

TRAVAUX PRATIQUES

Analyse de ségrégations chez *Drosophila melanogaster*

A. INTRODUCTION

La mouche de vinaigre, *Drosophila melanogaster*, est l'un des organismes à phases diploïdes dominantes les mieux connus des généticiens.

Son utilisation en génétique présente de nombreux avantages. C'est un animal peu exigeant et donc facile à élever. Son corps de petite taille permet qu'un grand nombre d'individus puisse être contenu dans un espace réduit. Le nombre de descendant par couple est relativement élevé (une centaine de descendant par ponte) permettant ainsi une étude statistique des phénotypes obtenus. Le cycle de vie étant rapide (environ 15 jours), le généticien peut observer de nombreux croisements.

De plus, l'équipement chromosomique de la Drosophile est simple ($2n = 8$), et plusieurs centaines de mutations sont maintenant connues chez cette espèce faisant donc apparaître de nouveaux caractères phénotypiques.

Il existe actuellement un grand nombre de lignées (plus de 1500) très bien caractérisées et répertoriées, rendant ainsi possible toute étude génétique.

1. CYCLE DE VIE

La drosophile passe au cours de sa vie successivement par les stades suivants (**Figure1**) :

- **Oeuf** : petit, blanc, oblong, nanti de deux filaments respiratoires.
- **Larve** (asticot) (le seul stade pendant lequel l'animal grandit) : vermiforme, blanche, se nourrissant continuellement. Elle n'arrête pas de creuser des galeries dans le milieu nutritif. Au cours de sa croissance, la larve passe par trois stades successifs séparés par des mues.
- **Pupe** (nymphe) (stade de transformation intense, dans une sorte de cocon) : à la fin du dernier stade larvaire, la larve sort du milieu nutritif, gagne un endroit sec, s'y fixe et se métamorphose. Elle apparaît alors comme une sorte de graine brunâtre sur la paroi interne du flacon d'élevage. Ce stade est appelé pupaison et dure environ 4 jours à 25°C.
- **Imago** (adulte) (la mouche a acquis sa forme définitive ailée) : au cours de sa vie en apparence immobile à l'intérieur de la pupa, l'animal s'est transformé très profondément pour acquérir des pattes, des ailes, des yeux, etc.

Lors de l'éclosion, l'adulte apparaît d'abord blanchâtre, mais il se pigmente et s'active rapidement. En l'espace de quelques heures, il a acquis sa taille et son aspect définitifs. S'il s'agit d'une femelle, elle devient fécondable après 8-10 heures et commence à pondre deux jours plus tard. C'est donc seulement à ce dernier stade (imago) que la drosophile est capable de se reproduire.

2. SOUCHE "SAUVAGE"

On appelle ainsi la souche de référence. Il est nécessaire de bien la connaître pour déterminer les nouveaux caractères phénotypiques issus de nombreuses mutations morphologiques connues chez la drosophile. C'est la drosophile telle qu'on peut la rencontrer dans la nature, avec ses longues ailes, son corps de couleur crème, et ses gros yeux de couleur rouge brique.

Les sexes sont séparés et donc facilement reconnaissables. Les femelles sont plus grandes que les mâles. L'abdomen de la femelle est de forme pointue (se courbe postérieurement jusqu'à un point), avec des segments terminaux de couleur claire jusqu'au bout terminal. L'abdomen du mâle est plus arrondi, avec des segments terminaux très foncés. Chez les mâles, il existe une petite touffe de soies noires située au niveau du premier article du tarse de la patte antérieure. Elle est sous forme de peigne de structure foncée appelé le peigne sexuel (**Figure 2**). La **Figure 3** représente le détail (forme et position des veines longitudinales et transversales) de l'aile de la drosophile de type sauvage.

3. SOUCHES MUTANTES

Les ailes longues, corps beige, yeux rouges ... sont par convention désignés comme étant les caractères [sauvages]. Les autres souches sont considérées chacune comme des mutants, c'est à dire comme des descendants de la souche sauvage dont le patrimoine héréditaire a subi une modification plus ou moins profonde.

C'est par un accident survenant dans le processus de reproduction cellulaire que ces souches mutantes apparaissent. Le phénomène se produit spontanément dans la nature, mais il est plutôt rare. On peut en augmenter la probabilité par différents procédés (irradiation, action de substances chimiques, ...), et des laboratoires spécialisés arrivent donc ainsi à "produire" des souches de drosophiles modifiées, qui sont mises ensuite à la disposition des chercheurs en génétique.

