

Etude génétique d'un mutant méiotique dominant chez *Caenorhabditis elegans*, souche Bergerac ⁽¹⁾

Bernard BEGUET

Laboratoire de Génétique physiologique et Nématologie,
Université Claude-Bernard, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, Villeurbanne, France.

RÉSUMÉ

Chez *Caenorhabditis elegans*, la souche sauvage produit par autofécondation à côté des hermaphrodites, de très rares mâles (10^{-3}). Leur présence s'explique par la production de rares gamètes nullo-X au cours de la gamétogenèse de l'hermaphrodite XX conduisant ainsi à quelques descendants XO de phénotype mâle. Après mutagenèse, une souche mutante F69 ségrégeant 20% de mâles a été obtenue. La mutation autosomique *f69 dm* en cause est dominante et agit vraisemblablement au niveau de la ségrégation des X au cours de la méiose. Elle provoque en outre la stérilité d'un pourcentage élevé d'hermaphrodites (17%).

SUMMARY

Genetic study of a dominant meiotic mutant in Caenorhabditis elegans, strain Bergerac

In *Caenorhabditis elegans*, wild-type hermaphrodites produce by self-fertilization hermaphrodites mainly with only a low frequency of males (10^{-3}). This XO male progeny is produced by nullo-X gametes. A mutant with increased frequency of males was found during a search for ethane-methane-sulfonate induced mutants. This mutation *f69 dm* is dominant and is located in an autosomal linkage group. Homozygous *him/him* or heterozygous *him/+* hermaphrodite for this mutation gave rise to approximately 20% males. They also produced 17% sterile hermaphrodites. Such mutants might allow analysis of meiosis in this organism because it reflects some kind of chromosomal abnormality. Probably, X loss occurs by a meiotic nondisjunction mechanism in both gametic lines.

Il est indéniable, que chez les nématodes, comme chez la drosophile, la connaissance des variations d'un caractère quantitatif aussi important que la fécondité nécessite l'obtention de nombreux mutants affectés à différents niveaux de la gamétogenèse. L'étape essentielle de cette gamétogenèse étant la méiose, il est donc intéressant d'isoler des mutants affectant ce processus sans que son déroulement en soit arrêté, ne conduisant pas ainsi à la stérilité de l'hermaphrodite muté.

Dans cette perspective, *Caenorhabditis elegans* constitue un matériel de choix. En effet, chez

cet hermaphrodite protandre autofécond, la cytologie concernant essentiellement la prophase méiotique ovogénétique a été très largement décrite en microscopie photonique par Brun et Nigon (1955) et en microscopie électronique par Abirached (1974). D'autre part, le minutage des étapes de la gamétogenèse a été défini par Hirsh, Oppenheim et Klass (1976).

Cependant, les études génétiques concernant la méiose chez *C. elegans* sont encore très peu nombreuses (Béguet, 1974; Hodgkin, 1975; Herman, Albertson & Brenner 1976). Dans ce travail, nous nous intéressons à une catégorie de mutants méiotiques aisément détectables du fait qu'ils ségrégent, par autofécondation, de nombreux mâles. En effet, ces hermaphrodites mutants XX donnent de nombreux gamètes

(¹) Travail exécuté grâce à une aide financière du C.N.R.S. (L.A.92).

nullo-X, si bien que dans leur descendance on observe, à côté des hermaphrodites XX, 20% d'individus XO de phénotype mâle. Rappelons que les hermaphrodites sauvages de la souche Bergerac ségrègent environ 10^{-3} mâles (Nigon, 1949).

Matériel et Méthode

Ce mutant méiotique a été isolé en F_2 , après mutagenèse à l'éthyl-méthane-sulfonate de jeunes larves sauvages parentales du 2^e stade larvaire (L_2). A chaque génération, cette mutation est maintenue à 18 °C en prélevant et en mettant en élevages individuels 20 hermaphrodites frères provenant d'un même parent ségrégant de nombreux mâles dans sa descendance. Cette lignée est appelée F 69, le gène la caractérisant *him (f 69) dm* et la mutation *f 69 dm* en accord avec les recommandations de Horvitz (comm. pers.) concernant la nomenclature génétique propre à *C. elegans*. Dans le restant du texte, lorsqu'il n'y aura pas d'ambiguïté, le gène sera dénommé *him* (high incidence of males) (Hodgkin, 1974).

