

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Adaptations évolutives chez drosophila melanogaster

Chanteux, Bernard

Award date:
1984

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1984



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ADAPTATIONS ÉVOLUTIVES
CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

CHANTEUX BERNARD

R E M E R C I E M E N T S

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon promoteur de mémoire, le Révérend Père A. Elens, pour l'accueil chaleureux qu'il m' a réservé au sein de son département. Son aide, ses conseils, ses encouragements et sa gentillesse constante m'ont été très précieux.

Je remercie aussi tout particulièrement Madame Libion-Mannaert et Madame Dernoncourt pour leur collaboration efficace lors des fractionnements et des dosages enzymatiques, leur patience sans limite et leurs encouragements, ainsi que Monsieur Lechien qui a bien voulu entretenir mes élevages.

Ma reconnaissance va aussi à Madame Wattiaux, pour les conseils, l'aide et les encouragements qu'elle m'a dispensés tout au long de ce travail, dans sa réalisation pratique et dans sa rédaction. Je la remercie également pour le libre accès de son laboratoire.

Je tiens à remercier Monsieur Eric Depiereux, du département de Biologie Quantitative, de l'accueil amical qu'il m'a réservé et de son aide précieuse pour l'analyse statistique des résultats.

Je remercie encore ma soeur Anita et mon frère Christian, qui sont venus m'aider dans les moments difficiles, ainsi que mes parents qui m'ont permis d'entreprendre les études que je termine.

T A B L E D E S M A T I E R E S

I N T R O D U C T I O N :

1. <u>Drosophila melanogaster</u> : une espèce cosmopolite.	1
2. <u>La tolérance à l'alcool.</u>	1
3. <u>Déshydrogénase alcoolique et tolérance à l'alcool.</u>	2
4. <u>Le métabolisme de l'éthanol.</u>	5
5. <u>Etudes in vivo</u> :	7
A. Survie sur milieu non nutritif, supplémenté ou non.	7
B. Tactisme préférentiel en présence de milieux supplémentés ou non.	8
6. <u>Etudes in vitro</u> :	9
A. Première étape métabolique : transformation de l'éthanol en aldéhyde acétique.	9
B. Seconde étape métabolique : transformation de l'aldéhyde acétique.	10
7. <u>But du travail</u> .	11

C H A P I T R E I : M A T E R I E L E T M E T H O D E S

1. <u>Souches et lignées de Drosophila melanogaster utilisées.</u>	13
2. <u>Méthodes in vivo : tolérance à l'éthanol et à l'aldéhyde acétique.</u>	16
3. <u>Méthodes in vitro : fractionnement subcellulaire et activités enzymatiques.</u>	18
A. <u>Centrifugation différentielle en milieu homogène.</u>	18
B. <u>Dosages enzymatiques.</u>	22

<u>C H A P I T R E II : ANALYSE DES RESULTATS DES EXPERIENCES IN VITRO</u>	26
- Les enzymes de référence.	27
- Les enzymes intervenant dans le métabolisme de l'éthanol.	28
- Discussion.	29
<u>C H A P I T R E III : ANALYSE DES RESULTATS DES EXPERIENCES IN VIVO</u>	32
- Effet de la souche.	38
- Effet du préconditionnement.	39
- Effet de la concentration en aldéhyde acétique et effet de la concentration en éthanol.	39
- Interaction éthanol - aldéhyde acétique.	40
- Interaction éthanol - souche et interaction aldéhyde acétique - souche.	42
- Interaction souche - préconditionnement.	44
<u>C H A P I T R E IV : RESUME ET CONCLUSIONS.</u>	46
<u>B I B L I O G R A P H I E.</u>	50

I N T R O D U C T I O N

1.- DROSOPHILA MELANOGASTER : une espèce cosmopolite.

De toutes les espèces de Drosophiles actuellement décrites, D. melanogaster est certainement la plus universellement répandue (Parsons & Stanley, 1981). Elle est aussi la plus remarquable par sa haute tolérance vis à vis de l'alcool (Mc Kenzie & Parsons, 1972; David et al., 1974). En s'adaptant à des climats tempérés, D. melanogaster (dont l'origine est considérée comme tropicale) semble bien avoir modifié sa niche écologique de façon à exploiter des sources de nourriture caractérisées par une concentration assez élevée en alcool : on la trouve dans les fruits en fermentation, mais aussi dans les caves où se fait la maturation du vin, les brasseries, et en général toutes les industries de fermentation (Mc Kenzie & Parsons, 1974; Mc Kenzie, 1974). C'est ainsi que les souches européennes de D. melanogaster sont devenues plus tolérantes à l'éthanol que les souches tropicales d'Afrique ou d'Amérique. La plupart des espèces du genre Drosophila ne montrent pas cette aptitude et même, pour un bon nombre, l'alcool est toxique.

2.- LA TOLERANCE A L'ALCOOL.

Pour déterminer la sensibilité d'une souche de Drosophiles à l'éthanol ou à d'autres alcools, on utilise des techniques telles que celle qui a été décrite dès 1974 par David et ses collaborateurs (David et al, 1974) et dont les résultats peuvent s'exprimer en "concentrations léthales 50 %" (LC_{50}). C'est la concentration d'alcool qui tue 50 % des mouches en un temps défini (1, 2, 3 ou 4 jours).

Grâce à ce type de test, on a pu montrer que la tolérance aux alcools décroît à mesure que le nombre d'atomes de carbone de ceux-ci augmente; le méthanol fait exception car il n'est pas du tout métabolisé (Fig.1). In vivo, c'est l'éthanol qui est le mieux toléré (David et al., 1976). Drosophila melanogaster est très tolérante envers l'éthanol; elle l'est bien moins pour les alcools secondaires qui se montrent même très toxiques (David & Bocquet, 1976 a). Par contre, in vitro, les alcools secondaires sont dégradés plus rapidement que les alcools primaires (Day & al., 1974 a; Vigue & Johnson, 1973; David & al., 1976).

Cette observation, faite par David en 1976, est un bon exemple d'un fait souvent observé; il n'y a pas toujours concordance entre les résultats obtenus lors d'expériences faites in vitro et les réactions in vivo de l'organisme animal.

On peut dire que, d'une façon générale, la tolérance augmente avec la latitude dans l'hémisphère Nord : les souches tropicales supportent très mal l'alcool tandis que la tolérance est de plus en plus grande à mesure qu'on avance vers le Nord dans les régions tempérées, et cela aussi bien en Amérique du Nord qu'en Europe (Fig. 2). L'espèce Drosophila melanogaster est probablement originaire d'Afrique tropicale, et les souches africaines ont des valeurs de "LC₅₀" voisines de 7,5 %; pour les souches européennes on atteint des valeurs de l'ordre de 17,5 %.

3.- DESHYDROGENASE ALCOOLIQUE ET TOLERANCE A L'ALCOOL

Chez Drosophila melanogaster, cette tolérance accrue envers l'alcool est certainement liée à une augmentation d'activité de la Déshydrogénase alcoolique (ADH), une enzyme qui est capable de transformer l'éthanol en aldéhyde acétique (David et al., 1976; Mc Kenzie & Parsons, 1972; David et al., 1974; Clarke, 1975). Par électrophorèse sur gel d'amidon, on a pu isoler diverses isoenzymes de l'ADH; il s'agit d'alozymes correspondant aux divers allèles d'un même gène Adh situé sur le chromosome 2, au locus 50.1 (Grell et al., 1965). Cinq alozymes au moins ont pu être mis en évidence par

cette technique (Fig. 3); trois d'entre eux sont assez rares (David, 1977). Dans presque toutes les populations de D. melanogaster étudiées, on ne trouve que les allozymes " F " (fast) et " S " (slow) ainsi nommés à cause de leur différence de mobilité électrophorétique. Les populations naturelles sont en général composées d'hétérozygotes $\underline{Adh}^F / \underline{Adh}^S$ et d'homozygotes $\underline{Adh}^F / \underline{Adh}^F$ ou $\underline{Adh}^S / \underline{Adh}^S$ (Ursprung & Leone, 1965 ; Birley & Barnes, 1973).

Certains facteurs semblent influencer la fréquence d'un allèle ou de l'autre : la température, la concentration en alcool dans l'environnement, et d'autres facteurs sans doute (Clarke, 1975). De même qu'on observe un gradient latitudinal d'augmentation de la tolérance à l'éthanol lorsqu'on passe des régions tropicales aux régions tempérées, on observe aussi un gradient parallèle de la fréquence de l'allèle \underline{Adh}^F (Fig. 4). On pense à une action sélective de la température et de la teneur en alcool des environnements colonisés par D. melanogaster.

En laboratoire on a de fait pu augmenter, par sélection artificielle (Fig. 5), la tolérance à l'alcool d'une souche donnée, simplement en additionnant d'éthanol le milieu nutritif qui leur est fourni (David & Bocquet, 1977). La pression sélective ainsi exercée favoriserait l'allèle \underline{Adh}^F (Gibson, 1970). Il n'a pas encore été démontré qu'une sélection à basse température favorise l'allèle \underline{Adh}^F , mais il a été montré que l'allozyme \underline{ADH}^S est plus stable à la chaleur que l'allozyme \underline{ADH}^F (Gibson, 1970; Clarke, 1975; Van Delden & Kemping, 1980) ; à 40° C l'allozyme \underline{ADH}^F est inactivé bien plus rapidement que l'allozyme \underline{ADH}^S .

Les allozymes \underline{ADH}^F et \underline{ADH}^S ne différeraient que par un seul acide aminé (Thatcher, 1980). Cette substitution suffirait à altérer de façon significative la vitesse maximale ("Vmax" en cinétique enzymatique), l'affinité pour le substrat (Km), la spécificité pour le substrat, la stabilité à la chaleur, ainsi que le comportement vis à vis des inhibiteurs (Vigue & Johnson, 1973 ; Day et al. 1974 a).

D'autre part, le niveau d'activité de la déshydrogénase alcoolique est en général plus élevé chez des individus homozygotes pour l'allèle Adh^F que chez des individus homozygotes pour l'allèle Adh^S (Day et al., 1974 a & b; Birley & Barnes, 1973). Les hétérozygotes auraient une activité intermédiaire (Gibson, 1970).

Selon certains auteurs, ce niveau d'activité ne dépendrait pas uniquement des gènes majeurs ou gènes "de structure" qui se situent au locus Adh (2-50.1). En effet, on a pu par sélection artificielle, augmenter ou diminuer en quelques générations le niveau d'activité de la déshydrogénase alcoolique de lignées homozygotes soit pour l'allèle Adh^F soit pour l'allèle Adh^S (Fig. 6); Ces changements progressifs sont attribués à la sélection de gènes mineurs (Pipkin & Hewitt, 1971); l'adaptation à des milieux alcoolisés ne dépendrait donc pas uniquement du "système Adh" (Gibson et al., 1979). Les gènes mineurs régulateurs (polygènes modificateurs) moduleraient le niveau d'activité de la déshydrogénase alcoolique, au moyen de macromolécules se fixant spécifiquement à des sites "contrôle", à proximité immédiate du locus du gène de structure (Ayala & McDonald, 1980; McDonald & Ayala, 1978 a & b). On obtient ainsi une variabilité continue du caractère "résistance à l'alcool", qui peut être étudiée par les méthodes de la génétique quantitative (David, 1978).

Pour expliquer le polymorphisme du locus Adh, des controverses existent entre deux écoles. D'une part, les partisans de la théorie "neutraliste" considèrent que les différents allèles rencontrés dans la population sont pratiquement équivalents au point de vue physiologique et qu'ils ne donnent pas prise à la sélection naturelle (e. g. Kimura & Ohta, 1971); d'autre part, les partisans de la théorie "darwinienne" pensent que le polymorphisme du locus Adh est maintenu par le mécanisme de la sélection naturelle, et traduit l'adaptation aux divers environnements colonisés par D. melanogaster (e.g. Clarke, 1970). Les partisans de la seconde école sont bien plus nombreux que ceux de la première, dont le représentant le plus illustre est certainement M. Kimura. La plupart des auteurs qui se sont intéressés à l'adaptation évolutive de D. melanogaster ont depuis longtemps eu tendance à attribuer au "système Adh" la capacité qu'a eu cette espèce de devenir "cosmopolite et domestique" (David, 1979) en colonisant les environnements liés à l'habitat humain et aux industries de fermentation.

5

Cette adaptation grâce au système Adh a même été présentée comme "le modèle" typique d'une évolution adaptative; c'est à ce titre qu'elle a été considérée comme "d'intérêt général" et qu'elle a attiré l'attention de tant de chercheurs (Clarke, 1975; David, 1978; McDonald & Ayala, 1978 a & b; Ayala & McDonald, 1980).

Il a d'abord été considéré que la déshydrogénase alcoolique agit en "détoxifiant" l'éthanol (David et al., 1974). Mais par la suite, il a été montré que l'éthanol peut même servir, - du moins en absence de toute nourriture normale -, de "source d'énergie" (Libion-Mannert et al., 1974, a & b; McKenzie & Parsons, 1974; Van Herreweghe & David, 1974; David & Bocquet, 1975; David, 1978; Kamping & Van Delden, 1978; Deltombe-Liétaert et al., 1979). Dès lors, J. David considérait que la déshydrogénase alcoolique détoxifie l'éthanol en le transformant en un produit intermédiaire, qui peut certes être transformé par la suite en produits utiles pour le métabolisme énergétique, mais qui peut présenter un effet de "toxicité secondaire" (David et al., 1976, b). Ceci est illustré à la figure 7.

L'adaptation évolutive aux environnements riches en alcool ne dépend donc pas uniquement du "système Adh" mais certainement aussi d'enzymes intervenant dans les étapes ultérieures du métabolisme de l'éthanol.

4.- LE METABOLISME DE L'ETHANOL.

Les voies métaboliques de dégradation de l'éthanol sont bien mieux connues chez les Vertébrés que chez les Insectes. Pour des raisons évidentes elles ont été très étudiées chez l'Homme.

Par analogie, on doit admettre la possibilité de l'existence chez la Drosophile de plusieurs systèmes enzymatiques capables de transformer l'éthanol en aldéhyde acétique. On sait que la déshydrogénase alcoolique (ADH) effectue habituellement cette transformation, et qu'il s'agit d'une réaction réversible (Grell et al., 1965; David et al., 1976). Mais on doit envisager aussi, toujours par analogie,

la possibilité d'une intervention de la Catalase et surtout d'un "Système microsomal d'oxydation de l'éthanol" ou M.E.O.S. ("microsomal ethanol oxidizing system") qui sont actifs chez les Mammifères. Enfin une autre enzyme, la Déshydrogénase octanolique (ODH), est certainement capable d'oxyder l'éthanol en aldéhyde acétique, mais elle ne jouerait qu'un rôle très mineur chez la Drosophile (Sieber et al., 1972; David et al., 1978).

