

Cribles génétiques

Identification de la base génétique et moléculaire des phénotypes de mutants induits

Virginie Orgogozo
Institut Jacques Monod, Paris
orgogozo@ijm.univ-paris-diderot.fr

Novembre 2010 – M1 génétique ENS

Qu'est-ce qu'un crible génétique ?

Une technique qui permet d'identifier les gènes impliqués dans un phénotype donné.

Elle consiste en 3 étapes :

1. production de nombreuses mutations
2. sélection des individus présentant un phénotype mutant
3. identification des gènes mutés responsables du phénotype mutant

Qu'est-ce qu'un crible génétique ?

Une technique qui permet d'identifier les gènes impliqués dans un phénotype donné.

Elle consiste en 3 étapes :

1. production de nombreuses mutations
2. sélection des individus présentant un phénotype mutant
3. identification des gènes mutés responsables du phénotype mutant

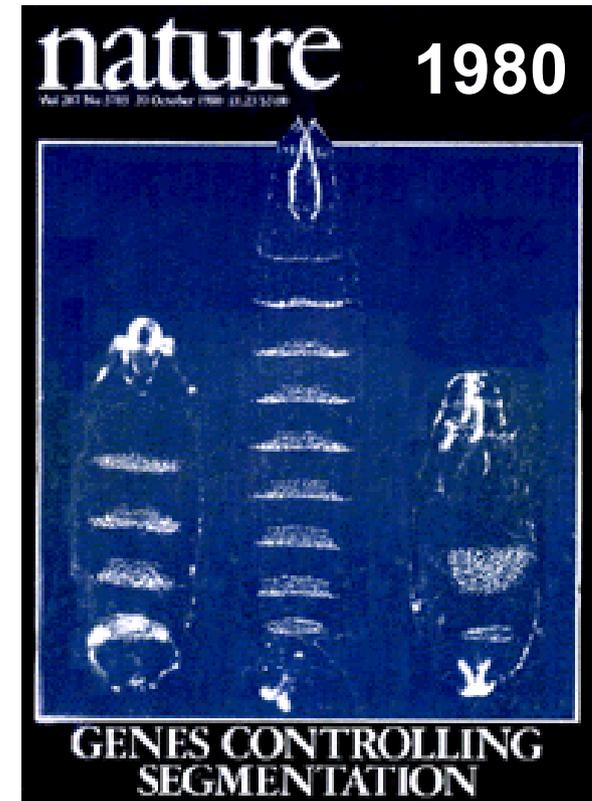
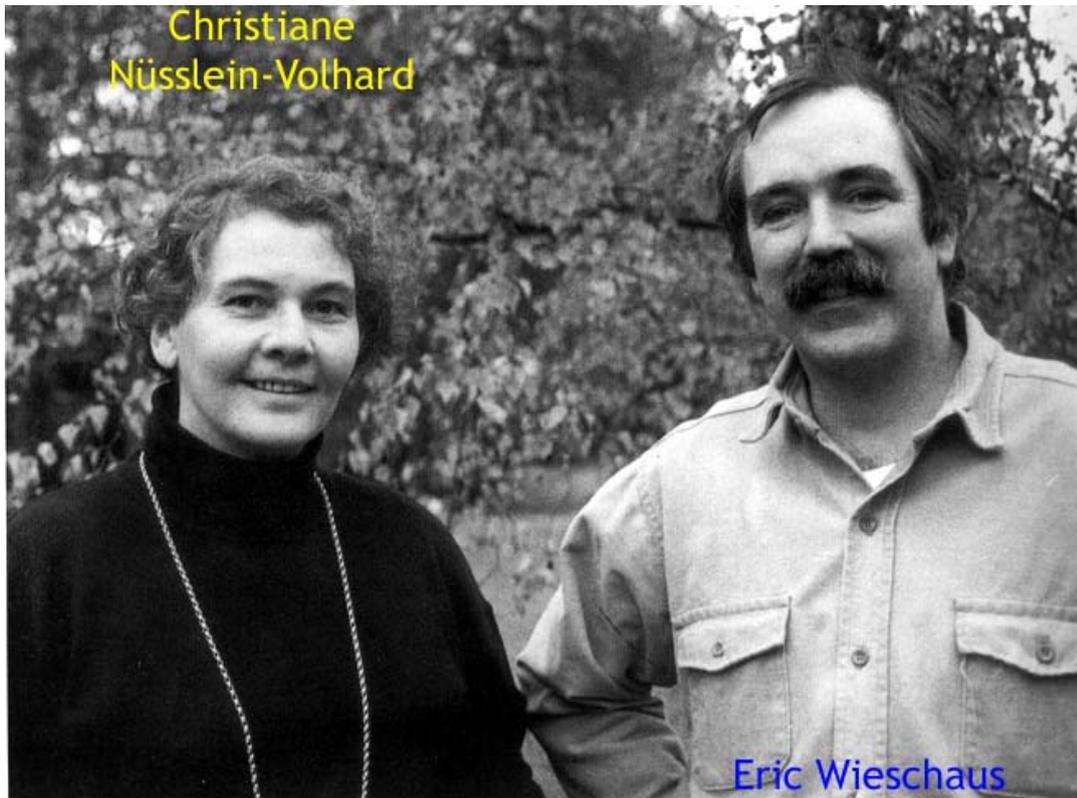
Crible historique de C. Nüsslein-Wolhard et E. Wieschaus