Pour son analyse génétique, c'est-à-dire la détermination de sa dominance ou récessivité et sa liaison ou non au chromosome X, un mutant récessif lié à X, *dpy (f 10) - X*, de phénotype dumpy a été utilisé. Ce mutant a été isolé et cartographié par Ouazana (1975), sous l'appellation *dpy-y*.

Dans cette analyse, effectuée à 18 °C, les croisements parentaux (cf. Fig. 1) ont été assurés en groupant 20 fois 10 mâles F 69 et 5 hermaphrodites DPY, de façon à augmenter le pourcentage de fécondation croisée. En effet, un seul rapprochement sur vingt s'est avéré positif.

Les hermaphrodites F_1 , issus de la fécondation croisée, et les hermaphrodites F_2 , issus de l'autofécondation de ces F_1 , ont été mis en cultures individuelles à la fin du 4^e stade larvaire (L_4), c'est-à-dire avant l'état adulte, de façon à ce qu'ils ne soient pas éventuellement fécondés par leur frère ; leur ponte a été fractionnée en quatre périodes de 24 heures, sensiblement égales.

Le dénombrement de la descendance des F_1 ou F_2 a été effectué lorsque les animaux F_2 et

F_3 atteignent tout juste l'état adulte (4,5 j). sous la loupe binoculaire au grossissement 25.

L'étude de la viabilité des œufs de la lignée F 69 (correspondant au développement de ceux-ci jusqu'à l'état adulte) a été réalisée en analysant des lots de 25 œufs F_4 (du stade 1 au stade gastrula), issus chacun de la ponte pendant 24 heures de 50 hermaphrodites « frères » F_3 provenant d'un même grand-parent sauvage F_2 du lot A ou du lot B (Fig. 1).

MÉTHODOLOGIE GÉNÉTIQUE

Celle-ci est résumée dans la figure 1.

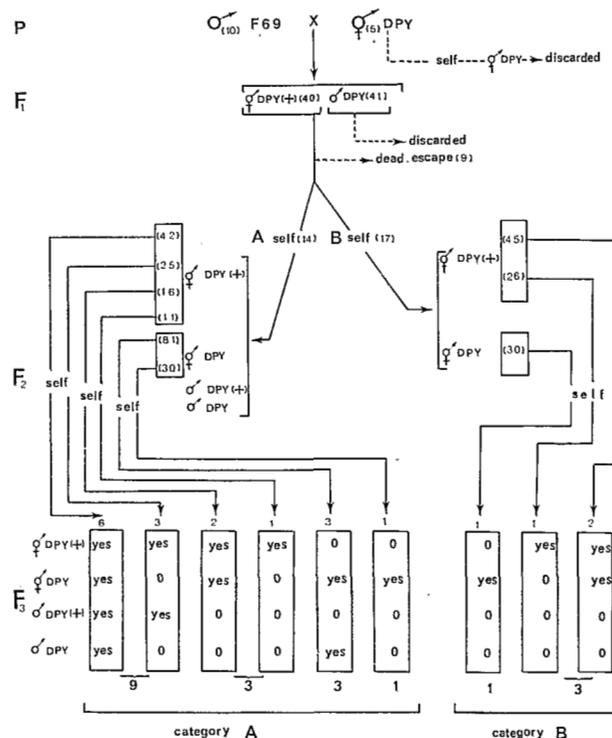


Fig. 1 : Schéma du croisement génétique impliquant F69. *Dpy* est le marqueur *dpy (f10) - X*, une mutation récessive liée au sexe produisant des nématodes nains ; σ° mâle ; σ° hermaphrodite. Self veut dire que les hermaphrodites sont en autofécondation. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'individus utilisés

Diagram of genetic cross involving (F69.) *Dpy* is the marker *dpy (f10) - X*, a sexlinked recessive mutation causing DPY worms ; σ° male ; σ° hermaphrodite. Self indicates that hermaphrodites were allowed to undergo self fertilization. Number in parentheses indicate number of individuals.

Les produits F_1 , issus de la fécondation croisée parentale se distinguent aisément de ceux de l'autofécondation du parent DPY qui ne fournit que des hermaphrodites de phénotype DPY : ils sont, en effet, soit hermaphrodites DPY(+), soit mâles DPY.

Tous les hermaphrodites DPY (+) F_1 ainsi obtenus ont été mis individuellement en autofécondation de manière à déterminer le nombre de catégories phénotypiques F_2 produites. Les hermaphrodites F_1 se sont ainsi répartis en deux catégories A et B. La catégorie A fournit quatre phénotypes en F_2 : hermaphrodites DPY(+), hermaphrodites DPY, mâles DPY (+) et mâles DPY. La catégorie B, par contre, ne donne naissance qu'à deux phénotypes : hermaphrodites DPY (+) et hermaphrodites DPY.