L'aldéhyde acétique, produit direct de l'action de l'ADH, peut certainement être très dangereux pour les Drosophiles. Des expériences in vivo ont montré qu'il suffit d'ajouter une très faible quantité d'aldéhyde acétique au milieu de culture (concentrations de l'ordre d'1 %) pour tuer rapidement la plupart des mouches adultes (David et al., 1978; Parsons & Spence, 1981; Moxon et al., 1982). L'aldéhyde acétique produit par la dégradation métabolique de l'éthanol doit donc être transformé très rapidement en un produit non toxique. On pensait tout d'abord que ce rôle était joué chez la Drosophile par une seule enzyme, l'Oxydase aldéhydique produite par un gène "Aldox" (3-56.7) du chromosome 3 (depuis qu'on a découvert d'autres oxydases aldéhydiques, on appelle à présent ce locus "Aldox 1") qui est connu depuis plusieurs années (Dickinson, 1970, 1971). On s'accordait à exclure une action de la Déshydrogénase aldéhydique (ALDH), - qui chez les Mammifères prend une part importante à la dégradation de l'aldéhyde acétique, mais dont les Insectes seraient totalement dépourvus.

On admet généralement que l'Acétyl-thiokinase et l'Acétyl-Coenzyme A interviennent dans les étapes suivantes, qui aboutissent à transformer l'acétate résultant de l'oxydation de l'aldéhyde acétique et qui n'est pas toxique, en produits non seulement inoffensifs mais qui sont même utiles puisqu'ils fournissent de l'énergie utilisable dans les voies anaboliques.

Ces voies métaboliques de la dégradation de l'éthanol chez les Drosophiles ont été récemment étudiées par diverses méthodes qui ont permis de les éclairer davantage, - sans qu'on puisse considérer qu'elles sont dès à présent entièrement connues !

On peut distinguer des méthodes d'études in vivo et des méthodes in vitro.

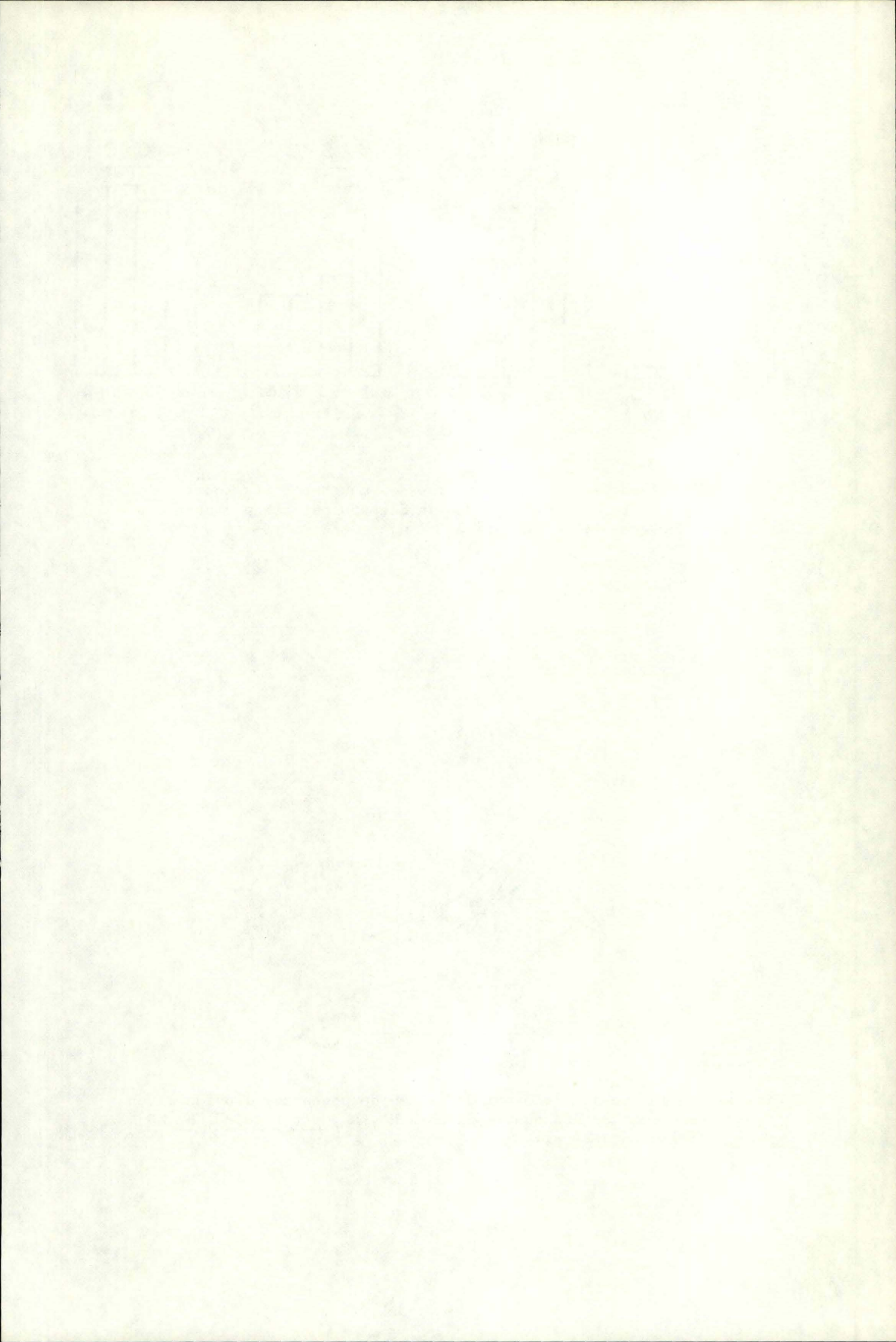
5.- ETUDES IN VIVO

A. Survie sur milieu non nutritif, supplémenté ou non.

Ces expériences concernent des adultes ou des larves. Placées sur un milieu "eau-agar" sans éléments nutritifs, les mouches meurent assez rapidement. Mais leur survie peut être prolongée de plusieurs jours si le milieu est additionné d'éthanol, pourvu que ces mouches possèdent une ADH active (Libion-Mannaert et al., 1974 a et b; 1976 ; Van Herrewege et al. 1974).

Ces expériences furent faites tantôt dans des récipients fermés par un bouchon d'ouate, tantôt dans des récipients hermétiques selon la méthode utilisée pour les tests "de toxicité". On a du reste essayé non seulement des milieux additionnés d'éthanol, mais aussi des milieux additionnés également d'aldéhyde acétique (en même temps que d'éthanol, ou indépendamment de celui-ci). C'est ainsi qu'on a pu constater que des lignées monomorphiques "AO-null" étaient cependant capables de supporter des concentrations relativement élevées d'éthanol, alors que leur locus "Aldox 1" ne produisait pas d'oxydase aldéhydique active; c'est du reste ce qui fait reconnaître l'existence d'une autre enzyme produite par un locus "Aldox 2" (Fig. 8) et soupçonner l'existence d'autres enzymes encore, capables de transformer elles aussi l'aldéhyde acétique en acétate. Ces mutants ne produisant pas d'oxydase aldéhydique active et se montrant cependant tolérants à l'éthanol sont de deux types : ceux qui proviennent d'une mutation du locus "Aldox 1" (3 - 56.7) et ceux qui sont dus à une mutation du locus "maroon-like" (1 - 64.8), qui est "sex-linked" (David et al., 1978).

Les tests de survie sans nourriture et de toxicité, comparant des mouches dépourvues de déshydrogénase alcoolique mais ayant de l'oxydase aldéhydique ("ADH-null"), des mouches dépourvues d'oxydase aldéhydique mais ayant de la déshydrogénase alcoolique ("AO-null"), et des mouches "wild" riches en déshydrogénase alcoolique et en oxydase aldéhydique ont permis de constater que les individus "ADH-null" supportent très mal l'éthanol et ne sont guère plus tolérants à la présence d'aldéhyde acétique que les individus "AO-null";



ceux-ci, par contre, survivent aisément en présence d'une concentration relativement élevée d'éthanol et sont même capables d'utiliser celui-ci comme "nourriture". Quant aux mouches "wild" elles se montrent évidemment capables de tolérer des concentrations bien plus élevées d'éthanol et d'aldéhyde acétique (Deltombe - Liétaert et al., 1979) (Tables 1 et 2 - Fig. 9).

La résistance des larves n'est pas nécessairement la même que celle des adultes de la même souche. Elles se montrent généralement plus tolérantes et envers l'éthanol et envers l'aldéhyde acétique. En très faibles concentrations, celui-ci est même utilisé comme source d'énergie (Parsons & Spence, 1981).

B. Tactisme préférentiel en présence de milieux supplémentés ou non

Ces expériences concernent également des adultes et des larves. Richmond & Gerking ont constaté que les diverses espèces de Drosophiles ont des exigences différentes envers le milieu de ponte qu'elles choisissent pour y déposer leurs oeufs. Ces exigences concernent divers facteurs physiques ou chimiques, et plus particulièrement la teneur en alcool de ces milieux (Richmond & Gerking, 1979). Par la suite, on a comparé les préférences ovipositionnelles de souches "wild" présentant des différences de niveau d'activité de leur déshydrogénase alcoolique (ADH), une souche "AO-null" sans oxydase aldéhydique et dont la déshydrogénase alcoolique est moins active encore que celle des souches sauvages, et une souche "ADH-null" ($bAdh^{n4}$) dont on a récemment découvert qu'elle a perdu également l'oxydase aldéhydique qu'elle possédait jadis (Heinstra et al. 1983). En général, les pondeuses choisissent des milieux d'autant plus alcoolisés qu'elles sont plus riches en déshydrogénase alcoolique; on est cependant étonné de constater que si la température d'ambiance est plus élevée les mouches " $bAdh^{n4}$ " (qui sont à la fois "ADH-null" et "AO-null") pondent de préférence sur les milieux nutritifs enrichis en éthanol (Fig. 10 et 11), qu'on aurait crus très toxiques pour elles (Hougouto et al., 1982).

Quant aux larves, on constate qu'en général elles sont attirées par les milieux "eau-agar" supplémentés en éthanol ou en aldéhyde acétique, pourvu que ces substances ne soient pas en concentrations trop élevées. Gelfand & McDonald (1980) ont remarqué que cette attraction est bien plus marquée pour les larves "ADH-null", et ils ont émis l'hypothèse que c'était dû à ce qu'elles produisent moins d'aldéhyde acétique puisqu'elles oxydent moins d'éthanol; en conséquence, elles seraient moins affectées par la présence de ces substances dans le milieu sur lequel on les place (Gelfand & McDonald, 1980). Lors d'une expérience comparant à cet égard, les larves des souches dont on avait précédemment étudié le "preferendum" ovipositionnel, on a constaté que si les larves de toutes ces souches sont attirées par l'éthanol et par l'aldéhyde acétique à 15°C et à 20°C, cette attraction est bien moins marquée à 25°C ou à 30°C (Fig. 12 et 13), sauf pour les larves de la souche "bAdhⁿ⁴" qui se comportent à nouveau de façon tout à fait inattendue si on se rappelle qu'elles sont à la fois "AO-null" et "ADH-null". (Depiereux et al., 1984 : communication personnelle).

6.- ETUDES IN VITRO

A. Première étape métabolique : transformation de l'éthanol en aldéhyde acétique.

Par chromatographie en phase gazeuse, et en prenant l'isopropanol comme étalon de comparaison, on a pu déterminer quelle quantité d'éthanol est transformée en aldéhyde acétique en un temps donné. Par utilisation des principaux inhibiteurs connus comme actifs chez les Mammifères (le pyrazole qui agit sur la voie métabolique de la déshydrogénase alcoolique et le "Sodium azide" qui inhibe la catalase) et en les faisant agir sur des homogénats d'individus adultes des souches "maroon-like" (AO-null), "bAdhⁿ⁴" (ADH-null), et "wild" dont il a été question plus haut, on a pu montrer que chez les Drosophiles le rôle de la Catalase est bien plus important qu'on ne le croyait. Chez les mouches "ADH-null" cela semble même

être la voie principale de la transformation de l'éthanol en aldéhyde acétique (Deltombe-Liétaert et al., 1979).

B. Seconde étape métabolique : transformation de l'aldéhyde acétique

Ainsi qu'il a été dit plus haut, on a d'abord attribué à l'oxydase aldéhydique (AO) un rôle exclusif dans cette seconde étape (Fig. 14). Mais cette exclusivité a par la suite été contestée par bien des auteurs. Dans sa publication précédemment citée, David (1978) accordait un rôle important à l'oxydase aldéhydique produite par le locus "Aldox 1" dans la détoxification de l'aldéhyde acétique présent dans le milieu nutritif ou dans l'environnement, mais il considérait qu'une autre enzyme (ou plusieurs autres) intervenait certainement pour transformer l'aldéhyde acétique résultant de la transformation de l'éthanol par la déshydrogénase alcoolique. Certains sont d'avis que la déshydrogénase alcoolique elle-même se chargerait de la seconde étape métabolique et transformerait l'aldéhyde acétique en acétate; elle aurait ainsi une "double fonction" (Heinstra et al., 1983). Mais la plupart des auteurs penchent plutôt pour l'intervention d'une enzyme analogue à la Déshydrogénase aldéhydique (ALDH) bien connue chez les Mammifères (l'Homme en particulier) et chez d'autres espèces encore (Garcin et al., 1982; Liétaert et al., 1982; Moxon et al., 1982; David et al., 1984 : communication personnelle). Il n'avait pas été possible jusqu'alors de mettre cette enzyme en évidence chez les insectes; mais en 1982 on a pu montrer, par chromatographie en phase gazeuse, que des inhibiteurs de la déshydrogénase aldéhydique (bien connus pour leur action chez les Vertébrés) - tels que par exemple la cyanamide -, empêchent la dégradation de l'aldéhyde acétique lorsqu'on les ajoute à un homogénat d'individus adultes provenant d'une souche monomorphique "AO-null" tandis qu'en l'absence de ces inhibiteurs il y a disparition de l'aldéhyde acétique initialement présent.

Récemment, on a pu prouver qu'il y a de la déshydrogénase aldéhydique chez les Drosophiles (Garcin et al., 1983), et que cette ALDH est présente notamment chez les mouches de la souche bAdhⁿ⁴ qui manquent à la fois d'ADH et d'AO (Libion-Mannaert et al., 1983).

7.- BUT DU TRAVAIL

Le but, forcément limité, du présent travail n'est pas de déterminer quel mécanisme moléculaire entraîne la mort des Drosophiles lorsqu'elles sont exposées à une concentration trop élevée d'aldéhyde acétique ou d'éthanol, tandis qu'elles peuvent utiliser ces substances comme sources d'énergie si leurs concentrations ne dépassent pas un certain seuil. Il s'agit certes là d'un très intéressant problème de physiologie cellulaire, - analogue à celui que pose l'action de l'alcool en physiologie humaine et que de nombreux chercheurs n'ont pas réussi jusqu'à présent à éclaircir -, mais qui dépasse les possibilités de temps et de matériel dont nous disposons.

Notre but n'est pas non plus la localisation, par centrifugation différentielle, des diverses enzymes qui semblent intervenir dans le métabolisme de l'éthanol chez la Drosophile, - bien que nous ayons participé à cette recherche qui se poursuit au laboratoire de Génétique générale de l'Unité de Génétique et Physiologie cellulaire. Il s'agit, aussi d'un problème très intéressant de chimie physiologique; mais, nous disposons d'un temps trop bref et de moyens trop limités pour prétendre le résoudre ici.