Principes généraux sur les cribles génétiques

D'autres types de cribles

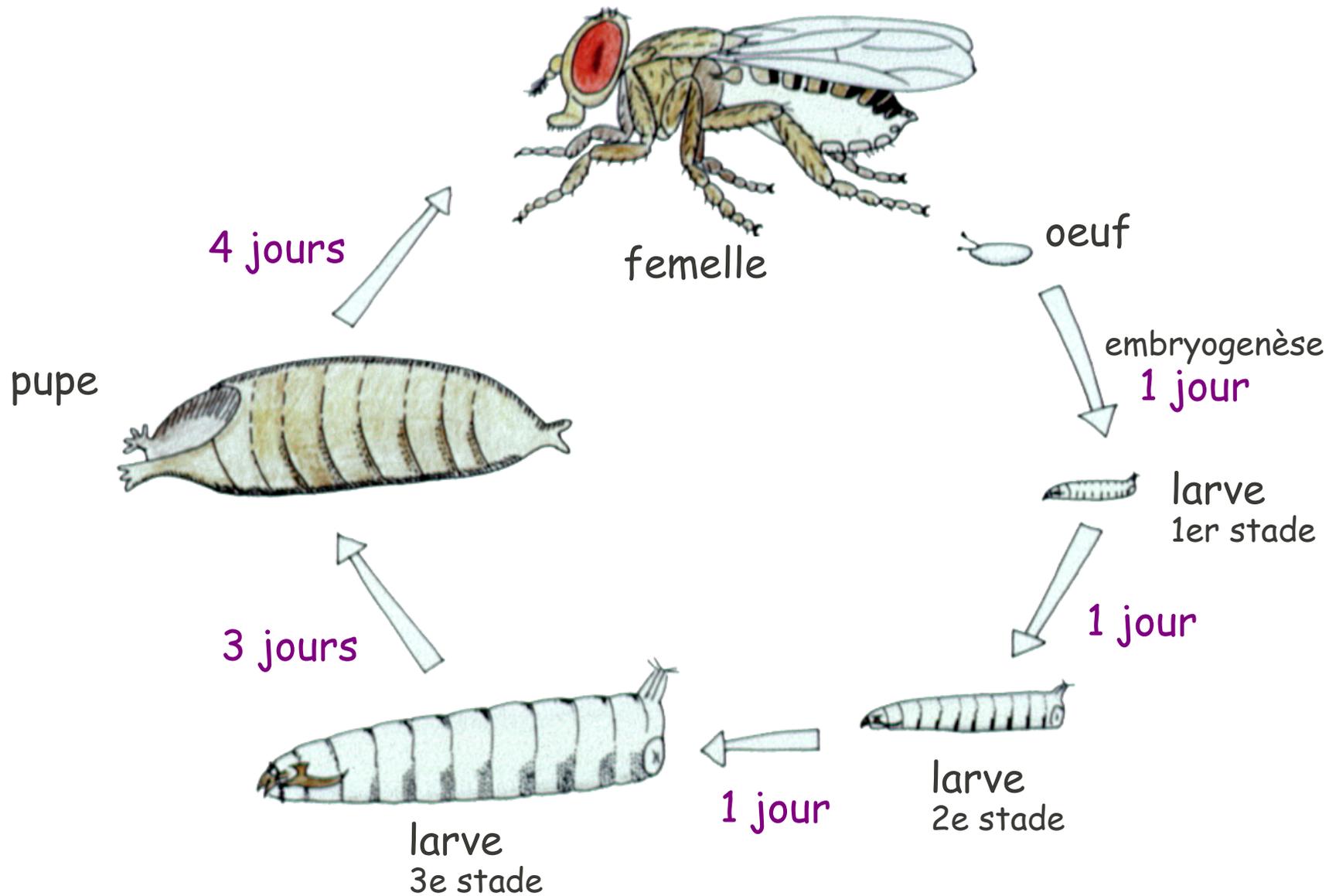
Quelques commentaires

Crible historique de C. Nüsslein-Wolhard et E. Wieschaus

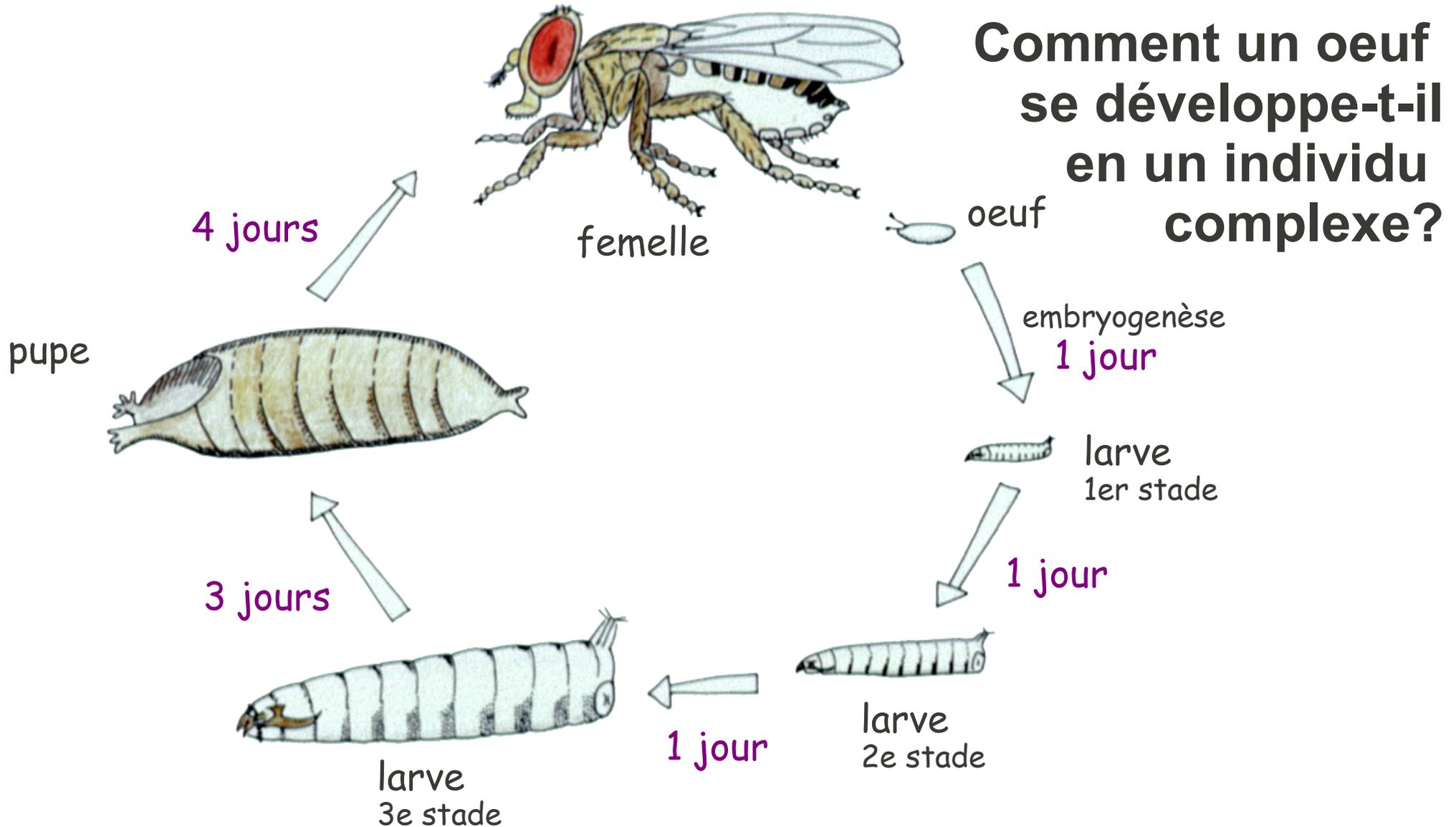


**Prix Nobel de Physiologie/médecine en 1995
avec E. Lewis**

Cycle de vie de la drosophile à 25°C



Cycle de vie de la drosophile à 25°C



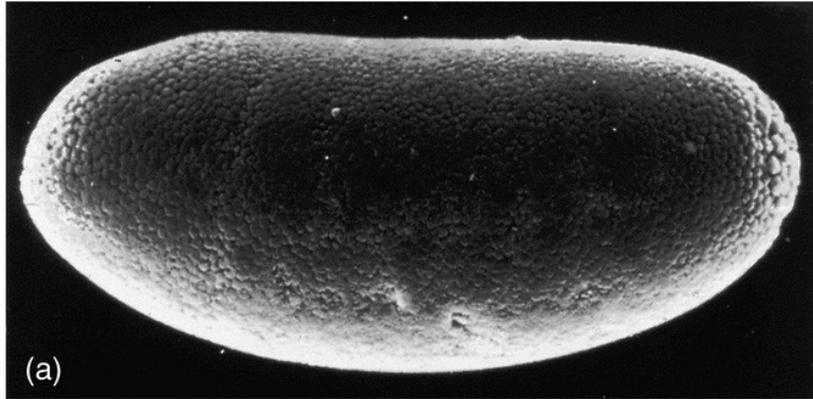
Comment un oeuf se développe-t-il en un individu complexe?



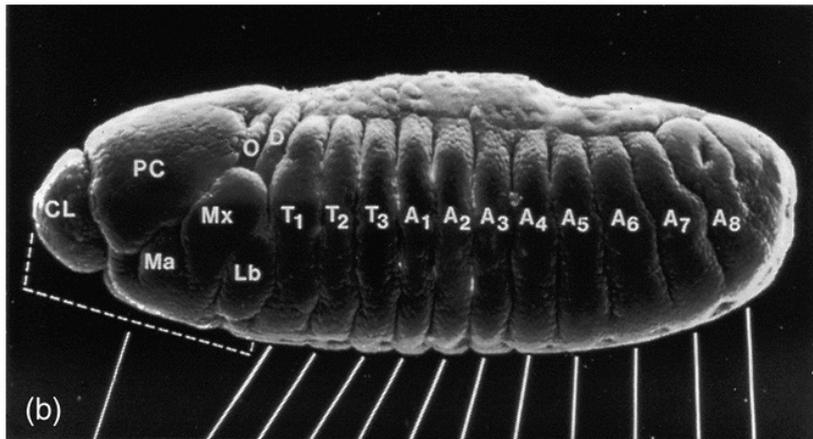
Embryon *His-YFP* visualisé par
SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy)
P. Tomancak, Dresden

Quels sont les gènes impliqués ?

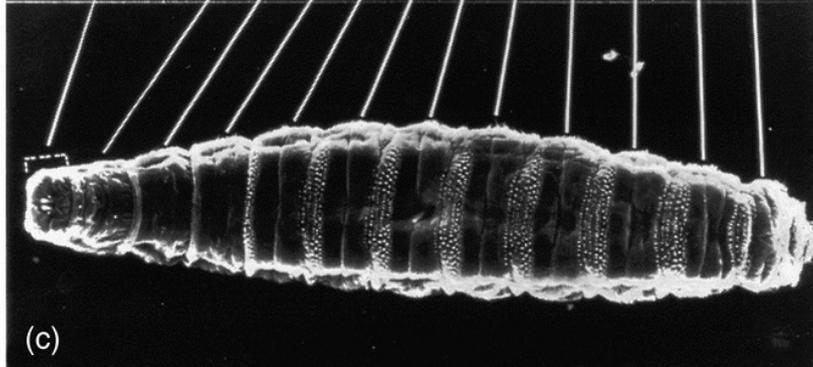
Stade blastoderme cellulaire
3 h



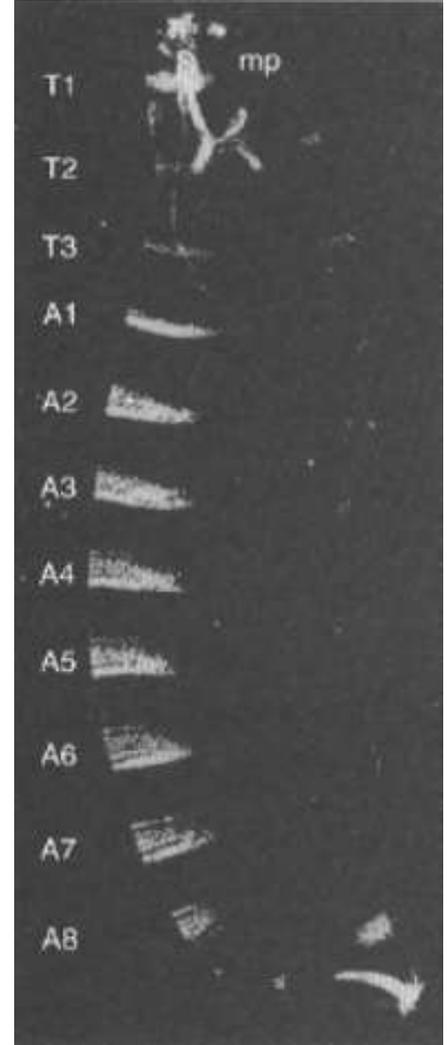
Embryon segmenté
10 h



Larve



Préparation d'une larve sauvage



sauvage

Recherche de
mutants qui affectent
le plan d'organisation
du corps

(=position /forme des
trichomes)

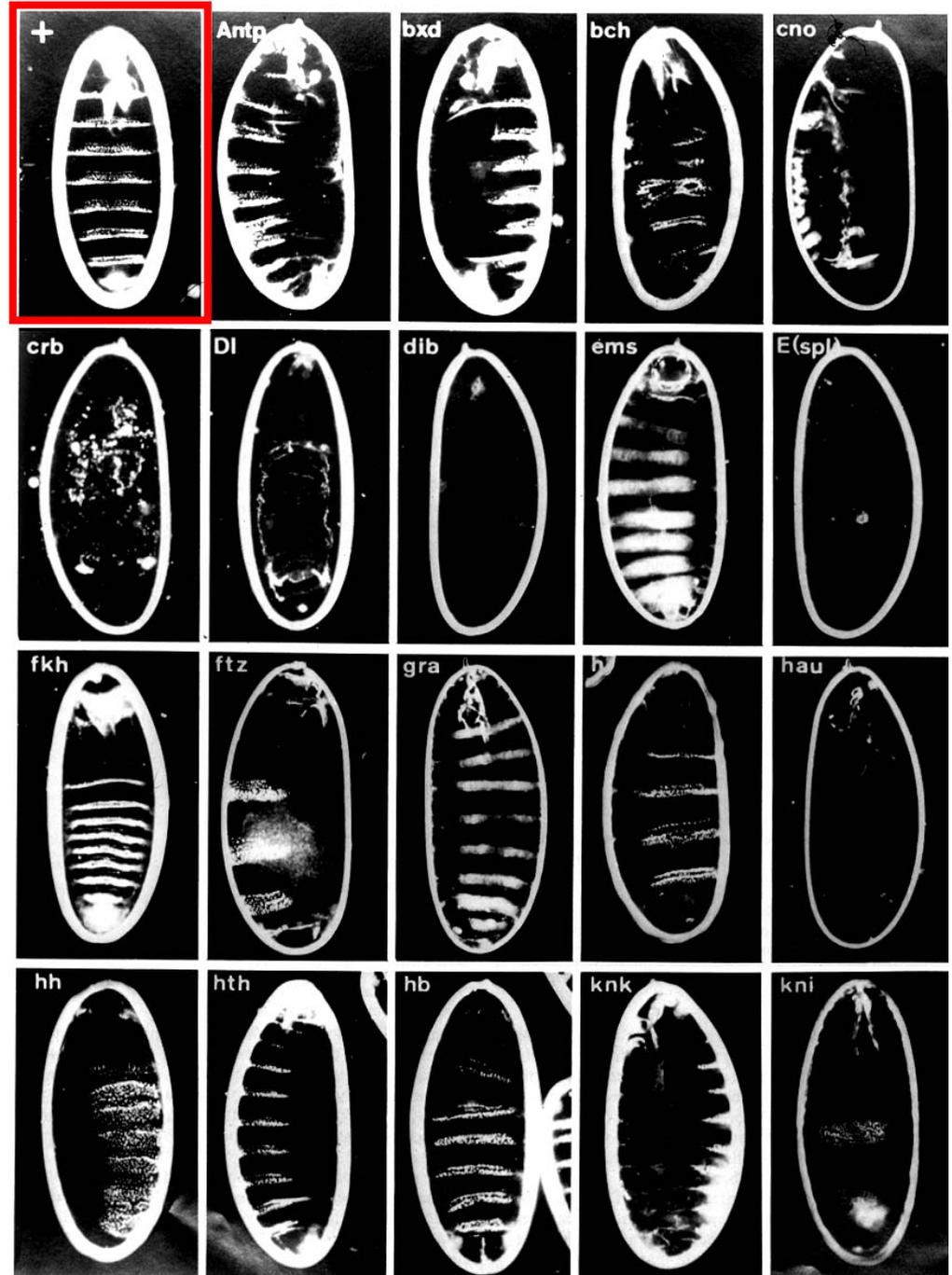
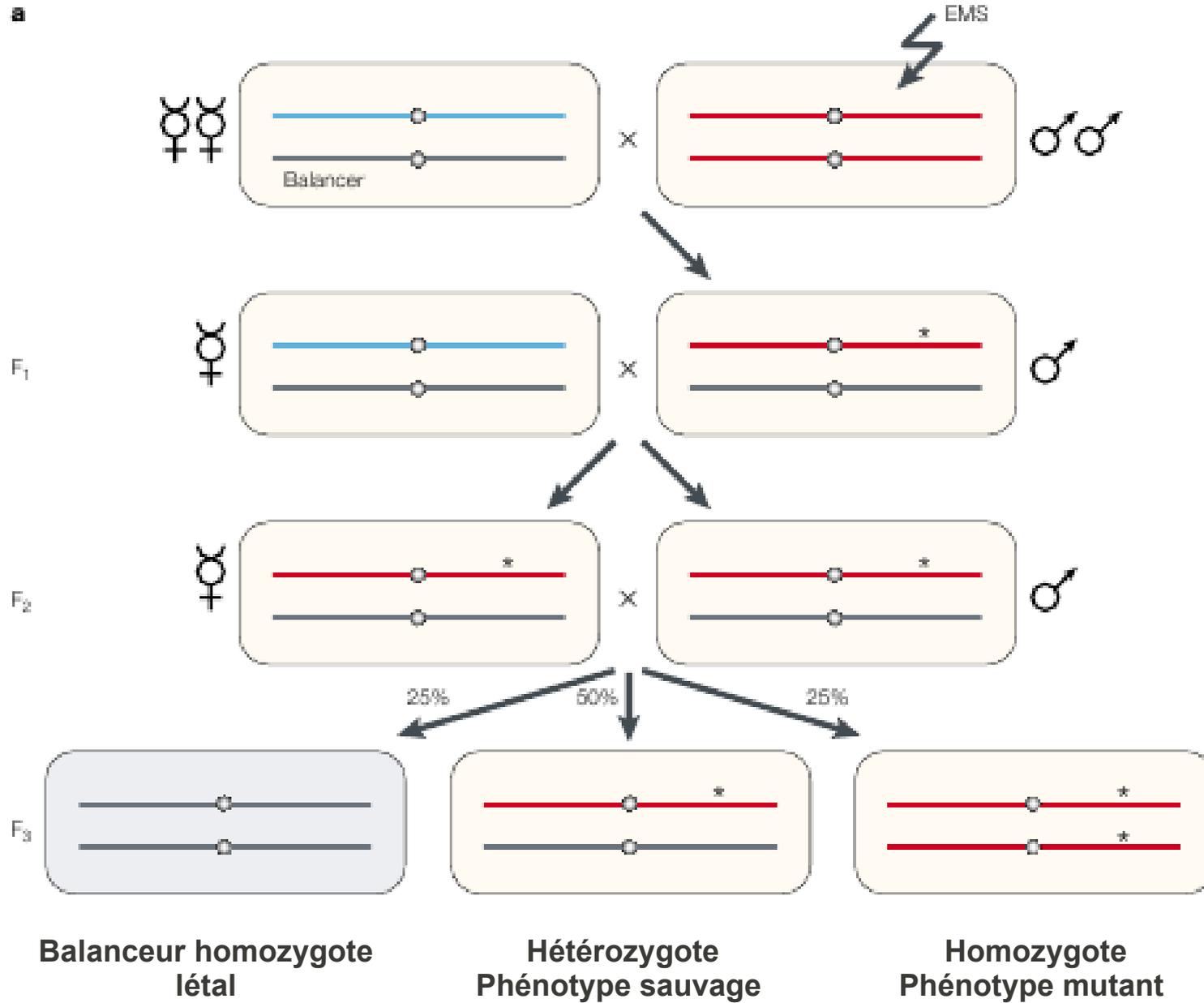