Un échantillon représentatif d'hermaphrodites F_2 de chacune des deux catégories ainsi définies a été prélevé, étudié et classé en fonction du nombre de phénotypes obtenus en F_3 .

Cette analyse systématique de la descendance F_3 d'un grand nombre de F_2 (306) nous a permis de déterminer le génotype des F_2 ainsi que leur fréquence.

Résultats

DÉTERMINISME DU SEXE DES MÂLES F 69 ET GÉNOTYPES DES MÂLES F 69 PARENTAUX

La présence, en F_1 , d'autant d'hermaphrodites DPY (+) que de mâles DPY, nous permet d'affirmer que les mâles F 69 sont digamétiques et ne correspondent pas à des hermaphrodites XX transformés en mâles comme ceux obtenus par Hodgkin (1974) dans la souche Bristol (gène *tra*). Ces mâles F 69 doivent donc présenter une constitution hétérochromosomique XO. L'utilisation de plusieurs mâles parentaux (cf. supra) ainsi que la présence de deux catégories A et B d'hermaphrodites DPY (+) en F_1 , ne nous permet pas de déterminer précisément le nombre de mâles parentaux fécondants et leur génotype.

Cependant, le nombre pratiquement équivalent d'hermaphrodites F_1 A et F_1 B nous conduit logiquement à n'envisager que deux possibilités à ce sujet : soit un mâle parental hétérozygote *him*/+ ou hémizygoté *him*/0, soit deux mâles

simultanément : l'un *him*/*him* et l'autre *him* (+)/*him* (+).

Comme nous allons le voir, la non-liaison au chromosome X de la mutation *f 69 dm* étant confirmée par l'étude de la descendance en F_2 et F_3 , la conception de l'hémizygotie *him*/0 doit être abandonnée. Par ailleurs, compte tenu de la rareté de la réussite des croisements (un cas sur vingt), l'intervention d'un seul mâle *him*/+ est plus probable que celle de deux mâles simultanément. Nous considérerons donc cette hypothèse en première approximation (Fig. 2).

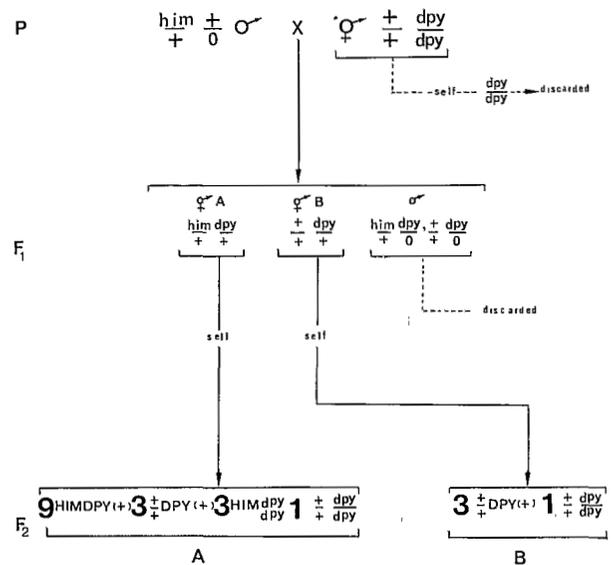


Fig. 2 : Schéma du croisement impliquant le gène *him* (*f69*) (cf. fig. 1). *Him* est une mutation dominante et *dpy* un marqueur récessif lié à X. A la génération F_2 : HIM = hermaphrodites qui ségrègent des mâles ; +/+ = hermaphrodites ne ségrègent aucun mâle.

Diagram of genetic cross involving *him* (*f69*) gene (fig. 1). *Him* is a dominant mutation and *dpy* a sex-linked marker. In F_2 generation : HIM = hermaphrodites that produce males ; +/+ = hermaphrodites that produce no males.

DOMINANCE ET NON-APPARTENANCE AU GROUPE DE LIAISON X DE LA MUTATION *f 69 dm*

Puisque les hermaphrodites F_1 de la catégorie B ségrègent uniquement des hermaphrodites, l'analyse génétique ne peut se faire qu'à partir de la catégorie A (cf. Fig. 1 et Fig. 2).

