

## Détection par PCR de mutations chez la drosophile

Sydney Brenner commença un jour une conférence de la manière suivante : « Il y a aujourd'hui deux sortes de biologistes : ceux qui ont un mutant et qui cherchent le gène, et ceux qui ont un gène et cherchent un mutant. » La seconde classe de cette (réductrice) dichotomie est de loin la plus nombreuse. En effet, les techniques de biologie moléculaire ont permis ces dernières années le clonage de centaines de gènes dont la fonction est totalement inconnue. Cette tendance va être encore accentuée par les retombées des programmes de séquençage systématique, notamment le programme de séquençage du génome humain. Le moyen le plus direct de connaître la fonction d'un gène est de l'inactiver *in vivo* par mutation, et d'analyser le phénotype résultant.

Il est donc nécessaire que soient développées des techniques qui permettent d'obtenir, dans un organisme choisi, des mutations d'un gène donné. Chez la souris, la méthode de mutagenèse dirigée par recombinaison homologe dans des cellules embryonnaires puis réintroduction dans une chimère a répondu à cette attente [1]. Chez la drosophile, pourtant organisme de prédilection des généticiens, les moyens de la génétique classique comportent des limitations qui ne permettent pas toujours d'obtenir la mutation désirée (*voir plus loin*). Une approche similaire à celle développée chez la souris n'est pas envisageable pour l'instant à cause de l'impossibilité actuelle de cultiver des cellules totipotentes.

La difficulté a été tournée par la mise au point dans les laboratoires de S. Benzer et de K. Kaiser d'une technique consistant à détecter par PCR l'insertion d'un élément transposable P au voisinage d'un gène d'intérêt [2] [3]. L'application de cette technique à un gène cloné au laboratoire, le gène *pourquoi-pas?* codant pour une protéine à doigt de zinc, nous a permis d'en obtenir des mutants, ce que nous n'étions pas parvenu à faire en suivant l'approche génétique classique [4].

### La voie classique

Lorsqu'on veut obtenir, par la voie génétique classique, des mutants d'un gène donné, il faut disposer d'une délétion de la région du gène étudié. Tous les mutagènes provoquent des mutations réparties au hasard (à l'échelle du génome) et la délétion sert à connaître celles localisées dans la région voulue. Le premier problème qui se pose est qu'il n'existe pas de délétions de toutes les régions chromosomiques, et un travail préliminaire consiste donc souvent en la longue et incertaine quête d'une délétion. Le second problème, si on dispose d'une

délétion, est de prédire le phénotype de la mutation. Les mutagenèses classiques sont fondées sur un crible phénotypique, or il n'est pas facile de prédire *a priori* quel sera le phénotype associé à l'inactivation d'un gène, surtout si celui-ci est exprimé dans de nombreux tissus ou à plusieurs étapes du développement.

La technique de détection par PCR des éléments transposables permet de contourner ces difficultés car elle ne requiert ni délétion, ni connaissance *a priori* du phénotype. Elle permet en outre de cribler les mouches en masse, ce qui est un avantage certain quand