Schéma des croisements

a



Crible du chromosome 2

Production de 5.764 lignées de mouches
dont 4.217 lignées homozygotes létales

Identification de 7.600 mutations létales
dont 2.843 mutations causant une létalité embryonnaire
dont 272 mutations causant des phénotypes embryonnaires

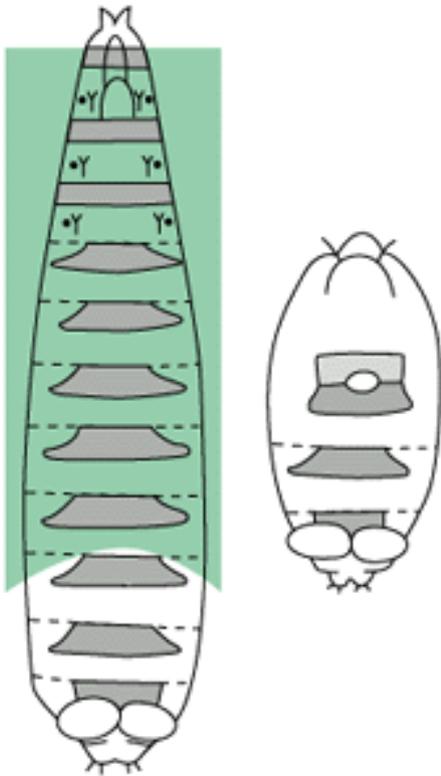
Test de complémentation pour les mutations donnant les mêmes phénotypes :

48 groupes de complémentation contenant en moyenne 5.4 allèles
13 allèles qui sont complétés par tous les autres mutants

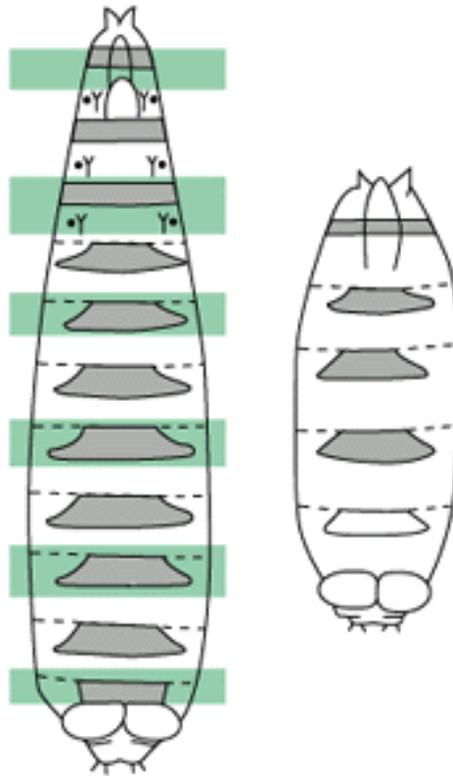
= 61 gènes au total

Résultat : identification de différents types de gènes

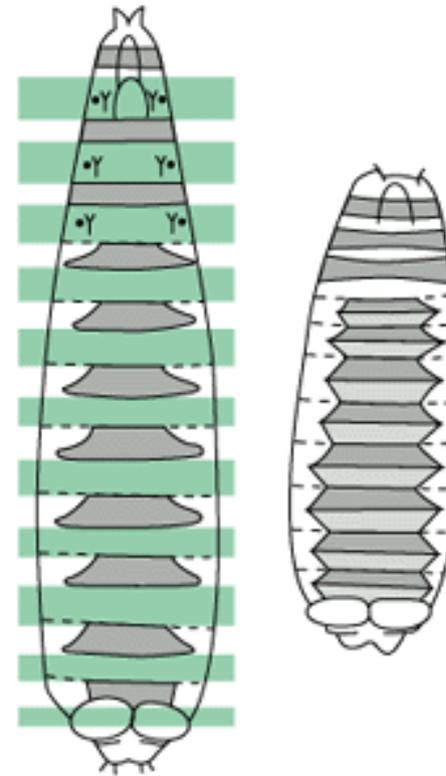
GAP GENE (*Krppel*)



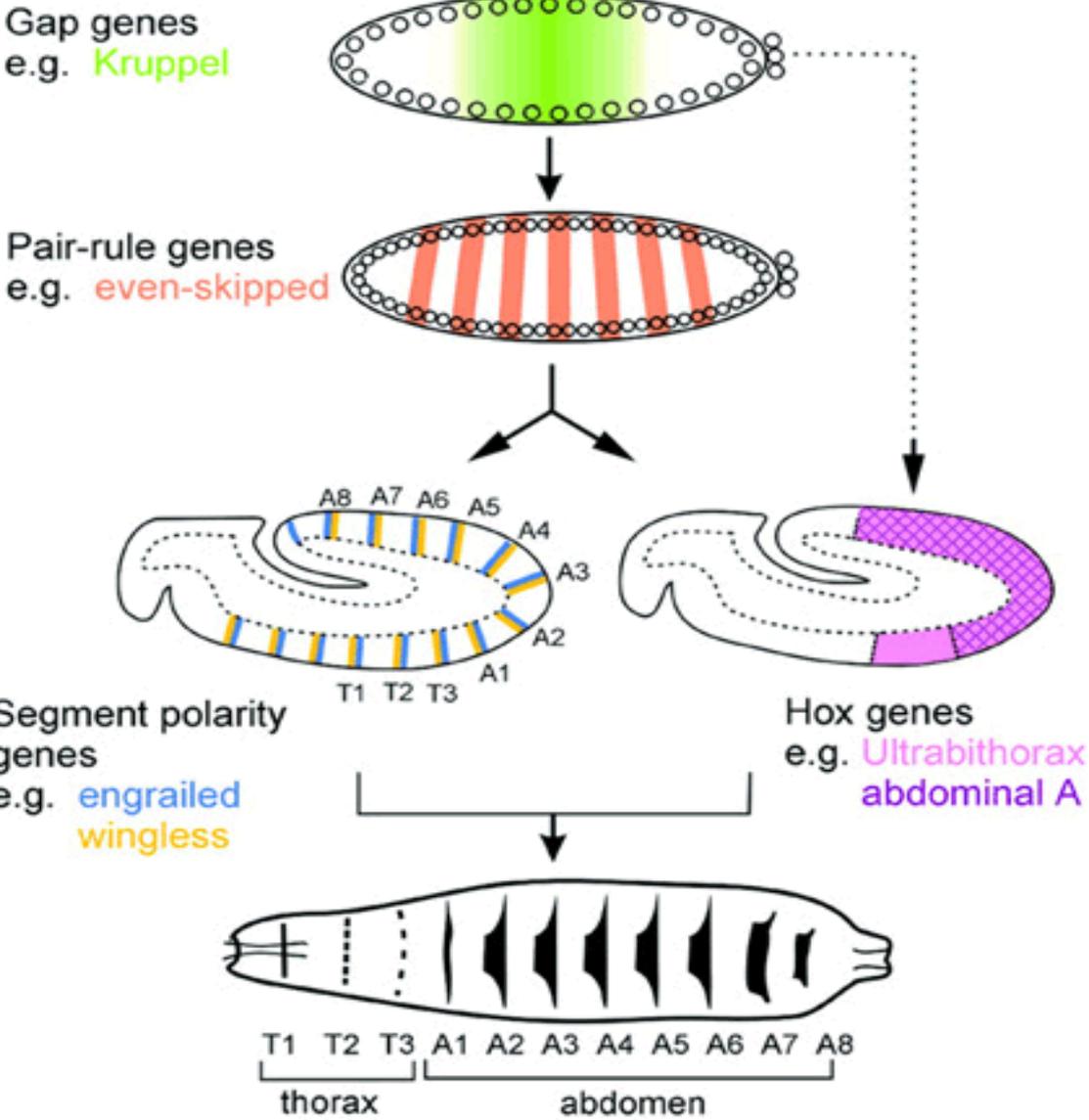
PAIR-RULE GENE (*even-skipped*)



SEGMENT-POLARITY GENE (*gooseberry*)



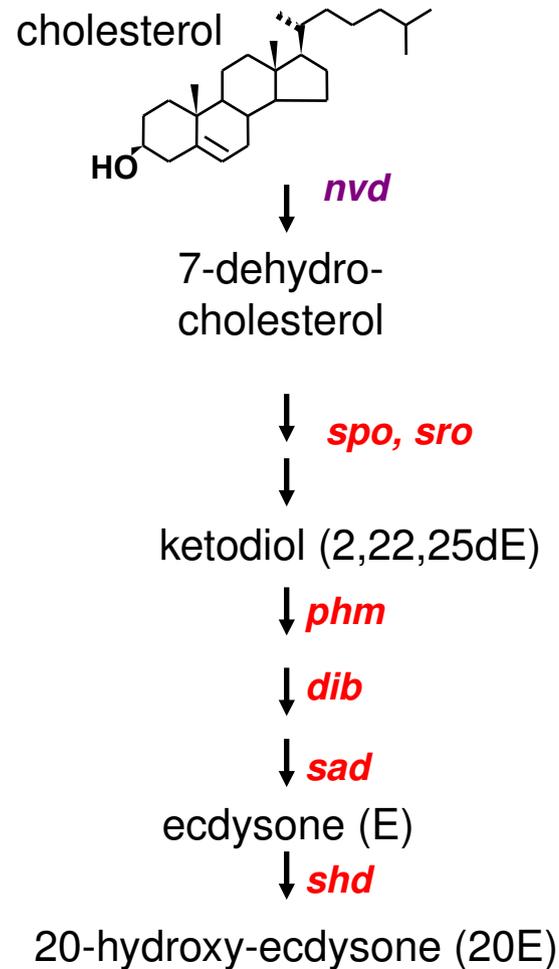
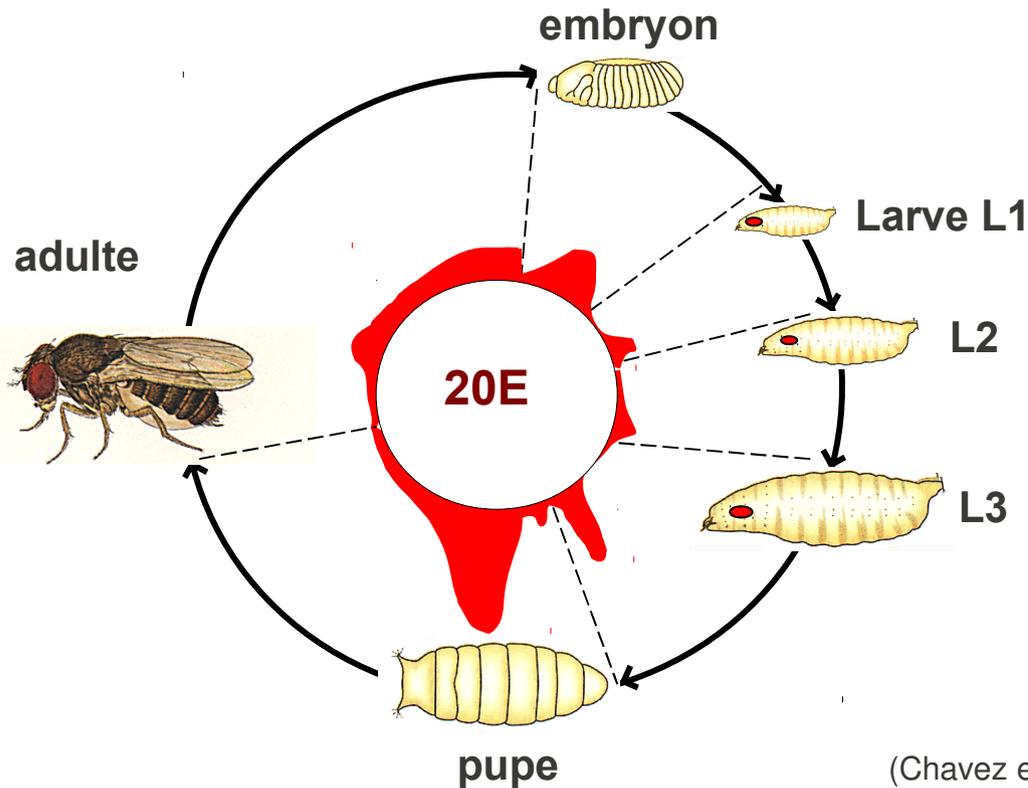
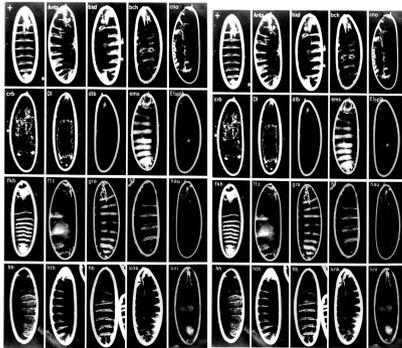
Reconstitution du développement embryonnaire