Nous avons simplement pour but, - nous plaçant du point de vue de la Biologie évolutive -, de chercher à expliquer les différences de résistance à l'éthanol et à l'aldéhyde acétique de quelques souches de Drosophila melanogaster. Ces souches sont monomorphiques pour certaines enzymes intervenant dans le métabolisme de l'éthanol. Les différences de résistance pourront être expliquées par le génotype de chaque souche. Ce génotype est directement responsable de la présence de certaines enzymes qui rendent possibles certaines voies métaboliques de l'éthanol. Dans la mesure où ces souches monomorphiques ont fait l'objet d'études de comportement, nous nous intéressons bien-sûr aux différences qu'elles présentent à cet égard; il semble en effet que les particularités du comportement puissent jouer dans l'adaptation évolutive un rôle bien plus grand qu'on le croyait jusqu'à présent.

Nous inspirant de travaux récents (Sampsel and Sims, 1982; Amosova et al., 1983; Johnson & Powell, 1974) et sachant que les températures extrêmes auxquelles les insectes peuvent se trouver exposés en nature peuvent être un facteur limitant de leur expansion géographique, nous avons également voulu étudier l'effet d'un "préconditionnement" des adultes que nous soumettions à des expériences de toxicité. Nous entendons par là qu'avant le test de toxicité nous plaçons les mouches à des températures presque léthales mais pour une durée limitée. Aucun individu ne meurt par cette action de la température mais le fonctionnement ultérieur des enzymes intervenant dans son métabolisme peut être éventuellement perturbé; cet effet pourrait être révélé par le test de toxicité qui fait suite à ce "préconditionnement".

1.- SOUCHES ET LIGNEES DE DROSOPHILA MELANOGASTER UTILISEES

Ces souches et lignées ont été choisies notamment parce qu'elles présentent des niveaux différents d'activité de leur Déshydrogénase alcoolique (ADH). Cette enzyme est en effet considérée par bien des auteurs comme jouant le rôle principal dans l'adaptation évolutive aux environnements riches en alcool. Ces souches étaient déjà connues par des expériences et des publications précédentes.

La lignée que nous appelons ici "wild e⁺" et qui sert de "contrôle" pour nos expériences, dérive à la fois des souches de laboratoire "wild Canton S" et "ebony e¹¹". Selon la méthode utilisée jadis par l'Héritier & Teissier (1937), une population mixte avait été formée ayant au départ 50 % d'individus de chacune de ces deux souches, de façon à mettre le gène muté "e" en compétition avec son allèle sauvage "e⁺". On sait, par les travaux de l'Héritier & Teissier, que l'élimination de ce gène muté n'est jamais complète. Il semble qu'il y ait hétérosis soit au niveau de la compétition larvaire (L'Héritier & Teissier, 1937) soit également au niveau de la compétition sexuelle (Elens, 1957 - 1958), ce qui maintient la fréquence du gène "e" à un niveau relativement élevé (entre 5 % et 10 % selon les conditions de température et d'humidité relative de l'air).

La souche "wild Canton S" est monomorphique $\underline{Adh}^S / \underline{Adh}^S$ et le niveau d'activité de son ADH n'est guère élevé, de même que celui de la souche "ébony e¹¹" qui est polymorphique pour \underline{Adh}^F et \underline{Adh}^S . Après une cinquantaine de générations de culture en compétition, on constate que l'allèle \underline{Adh}^S a disparu (sans doute complètement) et que le niveau d'activité de l'ADH est devenu très élevé chez toutes les mouches ($\underline{e}/\underline{e}$, $\underline{e}/\underline{e}^+$, $\underline{e}^+/\underline{e}^+$).

Par sélection, il fut aisé d'obtenir des souches "ebony" et "wild", appelées "B" à cette époque (Deltombe-Liétaert et al., 1974; Libion - Mannaert et al., 1976), monomorphiques $\text{Adh}^F/\text{Adh}^F$ et possédant un niveau d'activité enzymatique ADH bien plus élevé que dans les souches de départ (fig. 15 et 16). Cette plus grande activité de leur Déshydrogénase alcoolique leur permet d'utiliser bien plus aisément l'éthanol comme source d'énergie (Libion-Mannaert et al., 1976).

En utilisant des chromosomes "balancés" (Cy/Pm ; D/Sb) on obtint à partir de la souche "ebony B" un certain nombre de lignées isochromosomiques pour les chromosomes 2 et 3, selon une technique très habituellement utilisée dans ce but (Wallace, 1974). La lignée que nous appelons ici "wild e⁺" descend d'une de ces lignées isochromosomiques obtenues en 1976, la lignée "e⁺ 0612a" (Deltombe-Liétaert et al., 1979). Le niveau d'activité de son ADH est assez élevé.

Les deux lignées "wild HA" et "wild LA" sont également monomorphiques $\text{Adh}^F/\text{Adh}^F$ et les niveaux d'activité de leur ADH sont de même ordre que le niveau d'activité de la souche "wild e⁺". Ces deux lignées sont l'aboutissement d'une sélection de longue durée portant sur l'activité sexuelle des mâles (Kaidanov et al., 1969) en même temps que d'un "inbreeding" prolongé (plusieurs centaines de générations de croisements "frères-soeurs"). La lignée "low activity" (LA) a des mâles très peu actifs; dans cette lignée on trouve en moyenne 4 fois plus de mâles que de femelles, ce qui semble nécessaire au maintien de la lignée. Il y a en outre bien d'autres différences et particularités caractérisant ces deux souches (Kaidanov et al., 1972; Hougouto et al., 1980; Kaidanov, 1980; Hougouto et al., 1982; Kaidanov et al. 1983; Amosova et al. 1983).

La souche "y v f mal^{bz}" (reçue du Département de Biologie de "Johns Hopkins University") manque totalement d'Oxydase aldéhydique (AO) mais possède un niveau d'activité de l'ADH relativement élevé. Il existe deux groupes de mutants "AO-null". Le premier groupe comprend les mutants du locus "Aldox 1 (3-58.0)"; "y v f mal^{bz}" fait partie du second groupe dit "maroon-like" car il est formé des mutants du locus "ma-1" (1-64.8). Ces mutants ont été étudiés par divers

auteurs (la fig. 17 représente la carte génétique de *D.melanogaster*) (Dickinson, 1970 ; Dickinson & Sullivan, 1975; Garcin et al., 1983; David et al., 1978). Le métabolisme de cette souche yvf mal^{bz} (appelée parfois "AO-null 184" d'après le numéro qui lui avait été attribuée dans son laboratoire d'origine) a fait l'objet d'études concernant la transformation de l'éthanol (Deltombe-Liétaert, 1979) et de l'aldéhyde acétique (Liétaert et al., 1981, 1982). On a aussi étudié le comportement ovipositionnel des adultes et le tactisme larvaire des individus de cette souche (Hougouto et al., 1982 ; Depiereux et al., 1984).

La souche "bAdhⁿ⁴" (originaire du Département de Biologie du "California Institute of Technology") est une des souches "ADH-null" décrite depuis des années comme dépourvue totalement de Déshydrogénase alcoolique (Sofer & Hatkoff, 1972 ; David et al., 1976). Le métabolisme de l'éthanol et de l'aldéhyde acétique chez cette souche (appelée parfois blackⁿ⁴ "ADH-null") a fait l'objet de diverses études (Deltombe-Liétaert, 1979; Liétaert et al., 1981). En 1980 cette souche "ADH-null" possédait une Oxydase aldéhydique assez active, mais par la suite cette activité a totalement disparu, ainsi qu'on a pu le constater dans divers laboratoires d'Amérique ou d'Europe (Heinstra et al., 1983; Depiereux et al., 1984; David, 1984). Comme les précédentes, cette souche a fait l'objet d'études du comportement des adultes et des larves (Hougouto et al., 1982; Depiereux et al., 1984).

Les niveaux d'activité de la Déshydrogénase alcoolique (ADH) pour les 5 souches sont représentés à la figure 18.

Les génotypes des cinq souches utilisées ont été vérifiés fréquemment par électrophorèse sur gel d'amidon, selon la méthode d'Ursprung et Leone (1965), tandis que l'activité de l'ADH était déterminée selon la méthode de Sofer & Ursprung (1948) et celle de l'AO selon la méthode de Courtright (1967).

2.- METHODES IN VIVO : TOLERANCE A L'ETHANOL ET A L'ALDEHYDE ACETIQUE

Nous avons effectué des expériences de survie (ou de toxicité) en présence de concentrations variées en éthanol et aldéhyde acétique. Pour ces tests, nous nous sommes inspirés de la méthode décrite antérieurement par David et ses collaborateurs (1974), à laquelle nous avons apporté quelques modifications. Nous avons choisi de faire varier en même temps la concentration en éthanol et la concentration en aldéhyde acétique. Dans les expériences antérieures, un seul facteur variait à la fois (David et al., 1974; Sampsell et Sims, 1982).

Les mouches des cinq souches ont été multipliées massivement sur du milieu axénique (David, 1959), dans une chambre à température constante (25° C) et à 60 % d'humidité relative. Nous utilisons pour nos expériences des mouches vierges, âgées de 4 à 6 jours. Pour ce faire, on sépare les mâles des femelles, 6 heures au plus tard après l'éclosion de l'adulte et on les laisse vieillir séparément pendant quatre à cinq jours sur du milieu axénique.

Pour le test, on prépare des petits tubes en matière plastique hermétiquement fermés, d'un volume de 30 ml environ (25 tubes par expérience). Deux ml d'une solution de saccharose à 3 % et contenant des concentrations variées d'éthanol et d'aldéhyde acétique (table 3) sont introduits dans chaque tube. Ces solutions sont préparées et introduites dans les tubes à l'intérieur d'une chambre froide (15° C) afin d'éviter l'évaporation de l'alcool et surtout de l'aldéhyde acétique. De l'ouate cellulosique est déposée préalablement dans le fond de chaque tube afin d'absorber le liquide et d'empêcher les mouches de se noyer. Après avoir anesthésié très légèrement les mouches à l'éther, dix mâles et dix femelles d'une même souche sont placés dans chaque tube. Cette opération se fait toujours dans la chambre à 15° C pour éviter l'évaporation des produits. Les mouches mortes sont comptées après un et deux jours.

Nous inspirant de travaux antérieurs (Amosova et al., 1983; Sampsell and Sims, 1982; Johnson and Powell, 1974), nous avons voulu tester l'influence d'un préconditionnement sur la survie ultérieure des différentes souches. Cela consiste à soumettre les mouches à des températures presque létales, mais durant un temps limité, tel qu'aucune mouche ne meure à cause de ce traitement.

Nous avons essayé un préconditionnement à haute température (40° C) pendant cinq minutes. Les mouches sont placées dans des éprouvettes en verre (en faible densité de population pour que la température s'élève de manière homogène dans tout le tube). Ces éprouvettes sont alors plongées dans un bain marie à 40° C pendant cinq minutes. L'effet du froid est testé en mettant les mouches dans des tubes en verre (toujours en faible densité de population pour assurer un refroidissement homogène) que l'on place au frigo à une température de 1 à 2° C, pendant six heures. Après le préconditionnement, les mouches sont transvasées dans des bouteilles contenant du milieu axénique frais et replacées dans la chambre à 25° C pendant un jour, pour leur laisser le temps de se rétablir.

Il est évident que les températures extrêmes observées en nature peuvent limiter l'extension géographique d'une espèce ou d'une race. Mais il se pourrait en outre que des *Drosophiles* ayant survécu à une exposition passagère (une nuit par exemple) à des températures presque létales soient par la suite incapables d'utiliser encore les milieux fermentés qu'elles colonisaient précédemment sans difficulté. Il s'agirait de l'inactivation de certaines enzymes ou peut-être de certaines allozymes, ainsi que l'envisagent par exemple Sampsell & Sims (1982).

Les tests de toxicité permettent de comparer les effets du prétraitement sur les mouches par rapport à des mouches contrôles non traitées.

Nous avons analysé les résultats de différentes manières :

- en représentant graphiquement les résultats sous forme de courbes de mortalité et en calculant les valeurs LC_{50} à partir de ces graphiques (David et al., 1974). Ces valeurs sont reprises dans un tableau (voir les résultats).
- par des graphiques en trois dimensions en mettant en ordonnée le pourcentage de survie, en abscisse frontale la concentration en éthanol (en %), en abscisse latérale, la concentration en aldéhyde acétique (en %). Ceci, pour le premier jour de traitement.
- une analyse de la variance a été réalisée par le logiciel BMDP8V (Brown et Dixon, 1978), sur le DEC 20-60 Digital.

3.- METHODES IN VITRO : FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE ET ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les cinq souches utilisées ont été décrites antérieurement. Les mouches sont élevées sur un milieu normal dont la composition est la suivante : 2000 cc H_2O , 300 gr de sucrose, 12,5 ml d'éthanol, 12,5 ml d'acide propionique, 30 gr d'agar, 45 gr de levure sèche, 300 gr de farine de maïs et 30 gr de farine de soja.

A. Centrifugation différentielle en milieu homogène.

Cette méthode de centrifugation permet de séparer les différentes fractions subcellulaires à partir d'un homogénat de mouches. Le coefficient de sédimentation des différents granules ne varie pas au cours de la centrifugation, puisque le milieu est homogène, et leur séparation sera basée sur leurs tailles différentes.

La vitesse de sédimentation ($cm\ sec^{-1}$) d'une particule sphérique dans un champ centrifuge s'exprime de la façon suivante :

$$v = dx/dt = \frac{2 r^2 (\rho_p - \rho_m) \omega^2 x}{9 \eta}$$

- où r = le rayon de la particule (cm)
 ρ_p = la densité de la particule (g cm^{-3})
 ρ_m = la densité du milieu (g cm^{-3})
 $(\rho_p - \rho_m)$ = la densité relative de la particule dans le milieu (g cm^{-3})
 η = la viscosité du milieu (poises)
 ω = la vitesse angulaire (radian sec^{-1})
x = la distance radiale (cm)
t = le temps (sec.)

Le coefficient de sédimentation de la particule est exprimé par la relation suivante :

$$s = v/\omega^2 x = \frac{2 r^2 (\rho_p - \rho_m)}{9 \eta}$$

Le coefficient de sédimentation représente la vitesse de sédimentation par unité de champ centrifuge.

$\omega^2 x$ est l'accélération centrifuge en cm/sec^2 .

La vitesse de sédimentation est parfois exprimée en "tours par minute" (rpm). Cette valeur peut être introduite dans l'équation :

$$\omega = \frac{2\pi \text{ rpm}}{60}$$

L'accélération (g) que la particule subit dans le champ terrestre est exprimée par la relation :

$$g = \frac{\omega^2 x}{981}$$

Pour convertir les valeurs de "rpm" en valeurs de "g", il est nécessaire de connaître les caractéristiques géométriques du rotor utilisé, notamment "x" : la distance radiale.

Pour une vitesse maximale de centrifugation avec le rotor à angle de type 40, nous pouvons calculer la valeur de "g" à partir des formules précitées :

$$\frac{\omega^2 x}{981} = \left(\frac{2 \text{ rpm}}{60} \right)^2 \times \frac{x}{981} = 144.875 \text{ g} \quad (x = 8,1 \text{ cm})$$

(rpm = 40.000)

Ceci correspond effectivement à la valeur citée dans les tables éditées par la firme Beckman : 144.800 g.

