30 % des changements d'acides aminés. Deux protéines présentant des structures primaires différentes peuvent donc présenter la même mobilité électrophorétique.

(c) Importance des mutations

L'électrophorèse ne donne pas d'indications précises sur le nombre d'acides aminés par lequel deux protéines diffèrent.

Pour ces trois raisons, l'électrophorèse risque de sous-estimer la variabilité génétique. Il y a une quatrième cause d'imprécision :

(d) Biaisage de l'échantillon

L'électrophorèse ne considère que le produit de gènes de structure codant pour des enzymes hydrosolubles. On

ne peut dire dans quelle mesure cet échantillon est représentatif de l'ensemble du génome.

L'électrophorèse a donc permis d'étudier la vitesse de migration des protéines enzymatiques et, pour une même fonction enzymatique, chez un même organisme, d'observer des différences de vitesse de migration et donc de structure. On a alors cherché à classer ces variétés enzymatiques, et à élucider leur signification biologique.

DÉFINITION ET CLASSIFICATION DES ISOENZYMES

Selon Markert et Møller (1959), on doit nommer « isozymes » ou « isoenzymes » des enzymes de même fonction, mais de structure différente, ayant donc des vitesses de migration électrophorétique différente. Cette définition recouvre en fait des cas variés.

Dans la littérature, on trouve plusieurs classifications des isoenzymes (voir par exemple Harris 1969, Markert 1968). Un schéma très clair a été donné par Ogita (1968). On peut le résumer ainsi :

Deux grands groupes sont à distinguer :

- 1) Isoenzymes unigéniques,
- 2) Isoenzymes multigéniques.

1. Isoenzymes unigéniques

Ogita baptise ainsi les isoenzymes ne se distinguant pas entre elles par leur commande génétique : elles sont donc d'un intérêt plutôt négatif dans les études de génétique, bruit de fond dont il importe de faire abstraction. Les différences de structure qu'elles présentent résultent de toutes les modifications secondaires que peut subir la chaîne polypeptidique originelle. Harris (1969) distingue deux grands groupes au sein de cette catégorie :

- isoenzymes unigéniques différant par leur structure primaire (exemples : combinaison à d'autres molécules, perte d'une partie de la molécule).

- isoenzymes unigéniques différant par leur structure tertiaire ou quaternaire : séries d'isomères de conformation ou « conformers » (Kitto, Wasserman et Kaplan 1966).

D'ordinaire, ces isoenzymes unigéniques ne peuvent être distinguées par les méthodes immunologiques telles que l'immunoélectrophorèse (Ogita 1968, Sasaki 1974).

2. Isoenzymes multigéniques

Ce sont celles dont la différence de structure répond à une commande génétique différente. On peut séparer deux catégories :

- Isoenzymes multigéniques alléliques.
- Isoenzymes multigéniques non alléliques.

A. ISOENZYMES ALLÉLIQUES

C'est pour elles que Prakash, Lewontin et Hubby (1969) ont forgé le terme d'« allozymes » ou « alloenzymes » : enzymes codées par des allèles différents d'un même gène (situé au même locus), séparables par la mobilité électrophorétique, et subissant une ségrégation mendélienne au sein des populations (notons qu'ici, le terme d'isoenzymes « multigéniques » est discutable, puisqu'il faut entendre par allèles des formes différentes d'un même gène). En ce qui concerne la génétique évolutive, l'étude des alloenzymes est spécialement féconde.

Les alloenzymes sont en principe impossibles à distinguer par l'immunoélectrophorèse (Ogita 1968, Sasaki 1974). D'autre part, en général, deux alloenzymes présentent exactement la même spécificité de substrat.

B. ISOENZYMES NON ALLÉLIQUES

Chaque isoenzyme résulte de l'action d'un gène propre. Pour un même sujet, la présence de deux isoenzymes multigéniques non alléliques (zymogramme à deux bandes) traduit donc l'action de deux gènes, situés à des loci différents.

On peut en général distinguer deux isoenzymes non alléliques par l'immunoélectrophorèse (Ogita 1968 ; Sasaki 1974). Ces différences de comportement antigénique trahissent sans doute des différences de structure plus fortes que celles qu'on observe chez les alloenzymes. D'autre part, on observe assez fréquemment des différences de spécificité de substrat.