On constate que, par autofécondation des hermaphrodites F₁ A de génotype *him/+*, *dpy/+*, des mâles DPY (+) et DPY apparaissent en F₂. Ceci suppose que la mutation *f 69 dm* est soit semi-dominante, soit dominante. En effet, d'après les schémas classiques mendéliens, si la mutation était récessive, les hermaphrodites de génotype récessif *him/him*, n'apparaissant qu'en F₂, ne pourraient élaborer des gamètes nullo-X et par autofécondation produire des mâles qu'en F₃. Ici, au contraire, on voit qu'un seul allèle muté *him* au niveau de la F₁ est suffisant pour la formation de gamètes nullo-X. Par ailleurs, comme la fréquence des mâles dans la descendance F₁ n'est pas significativement différente de celles trouvées au niveau du maintien de la souche et aux autres générations étudiées (Tab. 1), ceci nous conduit à penser que la mutation *f 69 dm* est une mutation dominante.

L'étude de la répartition des génotypes de tous les hermaphrodites F₂ issus des hermaphrodites F₁ A *him/+*, *dpy/+* (cf. Fig. 1 et Fig. 2)

montre que *him* et *dpy* ségrègent comme deux gènes mendéliens indépendants. *Him* appartient donc à un groupe de liaison autosomique.

CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES DES DIFFÉRENTS GÉNOTYPES OBTENUS AUX DIFFÉRENTES GÉNÉRATIONS

Nous avons étudié le pourcentage global de mâles, l'évolution de celui-ci avec l'âge parental, ainsi que la viabilité des œufs de la lignée F 69 et de la lignée sauvage.

Pourcentage global de mâles

Comme il n'est pas possible, mis à part en F₁ A, de faire la distinction entre les génotypes *him/him* et *him/+*, étant donnée la dominance de l'allèle muté *him*, le génotype pour ce gène sera désigné par *him/●*. On n'a étudié que l'association de *him* avec *dpy (+)* ou *dpy*, comme le révèle le tableau 1.

Tableau 1
Pourcentage de mâles des différents génotypes.

Table 1
Frequency of males of different genotypes

Génération	Génotypes*	Nbre d'hermaphrodites parentaux	Nbre de descendants adultes	Nbre de mâles	Pourcent de mâles $\frac{\delta}{\delta + \delta}$
Souche d'entretien	<i>him/●, dpy(+)/dpy(+)</i>	62	9 095	1 681	18,48
F ₁	<i>him/+, dpy(+)/dpy</i>	14	1 017	178	17,50
	<i>him/●, dpy(+)/dpy(+)</i>	14	1 831**	394	21,51
F ₂	<i>him/●, dpy(+)/dpy</i>	25	3 289**	682	20,73
	<i>him/●, dpy/dpy</i>	17	648	126	19,44

* : Voir le texte pour la définition du génotype *him/●*

** : La fécondité totale moyenne des génotypes étudiés pour lesquels on a pu dénombrer la descendance totale varie entre 110 et 130, alors que celle de la souche sauvage standard est égale à 140.

* : see the text for definition of genotype *him/●*

** : Mean total fecundity of genotypes studied varied from 110 to 130, whereas that of the wild type population was 140.

Ces résultats nous montrent que la proportion de mâles issus de la souche F 69, portant la mutation *him (f 69) dm*, est constante quel que soit le génotype étudié et se situe autour de 20%.

Pourcentage de mâles en fonction de l'âge des géniteurs F₂ A

Le tableau 2 présente la répartition des mâles dans la génération F₃ pour l'ensemble des génotypes *him/●, dpy (+)/dpy (+)* et *him/●, dpy (+)/dpy* par rapport au nombre total de descendants en fonction de l'âge des géniteurs.

Ainsi, l'âge parental n'influe pas significativement sur la proportion de mâles obtenus dans la descendance des hermaphrodites F₂ A HIM DPY (+)

Viabilité des œufs issus des phénotypes F₂ DPY (+)

Le tableau 3 donne les résultats concernant la viabilité des œufs F₄ issus de deux catégories phénotypiques d'hermaphrodites F₂ HIM DPY (+) et HIM (+) DPY (+) (cf. Fig. 2).

Tableau 2

Pourcentage des mâles obtenus dans la descendance F₃ pour l'ensemble des F₂A de phénotype HIM DPY(+) lors de la première moitié, deuxième moitié et dernier quart de leur ponte.

