

Université de Paris-Sud
Centre d'Orsay
Laboratoire d'Entomologie

Mémoire de D.E.A.

ISOENZYMES D'ESTERASES
de Aedes polynesiensis MARKS, 1951

par

A. J. SILBERSTEIN

O.R.S.T.O.M., Entomologie médicale et vétérinaire, Bondy
Institut de Médecine tropicale, Zoologie médicale, Anvers

septembre 1977

Plan d'étude

I. Isoenzymes et électrophorèse

- A. Définitions et introductions
- B. Aspects génétiques et structurels du polymorphisme enzymatique
- C. Utilité des isoenzymes en entomologie médico-vétérinaire

II. Etudes histo-biochimiques d'acides aminés, protéines et enzymes

- A. Moustiques
- B. Autres insectes et arthropodes

III. Isoenzymes des moustiques

- A. Zymogrammes
- B. Système gène-enzyme : genres Anopheles, Culex, Aedes
- C. Isoenzymes marqueurs
- D. Isoenzymes et résistance aux insecticides
- E. Isoenzymes et parasites

IV. Esterases d'Aedes (Stegomyia) polynesiensis Marks, 1951

- A. L'espèce Aedes polynesiensis
- B. Le groupe d'isoenzymes estérases
- C. Matériels et méthodes
- D. Résultats obtenus :
 - les larves, les pupes, les femelles, les mâles
 - couples et leurs descendances
- E. Interprétations et conclusion

V. Bibliographie

Remerciements

Les expressions de ma plus profonde gratitude vont

au Professeur A. Fain (laboratoire de zoologie médicale, Anvers) et à Monsieur J. Mouchet (inspecteur général de recherche à l'O.R.S.T.O.M.) pour leurs encouragements et conseils;

à Madame N. Pasteur (Montpellier) qui m'a permis de me baser sur ses techniques d'électrophorèse;

à Mesdames J. Barathe et C. Sannier (O.R.S.T.O.M., Bondy) ainsi que Madame F. Peeters et Monsieur K. Devoght (laboratoire du Professeur M. Wery, Anvers) pour leurs aide et conseils en matière d'élevage de moustiques;

à Mesdames M. Louis, E. Pla et L. Negron (laboratoire de feu le Professeur C. Bocquet, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette), Madame M. Van 't Ende et Monsieur L. Van der Geest (laboratoire du Professeur W. Helle, Amsterdam) et Mesdames M. De Vlioger et E. De Groof et Monsieur A. Moors (laboratoire du Professeur G. Van Ros, Anvers) pour leurs aide et conseils en matière d'électrophorèse.

I. Isoenzymes et électrophorèse

A. Définitions et introduction

Le terme "Isoenzyme" est recommandé officiellement par le Standing Committee on Enzymes of the International Union of Biochemistry (Report, 1961). Il définit des protéines dont l'action enzymatique catalyse une même réaction au sein d'une espèce mais dont les propriétés physico-chimiques sont différentes. Le terme "isozyme" de Markert et Moller (1959) est également accepté, celui d'"hétérozyme" pour des enzymes isodynamiques mais d'organes ou d'espèces différentes est peu usité. Le terme "alloenzyme" (Prakash et al., 1969) désigne l'enzyme codé par l'un des allèles d'un même locus.

Des protéines, placées dans un milieu déterminé, migrent sous l'influence d'un champ électrique, selon leur charge électrique nette qui est influencée par le pH du tampon utilisé : en milieu alcalin, la plupart des protéines migrent vers l'anode. Cette migration dépend également des dimensions et formes des protéines; elle est aussi influencée par la force ionique, la viscosité et les propriétés chimiques du tampon. La distance de migration dépend de la force du champ électrique. Une fois la migration terminée, des méthodes de coloration spécifique permettent de mettre les protéines étudiées en évidence à différents endroits du milieu de migration lui-même. On obtient ainsi des taches ou des bandes fixables, dont les positions, fréquences, intensités et natures feront l'objet d'interprétations et éventuelles conclusions. Lorsque des isoenzymes sont étudiés, l'ensemble des endroits ainsi visualisés forme un zymogramme.

Ce fut Michaelis (1909) qui introduisit le terme d'"électrophorèse" ("elektrische Uberführung") pour décrire la migration anodique de l'invertine sous l'influence d'un champ électrique. Le développement entre 1945 et 1955 de techniques de séparation de protéines par électrophorèse zonale (c.a.d., l'électrophorèse en milieu poreux avec révélation des protéines par des méthodes histochimiques) a mis en place les moyens d'études d'isoenzymes, une fois ceux-ci découverts. Ce furent Hunter et Markert (1957) qui introduisirent l'électrophorèse zonale pour les enzymes. Ces techniques présentent plusieurs avantages : elles sont relativement simples et peu coûteuses; des homogénéisats de tissus, d'organes ou d'organismes peuvent être utilisés de telle façon que les enzymes ne subissent pratiquement pas de changement durant l'expérience; des petites quantités de matériel homogénéisé suffisent, permettant l'étude d'un grand nombre de lots ou d'individus.

De nombreuses techniques utilisant des substrats de migrations différents ont été employé au cours des dernières décades (Brewer, 1970, Sargent et George, 1975). L'électrophorèse sur papier a servi à l'étude d'enzymes animales et humaines depuis 1954, celle sur agar et celle sur acétate de cellulose depuis 1959. Si le bloc d'amidon a été utilisé depuis 1952 et appliqué à l'étude des isoenzymes de l'homme à partir de 1957, c'est le gel d'amidon (Smithies, 1955 et 1959) qui a permis l'essor fantastique des connaissances concernant les isoenzymes. Wilkison (1970) donne un tableau récapitulatif d'une vingtaine d'isoenzymes séparés ainsi par cette technique chez un large éventail d'embranchements végétaux et animaux. Raymond et Weintraub (1959) ainsi que Ornstein et Davis (1959) mirent au point l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui permet des séparations délicates sur de très petites quantités d'homogénéisats ou de petits individus (glande salivaire de moustique; individus de Jera albifrons actuellement étudiés par Bocquet).

Déjà en 1895, Emil Fisher (*in* Wilkinson, 1970) insistait pour que toute description d'enzyme soit accompagnée d'une précision de l'espèce, de l'organe et du tissu d'origine, pré-sentant que des enzymes, catalysant la même réaction et possédant la même spécificité de substrat mais dérivant de sources différentes, pouvaient différer par d'autres propriétés. En effet, la phosphatase acide humaine (déterminée par Demuth en 1925) de la prostate et celle des erythrocytes réagissaient différemment sous l'action d'inhibiteurs. En 1943, Warburg et Christian démontrèrent que l'aldolase de levure différait en plusieurs points de celle obtenue de tissus musculaires animaux. Meyer, Fisher et Bernfeld (1947) démontrèrent ensuite que l'alpha-amylase humaine salivaire et pancréatique différait de celle du pancreas du porc. Meister (1950) et Neilands (1952) démontrèrent que la lactate déshydrogénase du coeur de boeuf se composait de 2 protéines enzymatiquement actives et électrophorétiquement distinctes : un enzyme d'un organe apparut donc comme étant au moins dimorphique. Les publications de 1957 (Vessel et Bearn, Wieland et Pfleiderer, Sayre et Hill) sur l'hétérogénéité de la lactate déshydrogénase donnèrent le signal de départ pour des études de ce genre sur d'autres enzymes : Vessel (1968) dénombra dans la littérature plus de 100 enzymes polymorphiques.

Pour s'y retrouver, un système conventionnel international de numérotation de ces isoenzymes fut décidé (Enzyme Nomenclature, 1965) : ceux-ci sont numérotés par ordre décroissant de leur charge électrique négative, prenant en considération que la majorité des enzymes migrent vers l'anode au sein de tampons dont le pH varie entre 7 et 9, l'acidité inactivant beaucoup d'enzymes. Webb (1964) insiste pour que cette méthode de numérotation soit temporaire jusqu'à ce que les différences chimiques entre isoenzymes soient mieux connues.

De l'intérêt clinique et diagnostique qu'eurent à l'origine chez l'homme ces isoenzymes, ceux-ci, de par leur polymorphisme, éveillèrent beaucoup d'intérêts génétiques.

B. Aspects génétiques et structurels du polymorphisme enzymatique

Dans "Genetics of Insect Vectors of Disease" (Wright et Pal, 1967) une page seulement est consacrée au polymorphisme enzymatique. Depuis des livres entiers ont paru sur les isoenzymes (Latner et Skillen, 1968, Barman, 1969, Wilkinson, 1970) tandis que les Annals of the New York Academy of Sciences (1968) y consacèrent près de 700 pages.

L'idée de "un gène, un enzyme" a été nuancée par la formule "un gène, une chaîne polypeptidique". Ainsi plusieurs modes de naissance d'isoenzymes peuvent être considérés (Harris, 1969) :

1. Les isoenzymes peuvent être déterminées par 2 ou plusieurs locus, chaque locus codant la séquence des acides aminés d'une chaîne polypeptidique distincte. Ces chaînes forment une gamme d'isoenzymes, séparément ou par associations diverses de ces chaînes (p.ex. les différentes formes moléculaires de l'hémoglobine).
2. Le gène d'un locus peut être formé par des allèles différents, chacun d'eux codant une chaîne polypeptidique différente; chez l'hétérozygote, plus d'une forme moléculaire isoenzymatique apparaîtra.
3. Une série d'isoenzymes peuvent ne différer entre eux que par leur structure monomérique, dimérique, polymérique.
4. Des différentes structures tertiaires ou quaternaires des protéines peuvent également faire apparaître des isoenzymes.
5. Une protéine enzymatique peut, in vivo, subir des modifications chimiques, une dénaturation progressive, qui se manifestera par des isoenzymes qui ne reflètent que des stades successifs de telles évolutions.
6. Des combinaisons intracellulaires entre enzymes et autres molécules pourront également faire apparaître des soit-disant formes multiples d'un enzyme.

Ces divers mécanismes peuvent s'intriquer pour causer l'apparition de multiples formes moléculaires d'enzymes, rendant leur déterminisme extrêmement complexe.

C. Utilité des isoenzymes en entomologie médico-vétérinaire

Un grand nombre d'arthropodes sont parasites ou vecteurs de parasites le plus souvent pathogènes (virus, bactéries, protozoaires, helminthes). Dans la lutte contre ces endémies ces arthropodes représentent un chaînon dont la rupture interrompera le cycle épidémiologique. Afin d'agir efficacement, économiquement, sans rompre des équilibres biologiques précieux et de limiter la pollution au stricte minimum, il faut que l'arthropode incriminé soit parfaitement bien connu en tant qu'espèce et dans son écologie : le travail monumental de l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral (Montpellier) est un exemple éclatant de réussite en ce domaine. Les résultats obtenus dans les luttes contre le complexe Anopheles gambiae, Simulium damnosum, Glossina palpalis et d'autres grands vecteurs le sont grâce à l'élaboration de ces connaissances.

Pour résoudre les problèmes des complexes d'espèces, des espèces jumelles et des écotypes, la morphologie classique ne suffit plus. Beaucoup d'espoirs sont fondés sur l'étude des isoenzymes pour contribuer à l'éclaircissement non seulement de ces problèmes de taxonomie et systématique, mais aussi des problèmes de génétique et d'évolution ainsi que de ceux posés par la résistance aux insecticides. Ces études pourront aussi déterminer les mécanismes qui font que certaines espèces sont vectrices et d'autres pas; l'on en déduira peut-être des thérapeutiques nouvelles.

II. Etudes histo-biochimiques d'acides aminés, protéines et enzymes

Tout comme par exemple la chaetotaxie sert à déterminer et différencier des espèces, plusieurs éléments histo-biochimiques ont montré pouvoir jouer le même rôle.

A. Moustiques

Les 19 acides aminés libres, trouvés par Micks et Ellis (1951 et 1952) chez différentes espèces de moustiques, montrèrent des différences quantitatives entre les espèces et entre les stades de développement. Ces différences furent confirmées chez Culex par Ball et Clark (1953). Micks (1954) introduisit ensuite la chromatographie sur papier pour étudier les acides aminés libres de 4 souches du complexe Culex pipiens (C. pipiens d'Europe et d'Amérique et C.p. fatigans d'Amérique); Lewallen (1957) le fit pour 8 souches californiennes d'Anopheles occidentalis et An. freeborni du complexe maculipennis; Micks et Gibson (1957) comparèrent 16 souches et espèces de moustiques dans 5 genres (Aedes, Culex, Culiseta, Psorophora et Anopheles) dans la première partie de leur travail : les différences quantitatives interspécifiques furent très nettes.

Les protéines de Culex pipiens et C. stigmatosoma (= C. peus) furent étudiées par électrophorèse sur papier (Clark et Ball, 1956). Par la même technique Chen (1959) compara les protéines de l'hémolymphe des larves de Culex pipiens pipiens autogène et de C.p. fatigans (= C.p. quinquefasciatus) anautogène. Egalement par électrophorèse sur papier, Micks et al. (1966a, b et 1967) étudièrent des souches d'Aedes aegypti et le complexe Anopheles gambiae.

Utilisant la diffusion sur gel d'agar, Zaman et Chellappah (1962, 1963, 1964 et 1965) différencièrent les oeufs et les larves d'espèces d'Aedes, de Culex et d'Armi-geres. Par la même technique Fox et al. (1963) comparèrent Aedes aegypti, A. taeniorhyncus, Culex pipiens fatigans et Culicoides furens. Yang et Davies (1968a), dans une partie de leur travail, étudièrent l'activité de l'amylase chez une population canadienne de Culex pipiens pipiens et une souche de laboratoire d'Aedes aegypti.

Des techniques sérologiques furent entretemps appliquées par Downe (1963) pour comparer les femelles de 4 espèces canadiennes d'Aedes (A. communis, A. punctor, A. trichurus et A. excrucians) et par Smith et Silverman (1966) pour 4 espèces d'Anopheles (A. albimanus, A. atroparvus, A. freeborni et A. quadrimaculatus) et Aedes aegypti.

L'électrophorèse sur acétate de cellulose fut introduite par Bianchi (1965) en Italie pour l'étude des protéines d'espèces jumelles du complexe Anopheles maculipennis : A. atroparvus et A. labranchiae furent ainsi qualitativement dissociables au stade pupal.