3.1. DESCRIPTION DES MUTATIONS

3.1.1. YEUX

- **"White" [w]** : cette souche se caractérise par l'absence complète de pigments oculaires. Les yeux sont donc entièrement blancs, alors que ceux de la souche sauvage ont une couleur rouge brique.

- **"Brown" et "scarlet" [bw] et [st]** : les yeux de ces mouches sont respectivement brun clair et rouge vif. Cette coloration résulte en fait de l'absence de l'un des deux pigments qui sont normalement présents dans l'œil [sauvage] (un pigment rouge et un pigment brun) :

Le mutant brown ne possède pas le pigment rouge.

Le mutant scarlet ne possède pas le pigment brun.

Note : Un mutant qui présente à la fois les caractères brown et scarlet devra donc avoir les yeux blancs (absence des deux pigments).

- **"Sepia" [se]** : cette souche possède des yeux bruns très foncés (presque noirs). Sepia est le nom latin de la seiche, animal marin produisant une encre utilisée autrefois comme matière colorante (couleur sépia).

- **"Bar" [B]** : les yeux de ce mutant apparaissent comme une "barre" mince, suite à une réduction du nombre d'ocelles (les "facettes" de l'oeil) :

L'oeil [sauvage] comporte environ 760 facettes.

L'oeil [Bar] comporte environ 80 facettes.

Le caractère Bar est semi-dominant. Les hybrides résultant du croisement de Bar avec la souche sauvage (Hybrides [B+] ont dans leurs yeux un nombre de facettes intermédiaire entre celui des types B et + : L'oeil [Semi-Bar] comporte environ 350 facettes.

3.1.2. CORPS

- **"Black" et "ebony" [b] et [e]** : le corps de ces mutants présente une couleur foncée ("black": "noir", "ebony": "ébène", nom d'un bois de couleur sombre). Le phénotype de ces deux mutants est donc similaire, bien qu'il s'agisse de gènes différents qui ont des caractéristiques génétiques différentes.

3.1.3. AILES

- **"Miniature" [m]** : les ailes de cette souche sont raccourcies. (Elles ne dépassent pas l'extrémité de l'abdomen). Cette souche est cependant toujours capable de voler.

- **"Vestigial" [vg]** : les ailes sont réduites à l'état de moignons. Cette souche est incapable de voler.

- **"Cut" [ct]** : ce mutant présente des ailes relativement courtes, avec une découpe irrégulière.

- **"Lyra" [Ly]** : l'aile de cette souche est plus étroite que la normale, avec une découpe particulière qui fait que la disposition des ailes sur le dos, au repos, évoque un peu la forme d'une lyre. Ce caractère est dominant, et létal à l'état homozygote (Il ne peut donc pas exister de souche pure Lyra).

- **"Dichaete" [D]** : Cette souche garde les ailes écartées au repos. Ce caractère est dominant, et létal à l'état homozygote (Il ne peut donc pas exister de souche pure Dichaete).

3.1.4. SOIES

- "forked" [f] : les soies thoraciques de cette souche apparaissent grosses, tire-bouchonnées et fourchues à l'extrémité.

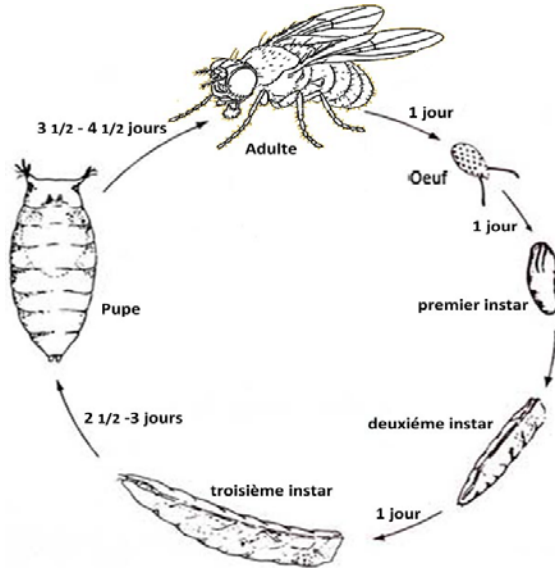


Figure 1. Cycle de vie de *Drosophila mélanogaster*

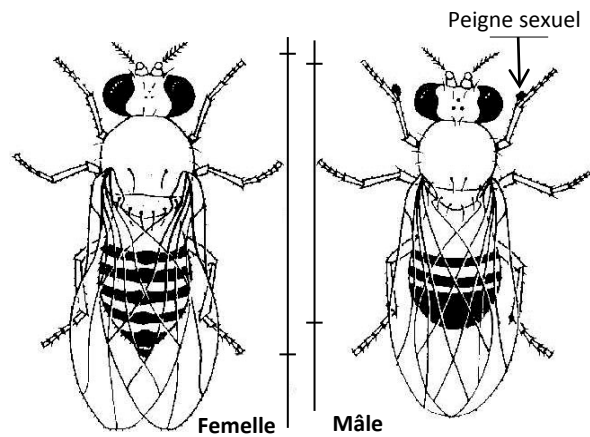


Figure 2. Différences morphologiques entre les mâles et les femelles de *D. mélanogaster*