Pour illustrer ces propos un peu arides, vont suivre quelques exemples d'interprétations de zymogrammes, en allant du simple au complexe. A chaque fois, on supposera la commande génétique de l'enzyme connue, c'est-à-dire l'inverse de la situation habituelle. Chaque figure illustrative montre un schéma du zymogramme étudié, et du génome correspondant. Il faut insister sur le fait que l'on parle ici de zymogrammes d'individus isolés (par exemple : un seul moustique), les expériences portant sur plusieurs sujets broyés ensemble n'étant utiles que pour la mise au point des techniques (ininterprétables génétiquement).

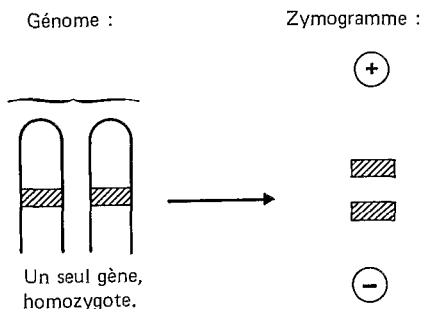


Fig. 1. — Zymogramme d'isozymes unigéniques.

Fig. 1 : Zymogramme de deux isoenzymes unigéniques. Formes différentes d'une même enzyme, produites par l'action d'un seul gène monomorphe (sujet homozygote pour le gène considéré, modifications secondaires de la molécule enzymatique).

Fig. 2 et photo. 1 : Zymogramme d'isozymes multigéniques alléliques ou alloenzymes, chaque allèle codant pour une enzyme monomérique (constituée d'une seule unité polypeptidique). Au locus étudié, le gène présente par exemple deux allèles différents, a et b. L'allèle a commande la synthèse de l'alloenzyme a, l'allèle b produit l'alloenzyme b.

L'homozygote a/a montre une bande simple, correspondant à l'alloenzyme a.

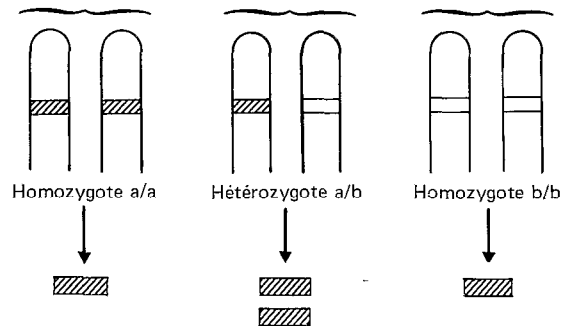


Fig. 2. — Zymogramme d'allozymes (enzyme monomérique).

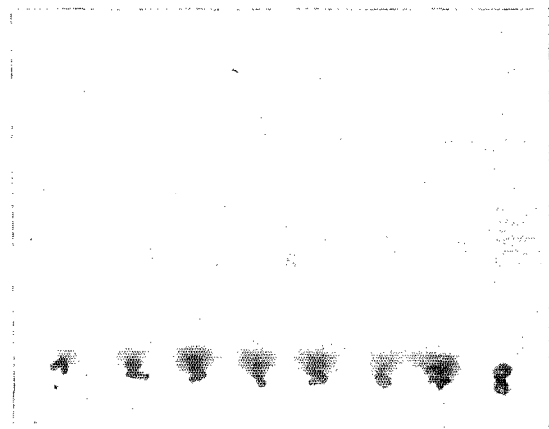


Photo 1. — Zymogramme de *Lutzomyia umbratilis* (Diptera, Psychodidae), vecteur de la leishmaniose cutanée en Guyane française : enzyme phosphoglucosmutase, support acétate de cellulose.

On observe la présence de 3 allèles : Middle (M), Slow (S) et Fast (F), désignés ainsi en raison de leurs vitesses de migration. Les sujets 3, 4, 5 sont homozygotes M/M. Les n^{os} 1 et 2 sont hétérozygotes M/S. Les n^{os} 5 et 6 sont hétérozygotes M/F (n^o 8 = moustique, *Toxorhynchites*).

L'homozygote b/b a aussi une bande simple, alloenzyme b, de mobilité différente de celle de a.

L'hétérozygote a/b, possédant les deux allèles, synthétise les deux alloenzymes (allèles « codominants »). Il montre les deux bandes a et b, en général plus atténuées que celles des homozygotes.