Warren et Breland (1969) étudièrent par électrophorèse sur gel d'amidon les protéines d'homogénéisats de lots d'individus préimaginaux et imaginaux de 14 espèces de Culicidae dans 7 genres (Anopheles, Culex, Aedes, Toxorhynchites, Orthopodomyia, Culiseta et Psorophora). Des distinctions spécifiques, aux différents stades de développement (présentant d'ailleurs des différences d'un stade à l'autre) furent apparentes ainsi que des caractères communs pour les groupes, les sous-genres et les genres. Quelques faits saillants apparurent : seul Toxorhynchites rutilus septentrionalis (non-hématophage, dont les larves sont très carnivores) présenta des fractions à migration cathodique; Psorophora ciliata, à larves carnivores mais anautogène, montra un nombre de bandes beaucoup plus élevé et un léger dimorphisme sexuel; Culiseta inornata et Culex tarsalis présentèrent un dimorphisme sexuel déjà perceptible chez la puppe et au 4ième stade larvaire; Culex pipiens pipiens et C.p. fatiga ~~quinquefasciatus~~ furent trouvés identiques ainsi que les adultes de Orthopodomyia alba et O. signifera mais chez ces 2 dernières espèces les larves du 4ième stade furent différenciables.

Les constitutions protéiques des différents stades de développement (de L2 à l'imago) d'Armigeres subalbatus (Desowitz, 1969) s'avérèrent être différentes.

Les acides aminés et les protéines d'oeufs de Culex pipiens pipiens autogènes et anautogènes furent comparés par Briegel (1969).

B. Autres insectes et arthropodes

La liste qui suit sert à donner un aperçu de l'étendue du champ d'étude créé; c'est d'ailleurs sur un certain nombre d'espèces citées ci-bas qu'ont été mises au point les techniques et recettes de mises en évidence des isoenzymes recherchés chez les arthropodes qui nous intéressent particulièrement.

Hadorn et Mitchel (1951) utilisèrent la chromatographie sur papier pour étudier les stades de développement de mutants de Drosophila melanogaster.

Micks (1956) utilisa cette technique pour l'étude qualitative et quantitative des acides aminés de 3 ordres d'insectes. Micks et Gibson (1957) caractérisèrent 27 souches dans 4 ordres d'arthropodes (moustiques, triatomes, blattes et tiques), par leurs acides aminés. Zebe et McShan (1957) étudièrent les déshydrogénases lactiques et les alpha-glycerophosphates déshydrogénases d'insectes. Les protéines hémolympatiques des différents stades de développement de Periplaneta americana furent déterminées par Steinhauer (1959) tandis que celles d'insectes divers furent analysées par Laufer (1960) et par Whittaker et West (1962) sur gel d'amidon. Laufer (1961 et 1964) entreprit ensuite l'étude des enzymes (e.a. des estérases) des stades de développement de Bombyx mori, Eguchi et al. (1965) celle des estérases et Yoshitake et al. (1966) les estérases et phosphatases des larves de ce ver à soie. Loughton (1965) étudia les protéines de l'hémolymphe de différents Lépidoptères; le polymorphisme esterasique de Colias eurytheme et Hemiargus isola fut établi par Johnson et Burns (1966) et Burns et Johnson (1967 et 1971).

Benoit et van Sande (1959) et Brodie et Rijckman (1967) s'intéressèrent aux protéines de l'hémolymphe de Triatominae. Cook et Forgash (1965) se concentrèrent sur les estérases de Periplaneta americana, Salked (1965) sur celles (19 en nombre) d'Oncopeltus fasciatus.

Les protéines de Drosophila melanogaster furent étudiées par Hubby (1963), celles d'espèces du groupe virilis par Hubby et Throckmorton (1965), qui les comparèrent pour les mettre en relation avec les problèmes d'évolution. Dès 1961 apparurent des séries impressionnantes de publications sur les isoenzymes des Drosophila. Wright (1961 et 1963) démontra le codage génétique d'un système d'estérases ("la 6ième des 10") chez Drosophila melanogaster : celles-ci sont codées par locus autosomique (sur le chromosome 3) à 2 allèles codominants. Le système homologue chez D. simulans est codé par un locus à 3 allèles codominants (Wright et Mac Intyre, 1963). Smith et al. (1963) déductèrent chez D. melanogaster au moins 2 locus pour la xanthine déshydrogénase : l'un sur le chromosome 3, l'autre sur le chromosome X. Beckman et Johnson (1964a, b, c et d) établirent le polymorphisme et la génétique des phosphatases alka-

lines des larves de D. melanogaster ainsi que le polymorphisme des esterase et le codage génétique des aminopeptidases. Les esterase et déshydrogénases furent déterminées par Sims (1965), de même que celles de D. virilis, chez qui les amylases furent étudiées par Kikkawa (1963b). Johnson et Denniston (1964), Grell et al. (1965) et Ursprung et Leone (1968) étudièrent les déshydrogénases de D. melanogaster, Kikkawa (1963a et 1964) et Doane (1965 et 1967) les amylases, MacIntyre (1965) les phosphatases acides (ainsi que celle de D. simulans), Schneiderman et al. (1966) et Schneiderman (1967) les phosphatases alcalines (dont un allèle inactif a été décrit par Johnson, 1966) ainsi que celles de D. simulans, D. virilis et D. funebris, Grell (1967) les alpha-glycerophosphates déshydrogénase, Trippa et al. (1970) les phosphoglucomutases. Young et al. (1964) et Kazazian et al. (1965) trouvèrent une glucose-6-phosphate déshydrogénase liée au chromosome X. Shaw (1965) explica la structure dimérique d'une esterase par la présence d'une troisième "bande hybride" entre celles des homozygotes. Le nombre d'allèles des loci codant les isoenzymes des esterase et des malates déshydrogénases chez D. pseudoobscura fut étudié par Hubby et Lewontin (1966), Lewontin et Hubby (1966) et Hubby et Narise (1967); ces auteurs améliorèrent la méthode de détection de l'activité estérasique. Plusieurs groupes d'isoenzymes de Drosophila ananassae, D. buskii, D. aldrichi et D. mulleri furent étudiés par Johnson et Sakai (1964), Johnson et al. (1966a et b, 1967, 1968) et Richardson et Johnson (1967). Johnson et al. (1968) considérèrent l'existence d'"allèles nuls" en étudiant 4 esterase chez 2 espèces. Stone et al. (1968) étudièrent D. ananassae et D. nasuta. Ayala et al. (1970, 1971, 1972) et Richmond (1972) déterminèrent le polymorphisme enzymatique du groupe D. willistoni. Durant les cinq dernières années le nombre de publications concernant les systèmes isoenzymatiques chez D. melanogaster est devenu énorme.

Ogita (1962 et 1968), Ogita et Kasai (1965a, b et c) et Gilmour (1965) établirent le contrôle génétique des esterase chez Musca domestica : 3 loci (dont 1 bi-allélique codominant) furent rattachés au chromosome 5, 1 locus au chromosome 4. Bratkowski (1967) étudia l'acetyl-cholinesterase de Musca autumnalis.

Après l'étude des protéines des larves de Calliphora erythrocephala (Price et Bosman, 1966), les esterase de Calliphora furent précisées par Thomsen (1966). Les Glossines sont actuellement étudiées par Helle et Van der Geest à Amsterdam (Van der Geest et Kawooya, 1975). Les activités de l'amylase, de la trypsine et de l'invertase d'espèces de simulies du Canada furent mises en évidence par Yang et Davies (1968a, b et c). Six groupes d'isoenzymes de Simulium damnosum furent étudiés par Coker (1973) dans la seconde partie de son travail.

Ogita et Kasai (1965d) s'intéressèrent aux enzymes de Tetranychus telarius et Paratetranychus citri. Arurkar et Knowles (1967 et 1968) étudièrent sur gel d'acrylamide les estérases d'un seul coléoptère d'abord, ensuite d'un autre coléoptère, de 2 orthoptères et de 3 lepidoptères, tous du Missouri; par des méthodes d'inhibitions ces estérases furent classées en différents groupes (voir plus loin le paragraphe "estérase").

Bulmer (1971) considère que ce polymorphisme protéinique est incompatible avec la théorie de Kimura (1968) et de Kimura et Ohta (1971) sur les isoallèles neutres et l'évolution. Cette théorie est également contestée par Pasteur (1974) qui a développé les arguments expérimentaux et éco-géographiques en faveur du rôle de la sélection. Cette controverse entre les "neutralistes" et les "sélectionnistes" atteint les sphères philosophiques. Considérant d'une part que tous les auteurs sont d'accord pour admirer le schéma théorique et mathématique de Kimura, considérant d'autre part que les exemples d'allèles favorisants sont évidents, considérant encore que dans le passé des controverses mémorables ont abouti à l'acceptation de la validité des deux opinions, chacune ayant son rôle dans des circonstances particulières, je crois pouvoir penser (comme Pasteur N., 1975) qu'également ici les 2 mécanismes interviennent dans l'apparition et le maintien du polymorphisme. Il est probable que les mutations neutres sont en fait les plus nombreuses et que parfois apparaissent des mutations à effet sélectif certain. Encore faut-il considérer que ces mutations "neutres" auront dans des circonstances spéciales un rôle sélectif, et même que certaines d'entre elles l'aient déjà, mais que nous ne pouvons pas encore nous en rendre compte. Ce polymorphisme permet donc à l'espèce de faire face à des conditions changeantes ou nouvelles du milieu extérieur; au plus polymorphique elle sera au plus elle pourra d'ailleurs également élargir son aire. J'irai même jusqu'à dire qu'une espèce DOIT être polymorphique si elle veut survivre aux variations agressives du milieu extérieur, ayant ainsi "prévu" et étant "parée" contre une agression déterminée qui éliminera une grande partie des individus non-porteurs de cet allèle "protecteur" précis.

III. Isoenzymes des moustiques

A. Zymogrammes

La première étape dans l'étude isoenzymatique d'une ou de populations consiste à en établir les zymogrammes afin de les décrire par ces isoenzymes, d'en déterminer d'éventuels polymorphismes ou d'essayer de les séparer au niveau spécifique.

Les premiers zymogrammes de moustiques furent obtenus par Bianchi (1966) en Sardaigne qui étudia les phosphatases alcalines de larves du quatrième stade et d'imagos femelles de 5 espèces jumelles du groupe maculipennis : Anopheles atroparvus, A. messeae, A. labranchiae, A. subalpinus et A. maculipennis str.s.; il trouva des phosphatases alcalines distinctes pour les 2 premières formes d'une part, la troisième d'autre part, enfin pour la 4ième et la 5ième. La phosphatase alcaline monomorphique d'An. atroparvus et celle d'An. labranchiae sont codées par 1 locus autosomique biallélique, comme le démontra des expériences de croisements réciproques et en retours. Ce groupe maculipennis fut également étudié par Christensen (1968) en Californie, qui trouva des zymogrammes différents pour chaque souche. Freyvogel, Hunter et Smith (1968) en Californie établirent sur gel d'amidon et de polyacrylamide les zymogrammes d'estérases de 14 souches de Culicidae appartenant à 8 espèces des genres Anopheles, Aedes et Culex : 2 souches californiennes d'Anopheles freeborni et 2 d'Anopheles occidentalis, une souche d'Anopheles stephensi (élevée en Georgie, U.S.A.), 2 souches californiennes de Culex pipiens et une de C. tarsalis, 3 souches d'Aedes aegypti (la première provenant d'un élevage de Liverpool, la seconde d'Arabie et la troisième du Cameroun), 2 souches d'Ae. vittatus (l'une d'Italie et l'autre de Rhodésie) et enfin une souche d'Ae. annandalei de Taiwan. Les zymogrammes obtenus de lots d'individus homogénéisés furent caractéristiques pour chaque espèce, race et souche. Seul An. stephensi montra un dimorphisme sexuel. Ces auteurs étudièrent également la répartition des estérases dans l'organisme en réalisant des zymogrammes à partir d'organes (glandes salivaires, tube digestif, etc...).

Des différences nettes, qualitatives pour les estérases et quantitatives pour les phosphatases alcalines, furent trouvées entre une souche italienne et une souche rhodésienne d'Aedes vittatus (Bigot) par Freyvogel et McClelland (1969).

Towson (1969a et 1969b) étudia d'abord les protéines totales de 2 souches d'Aedes aegypti et puis les estérases de 4 souches d'Aedes aegypti : il trouva 6 isoenzymes d'estérases (voir également paragraphe "Isoenzymes et parasites).

Trebatoski et Haynes (1969) aux U.S.A. comparèrent sur gel d'amidon 6 groupes d'isoenzymes (estérases acétiques et butyriques, phosphatases alcalines et acides,

déshydrogénases lactiques et maliques) de larves du 4^e stade de 12 espèces de moustiques : 10 espèces d'Aedes (A. aegypti, A. mascarensis, A. albopictus, A. pseudoscutellaris, A. scutellaris, A. vittatus, A. atropalpus, A. togoi, A. triseriatus et A. sierrensis), Culex pipiens pipiens et Anopheles quadrimaculatus. Les estérases et les phosphatases alcalines furent caractéristiques pour chacune de ces 12 espèces. Les phosphatases acides et les déshydrogénases furent identiques chez 2 espèces du sous-genre Stegomyia (Ae. aegypti et Ae. mascarensis) tandis que les déshydrogénases lactiques furent identiques chez 3 autres espèces (Ae. albopictus, Ae. pseudoscutellaris et Ae. scutellaris) de ce même sous-genre. Par contre pas de différences génériques nettes n'apparurent.

Les zymogrammes des estérases de tous les stades de développement de Culex pipiens fatigans furent réalisés sur gel d'acrylamide par Jean-Pierre Simon (1969) dans la première partie de son travail. Des différences nettes furent trouvées entre chaque stade de développement, c.a.d., oeufs, larves, pupes et imagos. Au sein de chaque stade (oeufs de 8 et 24 heures, les 4 instars larvaires, pupes de chacun des 3 jours, imagos de 3 différents jours d'âge) des différences surtout quantitatives furent notées selon les âges.