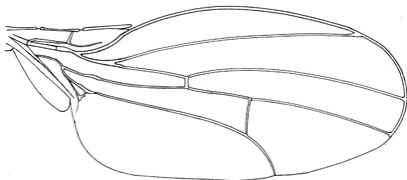


Figure 3. Détail de l'aile de la *D. mélanogaster* type sauvage

ELEVAGE VIRTUEL DE DROSOPHILES ET ETUDE DE CROISEMENTS

A. UTILISATION DU LOGICIEL DROSOFLY

C'est un logiciel de simulation vous permettant de réaliser un élevage de Drosophile en vous mettant devant une situation de travail très proche de celle de l'expérimentation réelle. Le programme vous permet de réaliser les croisements que vous voulez et vous présente les résultats obtenus.

Au lancement du logiciel, il vous demande de saisir votre nom et votre classe. Remplissez et cliquez sur la flèche verte. Vous accédez alors à la paillasse de travail.



1. Visualiser la paillasse et la ramener à l'avant-plan.
2. Commander les souches de drosophiles que vous désirez utiliser dans vos expériences.
3. Ouvrir l'incubateur pour accéder à vos flacons.

Les flacons sont rangés dans l'incubateur. Celui-ci est muni d'un thermostat réglable.

Lorsque vous voulez effectuer une opération sur un flacon, vous le placez sur la paillasse.

Pour placer une étiquette sur un flacon (important !), utilisez l'option14 (crayon).

4. Activer la loupe binoculaire pour observer directement les mouches d'un flacon.

Cette option vous permet de déterminer le sexe de l'animal ainsi que le phénotype recherché et aussi de sélectionner les mouches à utiliser dans un croisement suivant, ou encore d'éliminer les imagos si besoin.

5. Préparer le milieu nutritif et garnir les flacons de cette nourriture.

La fenêtre qui apparaît comporte tous les éléments nécessaires pour que vous puissiez tester la recette.

Vous devez appliquer cette recette correctement pour pouvoir ensuite remplir les flacons. Le logiciel vous indique quand le milieu est correctement préparé.

6. Effectuer un saut dans le temps.

Le logiciel permet de sauter quelques jours virtuels et observer tout de suite les résultats de vos croisements. Attention à ne pas sauter un trop grand intervalle de temps.

7. Afficher l'historique des manipulations (compte-rendu des opérations lequel pourra également être imprimé ou exporté dans un fichier texte).

8. Consulter la galerie des photos, accompagnées de commentaires explicatifs.

9. Accédez au système d'aide en ligne.

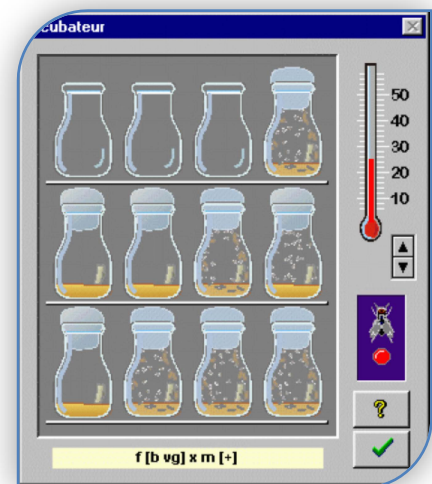
10. Accédez à quelques démonstrations animées.

11. 12. Prendre l'étheriseur et la bouteille d'éther.

13. Eliminer les mouches évadées.

14. Marquer un flacon d'élevage.

15. Nettoyer un flacon d'élevage.



C'est ainsi que vous serez amené, entre autres, à : préparer des milieux de culture, commander les souches de mouches, introduire ces mouches dans ses flacons d'élevage, les endormir avec de l'éther pour les manipuler (vous verrez les mouches voler, et même s'échapper en cas de fausse manœuvre), attendre l'émergence des imagos, observer les mouches à la loupe binoculaire, etc.

1. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE

Respectez scrupuleusement les étapes ci-dessous :

Ajoutez 500 g d'eau distillée. Commencez à chauffer et à mélanger.

Ajoutez 56 g de semoule de maïs. Ajoutez 38 g de sucre.