EMBO reports 2, 12, 1083–1088 (2001)

Récemment : identification des enzymes de la voie de biosynthèse des hormones stéroïdes

Mutants Halloween



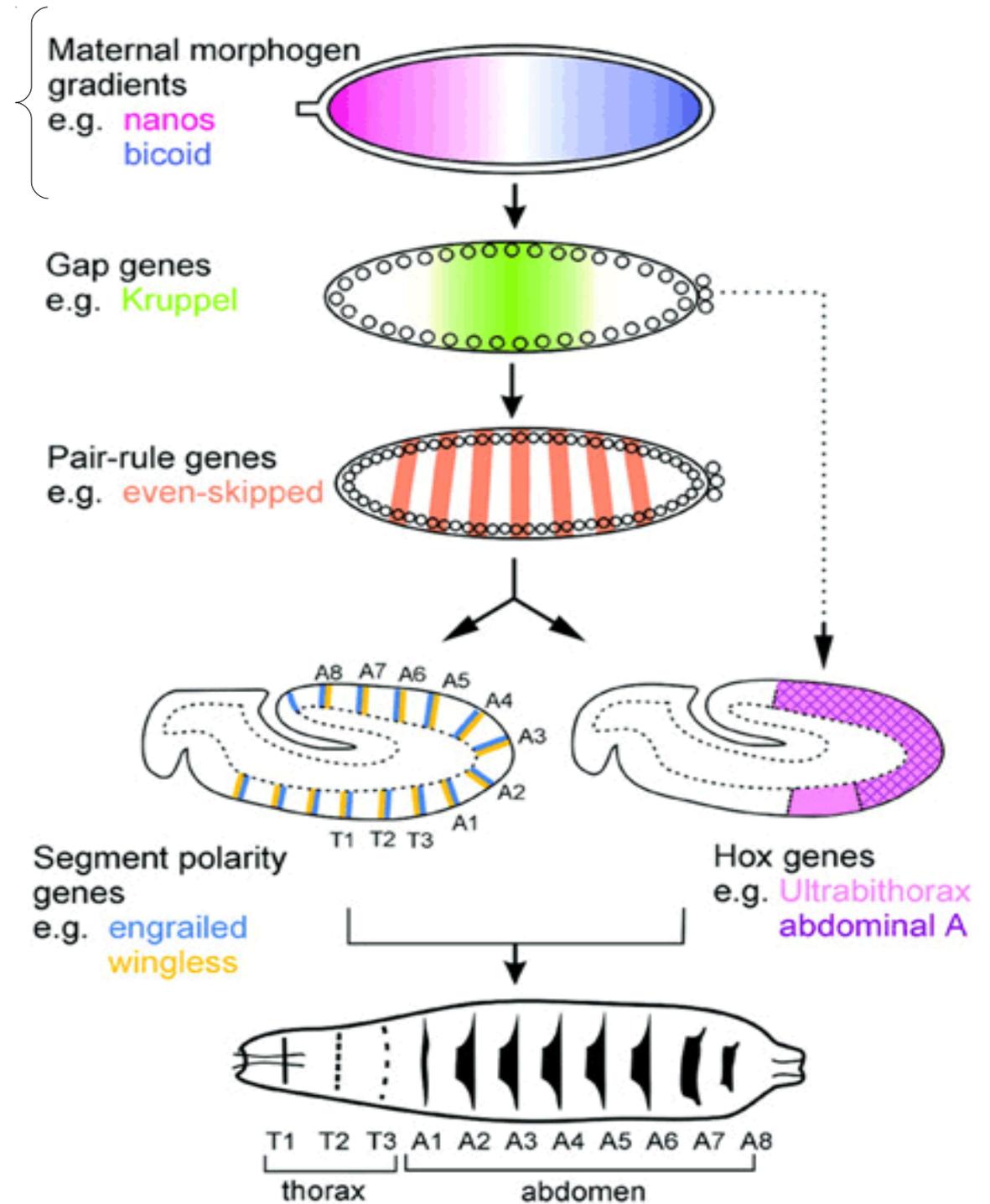
(Chavez et al., 2000; Warren et al., 2002; Petryk et al., 2003; Niwa et al., 2004; Warren et al., 2004; Namiki et al., 2005; Yoshiyama et al., 2006)

Certains gènes impliqués dans le développement embryonnaire n'ont pas été identifiés