Des études similaires sur acrylamide furent entreprises par Briegel et Freyvogel (1971) sur les estérases des différents stades de développement de souches de Culex pipiens pipiens autogène de Paris, de C.p. fatigans des Etats-Unis et d'Aedes aegypti du Zaïre. Les zymogrammes des oeufs de 40 heures (ainsi que ceux en diapause depuis 40 j. d'Aedes aegypti), des larves du 4^{ième} stade, des pupes et des imagos de 24 heures furent comparés. Pour chaque souche, 3 types de zymogrammes furent obtenus, groupant d'une part les oeufs, d'autre part les larves et les oeufs en diapause de Aedes aegypti et enfin les pupes et adultes. Aucun dimorphisme sexuel ne fut observé. Ces résultats sont donc différents de ceux de Simon (1969). Ces zymogrammes, comparés entre les 3 souches, permettent de les différencier spécifiquement et sub-spécifiquement, ceci aux différents stades de leur développement.

Bullini et al. (1972a) étudièrent les phosphoglucomutases de 102 populations de 35 espèces d'Aedes, Culex, Culiseta, Orthopodomyia et Anopheles : si les Anophelinae ne produisirent par allèle (voir plus loin "Système gène-enzyme) qu'une bande, les Culicinae en produisirent deux. La phosphoglucomutase d'une population italienne d'Orthopodomyia pulchripalpis fut trouvée monomorphique par Bullini et al., 1972a et Bullini et Coluzzi, 1973. Des populations de Culiseta longiareolata de ce pays, de Sicile et de Tunisie montrèrent 6 allèles pour cet enzyme, dont 3 polymorphiques; ces auteurs trouvèrent 4 allèles pour cet enzyme chez une population italienne de Culiseta annulata.

Quatre groupes d'isoenzymes (estérases, déshydrogénases maliques, déshydrogénases lactiques et leucines aminopeptidases) furent étudiés chez les larves, pupes et imagos du complexe Anopheles gambiae par Coker (1973) dans la première partie de son travail. Deux autres activités enzymatiques (alcool déshydrogénase et phosphatase alcaline) ne furent pas décelées. Le polymorphisme enzymatique apparut surtout parmi les estérases qui montrèrent un plus grand nombre d'isoenzymes (2 cholinesterases) chez les larves et les pupes. Comme l'avaient déjà remarqué Freyvogel et al. (1968) chez Anopheles freeborni et Aedes aegypti, l'inhibition par l'ésérine d'une bande déterminée chez l'imago d'Aedes gambiae démasqua la présence d'une autre bande.

B. Système gène-enzyme

La seconde étape consiste à établir la génétique formelle des isoenzymes à partir des zymogrammes obtenus de couples parentaux et de leur descendance. En effet, un enzyme étant codé (en partie ou en totalité) par un allèle chromosomique, chaque système enzymatique reflète un système génique caractéristique d'une espèce, d'une race, d'une souche.

1) Genre Anopheles

Etudiant les phosphatases alcalines des larves du 4ième stade d'Anopheles atroparvus et An. labranchiae (espèces jumelles européennes du groupe maculipennis) ainsi que celles des L4 hybrides, Bianchi (1968a) put conclure que ces enzymes étaient des dimères et étaient codés chacun par un locus monomorphique.

Bianchi et Rinaldi (1970) démontrèrent chez les imagos d'Anopheles atroparvus des estérases codées par 1 locus autosomique tètre-allélique : des élevages à partir de ces 4 allèles produisirent en effet 10 phénotypes. Bianchi et Chessa (1970) démontrèrent chez cette espèce le codage tri-allélique codominant des xanthines-déshydrogénases présentent uniquement chez la femelle.

Bianchi (1968b) démontra chez les L4 de 2 souches d'Anopheles stephensi (voir paragraphe "Isoenzymes et parasites") qu'une esterase était codée par 1 locus bi-allélique autosomique (et non 2 loci comme le mentionne le résumé anglais de la publication italienne).

Les phosphoglucomutases de cette espèce furent intensivement étudiées par Bullini et al. (1971a, b, 1973b) : 12 souches provenant d'Iraq, d'Iran, du Pakistan et des Indes montrèrent 5 isoenzymes codés par 5 allèles codominants à 1 locus.

Toujours chez cet Anopheles stephensi, Iqbal et al. (1973a, b) découvrirent, chez 2 souches pakistanaises, 3 isoenzymes de l'alcool déshydrogénase. Après avoir obtenus

des élevages homozygotes, ces auteurs établirent que l'isoenzyme à la migration la plus lente et celui à la migration la plus rapide étaient codés par 1 locus autosomique à 2 allèles codominants; la protéine enzymatique put être considérée comme un dimère, vu que l'hétérozygote montra une troisième bande située entre celles des parents homozygotes. Un locus estérasique se composa de 2 allèles codominants, de même qu'un locus pour les 2 phosphatases acides. Ce dernier locus ainsi que celui des alcools déshydrogénases sont "linked".

Aux Etats-Unis, Narang et Kitzmiller (1971a, b) trouvèrent chez les imagos d'Anopheles punctipennis 6 loci autosomiques codant des estérases. Ils étudièrent la génétique pour 3 d'entre eux : les systèmes estérasiques A et B présentèrent des allèles "nuls", le système C fut codé par 1 locus autosomique tri-allélique. Ces auteurs (Narang et Kitzmiller, 1972) étudièrent ensuite, chez les larves et imagos femelles et mâles de cette espèce, des xanthines déshydrogénases : celles-ci (présentes également chez les mâles) sont contrôlées par 2 loci autosomiques, l'un tri-allélique, l'autre bi-allélique; les octanols déshydrogénases sont contrôlées par 1 locus autosomique.

Dans leur révision des systèmes gène-enzyme des moustiques Bullini et Coluzzi (1973) y ajoutèrent les résultats de leurs études sur les phosphoglucomutases de 140 souches de 45 espèces dans 5 genres (Anopheles, Aedes, Culex, Culiseta et Orthopodomya) : les Anopheles paléarctiques An. plumbeus d'une part, les espèces jumelles An. claviger et An. petraganaii, ainsi que An. hispaniola, d'autre part et enfin An. algeriensis présentèrent des isoenzymes codés respectivement par quatre, trois et deux allèles codominants; 11 populations des 5 espèces jumelles paléarctiques An. maculipennis, An. messeae, An. labranchiae, An. atroparvus, An. melanon et An. sacharovi (appartenant au complexe paléo-néarctique maculipennis) présentèrent 6 isoenzymes; 4 souches d'Anopheles albimanus (néarctique) montrèrent 2 isoenzymes codés par un locus bi-allélique. L'An. superpictus méditerranéen différa de l'An. stephensi oriental (dont les études ont été mentionnées plus haut) par un seul isoenzyme distinct, tandis que l'An. rufipes éthiopien présenta deux isoenzymes à migrations semblables à deux d'An. stephensi. An. farauti de Mélanésie montra également deux tels isoenzymes. Les 6 espèces du complexe éthiopien An. gambiae (species A,B,C et D, An. merus et An. melas) présentèrent 4 isoenzymes codés par 4 allèles codominants.

2) Genre Culex

Dans la seconde partie de son travail Simon (1969) établit le contrôle génétique d'une estérase chez les L4 de Culex pipiens fatigans : celle-ci est codée par une paire allélique codominante autosomique; sa structure apparait comme un dimère, l'hété-

rozygote présentant en effet une bande intermédiaire entre celles des homozygotes. Garnett et French (1971) étudièrent chez les adultes de la même espèce 2 isoenzymes estérasiques (parmi 13 isoenzymes obtenus) codés par une paire allélique codominante autosomique (sans bande intermédiaire chez l'hétérozygote).

Les phosphoglucomutases de 8 souches de Culex du complexe pipiens (2 C.p. pipiens et 6 C.p. intermédiaires entre urbain autogène et rural) furent étudiées par Bullini et al. (1971c et 1972b) : chez une population urbaine romaine 6 phénotypes isoenzymatiques furent déterminés par un locus à 3 allèles codominants; 8 autres populations italiennes montrèrent 6 allèles codominants, déterminants 21 phénotypes (y compris les 6 phénotypes romains). Les estérases de C.p. pipiens autogènes furent étudiées par de Stordeur (1975); 2 locus autosomiques furent déterminés génétiquement : le premier, liés sur un chromosome autosomique, présenta 3 allèles (dont un "nul") et le second sept allèles (dont un "nul"). Pasteur et Sinègre (1975), dans leur étude sur des populations résistantes à un organophosphoré (voir le chapitre sur les isoenzymes et résistance aux insecticides), ajoutèrent 3 allèles au premier locus de de Stordeur et 2 au second. Une leucine-amino-peptidase, codée par un locus biallélique codominant, fut trouvée liée au chromosome portant le facteur sexuel (Pasteur, 1975); les alpha-glycérophosphate-déshydrogénases des pupes préimaginales et des adultes furent codées par un locus autosomique à 2 allèles codominants; leurs structures sont dimériques (Pasteur et de Stordeur, 1976).

Bullini et Coluzzi (1973) trouvèrent 4 allèles pour les phosphoglucomutases de Culex hortensis et 2 pour Culex mimeticus. Sakai et al. (1973) trouvèrent que les phosphatases alcalines de 2 souches de Culex tritaeniorhynchus (vecteur important de viroses en Asie) étaient codées par 2 allèles codominants d' 1 locus autosomique et leur structure dimérique.

3) Genre Aedes

Sur les 6 locus d'estérases de 2 souches "inbred" d'Aedes aegypti, Trebatoski et Craig (1969) dans l'Indiana (U.S.A.) établirent que les 2 estérases du locus à migration sur gel d'amidon la plus rapide étaient codées par une paire d'allèles codominants.

Cet enzyme chez cette espèce fut également étudiée sur gel de polyacrilamide par Townson (1969b) à Liverpool (voir paragraphe "zymogrammes") : se concentrant sur la paire d'isoenzymes la plus intensément colorable, ce chercheur (Townson, 1971 et 1972) conclut, de par les 4 phénotypes obtenus (à savoir : les 2 homozygotes, l'hétérozygote avec les 2 bandes et le phénotype ne présentant aucune bande), que le codage se fait par un locus triallélique dont l'un est un allèle "nul".

Les phosphoglucomutases d'Aedes aegypti furent étudiées par Bullini et al. (1970a

et b, 1972a et c et 1973a) et Bullini et Coluzzi (1972b) : comparant d'abord les oeufs, larves, pupes et adultes d'une population ouest-africaine et une souche de Liverpool, ces auteurs trouvèrent 2 phosphoglucomutases codées par 1 locus autosomique à 2 allèles codominants; une population voltaïque montra ensuite 6 phénotypes, déterminés par un locus triallèlique; un quatrième et un cinquième allèle du même locus furent trouvés chez une population de Tanzanie; enfin, 19 populations provenant d'Afrique, d'Asie, des Caraïbes et du Pacifique Sud montrèrent 7 isoenzymes phosphoglucomutasiques dépendant chacun d'un allèle d'un même locus autosomique.

Etudiant sur gel d'amidon 2 écotypes sympatriques d'Aedes aegypti du Kenya (l'un domestique et l'autre péridomestique), Scott et McClelland (1975) trouvèrent des différences nettes dans les protéines totales, les phosphatases alcalines et les leucine-aminopeptidases; les estérases, les enzymes maliques et les phosphoglucomutases furent quasi-identiques. Des populations d'Aedes aegypti de Porto-Rico, d'Ae. mascarensis de l'île Maurice et d'Ae. albopictus de Singapour furent utilisées pour comparaison. Après des expériences d'hybridisation, ces auteurs conclurent que "what we are calling "ecotypes" may actually be incipient species, partially isolated by habitat selection". Egalement du Kenya, Tabachnik et Powell (1976) étudièrent plusieurs systèmes enzymatiques de 3 populations d'Aedes aegypti de 3 villages séparés par 1 à 2 Km. Si 9 loci furent monomorphiques 4 furent très polymorphiques, dont les estérases; les isoenzymes de l'hexokinase sont codés par au moins 3 loci polymorphiques, dont des allèles "nuls" pour 2 d'entre eux.

Bullini et Coluzzi (1973) ne trouvèrent qu'une phosphoglucomutase chez Aedes vexans et Aedes echinus, tandis que Aedes geniculatus (jumelle avec Ae. echinus) présenta 3 isoenzymes codés par un locus triallèlique et Aedes caspius en présenta 5; les espèces jumelles Ae. pulchritarsis et Ae. herlandi sont différenciables par leurs isoenzymes phosphoglucomutasiques : 3 pour la première, 2 pour la seconde. Pour Ae. pullatus, Ae. cataphylla et Ae. detritus (du groupe communis) ces auteurs trouvèrent respectivement 2, 4 et 5 isoenzymes de la phosphoglucomutase. Ae. excrucians (du groupe annulipes) montra 4 de ces isoenzymes. L'unique phosphoglucomutase d'Ae. rusticus montra la même mobilité que la seconde des 3 d'Ae. refiki.

C. Isoenzymes marqueurs

Les isoenzymes représentent un instrument précieux en les utilisant comme marqueurs dans les expériences de lâchés pour étudier d'une part d'éventuels isolements précopulatoire entre des formes allopatriques et d'autre part, dans des tentatives de contrôle génétique (Bullini et Coluzzi, 1972a).

Dans le but d'obtenir des "enzymes marqueurs" pour des expériences de lâchés, le polymorphisme enzymatique et le codage génétique des phosphoglucomutases des 3 espèces jumelles méditerranéennes du complexe Aedes mariaae (Ae. maria, Ae. zammitii et Ae. phoeniciae) furent étudiées par Coluzzi et Bullini (1971) et Coluzzi, Bullini et Bianchi Bullini (1971a, b et c). Ils trouvèrent en tout 5 isoenzymes chez 15 populations d'Aedes mariaae (italiennes et tunisiennes), trois d'Ae. zammitii (italiennes et grecques) et une d'Ae. phoeniciae (libanaise). Les phosphoglucomutases chez Ae. mariaae de la Côte Tyrrhénienne et chez Ae. zammitii de la Côte Adriatique sont monomorphiques (à deux bandes) et distinctes, codées par un locus à 2 allèles codominants, comme le révéla les hybrides hétérozygotes obtenus en laboratoires. Transvasant 25.000 larves L4 et pupes de la Côte Adriatique vers la Côte Tyrrhénienne et utilisant les phosphoglucomutases comme marqueurs, ces auteurs constatèrent l'absence quasi-totale d'hybrides et conclurent à l'existence dans la nature d'un mécanisme d'isolement pré-copulatoire.