Table 2

Male frequency for F₂A hermaphrodites of HIM DPY(+) phenotypes among different egg-laying periods.

<i>Age parental</i>	<i>Descendance adulte</i>	<i>Mâles</i>	<i>Pourcent de mâles</i>
Première moitié de la ponte*	3 541	744	21,01
Deuxième moitié de la ponte*	3 219	680	21,12
Dernier quart de la ponte**	548	107	19,52

Etude faite à partir de * 94 hermaphrodites F₂, ** 39 hermaphrodites F₂

*Study with * 49 hermaphrodites F₂, ** 39 hermaphrodites F₂*

Tableau 3

Comparaison entre les viabilités des œufs F₄ issus de deux ensembles phénotypiques concernant les hermaphrodites F₂, HIM DPY(+) et HIM(+) DPY(+).

Table 3

Viabilities of F₄ eggs laid by HIM DPY(+) and HIM(+) DPY(+) hermaphrodites.

<i>Phénotype des F₂A</i>	<i>Nbre d'œufs F₄ repiqués*</i>	<i>Descendance totale**</i>	<i>Hermaphrodites adultes</i>	<i>Mâles Hermaphrodites à croissance ralentie***</i>	<i>Pourcent C.R.</i>	<i>Pourcent mâles****</i>	<i>Viabilité *****</i>
HIM DPY(+)	250	208	147	25	36	17,30	17,00
HIM(+) DPY(+)	250	181	172	1	8	4,40	0,58

* : prélevé avant le stade gastrula, ** : dénombrée cinq jours plus tard, *** : C.R. = animaux à croissance ralentie, **** : défini comme dans le tableau 1, ***** : définie par le rapport descendance normalement développée sur le nombre d'œufs repiqués.

* : picked up before gastrula stage, ** : counted five days after, *** : C.R. = worms growing extremely poorly, **** see table 1 for definition, ***** : the ratio of progeny growing normally to the number of picked up eggs.

On peut en conclure que :

- la viabilité est sensiblement équivalente dans les 2 cas.
- le pourcentage d'animaux à développement ralenti est bien plus élevé dans la descendance des hermaphrodites de phénotypes HIM.

Une étude préliminaire nous a permis de voir que les hermaphrodites à croissance ralentie (issus des hermaphrodites HIM), qui présentent une membrane très proéminente au niveau de la vulve, sont stériles. Ceci nous laisse supposer que ces hermaphrodites à croissance ralentie ont une constitution chromosomique anormale.

Conclusions

Dans la souche F 69, une mutation dominante autosomique *him (f 69)* dm provoque une augmentation de la fréquence des mâles dans la descendance d'hermaphrodites porteurs de cette mutation : 200 % au lieu de 1 %. Cette haute fréquence varie très peu avec la constitution génotypique. Par ailleurs, elle ne varie pas avec l'âge parental. Par contre, on a pu mettre en évidence que ces mêmes hermaphrodites F 69 ségrègent, à côté des hermaphrodites féconds et des mâles, un pourcentage élevé d'hermaphro-

dités stériles (17%) dont la croissance est ralentie. La mutation *him (f 69)* dm est donc pléiotrope.

Discussion

Du fait de sa dominance, le mutant méiotique *him* se révèle d'un intérêt exceptionnel. Les mutations dominantes affectant la méiose sont en effet extrêmement rares. Ainsi, chez *Drosophila*, parmi 500 mutants méiotiques décrits, un seul *mei-S332* est semi-dominant (Baker & Hall, 1976), chez *C. elegans* souche Bristol sur 619 mutants isolés par Brenner (1974), aucun ne se classe dans cette catégorie. A ma connaissance, *him f 69* dm est donc la seule mutation dominante connue chez *C. elegans* non-létale ou stérile affectant la physiologie de la reproduction. Son utilité dans l'analyse génétique de la gamétogenèse est encore accrue par le fait qu'elle ne provoque qu'une très faible réduction de fécondité si on la compare avec un mutant méiotique de la souche Bristol de même nature mais récessif *him-1 (e879)* ségrégant environ 25 % de mâles, Hodgkin (1974). Cette comparaison est résumée dans le tableau 4.

Tableau 4

Comparaison de deux mutants méiotiques *him(f69)* dm (souche Bergerac) et *him-1(e879)* (souche Bristol) isolés chez *C. elegans*.

Table 4

Comparison between two meiotic mutants *him(f69)* dm (strain Bergerac) and *him-1(e879)* (strain Bristol) isolated in *C. elegans*.