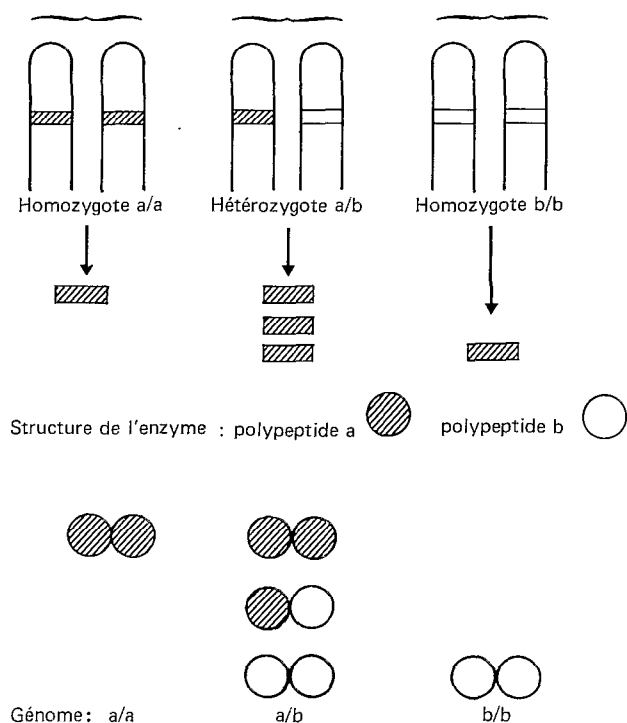


Fig. 3. - Zymogramme d'allozymes, enzyme dimère.

Fig. 3 : Zymogramme d'alloenzymes, chaque allèle codant non pas pour une enzyme, mais pour un polypeptide (= unité monomérique). L'enzyme fonctionnelle est constituée de plusieurs de ces unités monomériques (dans le cas figuré, deux : enzyme dimère, cas très fréquent). Au locus du gène considéré, on rencontre deux allèles a et b. L'allèle a commande la synthèse du polypeptide a. L'allèle b code pour la formation du polypeptide b.

L'homozygote a/a synthétise l'alloenzyme a-a (deux unités polypeptidiques a).

L'homozygote b/b possède l'alloenzyme b-b, de mobilité différente de celle de a-a.

L'hétérozygote a/b a trois alloenzymes (donc trois bandes) : a-a, b-b, et a-b. Cette dernière est une molécule hybride, constituée d'un monomère a et d'un monomère b. Sa mobilité est intermédiaire entre celle de a-a et celle de b-b. L'intensité respective de chaque bande est proportionnelle à l'intensité de synthèse de chaque allèle (voir

Harris 1969). Parfois, chez l'hétérozygote, la molécule hybride n'apparaît pas (inhibition de sa synthèse, ou destruction dans les conditions de l'expérience). Le zymogramme est alors le même que celui de la fig. 2.

Génome : voir Fig. 3

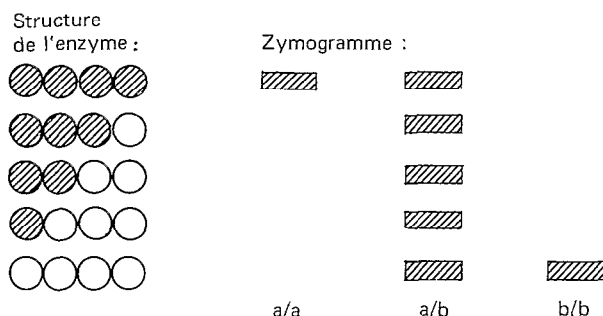


Fig. 4. - Zymogramme de tétramère.

Fig. 4 : Zymogramme de tétramère. L'allèle a synthétise le polypeptide a. L'allèle b produit le polypeptide b.

L'homozygote a/a synthétise l'alloenzyme a-a-a-a.

L'homozygote b/b a l'alloenzyme b-b-b-b.

L'hétérozygote a/b possède ces deux alloenzymes, plus trois sortes de molécules hybrides, de vitesses de migration intermédiaires entre celles de a-a-a-a et b-b-b-b. Ces hybrides sont a-a-a-b, a-a-b-b, et a-b-b-b.