D. Isoenzymes et résistance aux insecticides

L'utilisation intense des insecticides depuis plusieurs décades sur la surface du globe a provoqué des pressions de sélections chez les insectes directement visés et leur faune associée ou ceux en contact avec les régions agricoles traitées.

L'apparition de nombreux résistants aux divers insecticides utilisés a été mis maintes fois en relation avec l'action spécifique d'un enzyme contrôlé génétiquement. Ainsi une DDT-déshydrochlorinase a été mise en évidence chez Aedes (Brown et Perry, 1956) et Musca domestica (Brown et Perry, 1956 et Lovell et Kearns, 1959) résistants au DDT. Cet enzyme chez Aedes aegypti, codé par un locus sur le chromosome 2 (Brown et Abedi, 1962 et Kimura et Brown, 1964), est responsable de la résistance au DDT chez cette espèce. Chez des résistants de Musca domestica et de Blatella germanica et Periplaneta americana une DDT-hydroxylase a été mis en évidence (Agosin et al., 1961).

Quant à la résistance aux organophosphorés, Matsumura et Brown (1961 et 1963) découvrirent chez Culex tarsalis une augmentation de l'activité carboxyestérasique d'une aliestérase. Par contre, Van Asperen (1959), Van Asperen et Oppenoorth (1959) et Oppenoorth et Van Asperen (1960) trouvèrent chez des Musca domestica résistantes aux malathion, diazinon et parathion une diminution de l'activité d'aliestérases; celles-ci seraient remplacées par 3 "aliestérases mutantes" qui métaboliseraient ces organophosphorés (Oppernoorth et Van Asperen, 1962). Menzel et al. (1963) étudièrent ces estérases électrophorétiquement et Velthuis et Van Asperen (1963) mirent en évidence leur caractères héréditaires.

Chez Drosophila melanogaster Ogita (1961) établit la relation génétique entre une aliestérase et la résistance à un insecticide. Kasal et Ogita (1965) trouvèrent une estérase dont l'activité était plus intense chez les Nephotettix cincticeps résistants au malathion. Tsakas et Kimbras (1970) trouvèrent une réduction de la fréquence de l'allèle "nul" d'une acétylcholinestérase de Dacus oleae. Beranek (1974) trouva une nette augmentation d'une carboxylestérase chez des souches résistantes de Mysus persicae

Etudiant les estérases de 12 populations de Culex pipiens pipiens de la région de Montpellier, soumises à un traitement au Dursban (R) (insecticide organo-phosphoré), et les comparant à une population d'une région avoisinante non-traitée et à 3 souches de laboratoire, Pasteur et Sinègre (1975) trouvèrent, chez les populations moins sensibles à ce produit, au second locus (voir paragraphe "système gène-enzyme") un nouvel allèle codant une estérase à activité intense et une diminution de la fréquence de l'allèle nul.

Il apparaît de ces études que les insectes, sans être pour cela déjà résistants, possèdent des enzymes capables de détoxifier des produits utilisés contre eux : tous les Aedes ont une déhydrochlorinase contre le DDT, tous les moustiques ont des carboxyestérases contre des organophosphorés; chez les souches résistantes ces enzymes existent en quantité plus grande ou ont une activité plus intense, ceci héréditairement.

E. Isoenzymes et parasites

Dans l'espoir d'élucider la relation hôte-parasite, Freyvogel et al. (1968) se mirent à étudier les estérases de moustiques, vecteurs ou non de plasmodia (voir paragraphe "zymogrammes").

Bianchi (1968b) compara les estérases d'un locus biallèlique déterminé d'une souche d'Anopheles stephensi sensible à l'infestation par Plasmodium gallinaceum et d'une autre souche réfractaire à ce parasite. Les larves L4 de la souche sensible présentèrent un isoenzyme différent de celui codé par l'allèle correspondant de la souche réfractaire. Les hybrides des 2 souches hétérozygotes présentèrent les 2 bandes.

Townson (1969b) étudia les estérases d'une souche d'Aedes aegypti (aux yeux noirs) sensible à l'infestation filarienne, celles d'une souche réfractaire (aux yeux rouges), celles d'une souche sensible (aux yeux rouges, obtenue après une série de croisements et de croisements en retours des 2 souches) et celles des hybrides F1 des 2 premières souches. Mais cet auteur n'essaya pas de différencier les souches par cette méthode ("at this stage no attempt was made to investigate differences between strains").

IV. Esterases d'*Aedes (Stegomyia) polynesiensis* Marks, 1951

A. L'espèce *Aedes polynesiensis*

L'aire de répartition de cette espèce (Belkin, 1962, 2, 311) s'étend sur un quadrilatère dont les angles sont situés à :

5° S., 175° O. (Iles Ellice)

20° S., 175° O. (Iles Fiji)

6° S., 140° E. (Iles Marquise)

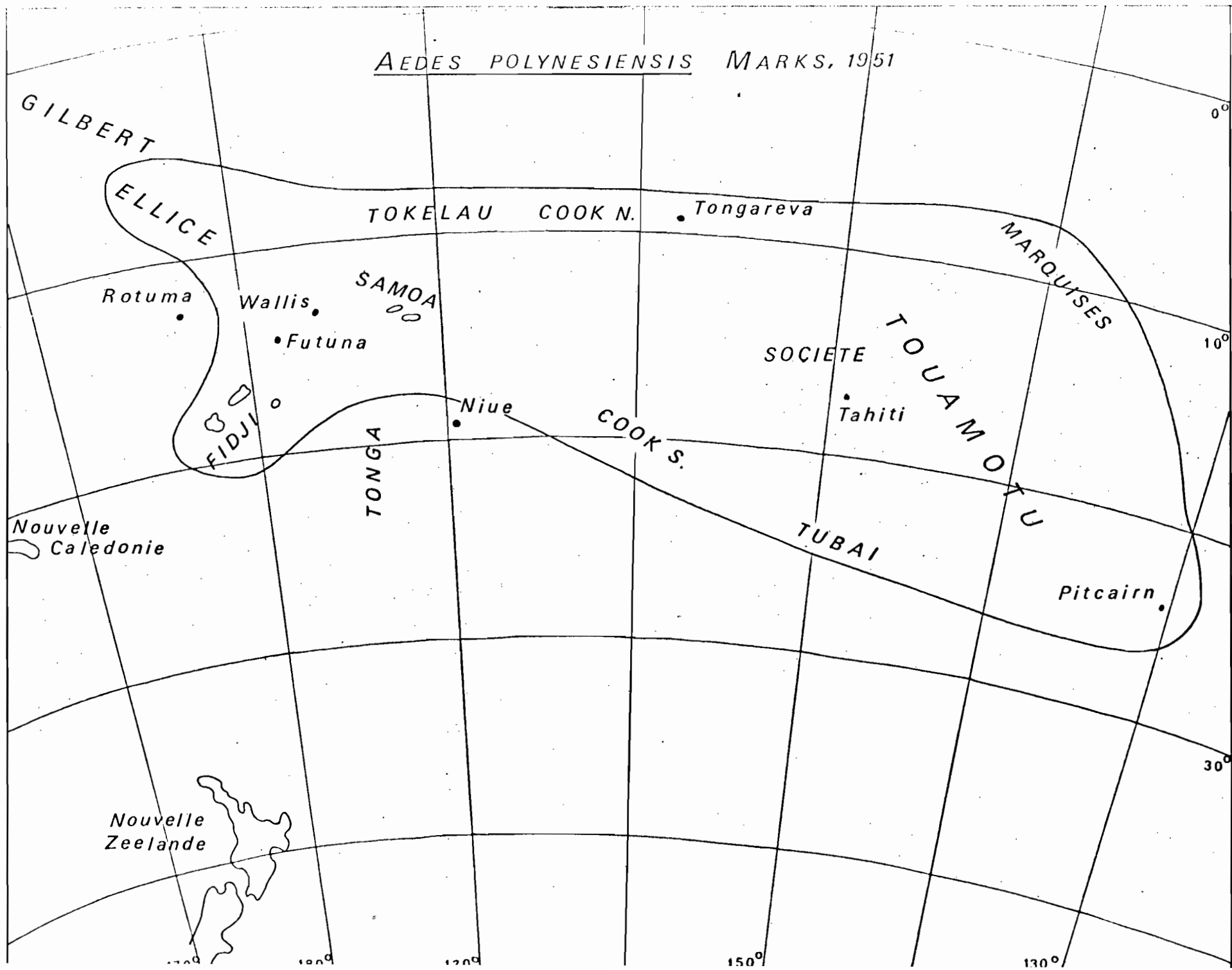
25° S., 130° E. (Ile Pitcairn)

Elle comprend donc, en plus des îles citées : Wallis et Futuna, les Samoa, les îles Tokelau, Cook, celles de la Société ainsi que les Touamotu et les Australes. Au sein de cette aire, des espèces du groupe scutellaris, auquel appartient *A. polynesiensis* sont restées localisées à des groupes d'îles : *A. pseudoscutellaris* et *A. horrescens* aux Fiji, *A. futunae* à Futuna et îles avoisinantes, *A. sp.* forme Wallis à Wallis, *A. upolensis* aux Samoa. Aux limites de cette aire, des espèces de ce groupe se trouvent également ainsi localisées : *A. rotumae* à Rotuma, *A. tongae* aux Tonga et *A. cooki* à Niue.

Aedes polynesiensis fut décrit de Taveuni aux Fiji par Elizabeth Marks (1951) qui le distingua de *A. pseudoscutellaris* (Theobald, 1910), après avoir constaté que "two distinct sibling species (apart from *A. horrescens*) have hitherto been included under the name *A. "pseudoscutellaris"*". Belkin (1962) et Huang (1975) sont également de cet avis, malgré les croisements expérimentaux réalisés par Woodhill (1954) et Rozeboom et Gilford (1954) entre ces deux espèces, qui donnèrent un certain nombre d'hybrides fertiles. *A. pseudoscutellaris* est donc une espèce cantonnée à quelques unes des îles Fiji.

Espèce semidomestique et anthropophile diurne, *A. polynesiensis* est le vecteur le plus important de la *Wuchereria bancrofti* subpériodique et transmet également le virus de la dengue dans les îles où elle est rencontrée. Ses gîtes préimaginaux sont très diversifiés; plusieurs écotypes peuvent être considérés : trou de rocher, trou d'arbre, trou de crabe, récipients produits par l'homme. Ces écotypes varient d'ailleurs dans l'intensité de leur pillosité larvaire. Se pourrait-il que ces écotypes soient différenciables isoenzymatiquement, qu'ils se soient isolés (partiellement ou totalement) par une sélection d'habitat, comme le démontrèrent par électrophorèse d'isoenzymes, Scott et McClelland (1975) pour 2 formes kenyannes d'*Aedes aegypti* ? A cette fin l'étude isoenzymatique d'*Aedes polynesiensis* que j'ai entreprise débuta par l'étude des esté-

Aedes POLYNESIENSIS MARKS, 1951



rases de l'écotype "trou de rocher". Ce groupe d'isoenzymes a été choisi parce que ces protéines enzymatiques présentent le plus grand polymorphisme.

Dans la littérature je n'ai trouvé qu'une référence à Aedes polynesiensis : Towson (1969), dans une remarque préliminaire, annonce avoir séparé A. polynesiensis d'A. pseudoscutellaris par leurs électrophorétochromes des protéines. Parmi les 12 espèces de moustiques étudiées par Trebatoski et Haynes (1969) figurent A. pseudoscutellaris, A. scutellaris et A. albopictus du groupe scutellaris auquel appartient A. polynesiensis; chez ces espèces 5 groupes d'isoenzymes furent étudiés, dont les estérases.

B. Le groupe d'isoenzymes estérases

Hunter et Burstone (1960) mirent au point une méthode de révélation de l'activité estérasique : l'alpha-naphtyl-acétate, utilisé comme substrat, donne un métabolite colorable par le Fast Blue RR (sel du diazonium). Allen (1961) ajouta à ce substrat l'alpha-naphtyl-butyrate, Hubby (1963) le bêta-naphtyl-acétate. Sims (1965), Hubby et Lewontin (1966), Markert et Hunter (in Maurer, 1968) et Ayala et al. (1972) raffinerent encore les méthodes. L'emploi de différents types d'inhibiteurs d'estérases (fréquemment utilisés comme insecticides) a permis une classification de celles-ci (Mounter et Whittaker, 1953; Van Asperen, 1959 et Menzel et al., 1963) :

1. les aliestérases, inhibées par les organophosphorés; parmi elles, les cholinestérases, inhibées en plus par l'ésérine;
2. les arylestérases non-inhibées par ces produits mais capables de les utiliser comme substrats;
3. de rares estérases n'inhibant ni hydrolysant les organophosphorés.

La production de ces multiples estérases est contrôlée génétiquement : Wright (1961 et 1963) l'établit chez Drosophila, Ogita et Kasai (1965) chez Musca, Bianchi (1968a et b) chez Anopheles (voir "Système gène-enzyme").

La majorité des estérases des moustiques étudiés par Freyvogel et al. (1968) apparurent lorsque l'alpha-naphtyl-acétate fut utilisé comme substrat. Ces auteurs utilisèrent également d'autres substrats ainsi que plusieurs insecticides inhibiteurs d'estérases pour caractériser celles-ci, sans toutefois les classer. L'utilisation de certains inhibiteurs permit la visualisation de bandes qui se trouvaient masquées. Ce fait fut déjà constaté par Arurkar et Knowles (1967) chez une cantharide. Les concentrations maximales de ces estérases de moustiques purent, après dissections et électrophorèses d'organes, être localisées aux organes à activité métabolique élevée tel que la paroi gastrique (surtout), les tubes de Malpighi et les ovaires.