Une règle de trois permet d'obtenir les valeurs en "g" pour d'autres vitesses de centrifugation :

12.500 rpm	:	10.930 g
25.000 rpm	:	43.719 g

Si on multiplie les valeurs de "g" ainsi obtenues, par le temps de centrifugation, on obtient des valeurs en "g. min." semblables à celles du schéma de de Duve et al. (1955).

Les mouches âgées de neuf à dix jours sont endormies dans la glace et pesées. On travaille avec environ 500 mg de mouches. L'homogénat complet est obtenu en broyant manuellement les mouches dans du sucrose 0,25 M (isotonique), au moyen d'un broyeur Kontes et d'un piston "loose". Cet homogénat est filtré sur deux épaisseurs de gaze stérile ce qui a pour but d'éliminer les pattes, les ailes et les autres éléments chitineux de l'exosquelette. On essaie de ne pas dépasser une dilution de 20 pour l'homogénat complet (10 ml d'homogénat pour 500 mg de mouches).

L'homogénat est centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes, dans une centrifugeuse INTERNATIONAL PR-J réfrigérée (0° C). On garde le surnageant et le culot est resuspendu dans du sucrose 0,25 M. On réhomogénéise cette suspension en passant cinq fois avec le piston "loose" et deux fois avec le piston "tight". On centrifuge de nouveau à 1500 rpm pendant 10 minutes. On garde le surnageant et on l'additionne au précédent. Le culot resuspendu dans du sucrose 0,25 M est broyé trois fois avec le piston "loose" et deux fois avec le piston "tight". La suspension est centrifugée cette fois à 600 rpm pendant 30 secondes, afin de séparer les fragments de pattes qui auraient traversé la double épaisseur de gaze (petits points noirs dans le fond du tube). Le surnageant est décanté et recentrifugé une dernière fois à 1500 rpm pendant 10 minutes. Le culot final est alors resuspendu dans du sucrose 0,25 M ce qui constitue la fraction N, enrichie en noyaux.

Les surnageants obtenus lors des centrifugations précédentes sont regroupés. Ils représentent l'extrait cytoplasmique E. On en prélève deux ml qui serviront aux dosages ultérieurs. Le reste est fractionné par centrifugation suivant la méthode de de Duve et de ses collaborateurs (1955) à l'aide de l'ultracentrifugeuse BECKMAN L₅ 65 et en utilisant un rotor à angle de type 40. Le schéma est donné à la figure 19.

les fractions obtenues sont les suivantes :

la fraction mitochondriale lourde (M), la fraction mitochondriale légère (L), la fraction microsomale (P) et la fraction soluble ou surnageant (S).

Chaque fraction sédimentable est diluée dans du sucrose 0,25 M. Elle est ensuite homogénéisée par trois passages d'un piston en teflon dans un potter Elvehjem (Braun).

Calcul des dilutions pour les différentes fractions :

Le nombre de ml dans lesquels sont resuspendues les fractions est divisé par le poids des mouches, ce qui nous donne la dilution des différentes fractions. Pour le calcul des activités enzymatiques, on multiplie par ce facteur tous les résultats de façon à exprimer l'activité enzymatique par rapport à un gramme de mouche du départ.

B. Dosages enzymatiques

Pour identifier les structures subcellulaires présentes dans les différentes fractions obtenues après centrifugation, nous avons utilisé des enzymes de référence. Ces enzymes ont une localisation bien précise et correspondent à une structure subcellulaire bien définie (de Duve et al., 1955). Ce sont des marqueurs biochimiques de l'organite en question.

Voici les enzymes de référence dont nous avons mesuré les activités, qui ont été comparées avec les valeurs obtenues pour le foie de rat :

- pour les mitochondries : la cytochrome c oxydase (marqueur de la membrane interne) et la malte déshydrogénase (marqueur de la matrice).
- pour les lysosomes : la phosphatase acide et la β - galactosidase.
- pour le réticulum endoplasmique : la NADPH cytochrome c réductase.
- pour les peroxysomes : la catalase.

Les résultats obtenus pour les dosages enzymatiques ne sont valables que si la somme des activités des différentes fractions correspond à l'activité dans l'homogénat.

Nous avons pour cette raison calculé le pourcentage de récupération en divisant la somme des activités de "N + M + L + P + S" par la somme des activités de "E + N".

Le pourcentage d'activité de chaque fraction est déterminé en divisant son activité par la somme des activités de (N+ M + L + P + S). Ce sont les "pourcents corrigés" de chaque fraction.

L'activité spécifique relative est égale aux pourcents corrigés de l'activité enzymatique dans une fraction, divisés par les pourcents corrigés des protéines de cette fraction.

Nous avons également dosé l'activité de certaines enzymes intervenant dans le métabolisme de l'éthanol. Ce sont la déshydrogénase alcoolique, la déshydrogénase aldéhydique, la catalase et l'oxydase aldéhydique.

Le tableau 1 représente pour chaque enzyme, la localisation subcellulaire, la concentration finale du substrat dans le test, la concentration finale du tampon dans le test et le pH, la méthode de mesure ainsi que la longueur d'onde à laquelle se fait la lecture et la méthode à laquelle on se réfère pour effectuer ces dosages.

Pour les lectures spectrophotométriques, nous avons utilisé le spectrophotomètre PERKIN-ELMER, sauf pour la cytochrome oxydase et la NADPH cytochrome c réductase pour lesquelles nous avons utilisé le spectrophotomètre GILFORD 240. Les lectures colorimétriques ont été effectuées au GILFORD 300 N.

Les protéines ont été mesurées par la méthode de Lowry et al. (1951).

<u>TAMPON</u>	<u>METHODE DE MESURE</u> (longueur d'onde)	<u>REFERENCE</u>
Phosphate 0.03 M (pH 7.4)	Spectrophotométrie du cytochrome c réduit (550 nm)	Schnaitman et al. (1967)
Tris 0.025 M (pH 7.4)	Spectrophotométrie du NADH (340 nm)	Ochoa (1955)
Acétate 0.05 M (pH 5)	Colorimétrie du phosphate inorganique (650 nm)	de Duve et al. (1955)
Citrate 0.05 M (pH 3.6)	Colorimétrie du P-nitophénol (420 nm)	Vaes (1966)
Phosphate de K 0.04 M (pH 7.4)	Spectrophotométrie du cyto- chrome <u>c</u> réduit (550 nm)	Beaufay et al. (1974)
Imidazole 0.02 M (pH 7.5)	Colorimétrie de H ₂ O ₂ (420 nm)	Baudhuin et al. (1964)
Na ₂ CO ₃ 0.05 M (pH 9.5)	Spectrophotométrie du NADH (340 nm)	Sofer et Ursprung (1968)
Phosphate de K 0.425 M (pH 7.5)	Spectrophotométrie du dichloroindophénol réduit (600 nm)	Courtright (1967)
Pyrophosphate 70 mM (pH 8) Inhibiteur ADH : pyrazole 0.4 mM	Spectrophotométrie du NADH (340 nm)	Eckfeld et al. (1976) Crow et al. (1974) Lindahl (1981) Tottmar et al. (1973)

CHAPITRE II

ANALYSE DES RESULTATS

DES EXPERIENCES IN VITRO

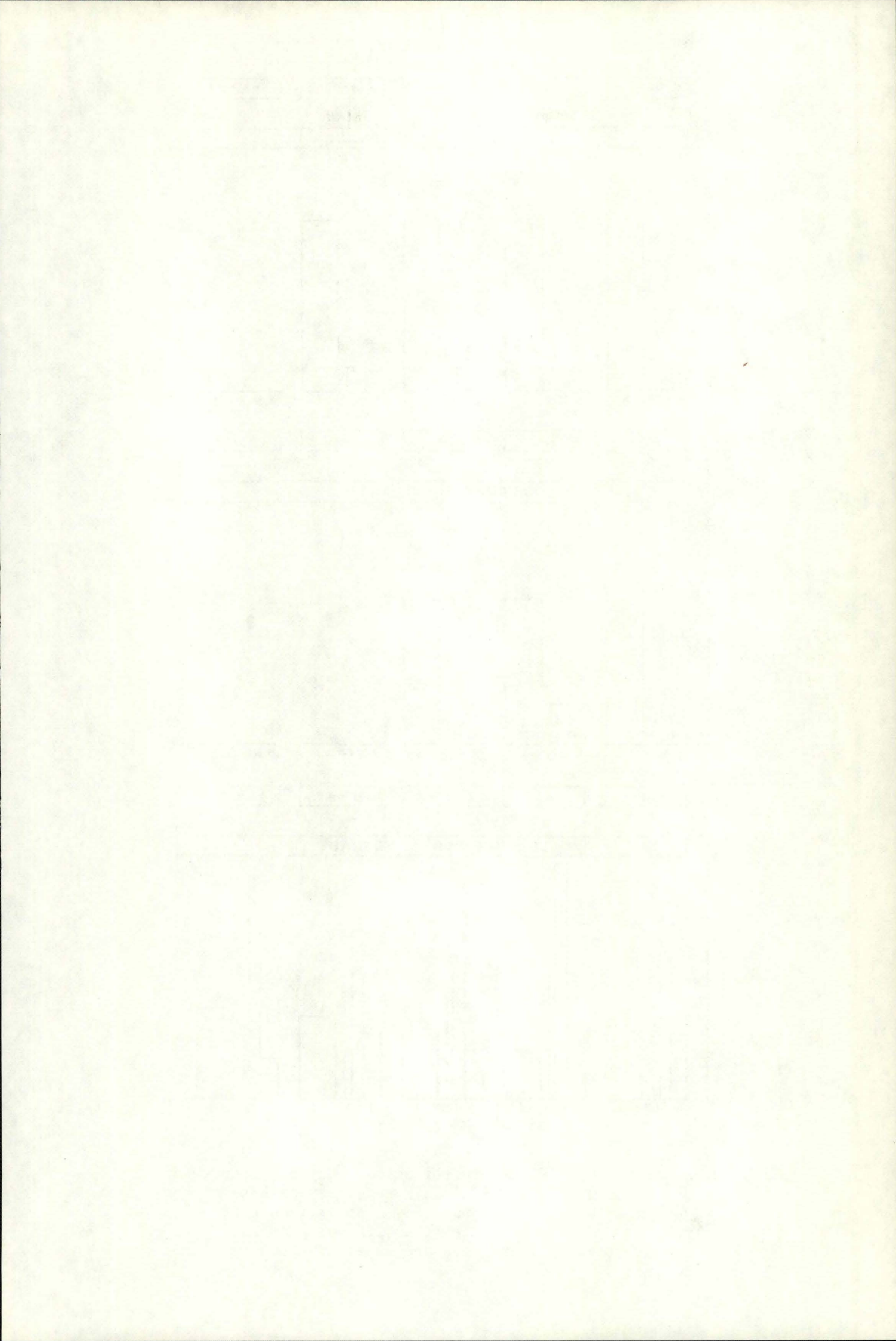
Nous avons regroupé dans le tableau n°2, les résultats des dosages enzymatiques. Y sont repris, les activités absolues calculées sur "E + N", les pourcentages d'activité dans chaque fraction (activité d'une fraction / activité absolue de "E + N"), ainsi que les activités spécifiques relatives et les pourcentages de récupération d'activité enzymatique pour chaque souche.

Nous constatons directement que les souches yvf mal^{bz} et bAdhⁿ⁴ ne montrent aucune activité de l'oxydase aldéhydique. La souche bAdhⁿ⁴ ne possède pas non plus d'activité de la déshydrogénase alcoolique.

Nous avons représenté graphiquement les activités spécifiques des enzymes de référence par rapport aux activités spécifiques du foie de rat (figure 20). L'activité spécifique du foie de rat est considérée comme étant égale à 100 %.

Nous trouvons des valeurs beaucoup plus élevées pour la NADPH cytochrome c réductase chez la Drosophile. Des valeurs similaires sont obtenues pour la cytochrome oxydase et beaucoup plus faibles pour les enzymes marqueurs des lysosomes (phosphatase acide et β -galactosidase) et des peroxysomes (catalase). Les valeurs pour la phosphatase acide sont vraiment très faibles par rapport à celles du rat.

La figure 21 nous donne les activités spécifiques relatives des enzymes de référence pour les cinq souches, comparées aux valeurs trouvées pour le foie de rat. On a représenté en ordonnée l'activité spécifique relative ("pourcentages corrigés" de l'activité dans une fraction / "pourcentages corrigés" des protéines dans la fraction correspondante). En abscisse, les quantités de protéines (en pourcents de la quantité totale) contenues dans chaque fraction.



Ces pourcents sont cumulés de gauche à droite et le total fait 100 %. Chaque fraction est donc représentée par un rectangle dont la hauteur représente le degré de pureté de la fraction et dont la surface représente la quantité relative d'enzyme dans chaque fraction (de Duve et al., 1955).

La figure 22 représente les activités spécifiques relatives des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'éthanol. Nous ne possédons pas de valeurs correspondantes pour le foie de rat.

LES ENZYMES DE REFERENCE :

La cytochrome oxydase :

Une grande partie de l'enzyme se retrouve dans les fractions N et M. Cependant, c'est la fraction mitochondriale lourde qui possède l'activité spécifique relative la plus élevée.

La malate déshydrogénase :

Cette enzyme est surtout présente dans les fractions N et M, mais aussi dans la fraction soluble S.

La phosphatase acide :

Elle est localisée dans la fraction mitochondriale lourde M et dans la fraction mitochondriale légère L.

La β -galactosidase :

L'activité enzymatique est principalement retrouvée dans la fraction mitochondriale légère L, et dans la fraction mitochondriale lourde M. Elle est présente également dans la fraction microsomale P.

La NADPH cytochrome c réductase :

L'enzyme marqueur du réticulum endoplasmique est principalement localisé dans la fraction microsomale P.

La catalase :

Pratiquement toute l'activité enzymatique se retrouve dans la fraction soluble. L'enzyme paraît donc non sédimentable. Dans le foie de rat, en utilisant les mêmes conditions de centrifugation, cette enzyme marqueur des peroxysomes est localisée dans la fraction L. Nous avons vu plus haut que l'activité spécifique de cette enzyme chez la Drosophile est très faible par rapport à celle que l'on retrouve chez le rat. Une explication possible est l'inactivation d'une partie de l'enzyme entre le moment du fractionnement et le dosage enzymatique. Le fait que la faible activité soit non sédimentable pourrait être dû aux conditions d'homogénéisation. Elles seraient inadéquates pour la préservation de la structure intacte des peroxysomes.

LES ENZYMES INTERVENANT DANS LE METABOLISME DE L'ETHANOL :

La déshydrogénase alcoolique :

On voit qu'elle est surtout présente dans la fraction non sédimentable. Ce serait donc une enzyme cytoplasmique (Ursprung and Leone, 1965; Ursprung and Carlin, 1968). Aucune activité enzymatique n'est décelable chez la souche bAdhⁿ⁴ .