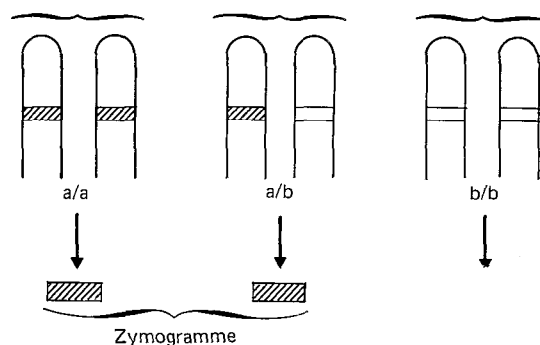


Fig. 5. - Zymogramme d'allozymes, avec un allèle « nul ».

Fig. 5 : Zymogramme d'alloenzymes, dont un des allèles est « nul ».

On qualifie de nul un allèle dont le produit n'est pas révéla- ble :

- soit parce que l'enzyme a perdu sa fonction enzymatique ;
- soit parce que la fonction enzymatique a été modifiée, et ne peut plus être révélée dans les conditions de l'expérience ;

- soit parce que l'enzyme n'est plus produite (délétion).

Soient deux allèles a et b d'un même gène, commandant la synthèse d'une enzyme monomérique. L'allèle a produit l'alloenzyme a. L'allèle b produit l'alloenzyme non révélable b, ou ne produit rien du tout (délétion).

Homozygote a/a : bande allozymique a.

Homozygote b/b : alloenzyme non révélable b, ou rien (délétion). Dans les 2 cas, aucune bande sur le zymogramme.

Hétérozygote a/b : une seule bande a.

Génome : voir Fig. 5

Zymogramme : a/a a/b b/b



Fig. 6. - Zymogramme d'allozymes, avec un allèle nul (dimère).

Fig. 6 : Enzyme dimère avec un allèle nul. Soient 2 allèles a et b d'un même gène. L'allèle a produit le polypeptide a. L'allèle b donne le polypeptide b non révélable, ou ne donne rien (délétion).

L'homozygote a/a possède l'alloenzyme a-a (une bande sur le zymogramme).

L'homozygote b/b synthétise l'alloenzyme b-b non révélable, ou ne synthétise rien du tout dans le cas d'une délétion. De toute façon, le zymogramme est muet.

L'hétérozygote a/b produit l'enzyme a-a, l'enzyme b-b non révélable, et une molécule hybride a-b, de mobilité intermédiaire entre celle de a-a et celle de b-b : zymogramme à 2 bandes. Mais si l'allèle b ne produit rien (délétion), il n'y a pas de molécule hybride, et l'hétérozygote n'a que l'enzyme a-a (une seule bande).

Génome : voir Fig. 5

Zymogramme : a/a a/b b/b

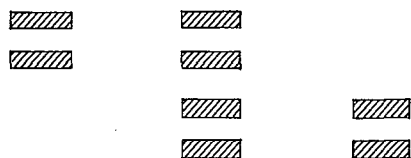


Fig. 7. - Zymogramme d'allozymes, chaque allèle commandant la synthèse d'une série d'enzymes unigéniques.

Fig. 7 : zymogramme d'alloenzymes, chaque allèle commandant la synthèse d'une série d'isoenzymes unigéniques (voir cas n° 1). Soient 2 allèles a et b d'un même gène. L'allèle a produit 2 isoenzymes unigéniques a et a'. L'allèle b donne 2 isoenzymes unigéniques b et b'.

L'homozygote a/a montre 2 bandes isoenzymiques a et a'.

L'homozygote b/b a 2 bandes isoenzymiques b et b'.

L'hétérozygote a/a arbore 4 bandes, a, a', b et b'.

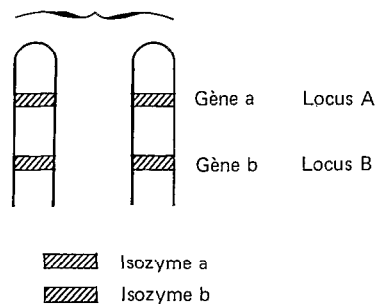


Fig. 8. - Zymogramme d'isozymes multigéniques non alléliques.

Fig. 8 : Zymogramme d'isozymes multigéniques non alléliques, avec le type le plus simple possible. L'enzyme a 2 isoenzymes, chacune étant codée par un gène différent située à un locus différent.