Trebatoski et Craig (1968) trouvèrent chez l'Aedes aegypti adulte 2 bandes non

inhibées par l'ésérine et une bande bien inhibée par ce produit. Simon (1969) établit chez Culex pipiens fatigans la structure dimérique d'une aliestérase. Garnett et French (1971) trouvèrent chez cette espèce 2 cholinestérases, 4 aliestérases (dont 2 sont codées par un locus biallélique codominant) et 2 arylestérases (dont l'une uniquement présente chez le mâle).

Coker (1973), utilisant l'action inhibitrice de l'ésérine, démontra que les larves et pupes d'Anopheles gambiae possèdent des cholinestérases qui sont absentes chez l'adulte, tandis que Simulium damnosum en possède une au stade pupal et imaginal mais non au stade larvaire; cette inhibition chez A. gambiae a permis la mise en évidence d'une autre bande estérasique.

L'allèle significativement plus élevé chez les Culex pipiens pipiens du Languedoc, résistants au Dursban (R), code une aliestérase (Pasteur et Sinègre, 1975).

C. Matériels et méthodes

Les larves d'Aedes polynesiensis ont été prélevées dans leurs différents biotopes à Tahiti et élevées. Les oeufs ont été envoyés à l'O.R.S.T.O.M. à Bondy où les élevages ont été poursuivis et continués à l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers. Les larves, pupes et imagos ont alors été étudiés : homogénéisats de plusieurs individus (3 à 5), d'individus, de couples parentaux et leur descendance.

Ces homogénéisats sont obtenus en écrasant un ou des individus dans une goutte d'eau déminéralisée, dans laquelle est ensuite trempé un morceau de papier filtre Whatman n° 3 (6 x 3 mm). Ce papier filtre est inséré dans une fente coupé dans le substrat poreux du côté de la cathode. La migration électrophorétique s'effectue au sein de ce substrat poreux, qui est constitué de gel d'amidon (selon la technique décrite par Smithies, 1955), coulé dans un moule de 14 x 19 x 7 mm. Le tampon employé pour la confection du gel et celui versé dans les bacs où passent les électrodes sont composés d'acide citrique et de tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane (tris-base) dans les proportions données par Selander et al. (1971). Les ponts entre le tampon d'électrode et le gel sont constitués par du papier filtre de Schleicher et Schull.

La migration, sous l'effet d'un courant d'environ 35 mA (produit par une source réglée à environ 150V), est menée, en frigidaire, durant 6 heures. Le gel est ensuite extrait du moule et plongé dans le tampon de coloration (phosphate disodique et phosphate monopotassique, molaires) où il subit une préincubation de 25 min. afin d'amener le pH de 8 à 6,5. Le tampon de coloration est alors renouvelé et le substrat des estérases ajouté à la solution : ce substrat est constitué d'une solution de 0,5 Gm d'alpha- et 0,5 Gm de bêta-naphtyl-acétate dans 75 ml d'acétone et 25 ml d'eau désio-

nisée. Les estérasas libèrent le naphthol, qui est, après 15 min. d'action enzymatique, coloré par 100 à 200 mg de poudre de Fast GBC Garnett Salt. Les premières taches apparaissent après quelques minutes, les dernières après environ 45 min. Le gel est alors fixé par deux fois par un mélange d'acide acétique (1 vol.), de méthanol (5 vol.) et d'eau courante (4 vol.); après 24 h, il est emballé dans du plastique et conservé au frigidaire jusqu'à un nombre suffisant de gels ait été obtenu pour y consacrer un film couleur.

D. Résultats obtenus

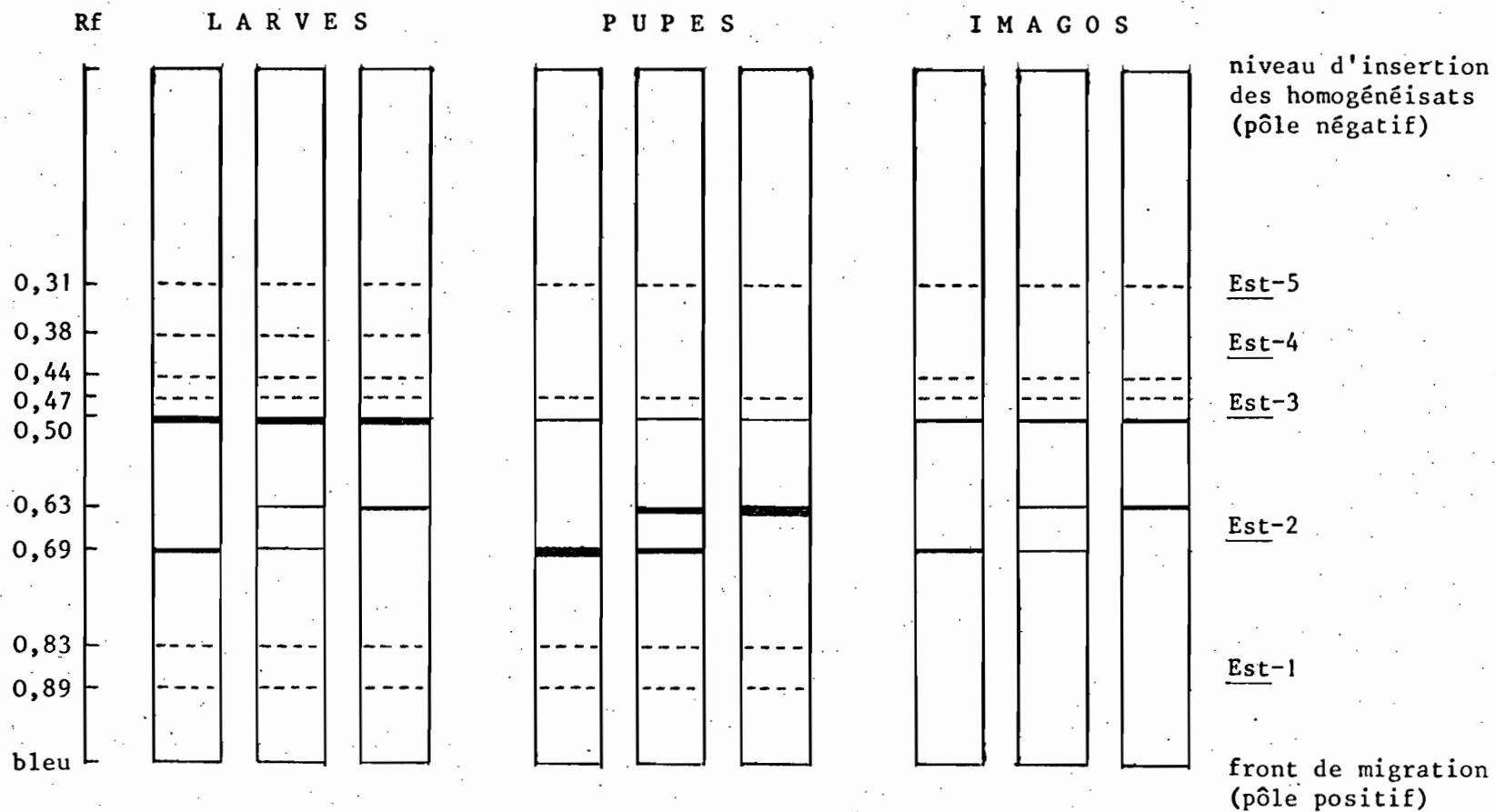
52 gels comportant 504 migrations d'homogénéisats individuels et 90 migrations d'homogénéisats de multiples individus ont été réalisés. Les deux premières études ont été effectuées sur une souche zairoise d'Aedes aegypti : elles révélèrent que les aspects pratiques de la technique, basée sur celle de Nicole Pasteur à Montpellier (communication personnelle), étaient d'emblée au point.

De façon générale pour Aedes polynesiensis "trou de rocher" de Paea (Tahiti), 5 systèmes enzymatiques estérasiques furent observés; numérotons les, par ordre décroissant de leur charge électrique négative, Est-1, Est-2, Est-3, Est-4 et Est-5 (ce dernier migrant donc le plus lentement). Le chiffre qui suit cette numérotation donne la "position allélique" ou "référence au front" (Rf), c.a.d., le rapport entre la distance parcourue par la protéine enzymatique et le front de migration (distance du bleu de bromophénol).

1. Les larves : 146 migrations individuelles et 67 multiples. Les homogénéisats de 3 individus de chacun des stades montrèrent **5** systèmes Est, l'intensité de coloration allant croissante selon le stade de développement (L1 à L4).

Les larves homogénéisées individuellement montrèrent :

Est-1 : ce système assez diffusé de 2 isoenzymes, Est-1-0,89 et Est-1-0,83, est inconstant : présent dans 2/3 des migrations multiples, il n'a été observé que dans 30 % des individus. Il n'apparaît que 20 à 30 min. après le saupoudrage du colorant et ne manifeste en général qu'une faible activité, si ce n'est sa quantité qui soit faible; 4 migrations individuelles et 3 multiples montrèrent cependant une intensité de coloration très nette. Ces Est-1-0,89 et Est-1-0,83 apparaissent d'abord rouges, passent au pourpre et finissent bleues (au moment de la fixation après 1 h. de coloration), ce qui implique qu'elles hydrolysent d'abord le bêta-naphtylacétate (produit de l'hydrolyse coloré en rouge) puis l'alpha-naphtyl acétate (produit bleu) qui l'emporte en fin de compte.



Les isoenzymes estérasiques d'Aedes polynesiensis "trou de rocher" sont schématisés pour chacun des stades de développement. Notez les 3 phénotypes des alloenzymes Est-2. Les bandes inconstantes sont en pointillés.

L'inconstance qualitative et quantitative dépend très probablement du métabolisme de la larve qui varie selon son état d'évolution par rapport à la mue : des larves jeunes manifestent certaines de leurs fonctions enzymatiques différemment que des larves pré-muantes.

Est-2 : ce système, composé des 2 bandes Est-2-0,69 et Est-2-0,63, est constant (100 % des larves), apparaît après 5 à 10 min. et est toujours nettement intense en coloration bleue (hydrolyse préférentielle de l'alpha-naphtyl-acétate). Ces 2 isoenzymes sont extrêmement intéressants parce qu'ils se manifestent par 3 phénotypes : l'un présentant les 2 bandes (Est-2-0,69 et Est-2-0,63), les 2 autres présentant l'une (Est-2-0,69) ou l'autre (Est-2-0,63) bande. Lorsqu'il n'y a qu'une bande son intensité de coloration est plus grande que si elle est accompagnée de l'autre. Par ces observations qualitatives et quantitatives, l'hypothèse d'un locus biallèlique vient de suite à l'esprit : les études de couples parentaux et leurs descendances (voir plus loin) la confirmeront.

Est-3 : ce système est également constant, apparaît déjà après 1 à 5 minutes et se colore fortement en pourpre, témoignant ainsi d'une présence quantitative importante ou d'une grande activité dans son action hydrolytique aussi bien pour l'alpha- que la bêta-naphtyl-acétate. En fait la bande constante et intense est l'Est-3-0,50, qui est, dans plus de la moitié des individus, accompagnée d'une bande ~~bleue~~^{pourpre} plus étroite et plus faible, un peu plus lente (Est-3-0,47); trois fois, 2 bandes ~~bleues~~^{pourpres} plus lentes (Est-3-0,47 et Est-3-0,44) accompagnèrent cette Est-3-0,50; une fois, cette seconde bande (Est-3-0,44) accompagna seule la bande principale Est-3-0,50. S'agit-il d'un locus tri-allèlique ou de 2 loci ou d'autre chose ? Des techniques plus précises (gel de polyacrylamide p.e.) pourront peut-être éclaircir ce système estérasiqque complexe.

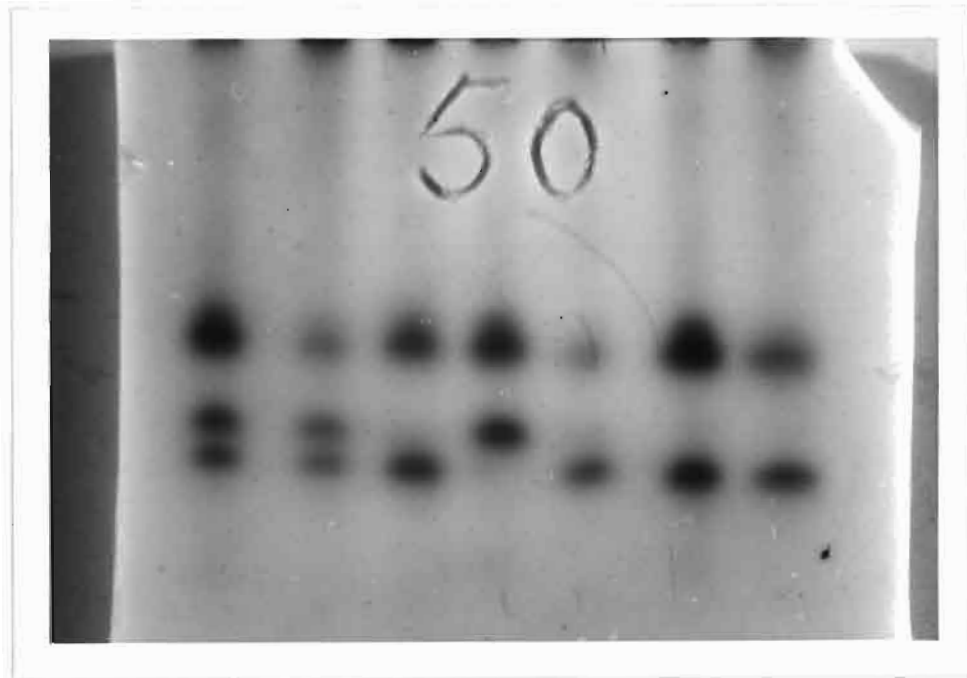
Est-4 : faiblement présent après 45 min. dans 80 % des homogénéisats multiples et près de la moitié des individus, ce système est composé d'une bande rouge, l'Est-4-0,38.

Est-5 : 7,5 % des individus et 45 % des homogénéisats multiples montrèrent, également après 45 min., ce faible système composé d'une bande rouge, l'Est-5-0,31.

