Cours de Françoise POIRIER
Date: 20/12/2012
Ronéotypeur: Michel DANON

ANIMAUX TRANSGENIQUES

Un animal transgénique comporte deux propriétés:

- Une intégration stable d'un ADN exogène (= transgène) dans le génome
- Le transgène est transmis en tant que caractère mendélien

Pourquoi étudier la souris?

- C'est un modèle pertinent car ressemblant à l'Homme
  - 60 x 10^6 années entre l'Homme et la souris
  - Chez les mammifères, la transcription commence tôt dans le développement
  - Importance des tissus extra-embryonnaires
  - Immunologie
  - Maladies humaines
  - Comportement
- L'élaboration d'expériences génétiques est possible

Caractéristiques de la souris:

- Temps de gestation: 19-21 jours
- Taille d'une portée: 6-15 souriceaux
- Temps de génération: 10 semaines (5 générations par an)
- Génome murin: 3 x 10^9 paires de bases - 30 000 gènes (idem chez l'Homme)
- 20 chromosomes (23 chez l'Homme)

Histoire de la génétique murine

- Début du XXème siècle
  - Technique: Collection des mutations naturelles
- Fin des années 70
  - Outils: Biologie Moléculaire
  - Technique: Transgénique «classique»
- 1970-1990
  - Outils: Cellules Souches Embryonnaires et Recombinaison Homologue
  - Technique: Transgénique «ciblée»
- 1990-1995
  - Outils: Système CRE/Lox
  - Technique: Mutations conditionnelles
- Début du XIXème siècle
  - Outils: Séquençage du génome murin et avancées de la Génétique Moléculaire
  - Technique: Génome Wide Phenotype Driven Screens

Quatre premiers jours du développement d'un embryon de souris

- Stades:
  - Morula
  - Compaction
  - Blastocyste jeune
  - Blastocyste mature
  - Eclosion

Transgénèse passive par addition ou Transgénèse classique

- Cette méthode permet des mutations par gain de fonction mais ne permet pas l'inactivation de gènes
- C'est une méthode direct et brutale
- Cette méthode repose uniquement sur la Biologie Moléculaire
- Ce procédé prend quelques heures
- On utilise un microscope

- On récupère les embryons le premier jour après la fertilisation
- On injecte mécaniquement avec une aiguille fine une solution contenant un plasmide dans lequel on a cloné le morceau d'ADN d'intérêt que l'on veut surexprimer
- Il y aura ensuite une intégration au hasard de l'ADN du plasmide dans l'ADN de l'embryon
- On réimplante ensuite cet embryon dans une femelle pseudo-gestante (= femelle qui a été accouplée avec un mâle vasectomisé => cette femelle a déclenché hormonalement un programme de gestation sans bébé)
- On obtient des bébés qu'on laisse grandir
- Une fois qu'ils sont assez grands, on coupe un petit bout de leur queue
- On extrait de l'ADN à partir de ce petit bout de queue
- On réalise ensuite une PCR avec cet ADN génomique pour mettre évidence la séquence d'intérêt
- Il y a donc deux cas de figure:
  - Soit la PCR est négative => l'ADN du plasmide ne s'est jamais intégré dans l'ADN génomique = 90% des cas
  - Soit la PCR est positive => Il y a eu intégration de l'ADN cloné dans le génome et création d'une nouvelle lignée transgénique = 10% des cas
- Exemples:

Transgène	Hypothèse	Résultat
GH	Hormone de croissance	Grosses souris
Sry	Gène de détermination sexuelle	Souris avec un phénotype mâle
Ras	Oncogène	Tumeurs

Transgénèse ciblée ou Transgénèse de substitution

- Principe

- Cette méthode consiste en l'<u>inactivation d'un gène</u>: On enlève le gène de façon extrêmement précise.
- C'est un événement qui est par définition extrêmement rare => il faut donc sélectionner cet évènement parmi tous ceux que l'on ne veut pas (on ne peut pas faire ça directement sur la souris car il faudrait un nombre incalculable de souris pour obtenir l'évènement désiré, cependant on peut obtenir cet évènement sur des cellules en culture c'est-à-dire par méthode indirect)
- On utilise par conséquent une <u>méthode indirect</u>
- Il s'agit de faire un réarrangement du génome extrêmement précis dans des <u>Cellules Souches Embryonnaires (ESC)</u>
- Or, les Cellules Souches Embryonnaires (ESC) ont la capacité de se différencier en cellules issues de n'importe lequel des trois feuillets embryonnaires, y compris les cellules germinales. Elles contribuent donc d'une manière décisive à la formation d'un nouvel individu.
- Donc, à partir de cette ESC réarrangée, on va construire la souris transgénique