Nature de la mutation	Groupe de liaison	Réduction en pourcent de la fécondité des hermaphrodites de la souche par rapport à la souche sauvage	Pourcentage des mâles dans la descendance	Présence d'hermaphrodites triplo-X dans la descendance en pourcent	Présence d'hermaphrodites à croissance ralentie stériles	Influence de l'âge parental sur la fréquence des mâles produits	Niveau d'action du gène
<i>him(f69)</i> dm dominante autosomique		15	20	?	oui	pas décelable	méiose II?
<i>him-1(e879)</i> récessive autosomique	L G I	50-67	21-25	5	non décrit	oui variation de 27 à 21	méiose I

On peut envisager que, bien que la fréquence des mâles obtenus soit pratiquement identique pour les deux mutants, les niveaux d'action de chacune des deux mutations sur le contrôle génétique des processus méiotiques doivent vraisemblablement être différents.

En ce qui concerne l'action du gène *him* (*f 69*) dans la gamétogenèse de l'hermaphrodite, deux questions essentielles se posent :

— le déroulement de la méiose est-il perturbé dans une seule ou dans les deux lignées gamétiques (spermatogenèse et ovogenèse) ?

— la non-disjonction au niveau des chromosomes X a-t-elle lieu à la méiose I ou à la méiose II ?

Pour répondre à ces questions, des études cytologiques, essentiellement à l'aide de la réaction de Feulgen, ont été entreprises au niveau de la prophase méiotique ovogénétique (méiose I) des hermaphrodites de la souche F 69. Celles-ci n'ont pas permis de déceler des anomalies chromosomiques fréquentes durant cette période (N. Mounier, comm. pers.). Les premières observations de la deuxième division de maturation n'ont pas été probantes, mais il est vrai qu'elles sont difficiles, à cause de la petite taille des chromosomes de *C. elegans*.

Aussi, seules des études génétiques, comparables à celles effectuées par Hodgkin (1974) pour le gène *him-1*, nous permettront de déterminer le moment de la non-disjonction des X. Nous prévoyons d'utiliser, pour cela, trois marqueurs récessifs de phénotypes différents, l'un autosomique et les deux autres liés à X.

Signalons, enfin, que le mutant *him* (*f 69*) dm sera extrêmement utile pour d'autres études génétiques, plus spécialement pour l'obtention de mutations létales ou non liées à X directement décelables chez les mâles XO ainsi que celles conduisant à la perturbation de la spermatogenèse.

Accepté pour publication le 1^{er} septembre 1977.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur J. Brun pour l'aide qu'il m'a apportée lors de la rédaction de ce manuscrit, ainsi que Mmes C. Bosch et M. Tardy pour leur assistance technique.

RÉFÉRENCES

- ABIRACHED, M. (1974). *Aspects ultrastructuraux de l'ovogenèse de Caenorhabditis elegans*. Thèse, Univ. Claude Bernard, Lyon, France 55 p.
- BAKER, B. & HALL, J. (1976). Meiotic mutants : Genetic control of meiotic recombination and chromosome segregation. In Ashburner & Novitsky (Eds) : *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 1 New-York Academic Press : 351-434.
- BEGUET, B. (1974). Un exemple de dérive méiotique chez un nématode libre autofécond *Caenorhabditis elegans*. *C. r. hebd. Séance Acad. Sci., Paris, (D)*, 279 : 2115-2118.
- BRENNER, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77 : 71-94.
- BRUN, J. & NIGON, V. (1955). L'évolution des structures nucléaires dans l'ovogenèse de *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900. *Chromosoma*, 7 : 129-169.
- HERMAN, R., ALBERTSON, D. & BRENNER, S. (1976). Chromosome rearrangements in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 83 : 91-105.
- HIRSH, D., OPPENHEIM, D. & KLASS, M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 49 : 200-219.
- HODGKIN, J. (1974). *Genetic and anatomical aspects of the Caenorhabditis elegans male*. Ph. D. Thesis., Darwin College, Cambridge, England.
- NIGON, V. (1949). Les modalités de la reproduction et le déterminisme du sexe chez quelques nématodes libres. *Annls Sci. nat. Zool.*, 11 : 1-132.
- OUAZANA, R. (1975). *Etude génétique physiologique et morphologique du nanisme dumpy, chez le nématode hermaphrodite Caenorhabditis elegans var. Bergerac*. Thèse, Univ. Claude Bernard, Lyon, France 44 p.