2. Les pupes : 101 migrations individuelles. Les bandes apparaissent dans les mêmes temps que ceux des larves.

Est-1 : les 2 bandes Est-1-0,89 et Est-2-0,83 n'apparurent faiblement que chez 16 pupes avec une évolution de coloration semblable à celle des larves. L'âge de la pupa joue-t-il éventuellement un rôle ou est-ce un "résidu" larvaire ?

Rf



0,50

0,63

0,69

Est-3

Est-2

A A B C B B B

Estérasas de pupes: A = hétérozygotes

B = homozygotes Est-2-0,69

C = homozygotes Est-2-0,63

Est-2 : également chez la pupa les 3 phénotypes (déjà décrits chez la larve) furent observés avec les mêmes Rf (Est-2-0,69 et Est-2-0,63) et la même coloration bleue. Leur intensité de coloration est cependant plus forte que celle des larves. La bande d'un des 2 phénotypes à bande unique est également plus prononcée que celle accompagnée de l'autre bande chez le 3ième phénotype.

Est-3 : constant en Rf 0,50 et de coloration rouge-pourpre, ce système reste moins intense que l'Est-2 (c'est l'inverse chez la larve) et aussi moins intense que l'Est-3 larvaire. 42 pupes montrèrent une petite bande étroite supplémentaire plus lente : l'Est-3-0,47, rouge-pourpre.

Est-4 : ce système estérasiqne ne fut pas observé.

Est-5 : 10 pupes seulement manifestèrent une faible activité rouge en Rf 0,31.

3. Femelles : 141 migrations individuelles et 8 multiples. Les bandes n'apparaissent qu'après 15 à 20 min. de coloration.

Est-1 : non mise en évidence.

Est-2 : les 3 phénotypes Est-2-0,69, Est-2-0,63 et Est-2-0,69 + Est-2-0,63 apparurent en bleu, avec une intensité moindre que les Est-2 des pupes mais sensiblement égales à celle des larves.

Est-3 : constant en Rf 0,50 et uniquement rouge (hydrolyse préférentielle du bêta-naphtyl-acétate), ce système est doublé dans la 1/2 des migrations individuelles et multiples par une bande rouge plus lente (Est-3-0,47); l'Est-3-0,44 apparut chez 1 des huit multiples et 2 individus; ces 2 estérases 0,47 et 0,44 furent simultanément présentes chez 5 individus.

Est-4 : non mise en évidence.

Est-5 : faiblement rouge, ce complexe est présent par 1 bandes dans la 1/2 des migrations multiples et 1/4 des migrations individuelles; sa Rf est de 0,31.

4. Mâles : 120 migrations individuelles et 13 multiples. Les bandes n'apparaissent également qu'après 15 à 20 min. et seulement chez des mâles de moins d'une semaine, l'idéal étant 36 à 48 h. après l'émergence.

Est-1 : non mise en évidence.

Est-2 : les 3 phénotypes sont identiques à ceux des femelles.

Est-3 : identique à celle de la femelle sauf que les bandes plus lentes sont moins fréquentes : 1 des 13 migrations multiples, 15 % des individus pour l'Est-3-0,47 et 2 individus avec l'Est-3-0,44.

Est-4 : non mise en évidence.

Est-5-0,31 : présente seulement chez 1 des 13 migrations multiples et 23 % des individus.

5. Couples et leurs descendances : Après que des pupes eurent émergées individuellement dans de petites cages, des couples formés d'une femelle et d'un mâle furent isolés. Après accouplement les mâles furent étudiés et, après repas sanguins et pontes, les femelles. L'attention se porta surtout sur l'Est-2 : une bande (Est-2-0,69 ou Est-2-0,63) ou les deux. Après une semaine de diapause des oeufs, ceux-ci furent mis en eau et les larves L4, pupes et imagos étudiés.

Mâle Est-2-0,69 et femelle Est-2-0,69 : tous les descendants furent trouvés Est-2-0,69

Mâle Est-2-0,63 et femelle Est-2-0,63 : tous les descendants furent trouvés Est-2-0,63

Mâle Est-2-0,69 et femelle Est-2-0,63 ou l'inverse : tous les descendants furent trouvés Est-2-0,69 + Est-2-0,63.

Mâle Est-2-0,69 et femelle Est-2-0,69 + Est-2-0,63 ou l'inverse : descendants trouvés Est-2-0,69 ou Est-2-0,69 + Est-2-0,63 dans les proportions 1 : 1.

Mâle Est-2-0,63 et femelle Est-2-0,69 + Est-2-0,63 ou l'inverse : descendants trouvés Est-2-0,63 ou Est-2-0,69 + Est-2-0,63 dans les proportions 1 : 1.

Mâle et femelle Est-2-0,69 + Est-2-0,63 : descendants trouvés Est-2-0,69, Est-2-0,69 + Est-2-0,63 et Est-2-0,63 dans les proportions 1 : 2 : 1.

Exemple : mâle Est-2-0,69 + Est-2-0,63

femelle Est-2-0,69 + Est-2-0,63

ponte : 48 oeufs, tous éclos; 2 larves L2 mortes

<u>Est-2</u>	0,69	0,69 + 0,63	0,63
larves L 4	3	7	3
pupes	8	13	7
imagos	-	4	1
total	11	24	11

E. Interprétations et conclusion

Le but de cette étude isoenzymatique est de caractériser Aedes polynesiensis "trou de rocher" afin de pouvoir le comparer aux autres écotypes pour établir l'existence d'un éventuel complexe d'espèce et d'alors mieux cerner le vecteur de Wuchereria bancrofti afin de le combattre efficacement. A cette fin, les Est-2-0,69 et Est-2-0,63 ainsi que l'Est-3-0,50 sont intéressantes; les autres isoenzymes estérasiques décrits le sont moins par leur inconstance et leur faible activité.

Est-3-0,50 : cette estérase est constante et toujours nettement active aussi bien chez les larves et les pupes que chez les mâles et femelles. Elle pourra servir de bande de référence et de comparaison avec d'autres écotypes d'Aedes polynesiensis et d'autres espèces du groupe scutellaris.

Est-2 : les études parentales démontrent l'hérédité mendélienne des deux isoenzymes codés par ce locus : les 3 phénotypes (identiquement présent à tous les stades de développement) correspondent à 3 génotypes comprenant l'homozygote Est-2-0,69, l'homozygote Est-2-0,63 et l'hétérozygote Est-2-0,69 + Est-2-0,63. Les allèles déterminent également quantitativement ces isoenzymes car chacune des deux bandes homozygotes est plus intensément colorée que celle présente chez l'hétérozygote, chez qui les deux bandes présentent la même intensité; l'on peut donc aussi conclure à une codominance de ces deux allèles. Comme femelles et mâles ne montrent pas de différence, ce locus est probablement porté par l'un des chromosomes autosomiques.

En conclusion, les isoenzymes estérasiques Est-2-0,69 et Est-2-0,63 sont des alloenzymes codés par un locus bi-allélique autosomique et sont codominants. Ils peuvent, avec l'isoenzyme Est-3-0,50 servir comme références dans des études ultérieures sur Aedes polynesiensis et le groupe scutellaris.

BIBLIOGRAPHIE

- AGOSIN M., MICHAELI D., MISKUS R., NAGASAWA S. et HOSKINS W.H., 1961 : A new DDT-metabolizing enzyme in the german cockroach.
J. econ. Ent., 54, 340-342.
- Annals N.Y. Academy of Sciences, 1968, 151, 1-689.
- APELLA E. et MARKERT C.L., 1961 : Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 171-176.
- ARURKAR S.K. et KNOWLES C.O., 1967 : Electrophoretic separation of soluble esterases from the blister beetle, Epicauta lemniscata (Fabricius), and their inhibition by certain organosphosphates and carbamates.
Proc. North Centr. Branch Entomol. Soc. Amer., 22, 134-137.
- ARURKAR S.K. et KNOWLES C.O., 1968 : Electrophoretic studies of insect esterases.
Ann. Entom. Soc. Amer., 61, 686-690.
- AYALA F.J., POWELL J.R., TRACEY M.L., MOURAO C.A. et PEREZ-SALAS S., 1972 : Enzyme variability in the Drosophila willistoni group. IV. Genic variation in natural populations of Drosophila willistoni.
Genetics, 70, 113-139.
- BALL G.H. et CLARK E.W., 1953 : Species differences in amino acids of Culex mosquitoes.
Syst. Zool., 2, 138-141.
- BARMAN T.E., 1969 : Enzyme handbook, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2 vol)
- BECKMAN L. et JOHNSON F.M., 1964a : Variations in larval alkaline phosphatase controlled by Aph alleles in Drosophila melanogaster.
Genetics, 49, 829-835.
- BECKMAN L. et JOHNSON F.M., 1964b : Genetic variations of phosphatases in larvae of Drosophila melanogaster.
Nature, 201, 321.
- BECKMAN L. et JOHNSON F.M., 1964c : Esterase variations in Drosophila melanogaster.
Hereditas, 51, 212-220.
- BECKMAN L. et JOHNSON F.M., 1964d : Genetic control of aminopeptidases in Drosophila melanogaster.
Hereditas, 51, 221-230.
- BELKIN J.N., 1962 : The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae).
Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, 2 vol.
- BENOIT P.L.G. et van SANDE M., 1959 : Etude des protéines de l'hémolymphe de Triatoma infestans et Rhodnius prolixus par ultra-microelectrophorèse en gel de gélose.
Ann. Soc. belg. Méd. trop., 39, 135-143.
- BIANCHI U., 1965 : Le affinita genetiche fra due specie di Anopheles studiate con la tecnica elettroforetica.
Atti Ass. Genet. It., 10, 231-240.
- BIANCHI U., 1966 : Zimogrammi delle fosfatasi alcaline in alcune specie di Anopheles appartenenti al grupo maculipennis.
Atti Ass. Genet. It., 11, 276-285.

- BIANCHI U., 1968a : Homologous alkaline phosphatases and homologous loci in two sibling species of European anopheline mosquitoes.
Nature, 217, 382-383.
- BIANCHI U., 1968b : Generica formale di una proteina dotata di attivita catalitica esterica in Anopheles stephensi.
Acc. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sc. Fis. Mat. e Nat., 45, 192-194.
- BIANCHI U. et CHESSA G., 1970 : Alloenzimi ad attivita xantindeidrogenasica in Anopheles atroparvus.
Boll. Zool., 37, 477.
- BIANCHI U. et RINALDI A., 1970 : New gene-enzyme system in Anopheles atroparvus : occurrence and frequencies of four alleles at the Est. 6 locus.
Can. J. Genet. Cytol., 12, 325-330.
- BRATKOWSKI T.A., 1967 : Properties of face fly acetyl-cholinesterase.
M.S. thesis, University of Missouri, Columbia, Missouri, 84 p.
- BREWER G.J., 1970 : An introduction to isozymes techniques.
Academic Press, New York and London.
- BRIEGEL H., 1969 : Untersuchungen zum Aminosäuren- und Proteinstoffwechsel während der autogenen und anautogenen Eireifung von Culex pipiens.
J. Insect. Physiol., 15, 1137-1166.
- BRIEGEL H. et FREYVOGEL T.A., 1971 : Non-specific Esterases during development of Culicine Mosquitoes.
Acta tropica, 28, 291-298.
- BRODIE H.D. et RIJCKMAN R.E., 1967 : Molecular taxonomy of Triatominae (Hemiptera : Reduviidae).
J. med. Ent., 4, 497.
- BROWN A.W. et ABEDI Z.H., 1962 : Genetics of DDT resistance in several strains of Aedes aegypti.
Cand. J. Genet. Cytol., 4, 319-322.
- BROWN A.W. et PERRY A.S., 1956 : Dehydrochlorination of DDT by resistant houseflies and mosquitoes.
Nature, 178, 368-369.
- BULLINI L. et COLUZZI M., 1972a : I sistemi gene-enzima nella lotta genetica.
Parassitologia, 14, 67-70.
- BULLINI L. et COLUZZI M., 1972b : Natural selection and genetic drift in protein polymorphism.
Nature, 239, 160-161.
- BULLINI L. et COLUZZI M., 1973 : Electrophoretic studies on gene-enzyme systems in mosquitoes (Diptera, Culicidae).
Parassitologia, 15, 221-248.
- BULLINI L., COLUZZI M., GIRONI A.M. et MORELLINI M., 1970a : Phosphoglucomutase polymorphism in Aedes aegypti.
Parassitologia, 12, 27-30.

- BULLINI L., GIRONI A.M., BIANCHI BULLINI A.P. et COLUZZI M., 1970b : Further observations on phosphoglucomutase polymorphism in Aedes aegypti.
Parassitologia, 12, 113-117.
- BULLINI L., COLUZZI M., CANCRINI G. et SANTOLAMAZZA C., 1971a : Multiple phosphaglucomutase alleles in Anopheles stephensi.
Heredity, 26, 475-478.
- BULLINI L., CANCRINI G., BIANCHI BULLINI A.P. et DI DECO M., 1971b : Further studies on the phosphaglucomutase gene in Anopheles stephensi : evidence for a fourth allele (Diptera, Culicidae).
Parassitologia, 13, 435-438.
- BULLINI L., COLUZZI M., BIANCHI BULLINI A.P. et BLEINER G., 1971c : Phosphaglucomutase polymorphism in Culex pipiens (Diptera, Culicidae).
Parassitologia, 13, 439-443.
- BULLINI L., COLUZZI M. et BIANCHI BULLINI A.P., 1972a : Studi genetici nella fosfoglucomutasi nei Ditteri Culicidi.
Atti Ass. Genet. It., 17, 43-45.
- BULLINI L., COLUZZI M., BIANCHI BULLINI A.P. et RENNA L., 1972b : Stability of frequencies of phosphoglucomutase alleles in Culex pipiens breeding in ecological different environments.
Acc. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sc. Fis., Mat'e Nat., 53, 608-611.
- BULLINI L., GIRONI A.M., BIANCHI BULLINI A.P. et COLUZZI M., 1972c : Phosphoglucomutase gene in Aedes aegypti : a fourth allele and preliminary linkage data.
Biochemical Genetics, 7, 41-44.
- BULLINI L., COLUZZI M., BIANCHI BULLINI A.P. et CANCRINI G., 1973a : A new phosphoglucomutase (PGM) allele in Aedes aegypti (Diptera, Culicidae).
Parassitologia, 15, 141-144.
- BULLINI L., CANCRINI G., MURA G., DI DECO M., BIANCHI BULLINI A.P., 1973b : Alleli per la fosfoglucomutasi in popolazioni di Anopheles stephensi di diversa origine geografica.
Parassitologia, 15, 217-220.
- BULMER M.C., 1971 : Protein polymorphism.
Nature, 234, 410-411.
- BURNS J.M. et JOHNSON F.M., 1967 : Esterase polymorphism in natural populations of a sulphur butterfly, Colias eurytheme.
Science, N.Y., 156, 93-96.
- BURNS J.M. et JOHNSON F.M., 1971 : Esterase polymorphism in the butterfly Hemiargus isola : stability in a variable environment.
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2480.
- CHEN P.S., 1959 : Studies on the protein metabolism of Culex pipiens L. III. Comparative analysis of the protein contents of the larval hemolymph of autogenous and anautogenous forms.
J. Ins. Physiol., 3, 335-344.