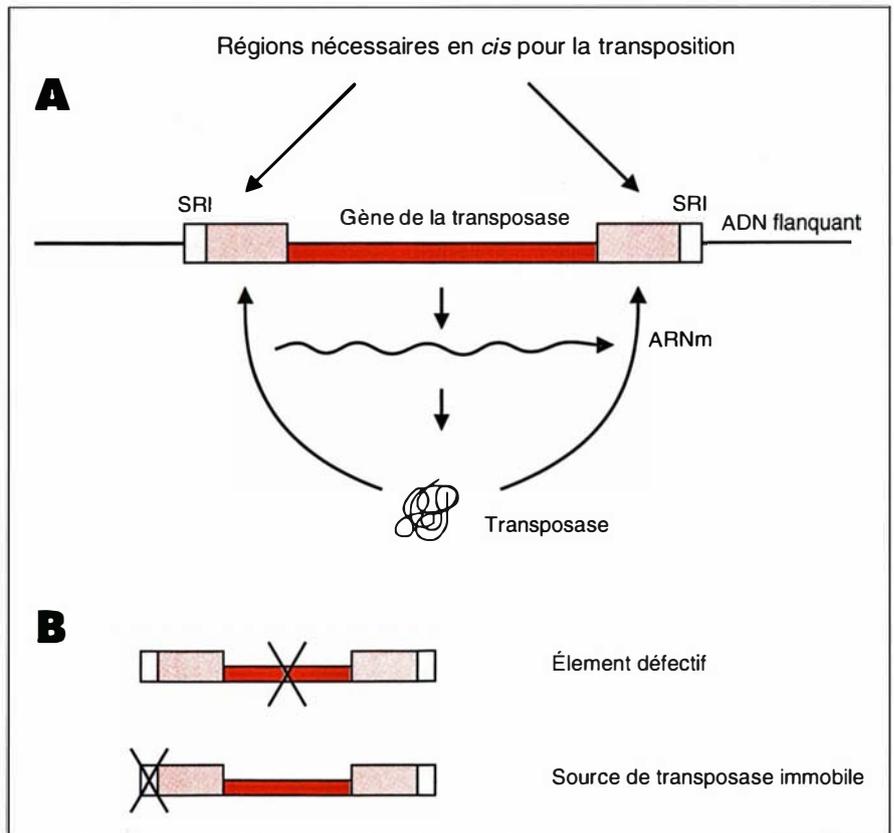


Figure 1. **Représentation schématique d'un élément transposable P complet.** A. L'élément P complet comprend à chaque extrémité des séquences nécessaires en cis à la transposition terminées par des séquences répétées inversées, et une phase de lecture interne codant pour la transposase, l'enzyme nécessaire à la transposition. SRI = séquences répétées inversées. B. Deux types de dérivés sont utilisés dans les protocoles de mutagenèse : les éléments défectifs, mutés dans le gène de la transposase et incapables de transposer seuls, et des éléments source de transposase immobiles.

on sait que l'événement favorable est rare. Elle comporte deux étapes : la mutagenèse par élément transposable P, et la détection des insertions par PCR.

### Mutagenèse par élément transposable P

L'élément P est l'élément transposable le mieux caractérisé chez la drosophile. Son utilisation en tant que mutagène s'est généralisée récemment [5]. C'est un élément transposable de type bactérien de 2,9 kb comportant deux fonctions essentielles à sa transposition : (1) les extrémités comportant les séquences nécessaires en *cis* à la transposition et terminées par des séquences répétées inversées ; (2) la phase de lecture codant pour la *transposase*, l'enzyme nécessaire à la transposition (figure 1). Dans les protocoles de mutagenèse, on préfère aux éléments P complets et autonomes (et par essence instables) deux types de dérivés ne possédant plus qu'une des deux fonctions : des éléments *défectifs* incapables de transposer seuls et des *sources de transposase* immobiles (figure 1B). En croisant des mouches porteuses des premiers avec des mouches porteuses des secondes, on obtient des descendants au sein desquels la transposition des éléments défautifs peut avoir lieu grâce à l'apport de transposase (figure 2). A la génération suivante, les mouches porteuses de la source de transposase sont éliminées, et les mouches restantes possèdent des éléments P localisés en de nouveaux sites chromosomiques et rendus immobiles par l'absence de transposase (figure 2).

### Détection par PCR des éléments P localisés à proximité d'un gène cloné

Les mouches de sexe femelle issues des croisements précédents sont rassemblées en groupes de 100, mises à pondre, puis les œufs sont récoltés et l'ADN en est extrait (figure 3).

