

# Ovogenèse chez la drosophile : Etude et caractérisation d'un phénotype affectant la fertilité à l'aide d'un gène rapporteur *lacZ*.

## Objectifs du TP :

Décrire les étapes de l'ovogenèse chez la drosophile à l'échelle cellulaire. Décrire les migrations cellulaires nécessaires à la formation d'un œuf fonctionnel. Tirer parti d'un gène rapporteur (*enhancer<sup>1</sup> trap*) pour le suivi d'une sous-population cellulaire au cours du développement. Caractériser la fonction d'un gène au cours du développement via l'étude d'un phénotype mutant.

## 1- Le modèle Drosophile

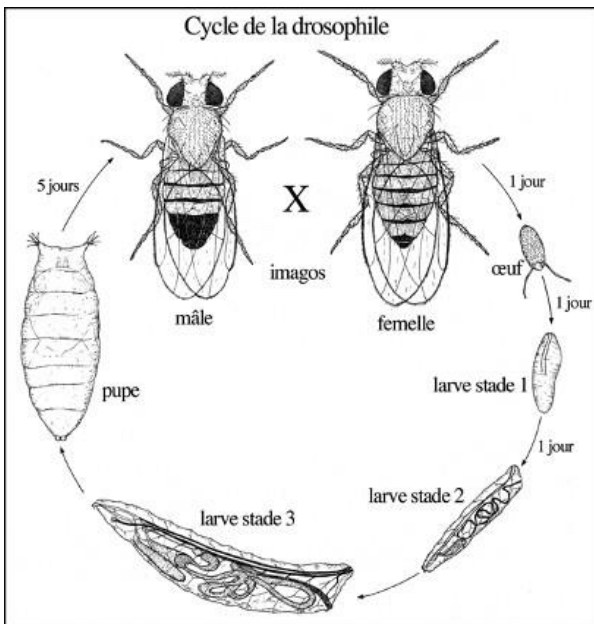


Figure 1. Cycle de vie de la drosophile *D. melanogaster*.

La drosophile est un insecte diptère (une seule paire d'ailes). Chez *D. melanogaster*, mâles et femelles se distinguent par plusieurs caractères dont la pigmentation des derniers segments postérieurs chez le mâle (dimorphisme sexuel). Le développement est discontinu : de l'œuf éclot une larve qui passe par 3 stades de croissance séparés par des mues (Ecdysozoaires), avant de s'immobiliser (stade puppe) et de se métamorphoser. L'individu adulte qui émerge de la puppe est appelé imago. Un cycle complet dure 10 jours à 25 °C. La femelle pond des œufs tout au long de sa vie si les conditions (température, nourriture, hygrométrie) sont favorables.



Figure 2. Femelle de drosophile en train de pondre.

Dans le milieu naturel, la femelle pond sur des fruits abimés (d'où le nom de *fruitfly* en anglais) sur lesquels des levures ont commencé à se développer. Elle est attirée par les produits de fermentation alcoolique (d'où le nom de mouche du vinaigre).

En laboratoire, on élève les drosophiles sur un milieu semi-solide composé de farine de maïs et de levure. L'accouplement n'est pas nécessaire à la ponte : un œuf pondu par une femelle vierge n'est pas fécondé (ne se développe pas), et présente exactement le même aspect qu'un œuf fécondé.

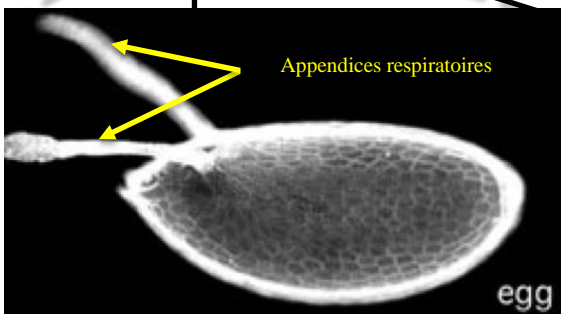
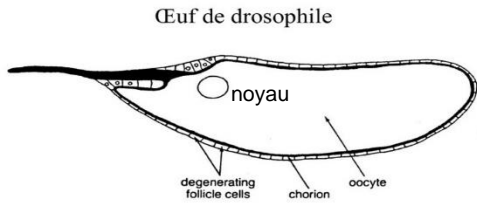