Gènes à effet maternel

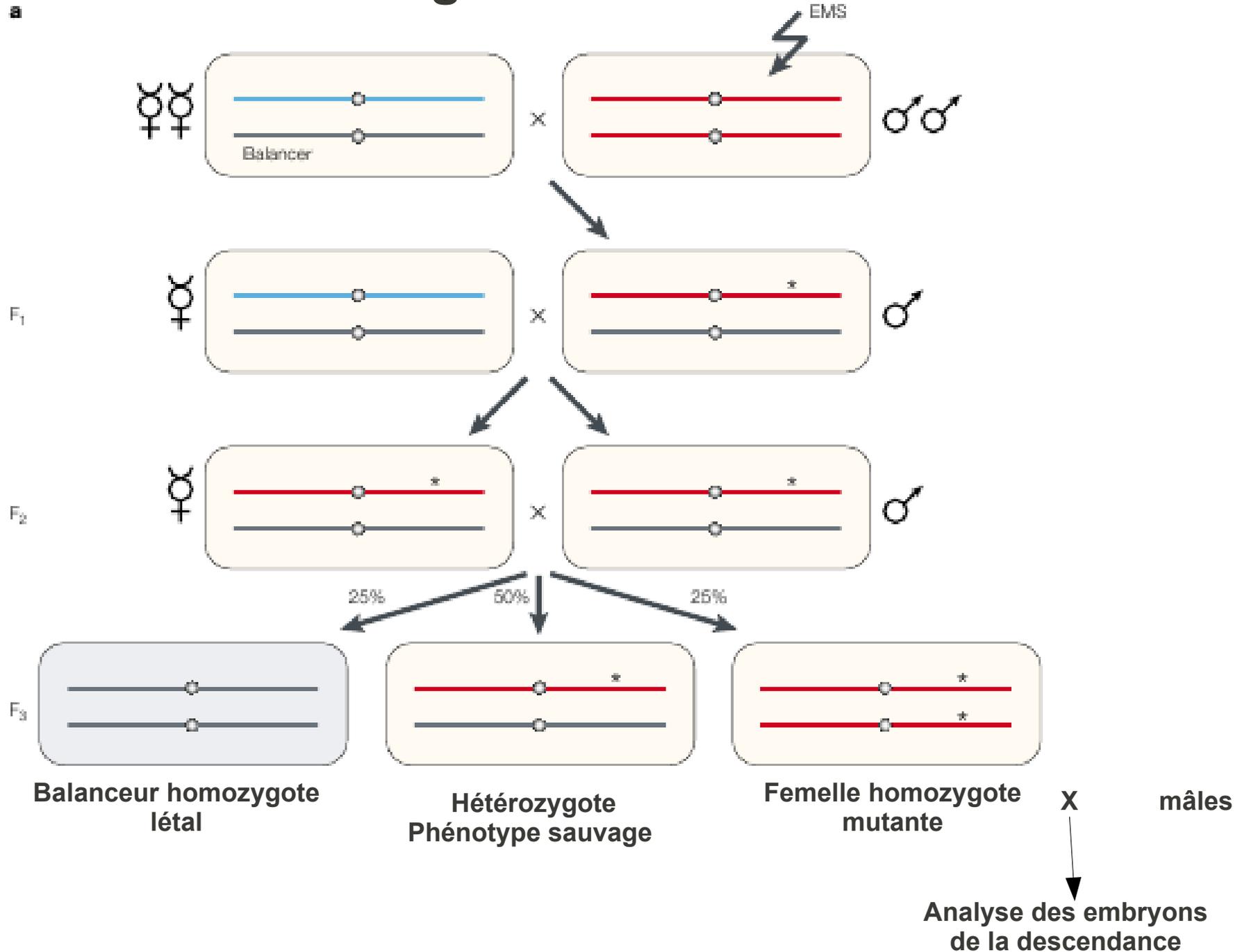
Gènes à effet maternel

ARNm déposés dans l'oeuf avant fécondation

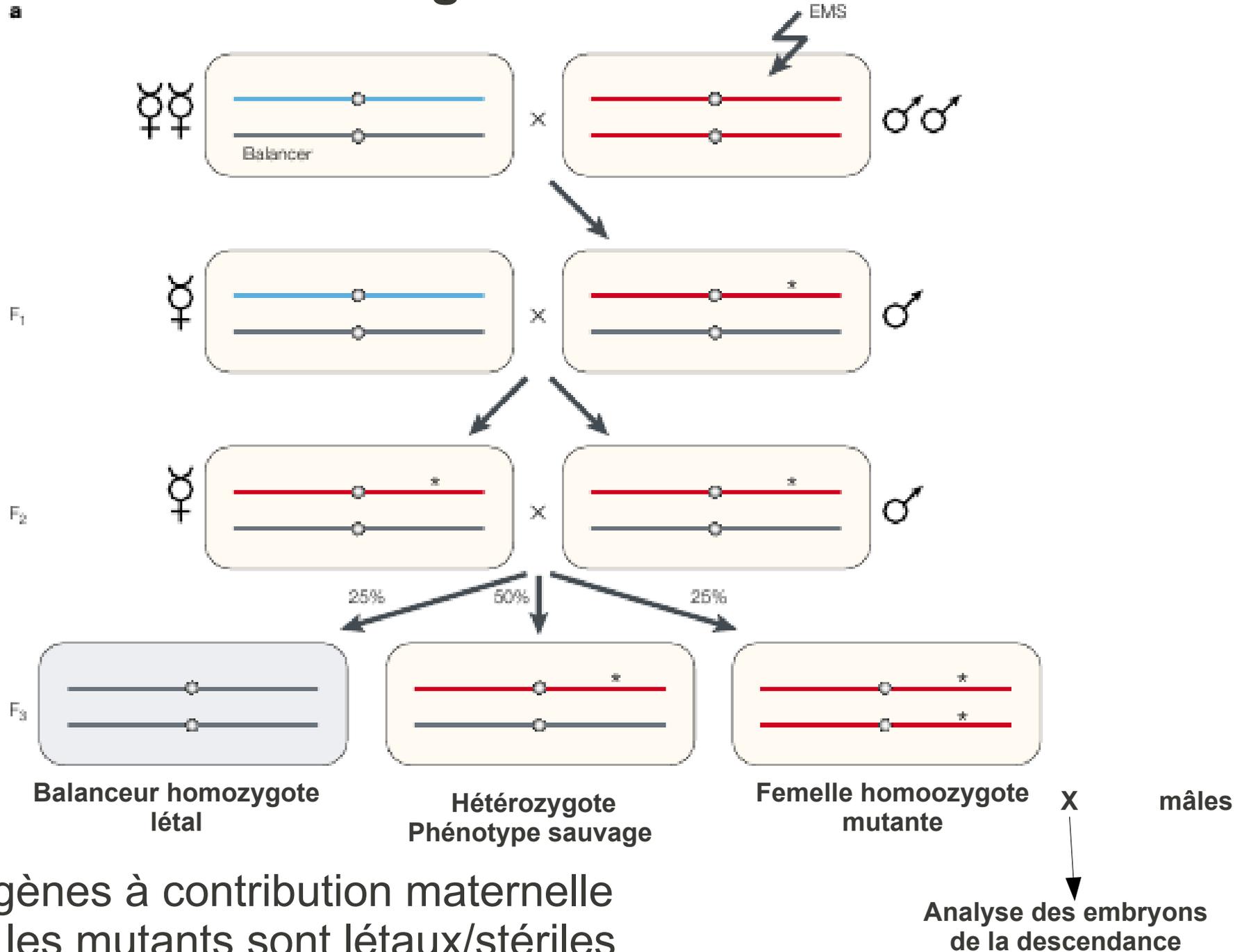


Crible des gènes à effet maternel

a



Crible des gènes à effet maternel



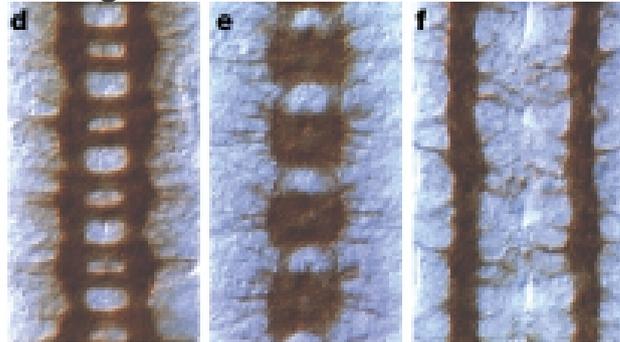
Les gènes à contribution maternelle dont les mutants sont létaux/stériles ne sont pas identifiés (ex : *Fz*, *Dsh*, *Apc*, *Nvd*)

Certains gènes impliqués dans le développement embryonnaire n'ont pas été identifiés

Gènes à effet maternel

Gènes impliqués dans le développement des structures internes (cerveau, intestin, etc.)

Sauvage *roundabout* *commissureless*



Certains gènes impliqués dans le développement embryonnaire n'ont pas été identifiés

Gènes à effet maternel

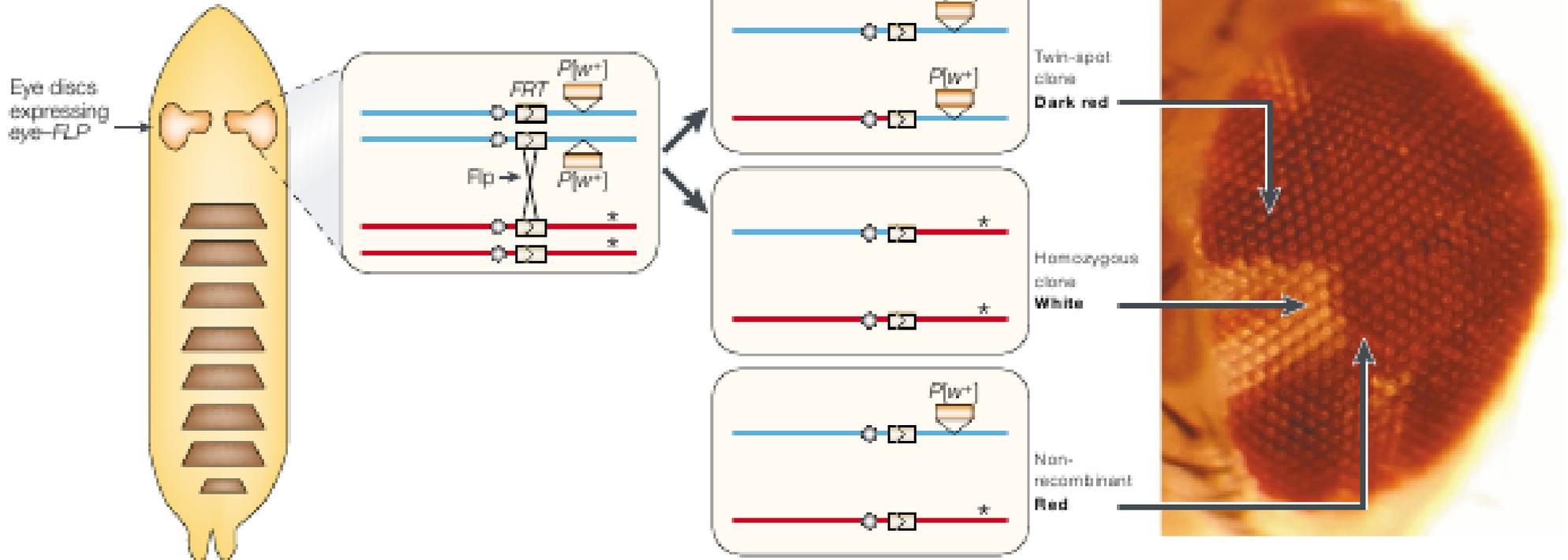
Gènes impliqués dans le développement des structures internes (cerveau, intestin, etc.)

Gènes redondants

Avec ces cribles, on ne peut détecter que la première fonction essentielle d'un gène.

1ère solution : réalisation de clones mitotiques

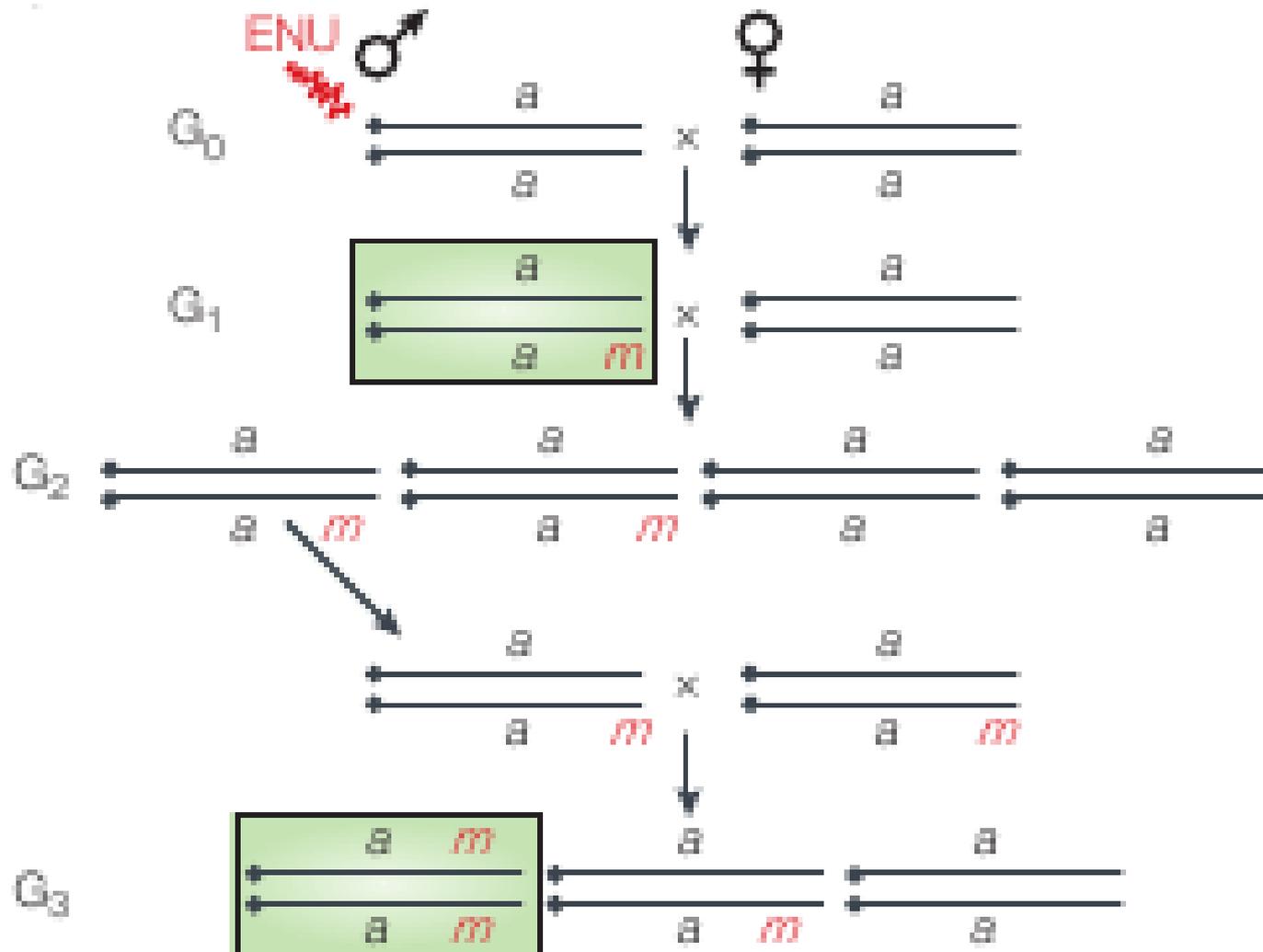
a Genotype: w eye-FLP; FRT P[w⁺] / FRT⁺



Flp = Flippase

FRT = Flippase Recombination Target

2ème solution : crible de supresseurs et d'enhancers



Les individus *a/a* sont viables et fertiles.

Crible de phénotypes plus sévères (enhancers) ou moins sévères (suppresseurs)

Principes généraux sur les cribles génétiques

Les agents mutagènes

Les croisements

Les phénotypes analysés

Identification et validation des mutations impliquées

Les agents mutagènes (1)

Rayons X : mutations ponctuelles, cassures chromosomiques, aberrations, délétions, translocations, inversions, chromosomes dicentriques

Ethylmethane sulfonate (EMS) : très efficace et peu toxique, agent alkylant (surtout production de O⁶-alkyl-G, qui s'apparie avec T -> transitions GC vers AT), très peu de délétions et insertions

Chez la drosophile, l'EMS peut produire $\sim 10^{-3}$ mutations par gène.

- combien de gènes mutés en moyenne sur un chromosome contenant 5000 gènes ?

- si 6000 chromosomes traités à l'EMS ont été générés, combien d'allèles par gène en moyenne devraient être disponibles dans ces lignées ?

Les agents mutagènes (2)

Methylmethane sulfonate (MMS) : agent alkylant, moins efficace que l'EMS pour la drosophile, induit un peu plus de délétions que l'EMS.