Ajoutez 3 g de levure séchée. Ajoutez 4 g d'agar-agar.

Attendez que le bouton devienne vert (image).

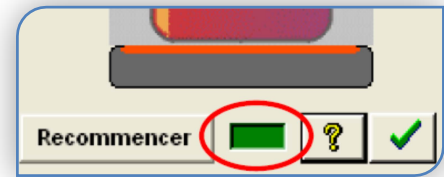
Arrêtez de chauffer (mais continuez à mélanger).

Ajoutez rapidement 2,5 g d'alcool éthylique pur.

Ajoutez rapidement 2,5 g d'acide acétique.

Ajoutez rapidement 0,5 g de nipagine.

Attendez qu'une fenêtre vous avertisse que la préparation a réussi. Si au bout de 30 secondes, rien ne se passe, recommencez.



2. REMPLISSAGE DES FLACONS

Cliquez sur le bouton **3** l'incubateur s'affiche. Amenez un premier flacon sur la pailleuse en faisant un glisser-lâcher. Pour le remplir, cliquez sur le bouton **5** nourriture (les flacons se remplissent automatiquement, et ils se ferment d'un gros tampon d'ouate, lequel permet une aération convenable). Cliquez sur le milieu du flacon et il retourne dans l'incubateur (surtout pas sur le coton car les drosophiles s'échappent).

Préparez ainsi au moins 3 flacons. Il vous en faudra un pour chacune des souches pures de drosophiles que vous désirez conserver, et un pour le croisement.

3. COMMANDE DES SOUCHES PURES

Cliquez sur le bouton **2**, le petit téléphone vous permet de commander des souches pures de drosophiles. Vous obtenez la fenêtre de commande.

Cochez un choix et validez en cliquant sur le bouton "ajouter à la commande". Répétez l'opération autant de fois que nécessaire. Pour terminer, cliquez sur le bouton "enregistrer la commande, quitter".

Sautez deux jours, en utilisant le bouton **6** calendrier. Un message vous avertit de l'arrivée des mouches. Ne pas cliquer sur la flèche verte (si c'est trop tard!, vous retrouverez votre colis en cliquant sur le bouton calendrier puis sur appliquer.

Dès leur réception, installez ces mouches homozygotes dans leurs flacons respectifs (chaque souche dans un flacon différent). Chaque flacon d'élevage est transféré de l'incubateur à la pailleuse par glisser-lâcher. On y transfère la souche choisie en cliquant sur son nom et par glisser-lâcher jusqu'au flacon de réception.

Prenez bien soin de marquer chacun des flacons d'un petit texte explicatif, afin de pouvoir les reconnaître aisément après (bouton **14**). On replace le flacon rempli par un cliquer dessus.

L'incubateur est muni d'un thermostat, que l'on peut régler en cliquant sur ses boutons de contrôle, un réglage sur 25°C constitue certainement l'idéal.

4. SELECTION ET ETHERISATION DES MOUCHES

Amenez un flacon contenant les drosophiles sur la pailleuse. Pour anesthésier ces mouches, cliquez sur le bouton **11** pour faire apparaître le flacon étheriseur avec son entonnoir, et le bouton **12** pour faire apparaître une petite bouteille compte-gouttes contenant de l'éther.

Cliquez sur le bouchon de la bouteille compte-gouttes. La bouteille s'ouvre, et le compte-gouttes proprement dit se positionne au-dessus du flacon. Cliquez sur la poire du compte-gouttes pour faire tomber une ou deux gouttes d'éther. Il ne faut pas en mettre davantage, sous peine de faire périr les mouches! En effet, l'éther endort les mouches quand elles en respirent sous forme gazeuse, mais il les tue si elles entrent en contact avec lui sous sa forme liquide.

Cliquez à nouveau sur la bouteille d'éther, pour la refermer, puis, cliquez sur l'entonnoir, pour le mettre en place sur le flacon étheriseur.

Cliquez sur le bouchon d'ouate du flacon d'élevage pour provoquer son ouverture. Attention: à partir de ce moment des mouches peuvent s'enfuir ! Alors, cliquez rapidement sur le corps du flacon d'élevage pour provoquer son retournement sur l'entonnoir de l'éthériseur.

Attendez que les mouches tombent et s'endorment. Vous pouvez alors les observer à la loupe binoculaire, sélectionner et les manipuler.

B. ORGANISATION DES CROISEMENTS

Pour réaliser un croisement de drosophiles, il suffit d'installer quelques mâles d'une souche et quelques femelles d'une autre souche, dans un même flacon d'élevage nouvellement préparé.