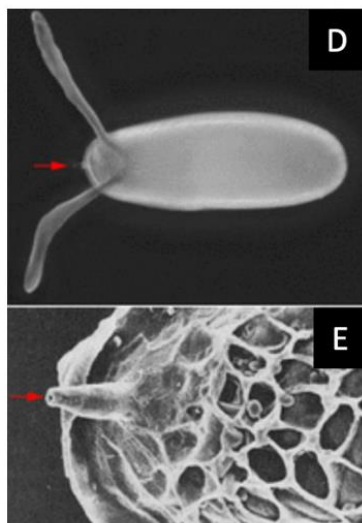
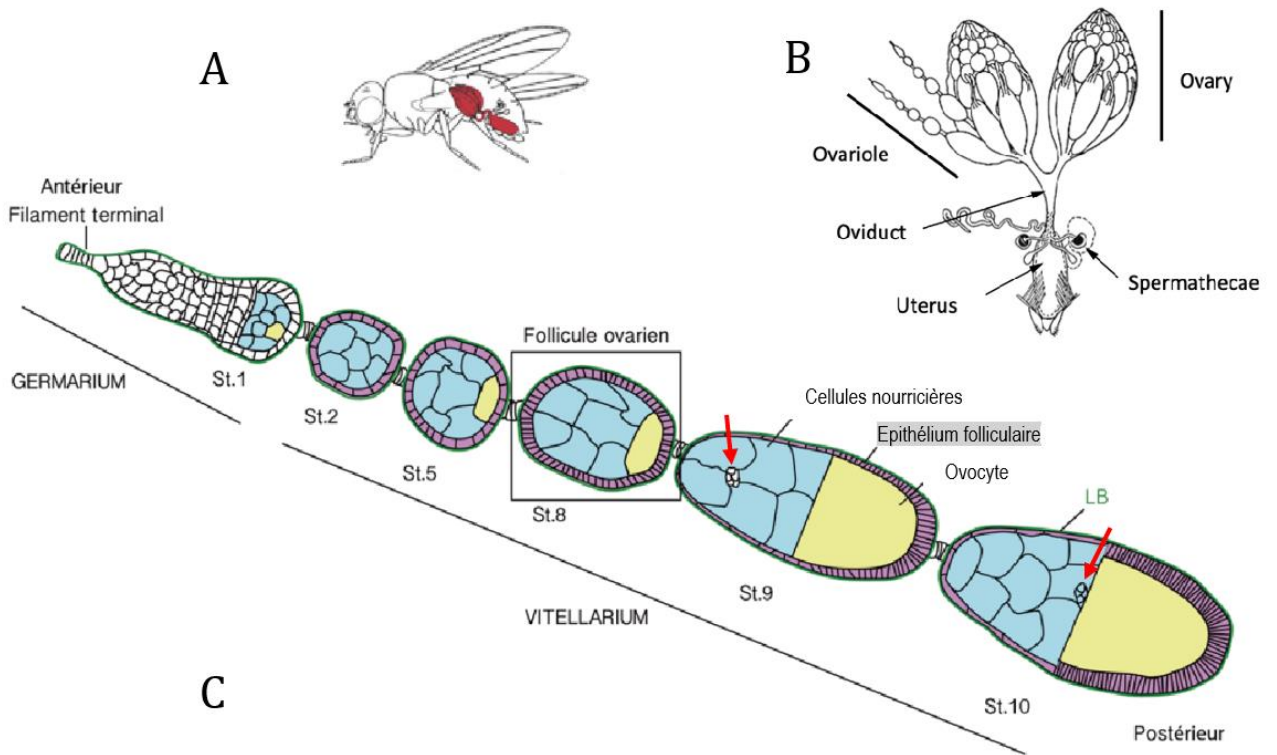
Figure 3. Vue externe d'un œuf.