Au locus A, le gène a produit l'isoenzyme a. Au locus B, le gène b donne l'isoenzyme b.

Ceci donne un zymogramme à 2 bandes (le sujet est homozygote pour ces 2 loci).

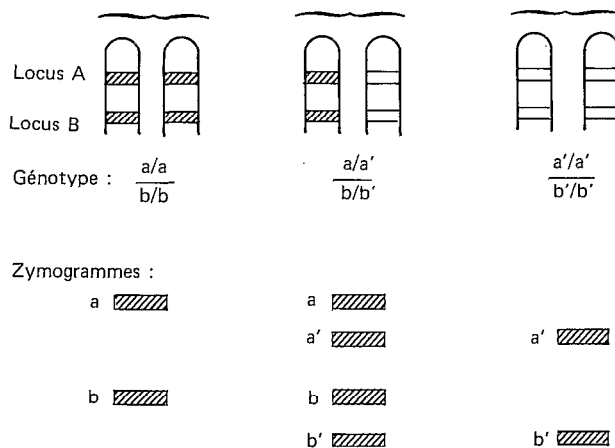


Fig. 9. - Zymogramme d'isozymes multigéniques avec présence de 2 allèles à chaque locus.

Fig. 9 : A chacun des loci peuvent ségréger plusieurs allèles, sécrétant des alloenzymes différentes. Par exemple, au locus A, le sujet présente 2 allèles a et a', sécrétant 2 alloenzymes a et a'.

Ceci donne 2 bandes. De même, au locus B, le sujet a 2 allèles b et b', qui produisent 2 alloenzymes b et b'. En tout, il y a 4 bandes sur le zymogramme.

On peut imaginer que chaque allèle produise non pas l'alloenzyme complète, mais un polypeptide, l'alloenzyme fonctionnelle étant un di, tri ou tétramère...

On peut avoir aussi des allèles donnant des séries d'isoenzymes unigéniques. Tout ceci peut aboutir à des zymogrammes très complexes.

Au vu de tous ces cas, il apparaît que tel zymogramme peut être produit par plusieurs types de commandes génétiques. Exemple : zymogramme à 2 bandes. Est-ce un homozygote pour 2 isoenzymes unigéniques (cas n° 1), ou un hétérozygote pour 2 alloenzymes monomériques (cas n° 2), ou un hétérozygote pour 2 alloenzymes dimériques avec un allèle nul (cas n° 6), ou encore un homozygote pour 2 isoenzymes multigéniques non alléliques ? Bien souvent, avec l'habitude, cela se voit à la « tête » du zymogramme. Mais parfois, seule l'analyse génétique peut trancher, avec confrontation des zymogrammes de nombreux individus.

APPLICATION DES ISOENZYMES

On se place ici d'un point de vue zoologique, laissant de côté par exemple les applications majeures des isoenzymes en médecine.

Même avec cette forte restriction, le sujet est encore très touffu. Beaucoup d'auteurs ont passé en revue les retombées possibles de l'étude des zymogrammes. Citons Bullini (1974), Avise (1975), Gottlieb (1971).

Dans le domaine qui nous intéresse spécialement, l'entomologie, Wagner et Selander (1974) ont donné une liste détaillée de tous les « créneaux » possibles. Avec eux, on peut distinguer 2 rubriques principales :

1. Organisation et développement des êtres vivants.
2. Génétique évolutive et Systématique.

1. Organisation et développement des êtres vivants

Les isoenzymes peuvent avoir une spécificité ontogénique, tissulaire, cellulaire, subcellulaire (isoenzymes cytoplasmiques et mitochondriales). Prenons un exemple d'application possible : en choisissant une enzyme ayant une spécificité tissulaire, mais ne connaissant pas de changement ontogénique, on peut l'utiliser comme marqueur pour étudier l'évolution des disques imaginaux.

2. Génétique évolutive et Systématique

Le sujet peut être scindé en plusieurs parties :

- Étude de la variation intrapopulation.
- Étude de la variation interpopulation.
- Étude des mécanismes de la Spéciation.
- Taxonomie.

La taxonomie enzymatique, qui nous préoccupe en priorité, sera particulièrement développée. Mais il est utile au préalable qu'on se penche sur les autres sujets, car elle n'en constitue qu'une « retombée ».