L'oxydase aldéhydique :

Il s'agit encore d'une enzyme localisée dans la fraction soluble. Elle est absente chez les souches yvf mal^{bz} et bAdhⁿ⁴ .

La déshydrogénase aldéhydique :

Elle est surtout présente dans la fraction mitochondriale lourde M et dans la fraction soluble S. Toutes les souches présentent une telle distribution de l'enzyme. Les lignées HA et LA montrent cependant une activité spécifique relative plus élevée pour la fraction mitochondriale lourde M. Il en va de même pour la souche bAdhⁿ⁴ .

DISCUSSION :

La technique de fractionnement mise au point pour le foie de rat, quoique appliquée à une entité tout à fait différente, semble être adéquate, malgré les différences observées. Les activités enzymatiques semblent être bien préservées après le fractionnement. Pour s'en convaincre, il suffit de regarder les pourcentages de récupération repris dans le tableau n°2.

La distribution des enzymes de référence est comparable à celle que l'on observe d'habitude pour le foie de rat. En effet, la distribution des enzymes marqueurs des mitochondries (la cytochrome c oxydase et la malate déshydrogénase) est semblable à celle que l'on trouve pour le foie de rat.

Les enzymes marqueurs des lysosomes (phosphatase acide et β -galactosidase) suivent également une distribution comparable à celle du foie de rat.

L'activité spécifique relative trouvée dans la fraction L est cependant plus faible chez la Drosophile, et cela pour les deux enzymes.

L'activité spécifique relative de la NADPH cytochrome c réductase, est plus élevée dans la fraction microsomale P aussi bien chez la Drosophile que dans le foie de rat.

Une seule enzyme nous pose un problème, c'est la catalase. Cette enzyme marqueur des peroxysomes et principalement localisée dans la fraction mitochondriale légère (foie de rat), paraît non sédimentable chez la Drosophile.

Certains auteurs, et notamment Locke et McMahon (1971), signalent la présence de peroxysomes dans le corps gras ("fat body") des insectes. Ils disent également que la concentration de ces peroxysomes (abondance), varie avec le stade de développement de l'insecte. Des études ultérieures permettront peut-être de mettre en évidence des peroxysomes chez la Drosophile et d'améliorer les conditions expérimentales pour éviter leur destruction (si elle existe) lors du fractionnement.

Quoiqu'il en soit, la catalase semble jouer un rôle important dans l'oxydation de l'éthanol en aldéhyde acétique, chez la souche bAdhⁿ⁴ qui est dépourvue de déshydrogénase alcoolique (Deltombe-Liétaert et al., 1979).

On sait que la déshydrogénase alcoolique joue un rôle prépondérant dans la tolérance de Drosophila melanogaster envers l'alcool (David et al., 1976). On verra plus loin que la souche bAdhⁿ⁴ (qui ne possède pas de déshydrogénase alcoolique ni d'oxydase aldéhydique) est beaucoup plus sensible à l'éthanol que les autres souches possédant une déshydrogénase alcoolique (ADH) plus ou moins active.

On pensait au début que l'oxydase aldéhydique jouait un rôle très important et même primordial dans la transformation de l'aldéhyde acétique en acétate, un produit non toxique (Dickinson, 1970 - 1971). On croyait à cette époque que les insectes étaient dépourvus de déshydrogénase aldéhydique, une enzyme présente en quantité relativement importante chez les mammifères, et responsable chez ceux-ci de la dégradation de l'aldéhyde acétique provenant de l'oxydation de l'éthanol. La déshydrogénase aldéhydique était très étudiée chez les mammifères tels que le lapin (Lindahl, 1981), la souris (Little et al., 1983), le rat (Pettersson and Tottmar, 1982; Tottmar et al., 1973; Marjanen, 1972; Lundquist et al., 1959, 1962), le mouton (Crow et al., 1974; MacGibbon et al., 1977 a et b, 1978), et le cheval (Pietruszko and Yonetani, 1981; Eckfeldt et al., 1976; Eckfeldt and Yonetani, 1976). Depuis quelques années, on pense que cette enzyme serait aussi présente chez la Drosophile (Garcin et al., 1983 a et b; Liétaert et al., 1982; Moxon et al., 1982; David et al., 1984). Elle a pu récemment être mise en évidence chez des souches mutantes : ALDOXⁿ¹ et mal¹, dépourvues d'oxydase aldéhydique (Garcin et al., 1983 b) et bAdhⁿ⁴, dépourvue de déshydrogénase alcoolique et d'oxydase aldéhydique (Libion-Mannaert et al., 1983). Les résultats présents confirment la présence de la déshydrogénase aldéhydique chez les cinq souches utilisées. De plus, la localisation subcellulaire de l'ALDH est comparable chez les Drosophiles et les mammifères (fraction M et S).

Nous voyons ici l'intérêt d'utiliser la Drosophile comme modèle animal, dans un cadre qui dépasse largement celui de la Biologie évolutive de l'adaptation des Drosophiles à des milieux alcoolisés et même de la Biologie évolutive en général. En effet, les mécanismes biochimiques de détoxification et de métabolisation de l'éthanol paraissent semblables chez les Drosophiles et les mammifères et même chez l'homme (Harada et al., 1979, 1980; Agarwal et al., 1981).

Elevs! La Drosophile peut donc servir de modèle et permettre de mener à bien ces recherches. C'est un matériel moins coûteux et plus facile à manipuler, ce qui lui confère un avantage certain par rapport aux mammifères.

La figure 23 schématise l'état actuel de nos connaissances sur les voies métaboliques de l'éthanol. Une comparaison est faite entre ce que l'on retrouve chez les mammifères et ce que l'on connaît actuellement chez la Drosophile.

CHAPITRE III

ANALYSE DES RESULTATS

DES EXPERIENCES IN VIVO

Lorsque nous avons commencé en 1983 nos expériences in vivo de tolérance et de survie des mouches adultes en présence de diverses concentrations d'éthanol et d'aldéhyde acétique, nous ne disposions pas encore de tous les renseignements apportés ultérieurement par les centrifugations fractionnées (Figures 21 et 22). Une bonne partie de ces dernières expériences n'ont été faites qu'en 1984 (surtout pour les mouches des lignées HA et LA).

Pour interpréter les résultats de ces expériences de survie, nous pouvions nous baser sur des études in vitro faites précédemment sur des homogénats non fractionnés provenant d'individus des mêmes souches (Deltombe-Liétaert et al., 1979; Liétaert et al., 1981; Hougouto et al., 1982).

Pour ce qui concerne la déshydrogénase alcoolique, - qui est très généralement considérée comme jouant le rôle principal dans le métabolisme de l'éthanol -, nous voyons qu'au départ de nos expériences de survie la souche wild e⁺ et les lignées "inbred" HA et LA sont assez riches en ADH; par contre la souche bAdhⁿ⁴ n'en a pas du tout et la souche y v f mal^{bz} en a peu (Figure 24). Il faut ajouter que la souche y v f mal^{bz} est "AO-null" car elle manque d'oxydase aldéhydique (Dickinson et Sullivan, 1975; David et al., 1978; Deltombe-Lietaert et al., 1979; Liétaert et al., 1981; Hougouto et al., 1982). Quant à la souche bAdhⁿ⁴, on sait depuis longtemps qu'elle est dépourvue de déshydrogénase alcoolique (Sofer et Hatkoff, 1972; David et al., 1976; Deltombe - Liétaert et al. 1979; Hougouto et al., 1982). Mais il est apparu par la suite que cette souche "ADH-null", - qui en 1978 était assez riche en aldéhyde oxydase (Deltombe-Liétaert et al., 1979) et qui en possédait encore en 1982 (données non publiées) -, est à présent devenue "AO-null" également (Heinstra et al., 1983; Libion-Mannaert et al., 1983; Liétaert et al., 1984).

Le même phénomène s'est produit successivement dans trois laboratoires au moins : chez W. Sofer à Baltimore, chez P.W.H. Heinstra à Utrecht, chez A. Elens à Namur; il faut ajouter qu'une autre souche "ADH-null" est en train de perdre également son oxydase aldéhydique : la souche Adhⁿ est déjà devenue "AO-null" dans le laboratoire du FNRS à Gif-sur-Yvette, mais possède encore de l'oxydase aldéhydique dans le laboratoire de l'Université Claude Bernard à Villeurbanne (J. David : communication personnelle).

Si nous considérons les résultats des expériences de centrifugation fractionnée faites en 1983 et 1984, nous sommes déçus en constatant que les valeurs globales obtenues en additionnant les activités des fractions E + N indiquent des activités spécifiques qui diffèrent de ce qu'avaient donné les dosages précédents, qui portaient sur des homogénats non fractionnés (tableau 2). Ceci est tout spécialement vrai pour les lignées HA et LA, dont la déshydrogénase alcoolique semble bien moins active que précédemment.

Peut-être est-ce l'effet de la différence des méthodes employées, mais on ne trouve pas de telles discordances pour les autres souches, ce qui tend à faire croire qu'il s'agit d'un phénomène particulier aux lignées HA et LA. Il faut se rappeler que ces lignées sont maintenues par une succession de croisements "frère-soeur" associés à une sélection portant sur l'activité sexuelle des mâles : on conserve dans la lignée HA les mâles qui copulent très tôt et dans la lignée LA ceux qui ne le font qu'après un certain temps.

Pour des raisons de contraintes temporelles, la précision de cette sélection a dû être diminuée ces derniers mois ; on s'est contenté de conserver comme géniteurs les couples qui donnaient peu de descendants parmi lesquels une majorité de mâles dans la lignée LA, et au contraire au moins 40 descendants et une "sex-ratio" normale dans la lignée HA. De plus, puisqu'une expérience de centrifugation exige au moins 500 mg de mouches âgées de 10 jours, il était nécessaire

de la faire précéder par quelques générations de multiplication massive. Nous croyons que ce relâchement de la sélection et de l'"inbreeding" est responsable des changements que nous constatons dans les niveaux d'activité enzymatique.

Pour ces mêmes mouches HA et LA, il a été montré (Hougouto et al., 1980; Amosova et al., 1983) qu'il suffit de deux ou trois générations de relâchement de la sélection pour que ces lignées perdent des caractéristiques physiologiques et autres qu'on croyait irréversiblement acquises. Par exemple, la lignée LA est connue pour sa faible fécondité et pour sa proportion anormalement élevée de mâles (leur activité sexuelle étant faible, c'est nécessaire pour le maintien de la lignée); il suffit de relâcher la sélection pendant un temps très bref pour qu'il y ait retour à la normale (figure 25). De même, la fécondité des mouches HA, -également faible à cause de la consanguinité imposée -, augmente rapidement dès qu'on relâche cette sélection (Figure 25). Il semble s'être passé quelque chose d'analogue dans le cas présent et les niveaux d'activité enzymatique sont revenus à des valeurs très inférieures. Afin de vérifier cette hypothèse, on procède dès à présent à des dosages portant sur des homogénats non fractionnés, ainsi qu'on l'a fait dans les années précédentes.

Pour interpréter les résultats de nos expériences de survie, il est donc mieux de se baser sur les dosages d'activité globale de l'ADH, plutôt que sur l'activité de l'ADH dans les diverses fractions obtenues lors des centrifugations. Cependant, il est intéressant de considérer aussi les différences que présentent à cet égard les diverses souches ou lignées.

Il aurait été trop long de représenter ici toutes les courbes de survie obtenues pour les tests de tolérance à l'éthanol. C'est pourquoi, nous avons regroupé dans le tableau n°3, les valeurs de LC_{50} pour l'éthanol après 1 et 2 jours. Ce sont les concentrations en éthanol qui tuent 50 % des mouches après un temps bien défini.

Les cinq souches sont représentées ainsi que l'effet du préconditionnement "chaud" ou "froid". Ces valeurs sont calculées pour des groupes de 100 à 200 mouches (cinq à dix répétitions de 20 mouches), d'après les courbes de survie (David et al., 1974).

Nous constatons que :

- la LC_{50} diminue le second jour, ce qui est tout à fait normal puisque les mouches mortes le deuxième jour sont cumulées avec celle du premier jour.
- la lignée HA est la plus résistante, suivie des mouches LA et wild e⁺. Pour des concentrations en aldéhyde acétique supérieures à 0,25 %, la lignée LA semble plus résistante que la lignée HA. La souche yvf mal^{bz} est beaucoup plus sensible au traitement et la souche bAdhⁿ⁴ est la plus sensible de toutes. Ceci paraît tout à fait normal quand on sait que l'activité de la déshydrogénase alcoolique décroît chez ces souches dans l'ordre : HA, wild e⁺, LA, yvf mal^{bz}; les mouches bAdhⁿ⁴ ne montrent aucune activité pour cette enzyme. On sait par ailleurs que les deux dernières souches citées ne possèdent pas d'oxydase aldéhydique, ce qui pourrait expliquer leur plus faible résistance lorsqu'on augmente la concentration en aldéhyde acétique.
- le prétraitement a tendance à faire diminuer la LC_{50} (explication possible : dénaturation enzymatique partielle, ce qui rendrait les mouches moins résistantes dans des tests de tolérance à l'alcool.) La souche bAdhⁿ⁴ ne semble pas affectée par ces préconditionnements. Attribuerions-nous cela au fait qu'elle ne possède ni déshydrogénase alcoolique, ni oxydase aldéhydique? En général, le préconditionnement à 40°C semble plus défavorable pour les mouches que celui à 1° C.

Il nous a semblé intéressant de reprendre dans le tableau n°4, les valeurs de LC_{50} pour les cinq souches (sans les valeurs pour les préconditionnements) en ne tenant compte que de cinq répétitions pour chaque test (total de cent mouches). Cela, en vue de comparer les résultats obtenus avec ceux d'expériences antérieures

datant de 1978 (tableau n°5) et portant sur les souches bAdhⁿ⁴ , yvf mal^{bz} et wild e⁺ . Nous constatons que les valeurs de LC₅₀ semblent inférieures en 1983 à ce qu'elles étaient en 1978. Cela pourrait résulter soit d'une diminution de résistance des souches (liée à l'activité de la déshydrogénase alcoolique), soit de certains changements dans les conditions expérimentales (période de l'année à laquelle se font les tests, expérimentateur différent...). Il semble que des fluctuations existent quant au niveau d'activité de la déshydrogénase alcoolique mais que celles-ci ne soient pas très importantes.

Par contre, pour la souche bAdhⁿ⁴, le niveau d'activité de l'oxydase aldéhydique semble avoir diminué de manière considérable durant ces dernières années. En 1978, l'activité spécifique était de "7958 ± 384". En 1979, elle avait diminué presque de moitié atteignant une valeur de "4454 ± 1065". On a remarqué en 1983 qu'elle l'avait complètement perdue. Les activités spécifiques sont exprimées en unités d'activité enzymatique/gr de protéine, avec l'intervalle de confiance à 95 %. Il semble que la diminution de résistance de cette souche (observée en 1983) sur des milieux contenant de l'aldéhyde acétique, soit liée à cette disparition d'activité de l'oxydase aldéhydique.

Nous avons également représenté les résultats sous forme de graphiques en trois dimensions (figure 26). En ordonnée, le pourcentage de survie après un ou deux jours. En abscisse latérale, la concentration en aldéhyde acétique (en %) et en abscisse frontale, la concentration en éthanol (en %).