L'ADN est ensuite testé par une réaction PCR pour laquelle on prend une amorce dans la séquence de l'élément P et une amorce dans le gène d'intérêt. Le principe de la méthode est le suivant (figure 4) : si un élément P est inséré près du (ou dans le) gène considéré, les brins d'ADN synthétisés à partir de chaque amorce pourront atteindre l'autre amorce, et on aura alors une amplification PCR classique, produisant suffisamment d'ADN pour être détecté sur un gel d'agarose après

coloration par le bromure d'éthidium (figure 4A). Si, en revanche, l'élément P est inséré trop loin du gène, les brins synthétisés à partir de chaque amorce ne pourront se rejoindre, et on ne pourra alors obtenir qu'une amplification linéaire, au rendement beaucoup plus faible (figure 4B). De plus, on peut tirer parti du fait que l'élément P se termine par des séquences répétées inversées en choisissant une amorce correspondant à cette séquence, ce qui permet de détecter un élément quel que soit le sens dans lequel il s'est inséré.

L'ADN de l'ensemble des œufs d'un groupe est testé dans un seul tube. Si l'ADN est négatif pour le test, les mouches correspondantes sont éliminées et de nouvelles mouches sont testées ; si l'ADN est positif, les mouches sont divisées en sous-groupes, mises à pondre, l'ADN des œufs de chaque sous-groupe testé, et ainsi de suite jusqu'à l'isolement de la (des) femelle(s) contributrice(s) du signal positif (figure 3). Dans ce dernier cas, la présence de l'élément P peut être vérifiée par *Southern blot*. Le nombre de mouches à tester dépend de l'affinité de l'élément P pour le gène étudié et

peut varier de quelques centaines [3] à quelques dizaines de milliers [4].

Il faut noter que les mêmes mouches peuvent servir pour la recherche de mutations de plusieurs gènes, ce qui constitue un avantage supplémentaire de cette méthode.

Des individus homozygotes pour l'insertion d'un élément P à proximité du gène *pourquoi pas ?* ont pu être ainsi isolés : ils sont dépourvus de phénotype particulier. Cependant, la mobilisation des éléments P insérés, obtenue par croisement avec une souche productrice de transposase, entraîne chez certaines mouches une délétion et l'apparition d'un double phénotype, une stérilité des femelles et une anomalie de la position et de la structure des ailes (phénotype *wings down*). La stérilité est due non à une malformation détectable, mais à des anomalies du développement embryonnaire précoce. Cette dernière anomalie doit être rapprochée du diagramme d'expression de la protéine *pourquoi pas ?* qui est détectée très précocement dans le noyau des cellules nourricières de la chambre ovarienne, puis dans le noyau de l'ovocyte [4]. A un stade très précis du développement, la protéine