LA VARIATION INTRAPOPULATION

C'est une découverte importante de la Génétique moderne. A peu près tous les organismes présentent un très fort polymorphisme allélique. D'après Gottlieb (1971), le % de loci polymorphes par populations tourne autour de 0,30, le % de loci hétérozygotes par individu est en général de 0,10. Sur ce vaste sujet, on peut lire entre autres les études classiques de Hubby et Lewontin (1966), Lewontin et Hubby (1966), Prakash, Lewontin et Hubby (1969). Tout ceci a été revu par Gottlieb (1971). Cette découverte a fait couler de l'encre, surtout qu'elle est à l'origine d'une âpre controverse entre les tenants de 2 thèses opposées :

Kimura (1971) a proposé l'hypothèse suivante : la plupart des allèles observés grâce aux zymogrammes sont neutres face à la sélection naturelle. Les variabilités observées sont imputables aux effets du hasard et de la dérive génique. Cet article audacieux s'est attiré une véritable levée de boucliers sélectionnistes. Citons au hasard les écrits de Bullini *et coll.* (1972 b), Johnson (1973), Powell (1971). En ce qui concerne la systématique, comme le souligne Avise (1975), cette querelle n'a pas d'importance. Même s'il est vrai que la plupart des allèles observés sont sélectivement neutres, l'intérêt en systématique n'en est qu'accru : le risque de convergence est alors supprimé.

VARIATION GÉOGRAPHIQUE INTRASPECIFIQUE

Si la variabilité au sein d'une population est élevée, par contre, cette variabilité semble peu variable d'une population à l'autre. Il est possible, mais souvent difficile de caractériser une population par ses isoenzymes. Dans une étude sur 4 populations de *Drosophila pseudoobscura*, Prakash, Lewontin et Hubby (1969) distinguent du point de vue de la variabilité géographique 4 sortes de loci polymorphes : ceux qui ne présentent pas de différences de fréquence d'une population à l'autre, ceux qui montrent un « cline », c'est-à-dire une variation continue de fréquence, ceux qui montrent un polymorphisme limité à une seule population, enfin, ceux qui présentent des fréquences alléliques très différentes d'une population à l'autre. Selon les types rencontrés, il sera possible ou difficile de caractériser les races géographiques.

MÉCANISMES DE LA SPÉCIATION

On cherche depuis longtemps à savoir quel degré de « divergence génétique » est requis pour qu'apparaisse et se maintienne le phénomène de la spéciation. Les isoenzymes fournissent une approche quantifiable de cette question théorique. Il faut d'abord dire un mot de la notion de « distance génétique ». D'après les fréquences alléliques, on a développé un certain nombre de « coefficients de

similitude ». Si les approches sont variables, ces coefficients donnent tous des résultats convergents. Ainsi, d'après le coefficient de similitude de Rogers (*in* Avise 1975), 2 populations monomorphes pour les mêmes allèles à la moitié de leurs loci, et ne partageant aucun allèle pour l'autre moitié, ont un coefficient de similitude de 0,50. Le coefficient peut aller de 0 (aucun allèle commun) à 1 (identité génétique). Au sujet de la distance génétique entre 2 espèces voisines, Gottlieb (1971) résume 2 thèses opposées : d'après certains, la spéciation pourrait s'observer avec très peu de remaniements, le rôle principal étant dévolu aux « gènes régulateurs ». D'autres (Mayr 1970) estiment que la spéciation requiert des remaniements profonds de tout le génome. Wagner et Selander (1974) notent qu'on ne peut chercher à établir de standard de distance génétique pour la spéciation, et qu'il n'y a pas de corrélation entre la distance génétique et le degré d'isolement reproductif. D'autres auteurs, au contraire (Hubby et Throckmorton 1965, Ayala 1974, Avise 1975), relèvent des distances génétiques bien plus nettes entre espèces différentes (même jumelles) qu'entre populations différentes d'une même espèce. En fait, il apparaît de plus en plus qu'il n'y a pas un, mais plusieurs procédés de spéciation, et qu'il est assez vain de mettre sur un même plan les phénomènes de remaniement chromosomique. Dans le second cas, l'intérêt systématique de l'électrophorèse est très diminué. C'est donc selon