- CHRISTENSEN H.A., 1968 : Biology of Anopheles occidentalis Dyar and Knab. Thesis, University of California at Davis.
- CLARK E.W. et BALL G.H., 1956 : Preliminary microelectrophoretic studies of insect proteins.
Physiol. Zool., 29, 206-212.
- COKER W.Z., 1973 : Electrophoretic patterns in Anopheles gambiae and Simulium damnosum.
Ann. trop. Med. Parasitol., 67, 475-481.
- COLUZZI M. et BULLINI L., 1971 : Enzyme Variants as Markers in the Study of pre-copulatory Mechanisms.
Nature, 231, 445-456.
- COLUZZI M., BULLINI L. et BIANCHI BULLINI A.P., 1971a : Phosphoglucomutase (PGM) allozymes in two forms of the mariae complex of the genus Aedes.
Biochemical Genetics, 5, 253-255.
- COLUZZI M., BULLINI L. et BIANCHI BULLINI A.P., 1971b : Phosphoglucomutase polymorphism in Aedes phoeniciae Coluzzi et Sabatini of the Ae. mariae complex (Diptera, Culicidae).
Bull. ent. Res., 61, 327-330.
- COLUZZI M., BULLINI L. et BIANCHI BULLINI A.P., 1971c : Alleli per la fosfoglucomutasi (PGM) nel complesso mariae del genere Aedes e studio dell'isolamento riproduttivo di popolazioni naturali.
Atti Ass. Genet. It., 16, 5-7.
- COOK B.J. et FORGASH A.J., 1965 : The identification and distribution of the carboxylic esterases in the american cockroach Periplaneta americana.
J. Insect Physiol., 11, 237-250.
- CRAIG G.B., 1963 : Prospects for vector control through genetic manipulation of populations.
Bull. World Health Organ. (Suppl.), 29, 89-97.
- DEMUTH F., 1925 : Uber Phosphatstoffwechsel. II.
Biochem. Z., 166, 162-171.
- DESOWITZ R.S., 1969 : Developmental changes in the protein constitution of a mosquito (Armigeres subalbatus) as revealed by disc electrophoresis.
J. Parasitol., 55, 476.
- DOANE W.W., 1965 : Disc electrophoresis of alpha-amylase isozymes in Drosophila melanogaster.
Amer. Zool., 5, 697.
- DOANE W.W., 1967 : Quantitation of amylases in Drosophila separated by acrylamide gel electrophoresis.
J. exp. Zool., 164, 363-378.
- DOWNE A.E.R., 1963 : Mosquitoes : Comparative serology of four species of Aedes (Cochle-rotatus).
Science, 139, 1286-1287.

- EGUCHI M., YOSHITAKE N. et KAI H., 1965 : Types and inheritance of blood esterase in the silkworm Bombyx mori L.
Japan J. Genet., 40, 15-19.
- ENZYME NOMENCLATURE. Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry, Elsevier, Amsterdam, 1965.
- FOX I., KNOGHT W.B. et BAYONA I.G., 1963 : Antigenic relationships among mosquitoes and sand flies demonstrated by agar-gel tests.
J. Allergy, 34, 196-202.
- FREYVOGEL T.A. et McCLELLAND G.A.H., 1969 : Differences in hydrolase isozymes of Italian and Rhodesian strains of Aedes vittatus (Bigot) (Diptera : Culicidae) and their hybrids.
Proc. roy. ent. Soc. Lond. (A), 44, 80-83.
- FREYVOGEL T.A., HUNTER R.L. et SMITH E.M., 1968 : Nonspecific esterases in moquitoes.
J. Histochem. Cytochem., 16, 765-790.
- GARNETT P. et FRENCH W.L., 1971 : A genetic study of an esterase in Culex pipiens quinquefasciatus.
Mosquits News, 31, 379-386.
- GRELL E.H., 1967 : Electrophoretic variants of alpha-glycerophosphate dehydrogenase in Drosophila melanogaster.
Science, N.Y., 158, 1319-1320.
- GRELL E.H., JACOBSON K.B. et MURPHY J.B., 1965 : Alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster : isozymes and genetic variants.
Science, N.Y., 149, 80-82.
- ~~GILBOURD, 1963~~
- HADORN E. et MITCHELL H.K., 1951 : Properties of mutants of Drosophila melanogaster and changes during development as revealed by paper chromatography.
Proc. natl. Acad. Sci., 37, 650-665.
- HARRIS H., 1969 : Genes and isozymes.
Proc. roy. Soc. Lond., 174, 1-31.
- HUANG YIAU-MIN, 1975 : A redescription of Aedes (Stegomyia) pseudoscutellaris (Theobald) with a note on the taxonomic status of Aedes (Stegomyia) polynesiensis Marks (Diptera : Culicidae).
Mosquito Systematics, 7, 87-101.
- HUBBY J.L., 1963 : Protein differences in Drosophila. I. D. melanogaster.
Genetics, 48, 871-879.
- HUBBY J.L. et 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. et NARISE S., 1967 : Protein differences in Drosophila. III. Allelic differences and species differences in vitro hybrid enzyme formation.
Genetics, 57, 291-300.
- HUBBY J.L. et THROCKMORTON L.H., 1965 : Protein differences in Drosophila. II. Comparative species genetics and evolutionary problems.
Genetics, 52, 203-215.
- HUNTER R.L. et MARKERT C.L., 1957 : Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels.
Science, N.Y., 125, 1294-1295.
- IQBAL M.P., SAKAI R.K. et BAKER R.H., 1973a : The genetics of an alcohol dehydrogenase in the mosquito Anopheles stephensi.
J. med. Ent., 10, 309-311.
- IQBAL M.P., TAHIR M.K., SAKAI R.K. et BAKER R.H., 1973b : Linkage groups and recombination in the malaria mosquito.
J. Hered., 64, 133-136.
- JOHNSON F.M., 1966 : Drosophila melanogaster : Inheritance of a deficiency of alkaline phosphatase in larvae.
Science, 152, 361-362.
- JOHNSON F.M. et BURNS J.M., 1966 : Electrophoretic variation in esterases of Colias eurytheme (Pieridae).
J. Lepidopterists' Soc., 20, 207-211.
- JOHNSON F.M. et DENNISTON C., 1964 : Genetic variation of alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster.
Nature, Lond., 204, 906-907.
- JOHNSON F.M. et SAKAI R.K., 1964 : A leucine aminopeptidase polymorphism in Drosophila buskii.
Nature, 203, 373.
- JOHNSON F.M., KANAPI C.G., RICHARDSON R.H., WHEELER M.R. et STONE W.S., 1966a : An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light Drosophila ananassae strains from American and Western Samoa.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 56, 119-125.
- JOHNSON F.M., KANAPI C.G., RICHARDSON R.H., WHEELER M.R. et STONE W.S., 1966b : An operational classification of Drosophila esterases for species comparisons.
Univ. Texas Publ., 6615, 517-
- JOHNSON F.M., KANAPI C.G., RICHARDSON R.H., SAKAI R.K., 1967 : Isozyme variability in species of the genus Drosophila. I. A multiple allelic isozyme system in Drosophila buskii : inheritance and general conditions.
Biochem. Genet., 1, 35-40.
- JOHNSON F.M., RICHARDSON R.H. et KAMBYSELLIS M.P., 1968 : Isozyme variability in species of the genus Drosophila. III. Qualitative comparison of the esterases of D. aldrichi and D. mulleri.
Biochem. Genet., 1, 239-247.
- JOHNSON G.B., 1974 : Enzyme polymorphism and metabolism.
Science, 184, 28-37.

- KASAI T. et OGITA L., 1965 : Studies on malathion-resistance and esterase activity in green rice leafhoppers.
SABCO J., 1, 130-140.
- KAZAZIAN H.H., YOUNG W.J. et CHILDS B., 1965 : X-linked 6 phosphogluconate dehydrogenase in Drosophila : Subunit associations.
Science, N.Y., 150, 1601-1602.
- KIKKAWA H., 1963a : Agar-gel electrophoretic studies on amylase in D. melanogaster.
Drosoph. Inf. Ser., 37, 94.
- KIKKAWA H., 1963b : The genetic study on amylase in Drosophila virilis.
Ann. Rep. scient. Wks. Osaka Univ., 11, 41-50.
- KIKKAWA H., 1964 : An electrophoretic study on amylase in Drosophila melanogaster.
Jap. J. Genet., 39, 401-411.
- KIMURA M., 1968 : Evolutionary rate at the molecular level.
Nature, 217, 624-626.
- KIMURA T. et BROWN A.W.A., 1964 : DDT-dehydrochlorinase in Aedes aegypti.
J. econ. Ent., 57, 710-716.
- KIMURA M. et OHTA T., 1971 : Protein polymorphism as a phase of molecular evolution.
Nature, 229, 467-469.
- KRIMBAS C.B. et TSAKAS S., 1971 : The genetics of Dacus oleae. V. Changes of esterase polymorphism in a natural population following insecticidal control : selection or drift ?
Evolution, 25, 454.
- LATNER A.L. et SKILLEN A.W., 1968 : Isozymes in biology and medicine.
Academic Press, New York et London.
- LAUFER H., 1960 : Blood proteins in insect development.
Am. N.Y. Acad. Sci., 89, 490-515.
- LAUFER H., 1961 : Forms of enzymes in insect development.
Am. N.Y. Acad. Sci., 94, 825-835.
- LAUFER H., 1964 : Macromolecular patterns in development and evolution. Taxonomic Biochemistry and Serology.
The Ronald Press Co. New York pp. 171-189.
- LEWALLEN L.L., 1957 : Paper chromatography studies of the Anopheles maculipennis complex in California (Diptera : Culicidae).
Ann. entomol. Soc. Amer., 50, 602-606.
- LEWONTIN R.C. et 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.
- LOUGHTON B.G., 1965 : An investigation of hemolymph proteins in Lepidoptera.
J. Ins. Physiol., 11, 1651-1661.

- LOVELL J.B. et KEARNS C.W., 1959 : Inheritance of DDT-dehydrochlorinase in the housefly.
J. econ. Ent., 52, 931-935.
- MACINTYRE R., 1965 : The genetics of an acid phosphatase in Drosophila melanogaster and Drosophila simulans.
Genetics, 53, 461-474.
- MARKERT C.L. et MOLLER F., 1959 : Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenic and species specific patterns.
Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 45, 753-763.
- MARKS E.N., 1951 : The vector of filariasis in Polynesia : a change in nomenclature.
Ann. trop. Med. Parasitol., 45, 137-140.
- MATSUMARA F. et BROWN A.W.A., 1961 : Biochemistry of malathion resistance in Culex tarsalis.
J. econ. Ent., 54, 1176-1185.
- MATSUMARA F. et BROWN A.W.A., 1963 : Studies on carboxyesterase in malathion-resistant Culex tarsalis.
J. econ. Ent., 56, 381-388.
- MAURER H.R., 1968 : Disk-Electrophorese.
Walter de Gruyter et Co., Berlin.
- MEISTER A., 1950 : Reduction of alpha, gamma-diketo and alpha-kets acids catalysed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase.
J. biol. Chem., 184, 117-129.
- MENZEL D.B., CRAIG R. et HOSKINS W.H., 1963 : Electrophoretic properties of esterases from susceptible and resistant strains of house-fly, Musca domestica L.
J. Insect. Physiol., 9, 479-493.
- MEYER K.H., FISCHER E.H. et BERNFELD P., 1947 : Sur les enzymes amylolytiques (I).
L'isolement de l'alpha-amylase de pancreas.
Helv. Chim. Acta, 30, 64-78.
- MICHAELIS L., 1909 : Elektrische Überführung von Fermenten. I. Das Invertin.
Biochem. Z., 16, 81-86.
- MICKS D.W., 1954 : Paper chromatography as a tool for mosquito taxonomy : the Culex pipiens complex.
Nature, 174, 217-218.
- MICKS D.W., 1956 : Paper chromatography in insect taxonomy.
Ann. entomol. Soc. Amer., 49, 576-581.
- MICKS D.W. et ELLIS J.P., 1951 : Free amino acids in adult mosquitoes.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 78, 69-72.
- MICKS D.W. et ELLIS J.P., 1952 : Free amino acids in the developmental stages of the mosquito.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 79, 191-193.
- MICKS D.W. et GIBSON F.J., 1957 : The characterization of insects and ticks by their free amino acid patterns.
Ann. entomol. Soc. Amer., 50, 500-505.