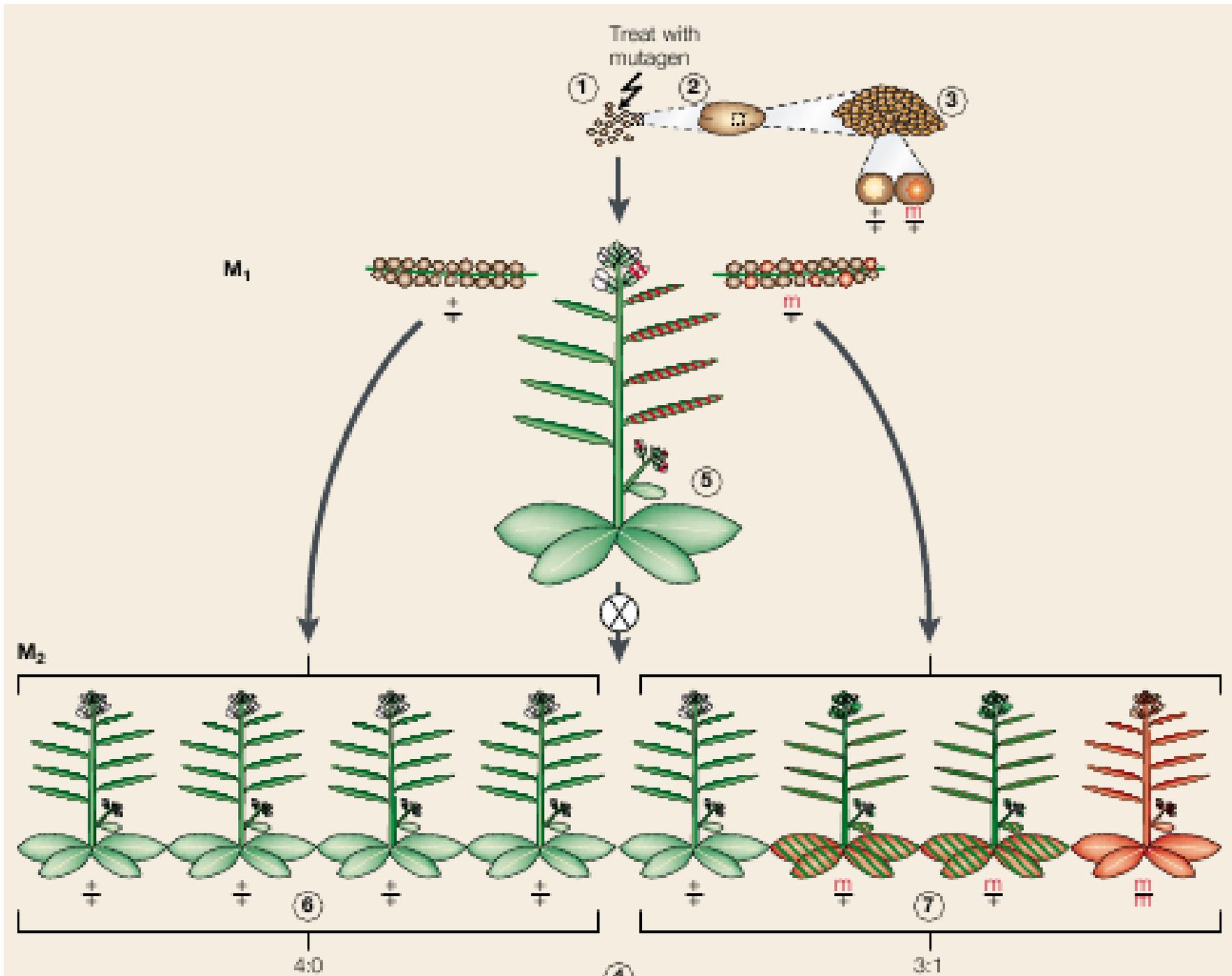
N-nitroso-N-ethylurée (ENU) : agent qui éthyle les atomes d'oxygène (le O2 et O4 de T é transitions AT vers GC, le O6 de G → transitions GC vers AT), induit moins d'aberrations que l'EMS

Triethylmelanine (TEM) : induit des délétions

Formaldéhyde : induit des délétions

Éléments transposables dépourvus de transposase: s'insèrent dans le génome, facilitent l'identification du gène

Les mutagènes créent des individus mosaïques



Les croisements

Comme les mutagènes chimiques créent des individus mosaïques, il faut toujours regarder la descendance

Cribles en F1 : cribles de suppresseurs et d'enhancers

Cribles en F3 : crible de mutations récessives

Cribles en F4 : crible des gènes à effet maternel

Les phénotypes analysés

Morphologie, Physiologie, Comportement

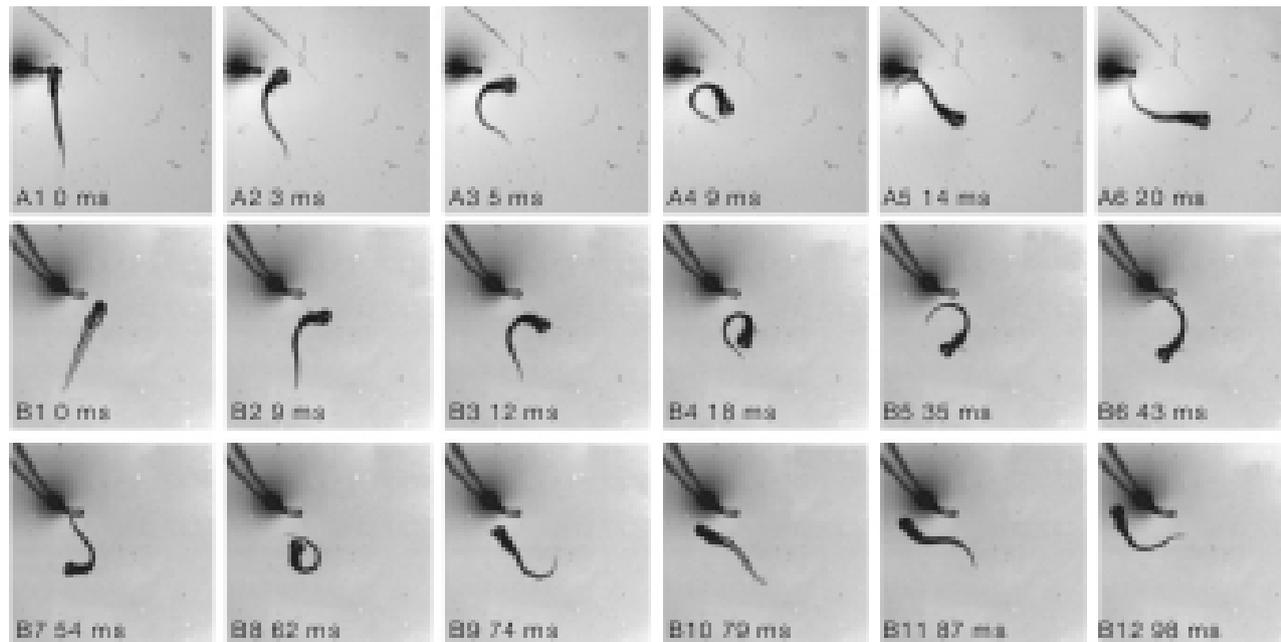


Figure 5 | **The space cadet locomotion mutant.** The space cadet mutant shows abnormal swimming behaviours during a stimulus-induced escape response. High-speed camera images capture the C-shaped bend of a wild-type larva as it rapidly moves its head away from the stimulus source (A1–A4; the timing of each frame is given, in milliseconds (ms)). The larva then makes a less powerful counterturn (A5, A6), before rapidly swimming away from the source (not shown). In response to a stimulus, the space cadet larva makes a C-shaped bend away from the stimulus in a similar manner to wild-type larvae (B1–B4), but has a poor counterturn (B5, B6). It then initiates a second turn towards the same side (B7–B9), before swimming away using a series of fast, bilateral tail flexures. A movie of the swimming defects of space cadet can be viewed at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/128/11/2131/DC1> and <http://www.nature.com/nsu/010607/010807-1.html>. Modified with permission from REF. 47 © (2001) Company of Biologists Ltd.

Les phénotypes analysés

Morphologie, Physiologie, Comportement

Observation directe

Sauvage

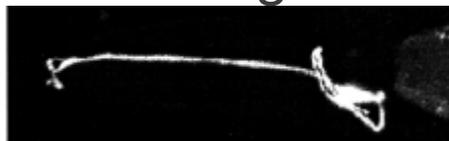


agamous-1

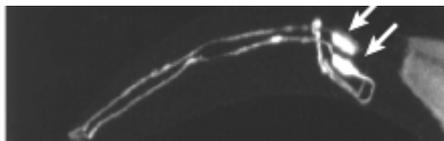


Marquage (GFP, anticorps)

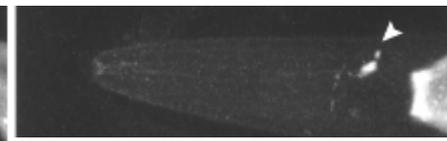
Sauvage



mutant 1

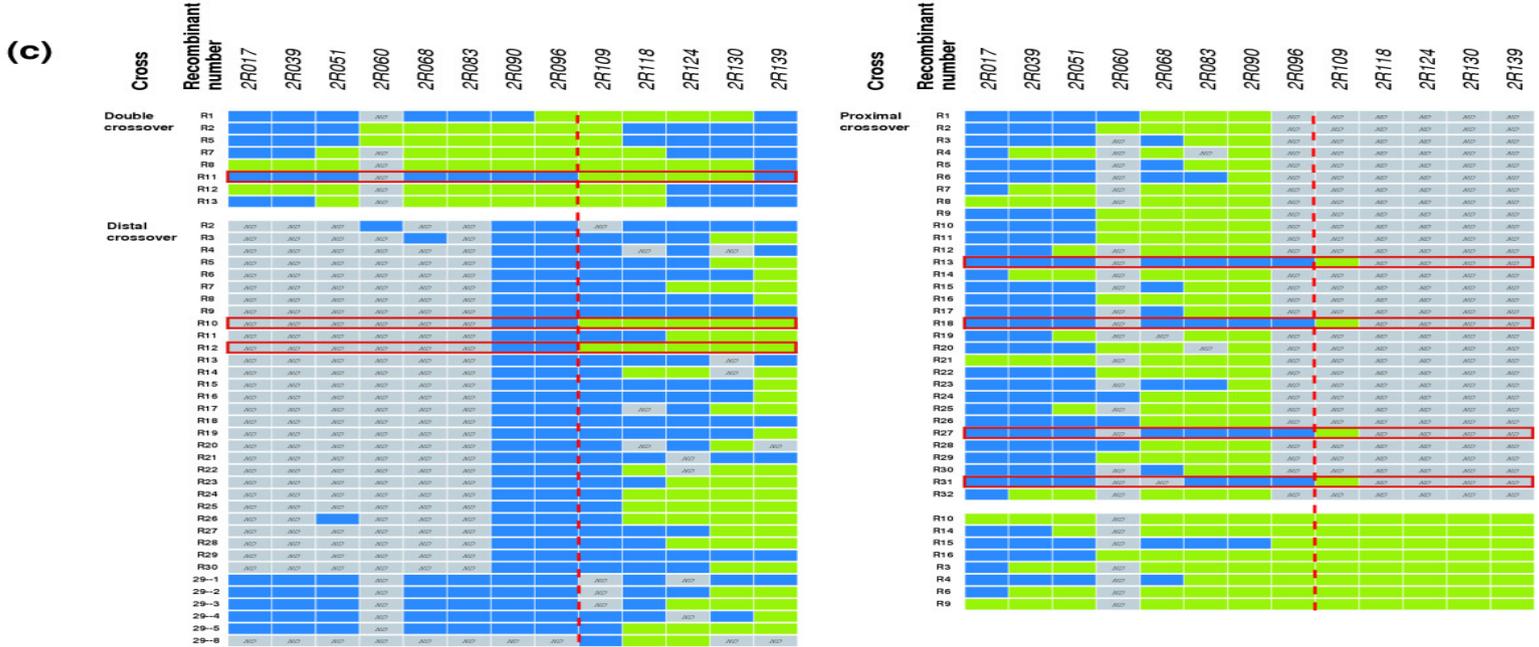
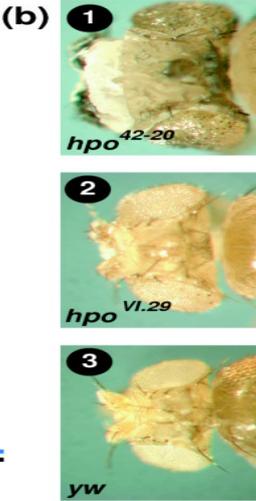
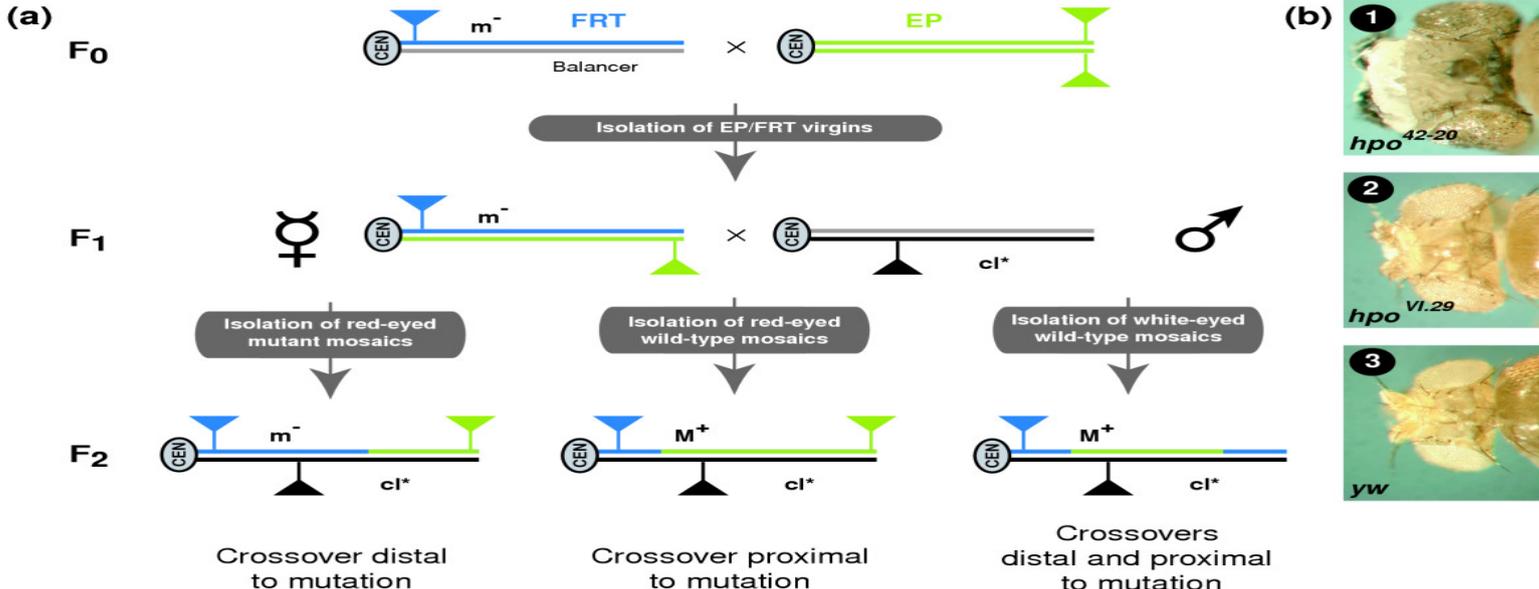