TAXONOMIE

Parente pauvre de l'étude des isoenzymes, la taxonomie n'est même pas mentionnée par Shaw (1965) dans son énumération des débouchés des zymogrammes. Depuis, la technique entre dans les mœurs, un peu trop vite peut-être, certains enthousiastes en font une panacée, et veulent lire dans les zymogrammes beaucoup plus que ce qu'on y peut trouver. C'est là le lot de toutes les techniques « à la mode ». Voici ce qu'on peut dire :

- on ne peut comparer avec les enzymes que des espèces suffisamment proches les unes des autres. Vouloir établir la distance génétique entre une drosophile et un rat musqué n'a pas de sens :

- entre 2 espèces, même très proches l'une de l'autre, il semble *en général* exister une plus forte somme de divergence qu'entre 2 populations conspécifiques. Cette distance génétique ne peut être calculée qu'en s'appuyant sur un nombre suffisant d'individus, et de loci (d'enzymes). Les études d'Ayala (1974) sur le complexe sud-américain *Drosophila willistoni* sont spécialement illustratives : elles montrent une corrélation entre le degré de spéciation (populations locales, sous-espèces, semi-species, espèces jumelles, espèces non jumelles) et les distances génétiques observées ;

- entre 2 espèces différentes, même jumelles, on trouve très souvent des « loci-diagnostic » (Ayala et Powell 1972, Lakovaara *et coll.* 1976). On nomme ainsi un

locus dont l'étude permet de déterminer un individu isolé avec une probabilité d'erreur inférieure à 0,05, voire 0,001 dans certains cas.

Au dessus du niveau de l'espèce, l'interprétation des zymogrammes devient délicate : on tombe facilement dans le cas limite où les 2 espèces comparées n'ont aucun allèle en commun, ce qui rend impossible tout calcul de distance génétique. Avise (1975) suggère les démarches suivantes : étude des loci « conservateurs », semblant plus résistants aux mutations que les autres, analyse des isoenzymes multigéniques non alléliques, application aux zymogrammes de traitements spéciaux : inhibiteurs spécifiques des enzymes, thermolabilité (permettant de révéler de légères différences de structure entre les isoenzymes). On pourrait y ajouter la confrontation avec d'autres méthodes de systématique biochimique : électrophorèse des protéines totales, isoélectrofocalisation des enzymes et des protéines totales, immunologie.

CONCLUSION : APPLICATION DES ISOENZYMES EN ENTOMOLOGIE MÉDICALE.

Entomologie proprement dite

Dans notre domaine, nous sommes condamnés à la systématique la plus rigoureuse, la plus « naturelle » possible. Le dessein ultime étant l'épidémiologie, l'aptitude vectorielle de 2 taxons même étroitement apparentés peut être très différente. L'apport le plus saillant des isoenzymes est la différenciation des espèces jumelles entre elles. De telles recherches tendent à devenir routinières : études de Mahon (1976) sur *Anopheles gambiae*, travaux de Saul *et coll.* (1977) sur *Aedes triseriatus* et *Aedes hendersoni* par exemple. On peut citer aussi les nouvelles clés de détermination pour le complexe *Simulium damnosum*. Dans ce domaine, les enzymes sont souvent plus performants que la cytogénétique : en ce qui concerne *Anopheles gambiae*, il y a possibilité de déterminer les adultes des 2 sexes, de tous âges physiologiques. En choisissant des enzymes ne connaissant pas de changements ontogéniques, on peut rapporter une larve à son stade adulte, et vice-versa.

Si la principale retombée est la taxonomie, toutes les autres applications citées plus haut peuvent trouver leur place en entomologie médicale. Au niveau de la sous-espèce, dans les contrées montagneuses en particulier, l'étude des « races d'altitude » peut être étayée par le calcul des fréquences alléliques.

Parasitologie

Le typage des souches de protozoaires est un débouché important, déjà bien exploité (flagellé, *Plasmodium*). Ces études ont jusqu'à présent porté sur l'analyse d'un nombre restreint de loci, permettant de définir des

« types » portant des numéros : pour les *Leishmania* par exemple, type Malate déshydrogénase 1, 2, 3... En ce qui concerne les flagellés, réputés asexués, la notion d'espèces n'a guère de sens (« agamospecies »), chaque clone étant par définition isolé génétiquement des autres. Si les manipulations sont les mêmes, l'approche théorique est donc très différente de celle qui est requise pour l'étude des vecteurs.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'ORSTOM le 3 janvier 1980.