Nous constatons directement que la lignée HA est la plus résistante (activité la plus haute en ADH), suivie de la lignée LA et de la ~~lignée~~ ^{souche} wild e⁺ . La souche yvf mal^{bz} est beaucoup moins résistante et la souche bAdhⁿ⁴ est la plus sensible de toutes. De manière générale, la survie diminue lorsqu'on augmente la concentration en éthanol ou la concentration en aldéhyde acétique, ou les deux simultanément. Les différences de résistance à l'éthanol entre les souches et lignées, correspondent bien aux niveaux d'activité différents de leur déshydrogénase alcoolique (figure 24).

Pour analyser plus en détail les résultats des expériences de survie, il fallait pouvoir distinguer l'influence des différents facteurs sur ceux-ci. Dans ce but, nous avons réalisé une analyse de la variance dont le tableau des résultats est repris ici (tableau n°6). Quatre facteurs sont fixés au départ. Ce sont la souche, le préconditionnement, la concentration en éthanol (en %) et la concentration en aldéhyde acétique (en %). Ces quatre facteurs sont croisés entre eux, c'est-à-dire que toutes les souches ont été traitées pour toutes les combinaisons possibles des trois autres facteurs. La variable aléatoire est la valeur de mortalité obtenue pour chaque répétition (cinq répétitions pour chaque combinaison).

Quand on analyse ce tableau, on remarque que tous les facteurs pris globalement ont une influence très significative (seuil de 1 %) sur les résultats. Toutes les interactions doubles sont également significatives au seuil de 1 %. Trois interactions triples sont significatives, dont deux au seuil de 1 %. Une seule interaction triple est non significative. L'interaction quadruple est également non significative.

On voit ici la difficulté d'interprétation d'un tel tableau. Prenons un exemple qui permettra de comprendre la complexité des résultats obtenus. Il y a un effet de l'éthanol (le facteur éthanol pris globalement est très significatif); mais l'effet de l'éthanol n'est pas le même pour chaque souche (interaction souche-éthanol très significative). Et l'effet de l'éthanol sur une souche n'est pas le même pour toutes les conditions expérimentales (interaction souche-préconditionnement-éthanol significative). Nous pourrions ainsi multiplier les exemples, mais ce n'est pas nécessaire.

Bien des représentations graphiques pourraient aider à l'interprétation de ces résultats; nous nous limiterons à quelques-unes qui nous paraissent plus intéressantes.

EFFET DE LA SOUCHE : (figure 27 : A - B - C)

La figure 27-A représente en ordonnée, la mortalité moyenne des cinq souches, considérant globalement toutes les autres conditions expérimentales. Les différentes souches se succèdent sur l'axe des abscisses.

Nous remarquons des différences entre les souches. Deux groupes peuvent être distingués. le premier comprend les lignées HA et LA ainsi que la souche wild e⁺. Ces mouches montrent une activité assez élevée de leur déshydrogénase alcoolique. Les deux autres souches montrent certaines déficiences enzymatiques, ce qui pourrait expliquer leur moindre résistance. La souche yvf mal^{bz} ne possède pas d'oxydase aldéhydique, ce qui peut la rendre plus sensible à l'aldéhyde acétique présent dans le milieu. La souche bAdhⁿ⁴ ne montre aucune activité de la déshydrogénase alcoolique. Elle est aussi dépourvue d'oxydase aldéhydique. Ceci permet d'expliquer la sensibilité aussi bien à l'éthanol qu'à l'aldéhyde acétique.

Il nous a paru intéressant de séparer l'effet de l'aldéhyde acétique de celui de l'éthanol. A la figure 27-B est représenté l'effet de l'éthanol seul en l'absence d'aldéhyde acétique (ceci permet de supprimer l'effet de l'aldéhyde acétique). Le graphique exprime la mortalité moyenne des mouches (en ordonnée) en fonction de la souche (en abscisse). Ce sont des moyennes globales pour toutes les autres conditions. Nous observons toujours les deux mêmes groupes. Cependant, la souche wild e⁺ semble moins résistante que les deux autres (HA et LA). L'écart se creuse davantage entre la souche yvf mal^{bz} et la souche bAdhⁿ⁴, cette dernière montrant toujours la mortalité la plus élevée.

A la figure 27-C nous avons représenté l'effet de l'aldéhyde acétique seul, en l'absence d'éthanol (l'effet de l'éthanol est ainsi supprimé). En ordonnée, la mortalité moyenne des mouches et en abscisse, les différentes souches. Les mortalités moyennes sont calculées globalement pour toutes les autres conditions.

Nous voyons clairement que l'effet de l'aldéhyde acétique est plus marqué que celui de l'éthanol (mortalités plus élevées pour l'aldéhyde acétique). Il ne faut d'ailleurs pas perdre de vue que les concentrations d'aldéhyde acétique utilisées sont dix fois inférieures à celles de l'éthanol. Nous voyons également que les différences entre souches sont moins marquées. La souche wild e⁺ semble plus résistante que les lignées HA et LA. La souche bAdhⁿ⁴ reste la moins résistante. Les lignées HA et LA, et la souche yvf mal^{bz} montrent des valeurs plus ou moins comparables.

EFFET DU PRECONDITIONNEMENT :

Il existe une différence entre les mouches prétraitées et les mouches contrôles quant à leur résistance dans les tests de toxicité. La mortalité est augmentée de façon comparable que ce soit pour le "chaud" ou pour le "froid".

EFFET DE LA CONCENTRATION EN ALDEHYDE ACETIQUE ET EFFET DE LA CONCENTRATION EN ETHANOL :

Ces deux effets sont représentés dans un même graphique (figure 28). On étudie l'effet de l'aldéhyde acétique, à concentration nulle en éthanol, et vice versa.

En ordonnée, la mortalité moyenne des mouches (moyenne calculée pour toutes les souches, pour les trois préconditionnements et pour une concentration nulle d'un des deux autres facteurs).

En abscisse, les concentrations en aldéhyde acétique et en éthanol sont représentées sur des échelles différentes (les concentrations en aldéhyde acétique sont dix fois inférieures à celles de l'éthanol).

On voit que l'aldéhyde acétique est bien plus toxique que l'éthanol.

INTERACTION ETHANOL - ALDEHYDE ACETIQUE :

Elle est représentée à la figure 29.

En A, la mortalité est représentée en fonction de la concentration en éthanol. Les mortalités moyennes sont calculées globalement pour les cinq souches et les différents préconditionnements. Les courbes obtenues correspondent aux différentes concentrations en aldéhyde acétique.

En B, la mortalité des mouches est représentée en fonction de la concentration en aldéhyde acétique. Les mortalités moyennes sont calculées comme en A. Les courbes obtenues correspondent aux différentes concentrations en éthanol.

L'interaction étant significative, cela veut dire que l'effet de l'aldéhyde acétique n'est pas le même pour toutes les concentrations en éthanol et vice versa. Dans le cas contraire, nous obtiendrions des courbes parallèles, montrant ainsi l'additivité des deux effets.

Nous avons représentés les résultats de manière quelque peu différente à la figure 30 (A et B).

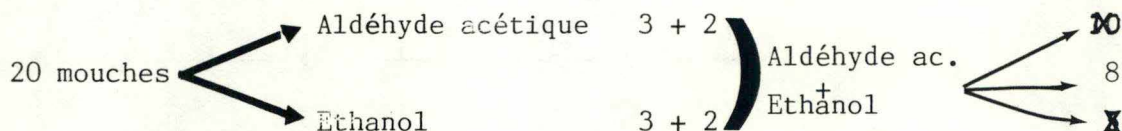
En A, la différence de mortalité supplémentaire quand on ajoute de l'aldéhyde acétique est représentée en fonction de la concentration en éthanol. Entre parenthèses, on a indiqué la mortalité due à l'éthanol seul, pour les différentes concentrations de celui-ci.

En B, la différence de mortalité supplémentaire quand on ajoute de l'éthanol est représentée en fonction de la concentration en aldéhyde acétique. Entre parenthèses, on a indiqué la mortalité due à l'aldéhyde acétique seul.

On voit très bien que la mortalité supplémentaire observée quand on ajoute le second facteur, diminue quand on augmente la concentration du premier facteur. Il n'y a donc pas additivité des effets des deux facteurs. Dans le cas d'une interaction non significative, nous aurions des droites horizontales, ce qui montrerait une additivité des effets des deux facteurs.

Essayons d'interpréter les résultats de la figure 29. On pourrait imaginer qu'il existe des mouches de sensibilités différentes. Dans un groupe de 20 mouches, certaines sont très sensibles et meurent très vite (pour de faibles concentrations d'aldéhyde acétique ou d'éthanol). D'autres sont très résistantes et ne mourront pas, même pour de fortes concentrations en aldéhyde acétique et/ou en éthanol.

Comment expliquer que la mortalité observée pour les différentes combinaisons d'alcool et d'aldéhyde acétique, est intermédiaire entre la somme des mortalités dues à chaque facteur pris séparément et la mortalité due à un seul des deux facteurs ? Ce petit schéma nous donne une interprétation possible :



Prenons par exemple un groupe de 20 mouches que l'on soumet à une certaine concentration en aldéhyde acétique. Cinq mouches meurent. Trois de ces mouches sont mortes à cause de l'aldéhyde acétique et ne seraient pas mortes pour un traitement à l'éthanol. Les deux autres mouches seraient mortes aussi pour un traitement à l'éthanol.

Reprenons ce groupe de 20 mouches que l'on soumet cette fois à une certaine concentration en éthanol. Cinq mouches meurent. Trois sont mortes à cause de l'éthanol et ne seraient pas mortes pour un traitement à l'aldéhyde acétique. Les deux autres mouches seraient aussi mortes pour un traitement à l'aldéhyde acétique. Ces deux mouches meurent donc quelles que soient les conditions de traitement.

Soumettons maintenant ce même groupe de 20 mouches aux deux facteurs à la fois. On observe non pas 10 mouches mortes, ni 5, mais bien 8 mouches mortes. Trois mouches sont mortes à cause de l'aldéhyde acétique, trois autres à cause de l'éthanol et les deux dernières mouches seraient mortes quelles que soient les conditions (éthanol ou aldéhyde acétique ou les deux).

Addendum pour les figures suivantes :

Fig. 31 (A et B) p. 42

Fig. 32 (A et B) p. 43

Fig. 33 (A et B) p. 44

Fig. 34 (1, 2, 3, 4) p. 45



$\nabla = \underline{\text{bAdh}}^{\text{n4}}$

$\Delta = \underline{\text{yvf mal}}^{\text{bz}}$

$\square = \underline{\text{wild e}}^{\text{+}}$

● = HA

○ = LA

Dans notre interprétation, nous ne devons pas oublier que les valeurs de mortalité obtenues pour cette interaction, sont des moyennes portant sur les 5 souches.

Les mouches sensibles dont nous avons parlé dans l'interprétation des résultats, correspondraient alors à des génotypes plus sensibles (probablement bAdhⁿ⁴ et yvf mal^{bz}). Les mouches les plus résistantes correspondraient aux génotypes les plus résistants (wild e⁺, HA et LA). Ces différences entre souches pourraient être responsables des valeurs de "différence de mortalité supplémentaire" obtenues à la figure 30 A et B.

INTERACTION ETHANOL - SOUCHE (figure 31 A)

INTERACTION ALDEHYDE ACETIQUE - SOUCHE (figure 31 B)

En ordonnée, la mortalité moyenne des mouches, calculée globalement pour toutes les souches, les trois préconditionnements et toutes les concentrations d'aldéhyde acétique (A) ou toutes les concentrations d'éthanol (B). En abscisse, la concentration en éthanol (A) ou la concentration en aldéhyde acétique (B).

Ces deux interactions permettent de distinguer deux groupes : les génotypes assez résistants à l'aldéhyde acétique et à l'éthanol (HA, LA et wild e⁺) et les génotypes sensibles à l'aldéhyde acétique et à l'éthanol (bAdhⁿ⁴ et yvf mal^{bz}).

Il nous semblait intéressant de pouvoir interpréter l'effet de chacun des deux facteurs pris séparément (en supprimant l'effet de l'autre facteur). C'est ce que nous avons représenté à la figure 32 A et B.

La figure 32 A représente la mortalité moyenne des mouches en fonction de la concentration en éthanol, la concentration en aldéhyde acétique étant nulle. Les moyennes sont calculées globalement pour toutes les autres conditions (souche et préconditionnement).

Les mouches des lignées HA et LA résistent bien à l'éthanol, même à forte concentration, celles de la souche wild e⁺ y sont à peine plus sensibles; ces trois génotypes ont un niveau élevé d'activité de la déshydrogénase alcoolique et ceci explique sans doute qu'ils tolèrent bien l'éthanol. Par contre, la souche bAdhⁿ⁴, qui manque de déshydrogénase alcoolique (et aussi d'oxydase aldéhydique), supporte très mal la présence d'éthanol. Quant à la souche yvf mal^{bz}, qui n'a pas d'oxydase aldéhydique mais possède une ADH assez active, elle tolère des concentrations en éthanol un peu plus élevées que celles qui tuent les mouches bAdhⁿ⁴. Cependant les mouches yvf mal^{bz} ne résistent pas à des concentrations en éthanol aussi fortes que celles que supportent aisément les mouches wild e⁺, HA, LA; c'est sans doute lié à leur manque d'oxydase aldéhydique. Devrait-on en conclure que cette enzyme intervient malgré tout, -partiellement du moins-, dans la détoxification de l'aldéhyde acétique produit par la transformation métabolique de l'éthanol ? Cela signifierait que la déshydrogénase aldéhydique (présente chez cette souche comme dans les autres génotypes étudiés) ne suffirait pas à détoxifier l'aldéhyde acétique produit par le métabolisme.

La figure 32 B représente la mortalité moyenne des mouches en fonction de la concentration en aldéhyde acétique, la concentration en éthanol étant nulle. Les moyennes sont calculées globalement pour toutes les autres conditions (souche et préconditionnement). Nous voyons que l'aldéhyde acétique est très toxique pour tous les génotypes. Les souches les plus affectées sont certainement celles qui ne possèdent pas d'oxydase aldéhydique (bAdhⁿ⁴ et yvf mal^{bz}).

Nous avons repris à la figure 33 A et B, le même type de graphique mais en fixant cette fois la concentration du second facteur à sa valeur maximale (10 % pour l'éthanol et 1 % pour l'aldéhyde acétique).

A la figure 33 A, les valeurs de mortalité obtenues pour les cinq souches, pour une concentration nulle en éthanol montrent une dispersion plus grande que pour une concentration en éthanol de 10 %.

De là pourraient venir les différences observées dans les valeurs de "différence de mortalité supplémentaire" de la figure 30 A. Le même type de commentaire peut être fait à propos de la figure 33 B (pour les concentrations de 0 % et 1 % d'aldéhyde acétique) par rapport à la figure 30 B.

A la figure 33 B, nous constatons que pour de faibles concentrations en aldéhyde acétique, la plupart des mouches bAdhⁿ⁴ et yvf mal^{bz} sont déjà éliminées à cause de la forte teneur du milieu en éthanol (10 %).