- MICKS D.W., REHMET A. et JENNINGS J., 1966a : Biochemical differentiation of morphologically indistinguishable strains of Aedes aegypti (Diptera : Culicidae).
Ann. entomol. Soc. Am., 59, 239-242.
- MICKS D.W., REHMET A., JENNINGS J., MASON G. et DAVIDSON G., 1966b : A chromatographic study of the systematic relationship within the Anopheles gambiae complex.
World Health Organ. Bull., 35, 181-187.
- MICKS D.W., JENNINGS J., REHMET A., MASON G. et DAVIDSON G., 1967 : Further chromatographic studies of the systematic relationship within the Anopheles gambiae complex.
World Health Organ. Bull., 36, 309-318.
- MOUNTER L.A. et WHITTAKER V.P., 1953 : The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterase and other esterases.
Biochemical J., 54, 511-550.
- NARANG S. et KITZMILLER J.B., 1971a : Esterase polymorphism in a natural population of Anopheles punctipennis. I. Genetics of the Est. A-B system.
J. Hered., 62, 259-264.
- NARANG S. et KITZMILLER J.B., 1971b : Esterase polymorphism in a natural population of Anopheles punctipennis. II. Analysis of the Est. C system.
Canad. J. Genet. Cytol., 13, 771-776.
- NARANG S. et KITZMILLER J.B., 1972 : Dehydrogenase polymorphism in Anopheles punctipennis (Diptera : Culicidae). Genetics of Xanthine and Octanol Dehydrogenases.
Ann. entomol. Soc. Amer., 65, 798-804.
- NEILANDS J.B., 1952 : Studies on lactic dehydrogenase of heart. I. Purity, kinetics and equilibria.
J. biol. Chem., 199, 373-381.
- OGITA Z., 1961 : Genetical relationship between aliesterase activity and insecticide resistance in Drosophila melanogaster.
Scientific Insect Control, 26, 93-97.
- OGITA Z., 1962 : Genetico-biochemical analysis on the enzyme activities in the housefly by agar gel electrophoresis.
Jap. J. Genetics, 37, 518-521.
- OGITA Z., 1968 : Genetic control of isozymes.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 151, 243-262.
- OGITA Z.I. et KASAI T., 1965a : Genetic control of multiple esterases in Musca domestica.
Japan. J. Genet., 40, 1-14.
- OGITA Z.I. et KASAI T., 1965b : Genetico-biochemical analysis of specific esterases in Musca domestica.
Japan. J. Genet., 40, 173-184.
- OGITA Z.I. et KASAI I., 1965c : Genetic control of multiple molecular forms of acid phosphomonoesterase in the housefly Musca domestica.
Jap. J. Genet., 40, 185-197.

- OGITA Z.I. et KASAI T., 1965d : A microtechnique for enzyme separation of individual spider mites with thin layer electrophoresis.
SABCO J., 1, 117-120.
- OPPENORTH F.J. et VAN ASPEREN K., 1960 : Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance.
Science, 132, 298-299.
- OPPENORTH F.J. et VAN ASPEREN K., 1962 : Organophosphorus resistance in the housefly.
Proceedings of the Eleventh Congress on Entomology, Vienna, 3, 227-229.
- ORNSTEIN L. et DAVIS B.J., 1959 : Disc Electrophoresis. Distillation Products Industries (Division of Eastman Kodak Co).
- PANTELOURIS E.M. et DUKE E.J., 1963 :
Genet. Res., 4, 441
- PASTEUR Georges, 1974 : Génétique biochimique et populations, ou : Pourquoi sommes-nous multipolymorphes.
Mem. Soc. Zool. France, 37, 473-531.
- PASTEUR Nicole, 1975 : Les leucine-amino-peptidases du moustique Culex pipiens : génétique formelle d'un locus chez l'imago.
C.r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris, 280, 113-116.
- PASTEUR N. et SINEGRE G., 1975 : Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphorus insecticide in Culex pipiens pipiens populations.
Biochemical Genetics, 13, 739-803.
- PASTEUR N. et de STORDEUR E., 1976 : L'alpha-glycerophosphate-deshydrogénase du moustique Culex pipiens : génétique formelle, linkage et étude de populations.
Genetica, 46, 319-326.
- POUCIK M.D., 1957 : Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers.
Nature, 180, 1477-1479.
- 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.
- PRICE G.M. et BOSMAN T., 1966 : The electrophoretic separation of proteins isolated from the larva of the blow fly Calliphora erythrocephala.
J. Insect. Physiol., 12, 741-745.
- RAKAI I.M., NASERUA J.D., MACNAMARA F.N. et PILLAI J.S., 1974 : Mosquito born infections in Fiji. IV. Biting times for village mosquitoes and human filaria transmission potential of Aedes polynesiensis and Aedes pseudoscutellaris.
J. Med. Entomol., 11, 588-594.
- RAYMOND S. et WEINTRAUB L., 1959 : Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis.
Science, 130, 711.
- REPORT Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, Oxford, 1961.

- 11 -
- RICHARDSON R.H. et JOHNSON F.M., 1967 : Isozyme variability in species of the genus Drosophila. II. A multiple allelic isozyme system in Drosophila buskii; a multiple polymorphic system.
Biochem. Genet., 1, 73-79.
- ROZEBOOM L.E. et FILFORD B.N., 1954 : The genetic relationship of Aedes pseudoscutellaris Theobald and A. polynesiensis Marks (Diptera : Culicidae).
Am. J. Hyg., 60, 117-134.
- SAKAI R.K., IQBAL M.P. et BAKER R.H., 1973 : Genetics of an alkaline phosphatase in a Mosquito, Culex tritaeniorhynchus.
Ann. ent. Soc. Am., 66, 913-916.
- SALKED E.H., 1965 : Electrophoretic separation and identification of esterases in eggs and young nymphs of the large milkweed bug Oncopeltus fasciatus (Dallas).
Can. J. Zool., 43, 593-602.
- SARGENT J.R. et GEORGE S.G., 1975 : Methods in Zone Electrophoresis. BDH Chemicals Ltd., Poole, England.
- SAYRE F.W. et HILL Br., 1957 : Fractionation of Serum Lactic Dehydrogenase by Salt Concentration Gradient Elution and Paper Electrophoresis.
Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., 96, 695-697.
- SCHNEIDERMAN H., 1967 : Alkaline phosphatase relationships in Drosophila.
Nature, Lond., 216, 604-605.
- SCHNEIDERMAN H., YOUNG W.J. et CHILDS B., 1966 : Patterns of alkaline phosphatase in developing Drosophila.
Science, 151, 461-463.
- SCOTT J.A. et McCLELLAND G.A.H., 1975 : Electrophoretic differences between sympatric ecotypes.
Nature 256, 405-406.
- SELANDER R.K., SMITH M.H., YOUNG 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, 4, 49-90.
- SHAW C.R., 1965 : Electrophoretic variation in enzymes.
Science, 149, 936-943.
- SHAW C.R. et PRASAD R., 1970 : Starch gel electrophoresis of enzymes : a compilation of recipes.
Biochem. Genet., 4, 297-320.
- SIMON J.P., 1969 : Esterase Isozymes in the Mosquito Culex pipiens fatigans. Developmental and Genetic Variation.
Ann. ent. Soc. Am., 62, 1307-1311.

- SIMS M., 1965 : Methods for detection of enzymatic activity after electrophoresis on polyacrilamide gel in Drosophila species.
Nature, 207, 757-758.
- SMITH S. et SILVERMAN P.H., 1966 : Metamorphic antigens in mosquitoes.
Mosq. News., 26, 544-551.
- SMITH K.D., URSPRUNG H. et WRIGHT T.R.F., 1963 : Xanthine dehydrogenase in Drosophila : detection of isozymes.
Science, 142, 226-227.
- SMITHIES O., 1955 : Zone Electrophoresis in Starch Gels : Group Variations in the Serum Proteins of normal human adults.
Biochem. J., 61, 629-641.
- SMITHIES O., 1959 : An improved procedure for starch-gel electrophoresis further variations in the serum proteins of normal individuals.
Biochem. J., 71, 585-587.
- STEINHAUER A.L. et STEPHEN W.P., 1959 : Changes in blood proteins during the development of the American cockroach Periplaneta americana.
Ann. ent. Soc. Amer., 52, 733-783.
- STONE W.S., WHEELER M.R., JOHNSON F.M. et KOJIMA K.I., 1968 : Genetic variation in natural island populations of members of the Drosophila nasuta and Drosophila ananassae subgroups.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 59, 102-109.
- STORDEUR E. de, 1975 : Esterases in the mosquito Culex p. pipiens L. : formal genetics and polymorphism of adult esterases.
Biochel. Genet., 14, 481-493.
- TABACHNIK W.J. et POWELL J.R., 1976 : Allozymic variation in the yellow fever mosquito. Aedes aegypti.
Genetics, 83, 75-76.
- THOMSEN E., 1966 : Esterase in the cells of the hindmidgut of the Calliphora female, and its possible dependence of the medial neurosecretory cells of the brain.
Z. Zellforsch., 75, 281.
- TOWNSON H., 1969a : Electrophoretic identification of strains of Aedes aegypti.
Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 63, 19-20.
- TOWNSON H., 1969b : Esterase isozymes of individual Aedes aegypti.
Ann. trop. Med. Parasitol., 63, 413-418.
- TOWNSON H., 1971 : Studies of an esterase in Aedes aegypti.
Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 65, 23-24.
- TOWNSON H., 1972 : Esterase polymorphism in Aedes aegypti : the genetics and Km values of electrophoretically heterogeneous forms.
Ann. trop. Med. Parasit., 66, 255-266.
- TREBATUSKI A.M. et CRAIG G.B. jr., 1969 : Genetics of an esterase in Aedes aegypti.
Biochemical Genetics, 3, 383-392.

- TREBATORSKI A.M. et HAYNES J.F., 1969 : Comparison of Enzymes of twelve Species of Mosquitoes.
Ann. ent. Soc. Am., 63, 327-335.
- TRIPPA G., SANTOLAMAZZA C. et SCOZZARI R., 1970 : Phosphoglucumutase (PGM) locus in Drosophila melanogaster : linkage and population data.
Biochemical Genetics, 4, 665-667.
- TSAKAS S. et KRIMBAS C.B., 1970 : The genetics of Dacus oleae. IV. Relation between adult esterases genotypes and survival to organophosphate insecticide.
Evolution, 24, 807.
- URSPRUNG H. et LEONE J., 1965 : Alcohol dehydrogenases : a polymorphism in Drosophila melanogaster.
J. exp. Zool., 160, 147-154.
- VAN ASPEREN K., 1959 : Distribution and substrate specificity of esterases in the house fly M. domestica L.
J. Insect. Physiol., 3, 306-322.
- VAN ASPEREN K. et OPPENOORTH F.J., 1959 : Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies.
Entomol. exp. appl., 2, 48.
- VAN DER GEEST L.P.S. et KAWOOYA J., 1975 : Genetic variation in some enzyme systems in the Tsetse Fly Glossina morsitans.
Ent. exp. et appl., 18, 508-514.
- VELTHUIS H.H.W. et VAN ASPEREN K., 1963 : Occurrence and inheritance of esterases in Musca domestica.
Entomol. exp. appl., 6, 79-87.
- VESSEL E.S., 1968 : Introduction. Multiple molecular forms of enzymes.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 151, 5-13.
- VESSEL E.S. et BEARN A.G., 1957 : Localization of Lactic Dehydrogenase Activity in Serum Fractions.
Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., 94, 96-99.
- WARBURG O. et CHRISTIAN W., 1943 : Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Zymohexase.
Biochem. Z., 314, 149-176.
- WARREN M.E. et BRELAND O.P., 1965 : Electrophoretic patterns in Mosquitoes.
Mosquito News, 29, 171-182.
- WEBB E.C., 1964 : Nomenclature of multiple enzyme forms.
Nature, Lond., 203, 821.
- WIELAND T. et PFLEDERER G., 1957 : Nachweis der Heterogenität von Milchsäure-dehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelaktrophorese.
Biochem. Z., 329, 112-116.

WILKINSON J.H., 1970 : Isoenzymes, Chapman and Hall Ltd, London.

WOODHILL A.R., 1956 : Experimental crossing of Aedes (Stegomyia) pseudoscutellaris Theobald and Aedes (Stegomyia) polynesiensis Marks (Diptera, Culicidae).
Proc. Linn. Soc. N.S.W., 79, 19-20.

WHITTAKER J.R. et WEST A.J., 1962 : A starch gel electrophoretic study of insect hemo-lymph proteins.
Can. J. Zool., 40, 655.

WRIGHT T.R.F., 1961 : The genetic control of an esterase in Drosophila melanogaster.
Am. Zoologist, 1, 476.

WRIGHT T.R.F., 1963 : The genetics of an esterase in Drosophila melanogaster.
Genetics, 48, 787-801.

WRIGHT T.R.F. et MacINTYRE A.J., 1963 : A homologous gene-enzyme system, Esterase 6, in Drosophila melanogaster and Drosophyla simulans.
Genetics, 48, 1717-1726.

WRIGHT J.W. et PAL R., 1967 : Genetics of Insect Vectors of Disease.
Elsevier, Amsterdam, 499-500.

YANG Y.J. et DAVIES D.M., 1968a : Amylase activity in black-flies and mosquitoes (Diptera)
J. med. Ent., 5, 9-13.

YANG Y.J. et DAVIES D.M., 1968b : Digestion, emphasizing trypsin activity, in adult simuliids (Diptera) fed blood, blood-sucrose mixtures, and sucrose.
J. Insect. Physiol., 14, 205-222.

YANG Y.J. et DAVIES D.M., 1968c : Occurence and nature of invertase activity in adult black-flies (Simuliidae).
J. Insect. Physiol., 14, 1221-1232.

YOSHITAKE N., EGUCHI M., AKIYAMA M. et TSUCHIYA Y., 1966 : Phosphatase and esterase polymorphism in larvae of the silkworm, Bombyx mori L.
Appl. Entomol. Zool., 1, 41-48.

YOUNG W.J., PORTER J.E. et CHILDS B., 1964 : Glucose-6-phosphate dehydrogenase in Drosophila : X-linked electrophoretic variants.
Science, N.Y., 143, 140-141.

ZAMAN V. et CHELLAPPAH W.T., 1962 : Gel-diffusion studies with mosquito antigens.
Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 56, 258.

ZAMAN V. et CHELLAPPAH W.T., 1963 : Gel-diffusion studies with mosquito antigens. I. Antigenic analysis during metamorphosis.
Exp. Parasitol., 13, 108-112.

ZAMAN V. et CHELLAPPAH W.T., 1964 : The agar-gel diffusion technique as a method of differentiating mosquito eggs.
Experientia, 20, 429.

ZAMAN V. et CHELLAPPAH W.T., 1965 : The agar-gel diffusion technique as a method of differentiating mosquito larvae.
Experientia, 21, 297-298.

ZEBE E. et McSHAN W.H., 1957 : Lactic and alpha-glycerophosphate dehydrogenase in insects
J. Gen. Physiol., 40, 779-90.