L'œuf est asymétrique. On peut corréler cette asymétrie de l'œuf aux futurs axes du plan d'organisation de la larve : la région antérieure se trouve toujours du côté des appendices respiratoires (à gauche et en haut sur la photo), la face dorsale se forme toujours du côté le plus aplati de l'œuf (en haut sur la photo), le plan de symétrie bilatérale de l'œuf s'aligne avec celui de l'embryon et de la larve.

<sup>1</sup> Dans la suite du texte, on parlera de "cis-regulatory sequences", qui peuvent être soit activatrices ("enhancer") soit répressives sur la transcription.

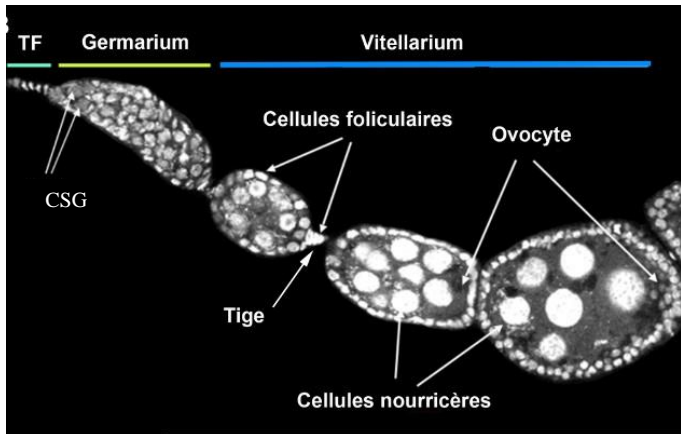


**Figure 4. Schéma d'un œuf de drosophile juste avant la ponte, vu en coupe sagittale.** L'ovocyte est une cellule asymétrique. Son noyau est localisé au futur pôle antéro-dorsal. L'ovocyte est entouré d'une couche de cellules folliculaires somatiques formant un épithélium squameux, également visible en Figure 3. La mort programmée de ces cellules se produit en fin d'ovogenèse laissant une enveloppe protectrice autour de l'œuf : le chorion.



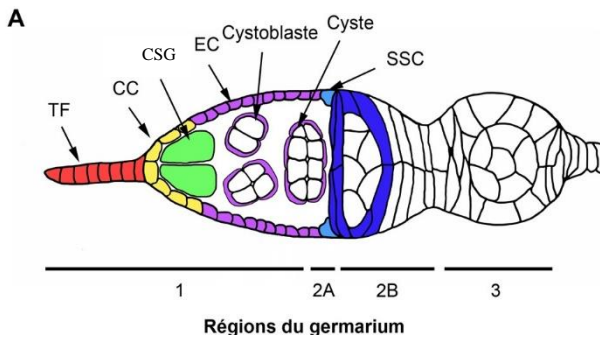
**Figure 5. Schémas de l'ovogenèse chez la drosophile.**