mutant 2

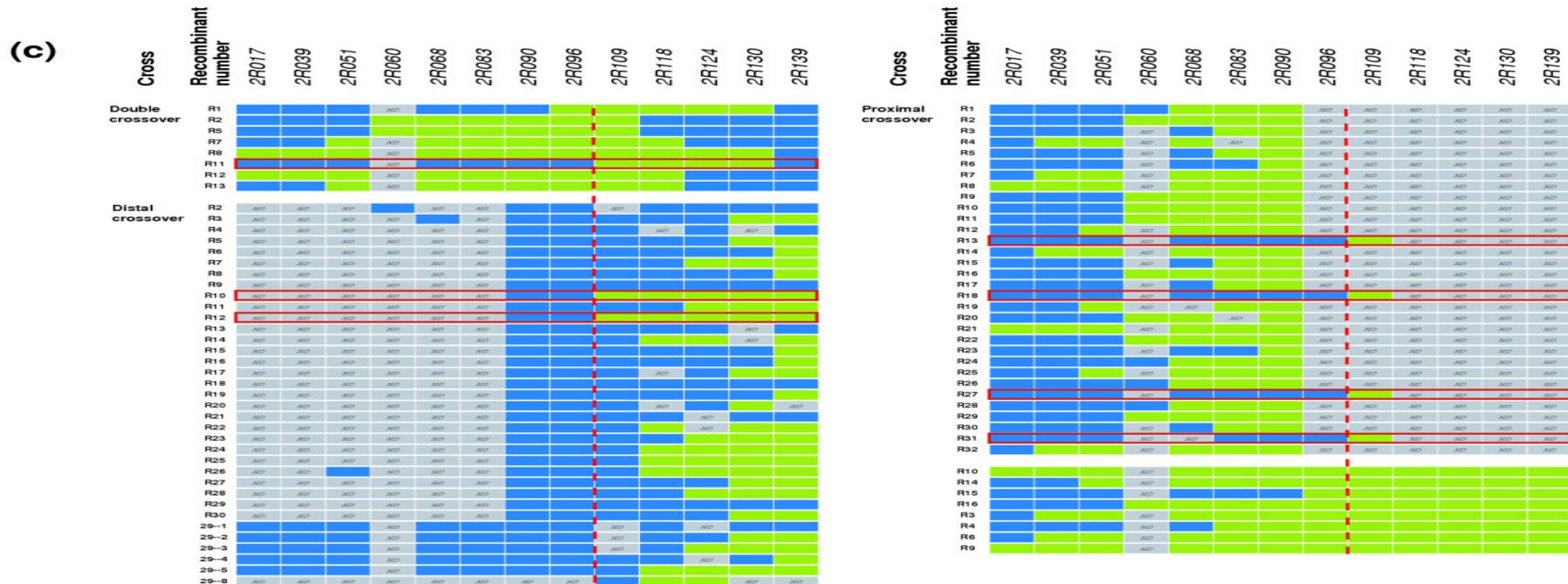
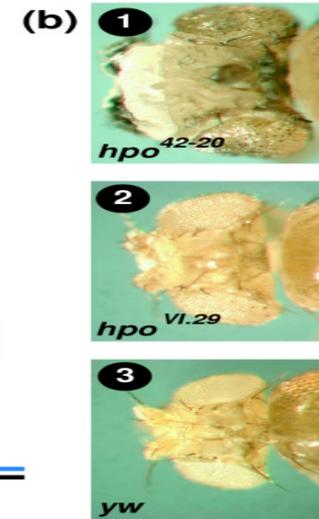
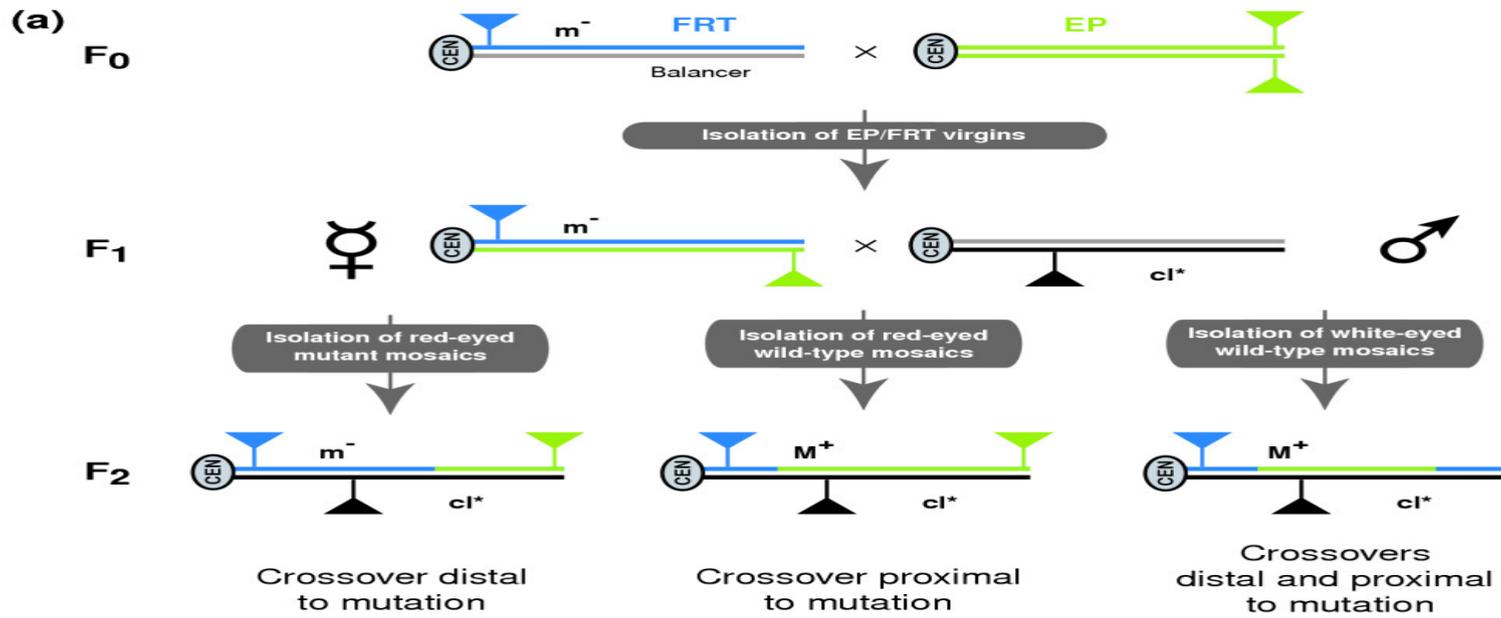


str2::GFP

Identification et validation des mutations impliquées (1)



Identification et validation des mutations impliquées (2)



La mutation est entre les marqueurs 2R096 et 2R109.

Identification et validation des mutations impliquées (3)

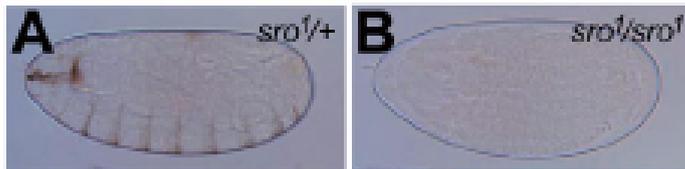
Test de complémentation avec des délétions ou des allèles mutants déjà connus

Identification et validation des mutations impliquées (3)

Test de complémentation avec des délétions ou des allèles mutants déjà connus

Analyse de l'expression des gènes candidats dans les mutants

Test de sauvetage de la mutation avec des transgènes



Niwa et al. (2010) Development 137, 1991

Table 1. *sro*¹ lethality was rescued by *sro/nm-g* overexpression

Genotype	Number of adults
<i>+/+; 2-286-GAL4 sro¹/+ sro¹</i>	0 (308)
<i>UAS-sro/+; sro¹/sro¹</i>	0 (170)
<i>UAS-nm-g/+; sro¹/sro¹</i>	0 (138)
<i>UAS-sro/+; 2-286-GAL4 sro¹/+ sro¹</i>	128 (286)
<i>UAS-nm-g/+; 2-286-GAL4 sro¹/+ sro¹</i>	57 (270)

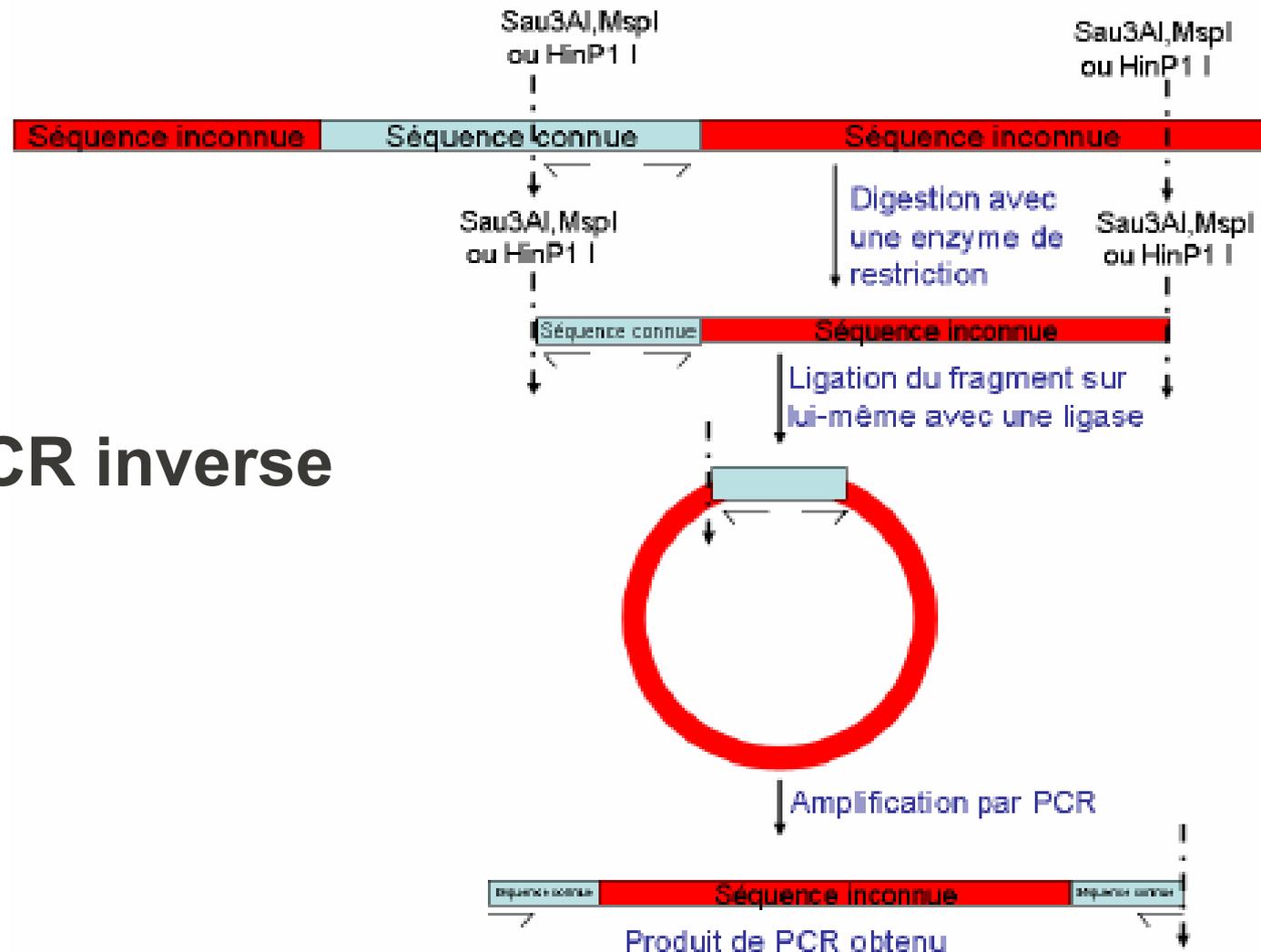
The numbers of viable adults were scored. Parentheses indicate the number of viable progeny with the presence of balancer markers from the parental strains.