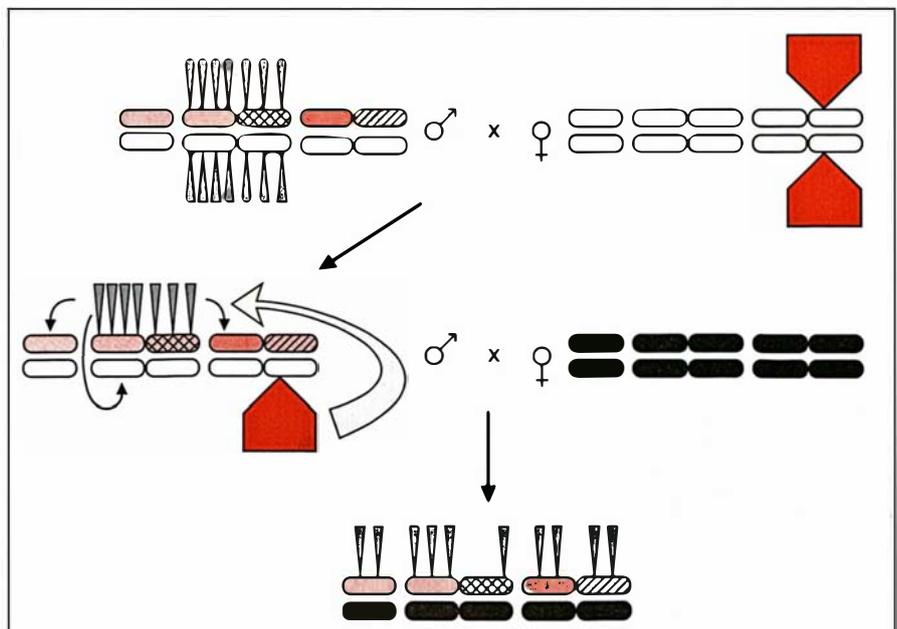


Figure 2. **Mutagenèse par élément transposable P.** Une souche possédant des éléments P défautifs (triangles allongés) est croisée avec une souche possédant une source immobile de transposase (triangle large). Chez les descendants, la transposase agit sur les éléments défautifs qui peuvent alors s'intégrer en de nouveaux sites chromosomiques. Les individus de la génération suivante qui n'ont pas hérité de la source de transposase portent des éléments stables. (Adapté de Cooley et al., *Trends Genet*, 4, pp. 254-258).

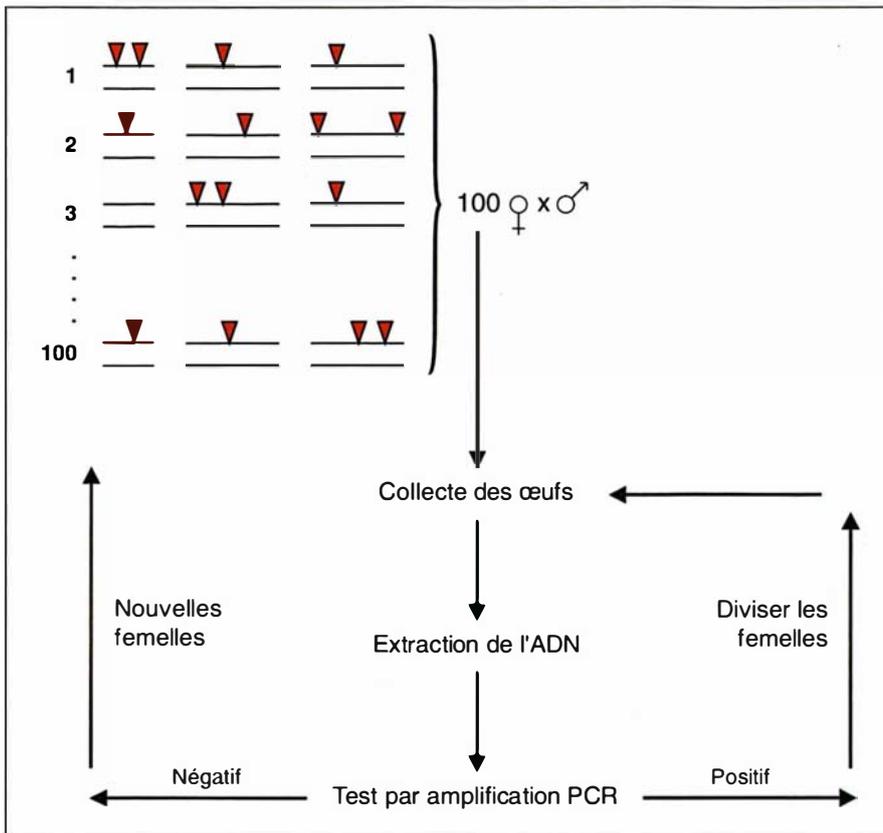


Figure 3. **Protocole expérimental.** Les femelles porteuses de nouvelles insertions P (triangles) sont rassemblées par groupes de 100 individus. Si un signal positif est obtenu à partir de l'ADN des descendants d'un groupe, les femelles sont divisées en sous-groupes et retestées jusqu'à isolement de la femelle positive.