(A) Les deux ovaires (en rouge) occupent une large partie de l'abdomen. (B) Les ovaires sont réunis à leur base postérieure par un oviducte. La fécondation est interne : suite à l'accouplement, les spermatozoïdes sont stockés dans des spermatheques. Ils y restent fonctionnels pendant plusieurs semaines. Lorsque l'ovocyte traverse l'oviducte et atteint l'utérus, auquel sont connectées les spermatheques, il arrive en contact des spermatozoïdes et la fécondation a lieu. Chaque ovaire est composé d'environ une vingtaine d'ovarioles. (C) Chaque ovariole est constituée d'une chaîne de « chambres à œufs » ou « follicules ovariens ». Chaque follicule est une unité fonctionnelle constituée de cellules somatiques formant une monocouche épithéliale emballant un cyste de cellules germinales. Dans chaque cyste précoce, une seule des cellules germinales, située en position postérieure, se différencie en ovocyte. Les autres cellules sont des cellules nourricières. Elles sont reliées entre elles par des canaux. Les cellules nourricières sont transcriptionnellement actives tandis que l'ovocyte ne l'est pas. Vers le stade 9, un petit groupe de 6-8 cellules somatiques appelées cellules de la bordure, *border cells* en anglais (flèches rouges) se détache de l'épithélium folliculaire en effectuant une transition épithélio-mésenchymateuse. Le groupe se met en mouvement, traverse le cyste du pôle antérieur de la chambre à œufs vers le pôle postérieur, migrant entre les cellules nourricières jusqu'à atteindre l'ovocyte. A la fin de l'ovogenèse, les cellules de bordure participent à la formation du micropyle, un canal qui permet le passage du spermatozoïde à travers les enveloppes de l'œuf. (D-E) Images en microscopie à balayage montrant des vues dorsales d'un œuf pondu (antérieur à gauche) et le micropyle indiqué par une flèche rouge (zoom de la partie antérieure en E).



**Figure 6. Détail de l'organisation cellulaire de l'extrémité antérieure d'une ovariole.**

La coloration DAPI (molécule fluorescente qui se fixe à l'ADN), permet de distinguer les noyaux des cellules en microscopie à fluorescence (pic d'émission à 457 nm). Le germarium est situé du côté antérieur de chaque ovariole. Il contient les cellules souches germinales (CSG) et les cellules souches somatiques qui sont à l'origine des cellules formant les chambres à œuf successives. Chaque cyste est constitué d'une couche externe de cellules somatiques et de 16 cellules germinales. Une seule cellule germinale reste diploïde, l'ovocyte, tandis que les autres croissent par polyténisation (duplication des chromosomes non suivie de division cellulaire) et se différencient en cellules nourricières.



**Figure 7. Schéma de l'organisation du germarium.**

Les 16 cellules germinales sont toutes issues d'une même cellule produite par division asymétrique d'une cellule souche CSG, qui s'est ensuite divisée 4 fois. A l'extrémité postérieure du germarium, le cyste « bourgeonne ». Il reste associé au germarium par une tige de cellules somatiques. Le processus se répète continuellement au long de la vie de la femelle, ce qui produit une chaîne d'ovocytes à différents stades de l'ovogenèse dans chaque ovariole.

## 2- Problématique

Au cours de l'ovogenèse chez la drosophile, une chorégraphie complexe de processus cellulaires impliquant des cellules somatiques et germinales façonne l'ovocyte fécondable au sein de follicules ovariens. Pour mieux comprendre certains aspects de la morphogenèse de l'ovocyte, une lignée transgénique « *enhancer trap* » est utilisée pour marquer une sous-population de cellules dans l'ovaire. Le TP vise à identifier et caractériser les cellules marquées au cours de l'ovogenèse pour mieux comprendre leur rôle.

## 3- Objectifs méthodologiques

La figure 8 décrit brièvement le principe de l'*enhancer trap* (l'utilisation de gènes rapporteurs pour étudier les gènes du développement sera revue en cours et lors du TD1-méthodologie).

La lignée *enhancer trap* utilisée dans ce TP (*X-P-lacZ*) correspond à l'insertion du rapporteur *P-lacZ* dans un gène exprimé au cours de l'ovogenèse, qu'on appellera X. Ce gène est localisé sur le chromosome II.

Les mouches hétérozygotes pour l'insertion de ce transgène sont viables et fertiles. Les mouches homozygotes pour cette insertion sont également viables, mais les femelles sont stériles.

La lignée transgénique est maintenue à l'aide d'un « chromosome balancier ». Les caractéristiques d'un balancier sont les suivantes :

- La recombinaison avec un chromosome sauvage homologue n'est pas viable.
- Il porte un marqueur dominant qui permet de le suivre dans les croisements.
- Il porte un allèle « létal » récessif : les homozygotes pour ce balancier n'atteignent pas le stade reproducteur (imago).