Séquençage et recherche de mutations (non sens, délétions, etc.)

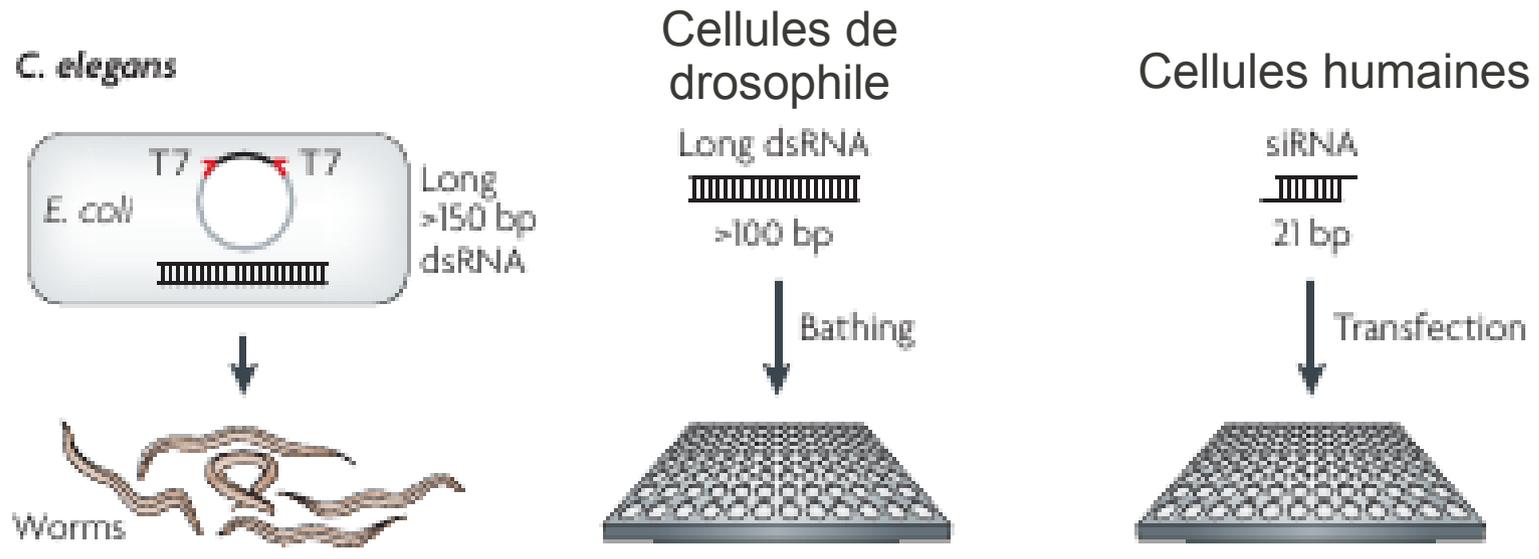
Identification et validation des mutations impliquées (4)

Cas particulier des insertions d'éléments transposables

La PCR inverse

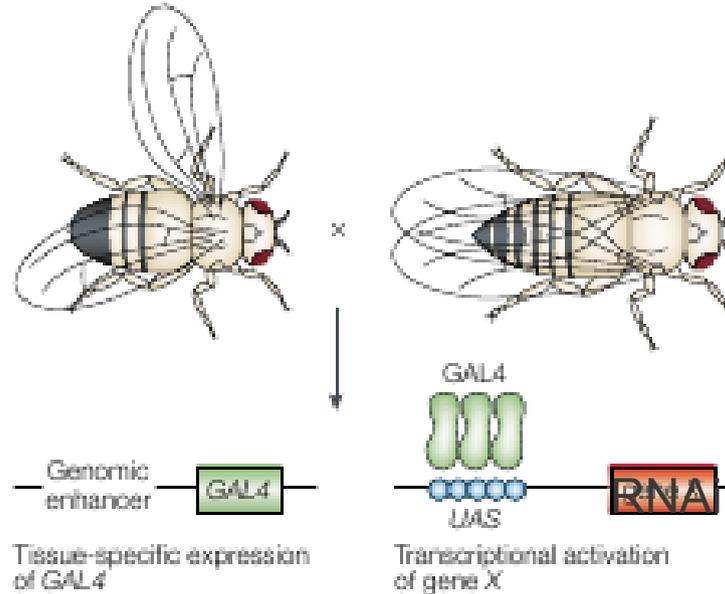


Un autres type de crible : le crible RNAi



Enhancer-trap GAL4

UAS-RNAi



D'autres types de cribles

Cribles d'expression

Puces (microarrays) ou séquençage du transcriptome

Hybridation in situ systématique de tous les gènes

Insertion d'éléments transposables pour créer des protéines fusion-GFP

Cribles sur les séquences

Gènes contenant des sites de fixation à certains ensembles de facteurs de transcription

Gènes contenant certains motifs protéiques

Quelques définitions

Une mutation peut être :

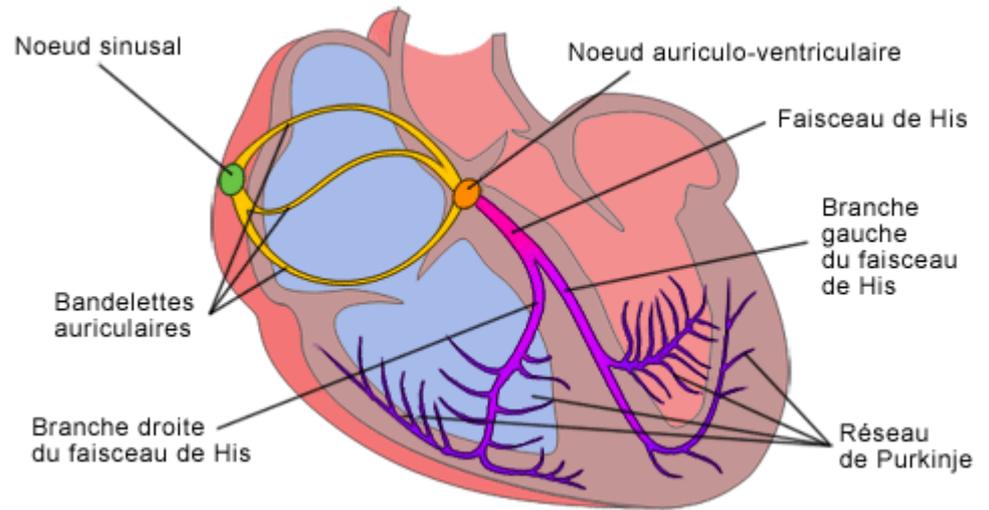
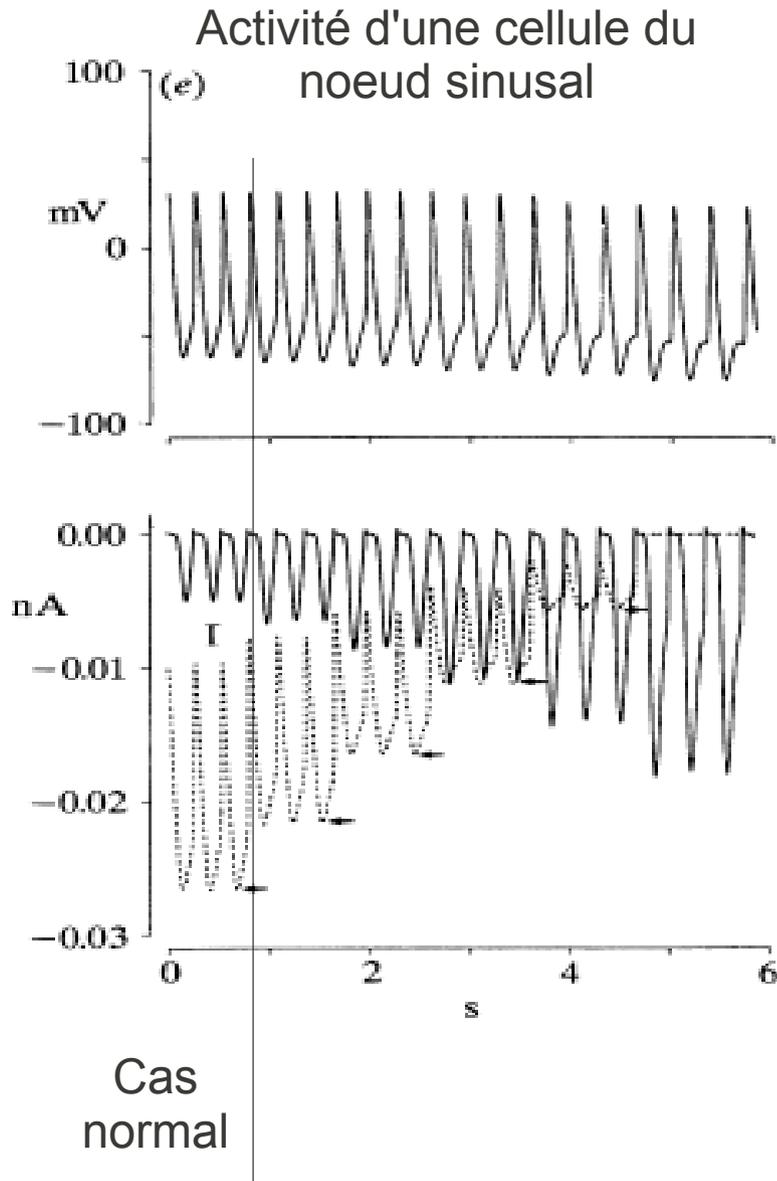
dominante, récessive

hypermorphe, hypomorphe/perte-de-fonction, amorphe/nulle,
néomorphe

dominante négative

Quelques commentaires

Faire attention à l'interprétation des mutants



www.inhalotherapie.com/ECG/

Disparition du courant $i_{b,Na}$

→ Baisse de la fréquence cardiaque de seulement 10%

Le courant i_f tamponne les effets. En fait, le courant $i_{b,Na}$ est responsable à 80% de la fréquence des battements du coeur.

Faire attention aux chromosomes utilisés

Deux mutants létaux du gène *Insensitive* (exprimé dans les cellules précurseurs des organes sensoriels) (Reeves et Posakony, 2005) : défauts de différenciation cellulaire identiques aux mutants *lgl*

En fait, ce phénotype est sauvé par le gène *lgl* !

13 stocks sur 89 testés sont *lgl*-nuls

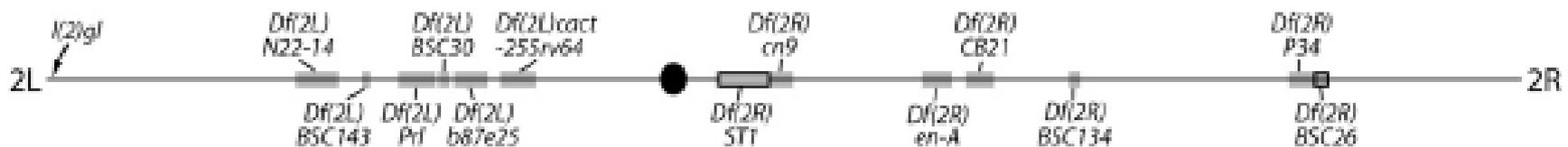


FIGURE 1.—The Bloomington second chromosome deficiency kit contains a high frequency of *lgl* alleles. The mapped deficiencies that fail to complement the null allele *lgl*[4] are shown

Note

Frequent Unanticipated Alleles of *lethal giant larvae* in *Drosophila* Second Chromosome Stocks

Le TILLING