Les trois autres souches sont plus résistantes dans ces conditions, et surtout les lignées HA et LA. Quand on augmente progressivement la concentration en aldéhyde acétique, - la concentration en éthanol restant fixée à 10 % -, la mortalité de ces trois souches se rapproche des mortalités élevées observées pour les souches plus sensibles (bAdhⁿ⁴ et yvf mal^{bz}).

Toutes ces différences entre les génotypes peuvent être expliquées, en partie du moins, par la présence d'une ADH assez active chez les trois génotypes les plus résistants et par des déficiences enzymatiques pour les deux autres souches.

INTERACTION SOUCHE - PRECONDITIONNEMENT (figure 34 : 1 - 2 - 3 - 4)

En 1, nous avons représenté la mortalité moyenne des mouches en fonction du préconditionnement. Les mortalités moyennes représentent des valeurs calculées globalement pour toutes les souches et pour toutes les concentrations en aldéhyde acétique et en éthanol.

Nous voyons que le préconditionnement n'a pas le même effet sur toutes les souches. En fait, ce préconditionnement entraînerait une dénaturation enzymatique partielle qui serait ressentie différemment suivant la souche. Il paraît normal à première vue que la souche bAdhⁿ⁴ soit moins affectée par ces prétraitements que les autres souches puisqu'elle ne possède pas d'ADH ni d'ALDOX. On remarque aussi que les traitements au "chaud" et au "froid" ont plus ou moins la même incidence sur l'augmentation de mortalité par rapport aux mouches témoins non traitées.

Nous avons également représenté l'effet du préconditionnement quand la concentration en éthanol est fixée à 0 % (en 2) et quand la concentration en aldéhyde acétique est fixée à 0 % (en 3). Si l'on compare les deux graphiques, on remarque que l'effet du préconditionnement est plus marqué en présence d'aldéhyde acétique qu'en présence d'éthanol.

L'effet du préconditionnement quand les concentrations en aldéhyde acétique et en éthanol sont nulles est représenté en 4. Cette représentation graphique n'apporte pas de renseignement supplémentaire.

NOS RESULTATS :

L'adaptation de Drosophila melanogaster à des milieux alcoolisés est considérée comme un "modèle" d'intérêt général pour l'étude de l'adaptation évolutive (Clarke, 1975; David, 1978; McDonald et Ayala, 1979). Notre travail se situe dans le cadre de cette étude.

Nous nous étions proposé d'expliquer, pour quelques souches et lignées de D. melanogaster, leurs différences de tolérance à l'éthanol et à l'aldéhyde acétique par les différences de niveaux d'activité des principales enzymes intervenant dans le métabolisme de l'éthanol que présentent également ces lignées et ces souches.

Les dosages enzymatiques effectués sur des homogénats globaux obtenus à partir de mouches de ces divers génotypes nous ont montré que les mouches les plus résistantes ont un niveau élevé d'activité de la déshydrogénase alcoolique (ADH) et possèdent aussi de l'oxydase aldéhydique (AO). Par contre, les moins résistantes manquent de déshydrogénase alcoolique (ADH), et les plus sensibles de toutes sont également dépourvues d'oxydase aldéhydique (AO).

Ces observations se basaient sur des dosages effectués à partir d'homogénats non fractionnés. Nous espérons obtenir plus de renseignements encore en procédant à des dosages enzymatiques portant sur les diverses fractions obtenues par centrifugation différentielle. Cette méthode nous a permis de comparer la distribution des principales enzymes de référence chez le rat et chez la Drosophile. Elle nous a aussi permis de prouver la présence de déshydrogénase aldéhydique (ALDH) chez tous les génotypes étudiés, ce qui n'avait pu être fait sur des homogénats non fractionnés. Cette enzyme est bien connue comme effectuant la transformation de l'aldéhyde acétique en acétate chez la plupart des espèces animales. On croyait cependant, jusqu'à une époque toute récente,

qu'elle était totalement absente chez les Insectes. Nous avons pu la mettre en évidence chez toutes les souches et lignées de D. melanogaster que nous étudions et la localiser dans les fractions M et S; nous savions du reste déjà, en commençant, que la présence de la déshydrogénase aldéhydique avait été démontrée chez la souche bAdhⁿ⁴, - qui est "ADH-null" et "AO-null" (Libion-Mannaert et al. 1983) -, et chez la souche mal^{bz}, - qui est "AO-null" mais qui possède de l'ADH (Garcin et al., 1983).

Nous pensons que l'ALDH ne joue pas, normalement, un rôle capital dans la tolérance aux milieux alcoolisés. L'importance de l'ADH est bien plus évidente dans l'adaptation à ces milieux.

Mais, nous croyons que l'ALDH prend une importance relative plus grande pour les mouches qui manquent d'ADH et d'AO, telles que celles de la souche bAdhⁿ⁴. Ces particularités enzymatiques expliquent sans doute le comportement étrange des adultes (qui préfèrent pondre sur des milieux plus alcoolisés) et des larves (qui sont attirées par des milieux enrichis en alcool ou même en aldéhyde acétique). On a suggéré que ce comportement paradoxal des larves "ADH-null" serait dû à ce qu'elles produiraient moins d'aldéhyde acétique parce qu'elles métaboliseraient moins d'éthanol et risqueraient donc moins l'empoisonnement par cette substance toxique lorsqu'elles se trouvent sur des milieux enrichis en éthanol (Gelfand et McDonald, 1980). Il est probable que le risque d'empoisonnement par l'aldéhyde acétique est aussi diminué par l'activité de l'ALDH, capable de détoxifier l'aldéhyde acétique en le transformant en acétate.

Une difficulté a surgi dans l'interprétation des résultats des centrifugations fractionnées concernant les lignées HA et LA. Les dosages portant sur des homogénats non fractionnés de mouches de ces lignées leur avaient fait attribuer une activité très élevée en ADH (supérieure même à celle de la souche wild e⁺). Au contraire, l'activité de l'ADH est apparue très faible dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle. La raison de cette discordance est évidente : pour une centrifugation fractionnée il faut au moins

500 mg de mouches (soit environ 500 mouches); cela suppose quelques générations de multiplication massive à partir des lignées "inbred" HA et LA. Nous avons espéré que l'acquisition par ces lignées HA et LA d'un haut degré d'activité de l'ADH serait irréversible, mais ce ne fut pas le cas; comme pour d'autres caractères physiologiques et morphologiques (Hougouto et al., 1980; Amosova et al., 1983) le relâchement de la pression sélective et de l' "inbreeding" a été la cause d'un retour rapide à la normale. Par contre, nos lignées "inbred" de stock ont gardé une activité d'ADH très élevée.

ORIENTATIONS EVENTUELLES DE TRAVAUX FUTURS :

Des difficultés techniques nous ont empêchés de compléter immédiatement nos études par des expériences sur les larves. Il est en effet bien plus malaisé d'obtenir, par broyage, un homogénat de larves qu'un homogénat de mouches (probablement à cause de la chitine présente en plus grande quantité chez les larves). Ces difficultés sont en cours de solution.

Nous espérons que ces travaux sur larves nous aideront notamment à mieux expliquer le comportement paradoxal des individus de la souche bAdhⁿ⁴, qui sont attirés par l'éthanol et par l'aldéhyde acétique alors qu'ils ne possèdent ni ADH, ni AO.

Dès à présent, on étudie sur le rat la distribution subcellulaire des principales enzymes intervenant dans le métabolisme de l'éthanol (ADH, ALDH, Catalase, AO). Il conviendrait d'étudier aussi la répartition de déshydrogénase octanolique (ODH) chez la Drosophile, - on sait que cette enzyme est présente chez la souche bAdhⁿ⁴ (résultats non publiés) -, et chez le rat si elle est présente. Nous souhaiterions aussi étudier la répartition du "système microsomal d'oxydation de l'éthanol" (MEOS) qui existe chez les Mammifères et que nous ne désespérons pas de mettre en évidence chez la Drosophile (comme nous avons mis en évidence la présence d'ALDH, qu'on croyait aussi ne pas exister chez les Insectes).

Ces comparaisons avec le rat nous montrent que les voies du métabolisme de l'éthanol chez la Drosophile et chez les Mammifères diffèrent bien moins qu'on le croyait. On comprend pourquoi les spécialistes de la pharmacogénétique de l'alcoolisme commencent à s'orienter vers le "modèle Drosophile" pour leurs recherches tandis qu'ils ont tendance à abandonner le "modèle Rongeurs", si populaire jusqu'à présent. Il est plus lent et plus coûteux de faire sur les Rongeurs des études portant sur plusieurs générations; l'utilisation de Drosophiles permet d'obtenir une réponse bien plus rapide. Depuis que ses voies métaboliques sont mieux connues, la Drosophile apparaît comme "one of the best animal models for the study of the pharmacology of ethanol", ainsi que l'écrivait récemment F. Garcin (communication personnelle) qui dirige au Canada une "Unit for Research on Alcohol and Drug abuse". La "petite mouche des vendanges" n'a donc pas fini de rendre service à l'humanité !

B I B L I O G R A P H I E

AMOSOVA I.S., BUGAEVA E.A., KAIDANOV L.Z. (1983). Tolérance au choc thermique de diverses lignées de Drosophila melanogaster obtenues par une sélection concernant divers caractères intéressant l'adaptation évolutive (russe). Citologija i Genetika (Kiev) 1983, n° 5 : 49-54.

AYALA F.J., McDONALD J.F. (1980). Continuous variation : possible role of regulatory genes. Genetics 52/53 : 1-15.

BAUDHUIN P., BEAUFAY H., RAHMAN-LI Y., SELLINGER O.Z., WATTIAUX R., JACQUES P., de DUVE C. (1964). Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissues. Biochem. J. 92 : 179-184.

BEAUFAY H., AMAR-COSTESECC A., FEYTMANS E., THINES-SEMPOUX D., WIBO M., ROBBI M., BERTHET J. (1974). Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. J. Cell. Biol. 61 : 188-200.

BIRLEY A.J., BARNES B.W. (1973). Genetical variation for enzyme activity in a population of Drosophila melanogaster. I. Extent of the variation for alcohol dehydrogenase activity. Heredity 31 : 413-416.

BROWN M.B., DIXON W.J. (1979). Biomedical computer programs. Univ. Calif. Press. London.

CLARKE B. (1970) . Darwinian evolution of proteins. Science 168 : 1009-1011.

CLARKE B. (1975). The contribution of ecological genetics to evolutionary theory : detecting the direct effects of natural selection on particular polymorphic loci. Genetics 79 : 101-103.

COURTRIGHT J.B. (1967). Polygenic control of aldehyde oxidase in Drosophila. Genetics 57 : 25-39.

CROW K.E., KITSON T.M., Mac GIBBON A.K.H., BATT R.D. (1974). Intracellular localization and properties of aldehyde dehydrogenases from sheep liver. Biochim. Biophys. Acta 350 : 121-128.

DAVID J. (1959). Etude quantitative du développement de la *Drosophila* élevée en milieu axénique. Bull. Biol. Fr. Belg. 93 : 472.

DAVID J.R. (1977). Signification d'un polymorphisme enzymatique : la déshydrogénase alcoolique chez *Drosophila melanogaster*. Ann. Biol. 16 : 451-472.

DAVID J.R. (1978). Du génotype au phénotype. La Recherche 9, n° 89 : 482-483.

DAVID J.R. (1979). Attractive behavior toward constructions help to explain the domestic and cosmopolitan status of some drosophilids. Experientia 35 : 1436-1437.

DAVID J., BOCQUET C. (1974). L'adaptation génétique à l'éthanol : un paramètre important dans l'évolution des races géographiques de *Drosophila melanogaster*. C.R. Acad. Sci. Paris 279 : 1385.

DAVID J., BOCQUET C. (1975). Similarities and differences in the latitudinal adaptation of two *Drosophila* sibling species. Nature 257 : 588-590.

DAVID J., BOCQUET C. (1976). Compared toxicities of different alcohols for two *Drosophila* sibling species, *D. melanogaster* and *D. simulans*. Comp. Physiol. Biochem. 54 C : 71.

DAVID J.R., BOCQUET C. (1977). Genetic tolerance to ethanol in *Drosophila melanogaster* : increase by selection and analysis of correlated responses. Genetica 47, 1 : 43-48.

DAVID J., BOCQUET., ARENS M.F., FOUILLET P. (1976). Biological role of alcohol dehydrogenase in the tolerance of *Drosophila melanogaster* to aliphatic alcohols : utilization of an ADH-null mutant. Biochem. Genet. 14 : 989-997.

DAVID J., BOCQUET C., VAN HERREWEGE J., FOUILLET P., ARENS M.F. (1978). Alcohol metabolism in *D. Melanogaster* : uselessness of the most active aldehyde oxidase produced by the aldox locus. Biochem. Genet. 16 : 203-211.

DAVID J.R., DALY K., VAN HERREWEGE J. (1984). Acetaldehyde utilization and toxicity in Drosophila adults lacking alcohol dehydrogenase or aldehyde oxidase. (communication personnelle).

DAVID J., FOUILLET P., ARENS M.F. (1974). Comparaison de la sensibilité à l'alcool éthylique de six espèces de Drosophila du sous-groupe melanogaster. Archs Zool. exp. gén. 115 : 401-410.

DAY T.H., HILLIER P.C., CLARKE B. (1974a). Properties of genetically polymorphic isozymes of alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster. Biochem. Genet. 11 : 141-153.

DAY T.H., HILLIER P.C., CLARKE B. (1974b). The relative quantities and catalytic activities of enzymes produced by alleles of the alcohol dehydrogenase locus in Drosophila melanogaster. Biochem. Genet. 11 : 155-165.

de DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R., APPELMANS F. (1955) Tissue fractionation studies. - 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissues. Biochem. J. 60 : 604-617.

DELTOMBE-LIETAERT M.C., DELCOUR J., LENELLE-MONFORT N., ELENS A. (1979). Ethanol metabolism in Drosophila melanogaster. Experientia 35 : 579-581.

DELTOMBE-LIETAERT M.C., LIBION-MANNAERT M., ELENS A. (1974). Ebony gene and selective value of ADH isozyme alleles. Dros. Inf. Serv. 51 : 132-133.

DEPIEREUX E., HOUGOUTO N., LECHIEN J., LIBION-MANNAERT M., LIETAERT M.C., FEYTMANS E., ELENS A. (1984). Larval behavioral response to environmental ethanol in relation with the alcohol dehydrogenase level in Drosophila melanogaster. (communication personnelle).

DICKINSON W.J. (1970). The genetics of aldehyde oxidase in Drosophila melanogaster. Genetics 66 : 487-496.

DICKINSON W.J. (1971). Aldehyde oxidase in Drosophila melanogaster : a system for genetic studies on developmental regulation. Devel. Biol. 26 : 77-86.