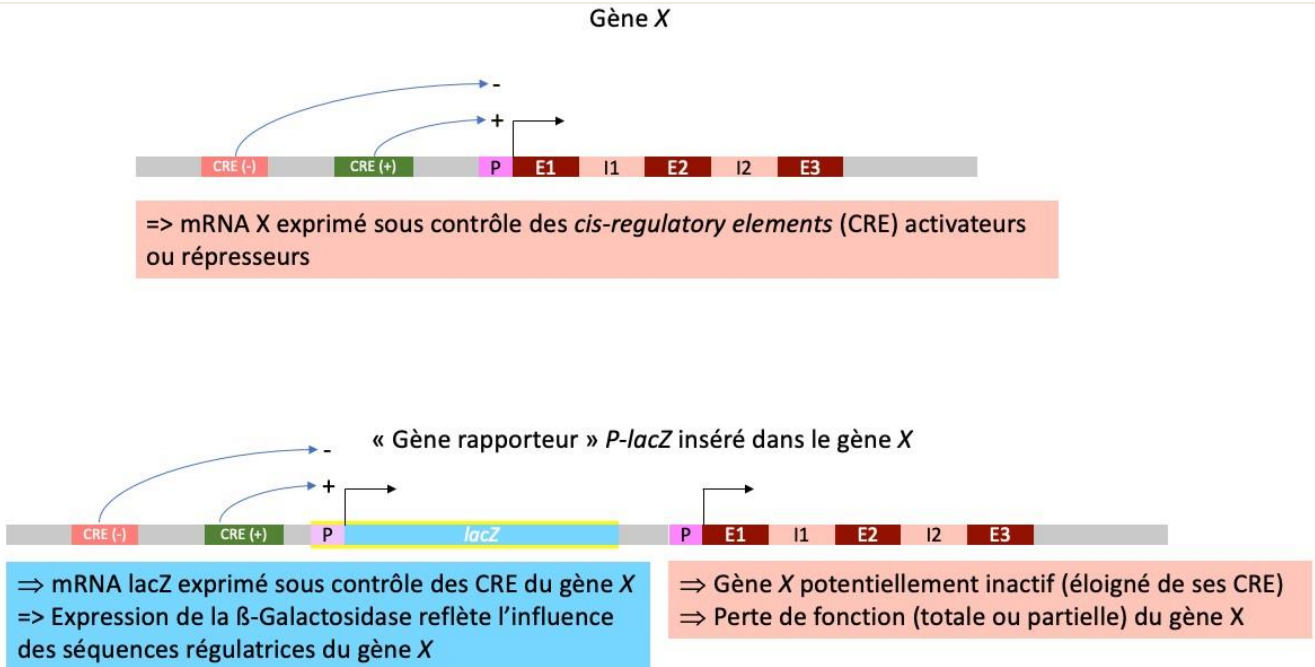
Le balancier utilisé ici est appelé *CyO*. Le marqueur dominant confère des ailes recourbées aux mouches hétérozygotes pour ce balancier.

Pour en savoir plus sur les balanciers : [https://www.youtube.com/watch?v=QYNmd\\_I4iys](https://www.youtube.com/watch?v=QYNmd_I4iys)

### Figure 8. Principe de l'enhancer trap.

La structure d'un gène eucaryote typique, appelé ici gène X, est montrée dans la partie haute de la figure. Le gène X est composé d'un promoteur basal (P) sur lequel se fixe le complexe RNA PolIII, d'une région transcrite constituée d'exons et d'introns, et de séquences cis-régulatrices ou « *cis-regulatory sequences* » (CRE) qui peuvent jouer un rôle activateur (+) ou répresseur (-). Ces séquences sont nécessaires pour la fixation des facteurs trans-régulateurs (non représentés sur le schéma) qui activent ou répriment la transcription du gène X, dans le temps et dans l'espace.