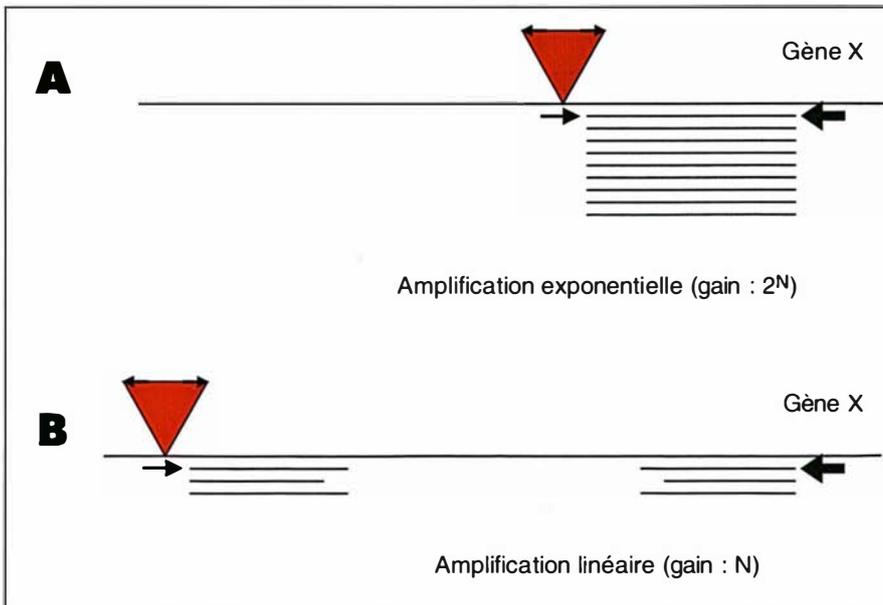


Figure 4. **Détection par PCR des éléments P insérés près d'un gène cloné.** Le triangle représente l'élément P avec ses répétitions terminales inversées (petites flèches noires). La réaction PCR est réalisée en choisissant une amorce dans la répétition inversée (flèche noire mince) et une amorce dans le gène d'intérêt (flèche noire épaisse). L'amplification exponentielle ne peut se produire que si les amorces sont proches, c'est-à-dire si un élément P est inséré à proximité ou dans le gène. A. Cas favorable. B. Cas défavorable.

apparaît d'ailleurs être très étrangement, localisée dans une toute petite région du noyau qui ne correspond pas de façon évidente à une structure cytotologique précédemment décrite.

En résumé, chez la drosophile, comme chez de nombreux autres organismes, il existe un nombre croissant de gènes pour lesquels on aimerait disposer de mutants actuellement inexistant. La technique de détection par PCR d'élément transposable P décrite ci-dessus permet de s'affranchir des limitations de la génétique classique pour faire face à ce problème. Bien que son application soit actuellement circonscrite à la seule drosophile, le principe sur lequel elle est fondée peut servir de modèle pour la mise au point de protocoles de mutagenèse chez les organismes dépourvus d'outils génétiques puissants ■

#### RÉFÉRENCES

1. Mansour SL, Thomas KL, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells : a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988 ; 336 : 348-52.
2. Ballinger DG, Benzer S. Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 9402-6.
3. Kaiser K, Goodwin SF « Site-selected » transposon mutagenesis of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 1686-90.
4. Ségalat L, Périchon R, Bouly JP, Lepesant JA. The *Drosophila* pourquoi-pas ?/wings down zinc finger protein : oocyte nucleus localization and embryonic requirement. *Genes Dev* 1992 ; 6 : 1019-29.
5. Engels WR. P elements in *Drosophila*. In : Berg D., Howe M, eds. *Mobile DNA*. Washington DC : ASM Publications, 1988 : 437-84.

Laurent Ségalat

Jean-Antoine Lepesant

Institut Jacques-Monod, CNRS et Université Paris 7, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France.

#### TIRÉS A PART

J.-A. Lepesant.