- DICKINSON W.J., SULLIVAN D.T. (1975). Gene-enzymes systems in Drosophila. Springer, Heidelberg, New-York. p. 53.
- DOANE W.W., TREAT CLEMONS L.G. (1982). Biochemical loci of the "fruit fly" (Drosophila melanogaster). Dros. Inf. Serv. 58 : 41-42.
- ECKFELDT J.H., MOPE L., TAKIO K., YONETANI T. (1976). Horse liver aldehyde dehydrogenase: purification and characterization of two isozymes. J. Biol. Chem. 251 : 236-240.
- ECKFELDT J.H., YONETANI T. (1976). Subcellular localization of the F1 and F2 isozymes of horse liver aldehyde dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 175 : 712-722.
- ELENS A. (1957). Importance sélective des différences d'activité entre mâles ebony et sauvage dans les populations artificielles de Drosophila melanogaster. Experientia Vol. XIII/7 : 293.
- ELENS A. (1958). Le rôle de l'hétérosis dans la compétition entre ebony et son allèle normal. Experientia vol. XIV/8 : 274.
- GARCIN F., COTE J., RADOUCO-THOMAS S., KASIENSZUK D., CHAWLA S., RADOUCO-THOMAS C. (1983 a). Acetaldehyde oxidation in Drosophila melanogaster and Drosophila simulans : evidence for the presence of an NAD⁺ dependent dehydrogenase. Comp. Biochem. Physiol. 75 B : 205-210.
- GARCIN F., COTE J., RADOUCO-THOMAS R., CHAWLA S., RADOUCO-THOMAS C. (1983 b). Drosophila ethanol metabolizing system. Acetaldehyde oxidation in ALDOX-null mutants. Experientia 39 : 1122-1123.
- GELFAND L.J., McDONALD J.F. (1980). Relationship between ADH activity and behavioral response to environmental alcohol in Drosophila. Behav. Genet. 10 : 237-249.
- GELFAND L.J., McDONALD J.F. (1983). Relationship between alcohol dehydrogenase (ADH) activity and behavioral response to environmental alcohol in five Drosophila species. Behav. Genet. 13 : 281-293.
- GIBSON J.B. (1970). Enzyme flexibility in Drosophila melanogaster. Nature 227 : 959-960.

GIBSON J.B., LEWIS N., ADENA M.A., WILSON S.R. (1979). Selection for ethanol tolerance in two populations of Drosophila melanogaster segregating alcohol dehydrogenase allozymes. Austr. J. Biol. Sci. 32 : 387-398.

GRELL E.H., JACOBSON K.B., MURPHY J.B. (1965). Alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster : Isozymes and genetic variants . Science 149 : 80

HARADA S., MISAWA S., AGARWAL D.P., GOEDDE H.W. (1980). Liver alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in the Japanese : isozyme variation and its possible role in alcohol intoxication. Am. J. Hum. Genet. 32 : 8-15.

HARADA S., AGARWAL D.P., GOEDDE H.W. (1979). Isozyme variations in acetaldehyde dehydrogenase in human tissues. Hum. Genet. 44 : 181-185.

HEINSTRA P.W.H., EISSES K.TH., SCHOONEN W.G.E.J., ABEN W., de WINTER A.J., van der HORST D.J., van MARREWIJK W.J.A., BEENAKKERS A.M.Th., SCHARLOO W., THORIG G.E.W. (1983). A dual function of alcohol dehydrogenase in Drosophila. Genetics 60 : 129-137.

L'HERITIER Ph., TEISSIER G. (1937). Elimination des formes mutantes dans les populations de Drosophiles. Cas des Drosophiles "ebony". C.R.Ac. Sc. Ser. Biol. Paris 124 : 882-884.

HOUGOUTO N., GLOTOV N.V., KAIDANOV L.Z. (1980). Sélection pour augmenter le nombre des soies abdominales dans les lignées LA et HA de Drosophila melanogaster. Genetika (russe) 16 : 1228-1233.

HOUGOUTO N., LECHIEN J., LIBION-MANNAERT M., DEPIEREUX E., LIETAERT M.C., FEYTMANS E., ELENS A. (1984). Relations entre l'activité de la déshydrogénase alcoolique et le comportement de Drosophila melanogaster. (communication personnelle).

HOUGOUTO N., LIBION-MANNAERT M., LIETAERT M.C., ELENS A. (1981). Phototactism, oviposition preference and ADH activity level in four strains of D. Melanogaster. Abstr. 7th Eur. Drosoph. Res. Conf. Oulu Finland.

HOUGOUTO N., LIETAERT M.C., LIBION-MANNAERT M., FEYTMANS E., ELENS A. (1982). Oviposition-site preference and ADH activity in Drosophila melanogaster. Genetica 58 : 121-128.

JOHNSON M.S., POWELL A. (1974). The alcohol dehydrogenases of Drosophila melanogaster frequency changes associated with heat and cold shock. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71.

KAIDANOV L.Z. (1980). The analysis of genetic consequences of selection and inbreeding in Drosophila melanogaster. Genetica 52/53 : 165-181.

KAIDANOV L.Z., ANISIMOVA L.F., LITVINOVA E.M. (1972). Etude génétique de l'activité sexuelle de D. melanogaster. III. Analyse de lignées différant pour l'activité sexuelle des mâles. Genetika (russe) 8, n° 9 : 75-83.

KAIDANOV L.Z., HOUGOUTO N., IOVLEVA O.V. (1983). Concentration of mutations differentiated according to the influence on viability, in selected inbred lines of Drosophila melanogaster. Genetika (russe) 19, n°9 : 1451-1456.

KAIDANOV L.Z., KUKSINSKAJA T.S., MEKSINA N.S. (1969). Recherches sur l'hérédité du comportement sexuel chez Drosophila melanogaster. I. Sélection et analyse génétique de lignées qui diffèrent par leur activité sexuelle. Genetika (russe) 5 : 116-123.

KAMPING A. , VAN DELDEN W. (1978). Alcohol dehydrogenase polymorphism in populations of Drosophila melanogaster. II. Relation between ADH activity and adult mortality. Biochem. Genet. 16 : 541-551.

KIMURA M. , OHTA T. (1971). Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. Nature, 229 : 467-469.

KING S., ROCKWELL R.F., GROSSFIELD J. (1976). Oviposition response to ethanol in Drosophila melanogaster and Drosophila simulans. Genetics 83 : S. 39.

LIBION-MANNAERT M. , DELCOUR J., DELTOMBE-LIETAERT M.C., LENELLE-MONFORT N., ELENS A. (1976). Ethanol as a "food" for Drosophila melanogaster : influence of the ebony gene. Experientia 32 : 22-23.

- LIBION-MANNAERT M., DELTOMBE-LIETAERT M.C., ELENS A. (1974 a). Ethanol utilization in a polymorphic ebony e¹¹ strain. Dros. Inf. Serv. 51 : 28-29.
- LIBION-MANNAERT M., DELTOMBE-LIETAERT M.C., ELENS A. (1974 b). Ageing and ADH activity in a polymorphic mutant ebony of D. melanogaster. Abstr. 4th Eur. Drosoph. Res. Conf. Umeå, Sweden.
- LIBION-MANNAERT M., ELENS A. (1972). Ageing in D. Melanogaster ebony, white and wild : alcohol dehydrogenase and other enzyme activity changes. Dros. Inf. Serv. 49 : 77
- LIBION-MANNAERT M., LIETAERT M.C., ELENS A. (1983). Subcellular fractionation and enzymatic activity in Drosophila melanogaster. Abs. Int. Conf. Biochem. and Development Genetics, Island of Kos, Greece.
- LIETAERT M.C., LIBION-MANNAERT M., ELENS A. (1981). Acetaldehyde metabolism in Drosophila melanogaster. Experientia 37 : 689.
- LIETAERT M.C., LIBION-MANNAERT M., HOUGOUTO N., ELENS A. (1982). How can Drosophila flies without aldehyde oxidase detoxify acetaldehyde ? Experientia 38 : 651-652.
- LIETAERT M.C., LIBION-MANNAERT M., WATTIAUX-DE CONINCK S., ELENS A. (1984). Drosophila melanogaster aldehyde dehydrogenase. Experientia (in press).
- LINDAHL R. (1981). Subcellular distribution and properties of rabbit liver aldehyde dehydrogenases. Biochem. Pharmacol. 30 : 441-446.
- LITTLE R.G., PETERSEN D.R. (1983). Subcellular distribution and kinetic parameters of HS mouse liver aldehyde dehydrogenase. Comp. Biochem. Physiol. 74 C : 271-279.
- LOCKE M., McMAHON J.T. (1971). The origin and rate of microbodies in the fat body of an insect. J. Cell. Biol. 48 : 61-78.
- LOWRY O.H., ROSEBROUG N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- LUNDQUIST F. (1974). Determination with aldehyde dehydrogenase, in: "Methods of enzymatic analysis", p. 1509-1513, by Bergmeyer H.U., Gawehn K., Eds. Academic Press, New-York.

- LUNDQUIST F., FUGMANN U., KLANING E., RASMUSSEN H. (1959). The metabolism of acetaldehyde in mammalian tissues : reactions in rat-liver suspensions under anaerobic conditions. Biochem. J. 72 : 409-419.
- LUNDQUIST F., FUGMANN U., RASMUSSEN H., SVENDSEN I. (1962). The metabolism of acetaldehyde in mammalian tissues. Reactions in rat-liver suspensions under aerobic conditions. Biochem. J. 84 : 281-286.
- MacGIBBON A.K.H., BUCKLEY P.D., BLACKWELL L.F. (1977 a). Evidence for two-step binding of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide to aldehyde dehydrogenase. Biochem. J. 165 : 455-462.
- MacGIBBON A.K.H., BLACKWELL L.F., BUCKLEY P.D. (1977 b). Pre-steady-state kinetic studies on cytoplasmic sheep liver aldehyde dehydrogenase. Biochem. J. 167 : 469-477.
- MacGIBBON A.K.H., BLACKWELL L.F., BUCKLEY P.D. (1978). Steady-state and pre-steady-state kinetic studies on mitochondrial sheep liver aldehyde dehydrogenase. Biochem. J. 171 : 527-531.
- MARJANEN L. (1972). Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. Biochem. J. 127 : 633-639.
- McDONALD J.F., AYALA F.J. (1978 a). Gene regulation in adaptive evolution. Can. J. Genet. Cytol. 20 : 159-175.
- McDONALD J.F., AYALA F.J. (1978 b). Genetic and biochemical basis of enzyme activity variation in natural populations. I. Alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster. Genetics 89 : 371-388.
- McKENZIE J.A. (1974). The distribution of vineyard populations of Drosophila melanogaster and Drosophila simulans during vintage and non-vintage periods. Oecologia 15 : 1-16.
- McKENZIE J.A., PARSONS P.A. (1972). Alcohol tolerance : an ecological parameter in the relative success of Drosophila melanogaster and Drosophila simulans. Oecologia 10 : 373-388.

McKENZIE J.A., PARSONS P.A. (1974). Microdifferentiation in a natural population of Drosophila melanogaster to alcohol in the environment. Genetics 77 : 384-394.

MOXON L.N., HOLMES R.S., PARSONS P.A. (1982). Comparative studies of aldehyde oxidase, alcohol dehydrogenase and aldehyde resource utilization among Australian Drosophila species. Comp. Biochem. Physiol. 71 B : 387-395.

OCHOA S. (1955). Malic dehydrogenase from pig heart, in: "Methods in enzymology", by Colowick S.P. and Kaplan N.O., Ed. Vol. 1 : 735-739 Academic Press, New-York.

PARSONS P.A., SPENCE G.E. (1981). Acetaldehyde : a low-concentration resource and larval attractant in three Drosophila species. Experientia 37 : 576-577.

PARSONS P.A., STANLEY S.M. (1981). Domesticated and widespread species, in: "The Genetics and Biology of Drosophila", p. 349-393, by Ashburner M., Carsons H.L., Thompson J.N. jr., Eds. Vol. 3a. Ass. Press. London.

PETTERSON H., TOTTMAR O. (1982). Aldehyde dehydrogenase in rat brain. Subcellular distribution and properties. J. Neurochem. 38, n°2 : 477-487.

PIETRUSZKO R., YONETANI T. (1981). Aldehyde dehydrogenase from liver, in : "Methods in enzymology", p. 772-781, by Colowick S.P. and Kaplan N.O. Eds. Vol. 71 - Academic Press, New-York.

PIPKIN S.B., HEWITT N.E. (1971). The influence of the X chromosome on specific activity of alcohol dehydrogenase of Drosophila. Dros. Inf. Serv. 46 : 66-67.

PIPKIN S.B., HEWITT N.E. (1972). Variation of alcohol dehydrogenase levels in Drosophila species hybrids. J. Heredity 63 : 267-270.

RICHMOND R.C., GERKING J.L. (1979). Oviposition site preference in Drosophila. Behav. Genet. 9 : 233-241.

- SAMPSELL B., SIMS S. (1982). Effect of Adh genotype and heat stress on alcohol tolerance in Drosophila melanogaster. Nature 296 : 853-855.
- SCHNAITMAN C., ERWIN V.G., GREENAWALT J.W. (1967). The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. J. cell. Biol. 32 : 719-735.
- SIEBER F., FOX D.J., URSPRUNG H. (1972). Properties of octanol dehydrogenase from Drosophila. FEBS Letters 26 : 274.
- SOFER W., HACKOFF M.A. (1972). Chemical selection of alcohol dehydrogenase negative mutants in Drosophila. Genetics 72 : 545-549.
- SOFER W., URSPRUNG H. (1968). Drosophila alcohol dehydrogenase Purification and partial characterization. J. Biol. Chem. 243 : 3110-3115.
- THATCHER D.R. (1980). The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes (Adhⁿ⁻¹¹, Adh^S and Adh^{uf}) from the fruitfly Drosophila melanogaster. Biochem. J. 187 : 875-886.
- TOTTMAR S.O.C., PETTERSON H., KIESSLING K.-H. (1973). The subcellular distribution and properties of aldehyde dehydrogenases in rat liver. Biochem. J. 135 : 577-586.
- URSPRUNG H., CARLING L. (1968). Drosophila alcohol dehydrogenase : in vitro changes of isozyme patterns. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151 : 456-475.
- URSPRUNG H., LEONE J. (1965). Alcohol dehydrogenase : a polymorphism in Drosophila melanogaster. J. exp. Zool. 160 : 147-154.
- VAES G. (1966). Subcellular localization of glycosidases in lysosomes, in: "Methods in enzymology", p. 509-514, by Colowick S.P. and Kaplan N.O. Eds. Vol. 8 , Academic Press. New-York.
- VAN DELDEN W., KAMPING A. (1980). The alcohol dehydrogenase polymorphism in populations of Drosophila melanogaster. IV. Survival at high temperature. Genetica 51, 3 : 179-185.
- VAN HERREWEGE J., DAVID J. (1974). Utilisation de l'alcool éthylique dans le métabolisme énergétique d'un insecte : influence sur la durée de survie des adultes de Drosophila melanogaster. C.R. Acad. Sc. Paris 279 D : 335-338.

VIGUE C.L., JOHNSON F.M. (1973). Isozyme variability in species of the genus *Drosophila* VI. Frequency-property-environment relationships of allelic alcohol dehydrogenases in *D. melanogaster*. Biochem. Genet. 9 : 213-227.

WALLACE S. (1974). Génétique des populations. Masson, Paris.

WARD R.D., HEBERT P.D.N. (1972). Variability of alcohol dehydrogenase activity in a natural population of *Drosophila melanogaster*. Nature New Biology 236 : 243-244.