BIBLIOGRAPHIE

- AVISE (J.), 1975. — Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.*, 23 : 465-481.
- AYALA (F. J.), 1974. — Genetic variation, sexual isolation, and evolution. In J. H. Bruel, Ed. *Prospects in behavior genetics*. Russell stage Foundation.
- AYALA (F. J.) & POWELL (J. R.), 1972. — Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69 : 1094-1096.
- BULLINI (L.) & COLUZZI (M.), 1972 b. — Natural selection and genetic drift in protein polymorphism. *Nature*, 239 : 160-161.
- BULLINI (L.) & COLUZZI (M.), 1973. — Electrophoretic studies on gene-enzyme systems in mosquitoes. *Parassit.*, 12 : 221-248.
- GOTTLIEB (L. D.), 1971. — Gel electrophoresis : new approach to the study of evolution. *Bioscience*, 21 : 939-944.
- HARRIS (H.), 1969. — Genes and isozymes. *Proc. Roy. Soc. London*, 174 : 1-31.
- HUBBY (J. L.) & LEWONTIN (R. C.), 1966. — A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54 : 577-594.
- HUBBY (J. L.) & THROCKMORTON (L. H.), 1965. — Protein differences in *Drosophila*. II. Comparative species genetics and evolutionary problems. *Genetics*, 52 : 203-215.
- HUBBY (J. L.) & THROCKMORTON (L. H.), 1968. — Protein differences in *Drosophila*. IV. A study of sibling species. *Amer. Nat.*, 102 : 193-205.
- HUNTER (R. L.) & MARKERT (C. L.), 1957. — Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125 : 1294-1295.
- JOHNSON (G.), 1973. — Importance of substrate variability to enzyme polymorphisms. *Nature New Biol.*, 243 : 151.
- KIMURA (M.) & OHTA (T.), 1971. — Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature*, 229 : 467.
- KITTO (G. B.), WASSARMAN (P. G.) & KAPLAN (N. O.), 1966. — Enzymatically active conformers of mitochondrial malate dehydrogenase. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 56 : 578-585.
- LAKOVAARA (S.), SAURA (A.), LANKINEN (P.), POHJOLA (L.) & LOKKI (J.), 1976. — The use of isoenzymes in tracing Evolution and in classifying *Drosophilidae*. *Zoologica scripta*, 5 : 173-179.
- LEWONTIN (R. C.) & HUBBY (J. L.), 1966. — A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54 : 595-609.
- MAHON (R. J.), GREEN (C. A.) & HUNT (R. H.), 1976. — Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). *Bull. ent. Res.*, 66 : 25-31.
- MARKERT (C. L.), 1968. — The molecular basis of isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 151 : 14-40.
- MARKERT (C. M.) & MØLLER (F.), 1959. — Multiple forms of enzymes. Tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 45 : 753-763.
- MAYR (E.), 1974. — Populations, espèces et Évolution. Hermann Ed. Paris.
- MILES (S. J.), 1978. — Enzyme variation in the *Anopheles gambiae* Giles group of species (Diptera, Culicidae). *Bull. Ent. Res.*, 68 : 85-96.
- OGITA (Z.), 1968. — Genetic control of isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 151 : 243-262.
- POWELL (J. R.), 1971. — Genetic polymorphisms in varied environments. *Science*, 174 : 1035-1036.
- PRAKASH (L.), LEWONTIN (R. C.) & 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 : 841-868.
- SASAKI (F.), 1974. — Esterase isozymes of *Drosophila virilis* : immunological study of alpha and beta esterases. *Jpn. J. Genet.*, 49 : 233.
- SAUL (S. H.), SINSKO (M. J.), GRIMSTADT (P. R.) & CRAIG Jr (G. B.), 1977. — Identification of sibling species *Aedes triseriatus* and *A. hendersoni* by electrophoresis. *J. med. Ent.*, 13 : 705-708.
- SHAW (C. R.), 1965. — Electrophoretic variation in enzymes. *Science*, 166 : 1365-1374.
- WAGNER (R. P.) & SELANDER (R. K.), 1974. — Isozymes in insects and their significance. *Ann. Rev. Ent.*, 19 : 117-138.