Remarque :

Lors d'expériences réelles, il est indispensable que les femelles utilisées pour les croisements soient vierges, car une femelle une fois saillie fait provision de sperme dans une spermathèque, et peut donc - bien longtemps après l'accouplement - continuer à pondre des oeufs qu'elle féconde elle-même à l'aide des spermatozoïdes qu'elle a en réserve, et qui proviennent donc toujours du même père. Ceci fausserait inmanquablement les résultats d'un croisement réalisé ensuite avec des mâles d'autres souches.

Si vous effectuez des croisements réels, il vous faut donc avant toute autre chose isoler des femelles vierges pour chacune des souches utilisées. La procédure est simple mais un peu contraignante : vous installez chaque souche dans un flacon d'élevage, et vous attendez la pupaison. Lorsque celle-ci a commencé, vous éliminez tous les imagos présents et vous attendez environ 8 heures. Après ce laps de temps, vous examinez le contenu du flacon. S'il ne s'y trouve toujours que des larves et des pupes, vous attendez de nouveau 8 heures, et ainsi de suite. Si des imagos sont apparus, ils sont nécessairement éclos depuis moins de 8 heures et n'ont pas encore eu le temps de s'accoupler. Séparez alors les mâles et les femelles (lesquelles sont donc vierges) dans des flacons distincts. Attendez à nouveau 8 heures, et ainsi de suite, jusqu'à ce que vous disposiez d'animaux en suffisance pour les croisements envisagés.

Dans la présente simulation, les choses se présentent cependant de manière plus simple : Toute femelle transférée d'un flacon dans un autre est considérée par le logiciel comme étant vierge au moment de son transfert, même si elle provient d'un flacon contenant des mâles. Vous ne devez donc pas procéder à l'isolement des femelles fraîchement écloses comme nous venons de le décrire ci-dessus.

Il ainsi est indispensable de prendre en compte la durée des différentes étapes du cycle de vie de la drosophile. Le calendrier type pour la réalisation d'un croisement :

Jour 0 : mise en place des géniteurs

Jour 4 : retrait des géniteurs. C'est indispensable pour ne pas mélanger les générations successives.

Jour 10 : apparition des premiers imagos F1

Jour 16 : observation et retrait de tous les imagos F1

Jour 20 : apparition des premiers imagos F2

Jour 25 : observation des imagos F2

C. REALISATION DES CROISEMENTS

Les croisements que vous devez réaliser sont les suivants :

Les premiers croisements

- × Croisement [eyeless] × [sauvage] : F1 puis F2= F1 × F1
- × Croisement [black sepia] × [++] : F1 puis test-cross

Les deuxièmes croisements

- × Croisement femelle [white miniature] × mâle [++], puis inverse : mâle [white miniature] × femelle [++]. Pour plus d'efficacité, vous faites ces deux croisements en parallèle. Eventuellement, vous réalisez les croisements complémentaires (F2) vous permettant de conclure sur la transmission de ces gènes et l'établissement de la carte génétique.

D. COMPTE-RENDU

Le compte-rendu doit contenir pour chaque croisement :

- × Les résultats des comptages de F1 et F2.
- × Les échiquiers de croisement théoriques correspondant à chaque hypothèse envisagée.
- × Le test χ^2 pour les premiers croisements.
- × La discussion éventuelle des résultats.
- × La carte factorielle pour les gènes concernés du deuxième croisement.

Distribution de χ^2

Degrés de liberté	Probabilité (p)											
	0.95	0.90	0.80	0.70	0.50	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001	
1	0.004	0.02	0.06	0.15	0.46	1.07	1.64	2.71	3.84	6.64	10.83	
2	0.10	0.21	0.45	0.71	1.39	2.41	3.22	4.60	5.99	9.21	13.82	
3	0.35	0.58	1.01	1.42	2.37	3.66	4.64	6.25	7.82	11.34	16.27	
4	0.71	1.06	1.65	2.20	3.36	4.88	5.99	7.78	9.49	13.28	18.47	
5	1.14	1.61	2.34	3.00	4.35	6.06	7.29	9.24	11.07	15.09	20.52	
6	1.63	2.20	3.07	3.83	5.35	7.23	8.56	10.64	12.59	16.81	22.46	
7	2.17	2.83	3.82	4.67	6.35	8.38	9.80	12.02	14.07	18.48	24.32	
8	2.75	3.49	4.59	5.53	7.54	9.52	11.08	13.36	15.51	20.09	26.12	
9	3.32	4.17	5.38	6.39	8.34	10.66	12.24	14.68	16.92	21.67	27.88	
10	3.94	4.86	6.18	7.27	9.34	11.78	13.44	15.99	18.31	23.21	29.59	
	Non significatif								Significatif			