Dans la partie basse de la figure, une séquence *P-lacZ*, constituée d'un promoteur basal et d'un cDNA codant la  $\beta$ -galactosidase de *E. coli*, est insérée entre les CRE du gène X et sa région transcrite. Les CRE du gène X se trouvent alors placés à proximité du promoteur basal de *P-lacZ*. La transcription de *P-lacZ* passe ainsi sous contrôle des CRE du gène X. Le gène X, le plus souvent, est alors soit totalement, soit partiellement inactivé.



## 4- Matériel fourni et expériences à réaliser

Vous avez à votre disposition un tube contenant des mouches du stock *X-P-lacZ / CyO*. Les solutions et des aliquotes ont été préparées par le personnel technique et enseignant.

### Jour 1 :

- 1) Transférez quelques mouches sur un bloc plastique congelé recouvert d'un sopalin. Ceci permet d'endormir les mouches par refroidissement. Observez les différents phénotypes et distinguez les mâles et les femelles. Prélevez 5 femelles hétérozygotes et 5 femelles homozygotes. Les placer séparément dans un tube Eppendorf de 2 ml vide, et conservez-les sur la glace jusqu'à la dissection. Les mouches restent endormies.
- 2) Transférer une mouche dans une coupelle en verre contenant du PBS froid. Si vous le souhaitez, séparez la tête du thorax à l'aide de pinces pour l'euthanasier. Pincer la mouche au niveau du thorax, et ouvrir l'abdomen (dorsalement ou ventralement, à vous de tester !), délicatement de l'avant vers l'arrière. Les ovaires restent attachés à la cuticule par l'extrémité de l'utérus. Séparer les ovaires de la carcasse et les transférer à l'aide d'une pipette Pasteur au fur et à mesure dans un tube Eppendorf de 0,5 ml, et conserver sur glace. Répéter l'opération avec les autres mouches, et pour les deux génotypes.

- 3) Lorsque la dissection est terminée, enfiler des gants, allez sous la sorbonne (enceinte ventilée), videz le PBS (à l'aide de la pipette Pasteur) puis ajoutez 500 µl de fixateur (aliquote fournie par l'enseignant·e) dans chaque tube. Retournez le tube plusieurs fois pour homogénéiser la solution. Laissez vos tubes 15 minutes sous la sorbonne pour fixer à température ambiante. Ne pas réchauffer le tube dans vos mains !
- 4) Sous la sorbonne, à l'aide d'une pipette Pasteur, aspirer le fixateur, jetez le dans la poubelle dédiée, puis ajoutez 500 µl de PBS. Fermez le tube, mélangez, laissez décanter les ovaires au fond du tube, puis aspirez le surnageant et jetez-le dans la poubelle dédiée.
- 5) Hors de la hotte, effectuez deux lavages de 5 minutes en PBS.
- 6) Après le dernier lavage, remplacez le PBS par 200 µl de solution de coloration (aliquote fournie par l'enseignant·e), tapotez le tube délicatement pour mélanger.
- 7) Incuber la nuit à 37°C à l'obscurité.

## Jour 2 :

- 1) Etiquetez une lame de verre (génotype, numéro, et vos initiales)
- 2) Aspirez la solution de coloration, puis rincez deux fois avec 500 µl de PBS. Remplacez le tampon par du glycérol.
- 3) Transférez un ovaire (ou une paire d'ovaires) sur la lame de verre à l'aide d'une P200 munie d'un cône que vous aurez coupé à quelques mm de son extrémité la plus fine pour l'agrandir et permettre d'aspirer les ovaires sans les abîmer.
- 4) Maintenir l'extrémité postérieure de l'ovaire avec une pince fine et séparez les ovarioles à l'aide des « minuties » fournies.
- 5) Eliminez les stades tardifs (œufs volumineux) s'il y en a dans votre préparation. Eliminez les autres déchets (fragments de cuticule, de tube digestif...) puis déposez autour des ovarioles 20 µl de glycérol.
- 6) Déposez délicatement une lamelle sur la préparation, scellez les 4 coins au vernis à ongle. Laissez sécher le vernis 5 minutes.
- 7) Répétez ces étapes avec un autre ovaire du même génotype.
- 8) Répétez ces étapes pour l'autre génotype. Etiquetez bien toutes vos lames.

## 5- Observations et schématisations

- Repérez les différents stades de l'ovogenèse chez les hétérozygotes *X-P-lacZ/CyO*, en utilisant les critères (Figure 5C), depuis le germarium jusqu'au pôle postérieur de l'ovariole (stades tardifs).
- Réalisez sur une feuille A4, à partir de vos observations, 5 schémas de chambres ovariennes représentatives des marquages observés en faisant apparaître les différents types cellulaires. Vous représenterez les stades suivants :
  - Stade 2, 3 ou 4
  - Stade 5, 6 ou 7
  - Stade 8
  - Stade 9
  - Stade 10
- Sur les préparations d'ovaires homozygotes pour *X-P-lacZ*, recherchez les stades 8, 9 et 10, schématisez-les (3 dessins), puis coloriez en bleu sur votre schéma les cellules marquées par la coloration X-Gal.
- Numérotez et légendez le plus complètement possible toutes vos figures.

## 6- Interprétation (compte-rendu à rédiger et à rendre sous quinze jours après la séance).

Pour rédiger ce compte-rendu, argumentez vos réponses aux questions suivantes en vous référant aux résultats obtenus à partir de vos observations. Citez dans vos réponses les figures sur lesquelles vous appuyez pour votre analyse (description et interprétation).

### 1) Génotype/phénotype des individus observés

Le site d'insertion de la séquence *P-lacZ* dans le gène *X* a été localisé 223 bp en amont du site d'initiation de la transcription du gène *X*.

- En utilisant la même schématisation que sur la Figure 8, représentez le génotype des femelles hétérozygotes *X-P-lacZ* / + et celui des femelles homozygotes *X-P-lacZ* / *X-P-lacZ*.
- Les femelles hétérozygotes *X-P-lacZ* / + sont fertiles. Par contre, les femelles homozygotes pour *X-P-lacZ*, croisées par des mâles sauvages, sont stériles : elles pondent des œufs mais ces œufs ne se développent pas. Interprétez ce résultat.
- La délétion du gène *X* est létale à l'état homozygote. En tenant compte de ce résultat ainsi que celui de la question précédente (1b), précisez l'effet de l'insertion de *P-lacZ* sur la transcription du gène *X*.

### 2) Chez les hétérozygotes :

- A quel stade apparaissent les cellules marquées chez les hétérozygotes ?
- Où sont-elles localisées à ce stade ?
- Décrire la localisation des cellules marquées aux stades 8, 9 et 10.
- Interprétez : D'après le marquage observé, quelles hypothèses peut-on faire sur la fonction du gène *X* ?

### 3) Chez les homozygotes :

- Pourquoi le marquage est-il plus fort chez les homozygotes ?
- Quelles sont les modifications du marquage cellulaire observées chez les homozygotes, dans le temps, et dans l'espace, par rapport aux hétérozygotes ? Quels processus cellulaires sont affectés ?
- Que peut-on en conclure quant à la fonction du gène *X* ?
- Comment reliez-vous cette fonction à la stérilité des femelles homozygotes pour *X-P-lacZ* ?

## Solutions utilisées

**Tampon** (pour la dissection) :

- PBS 1X : Phosphate buffer saline, pH 7,6

**Solutions** (fournies par l'enseignant-e) :

**Fixateur**, pour 1 ml (2 x 500 µl) :

- PBS 1X 900 µl
- Formaldéhyde (40%) 100 µl
- MgCl<sub>2</sub> 0,1M 10 µl

**Solution de Coloration**, pour 1 ml (préparer 4 ml pour 10 binômes, 400 µl/binôme pour deux échantillons)

- PBS 1X 950 µl
- MgCl<sub>2</sub> 0,1M 10 µl
- Ferri-Ferro 35 µl
- X-Gal 10% 15 µl