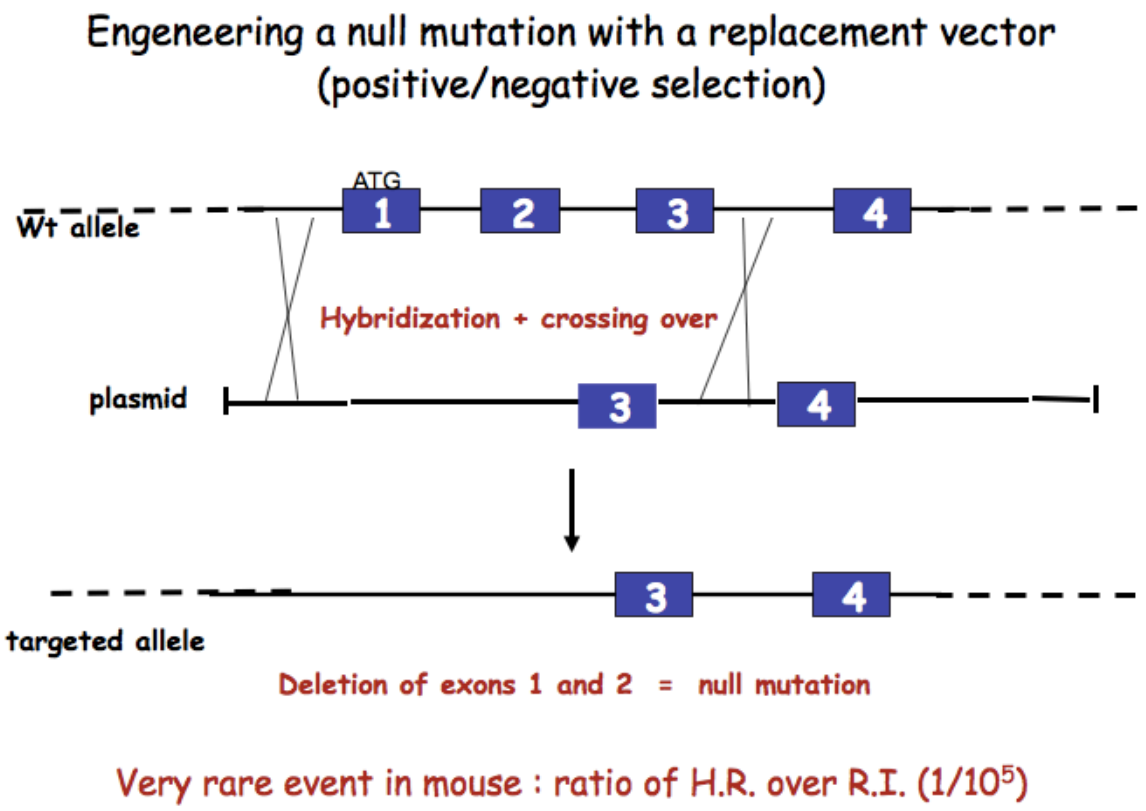
- Première étape: Obtention des Cellules ES

- Les ESC sont le résultat de 10 à 20 ans de recherche
- On prend un blastocyste appartenant à la lignée de souris marrons 129
- On le met dans un milieu de culture composé de sérum de veau foetal de haute qualité et de 2-beta-mercaptoethanol
- On laisse la croissance s'opérer
- On sépare ensuite les différents groupes de cellules grossièrement (mais on ne sépare pas les cellules individuellement sinon ça ne marche pas)
- On obtient donc les cellules de la Masse Cellulaire Interne (MCI) qui auraient donné l'individu entier (mais si l'on met une seule de ces cellules en culture on n'obtiendra pas un individu entier)
- On les installe sur un paquet de cellules fibroblastiques irradiées qu'on appelle les cellules nourricières qui vont former un tapis sécrétant dans le milieu des facteurs de croissance, ce qui va permettre aux cellules que l'on vient de dissocier de pousser (mieux que si on les avaient mis dans des boites plastiques de cultures dépourvues de tapis cellulaire)
- Dans ce milieu, les cellules qui dégénèrent en formant des cubes très plats sont les cellules du Trophectoderme
- Dans ce milieu, les cellules qui survivent et qui se multiplient très rapidement sont les cellules de la Masse Cellulaire Interne (MCI) => ce sont les ESC (pendant leur croissance il faut les surveiller tous les jours pour éviter qu'elles dérivent et qu'elles perdent leur pluripotence)

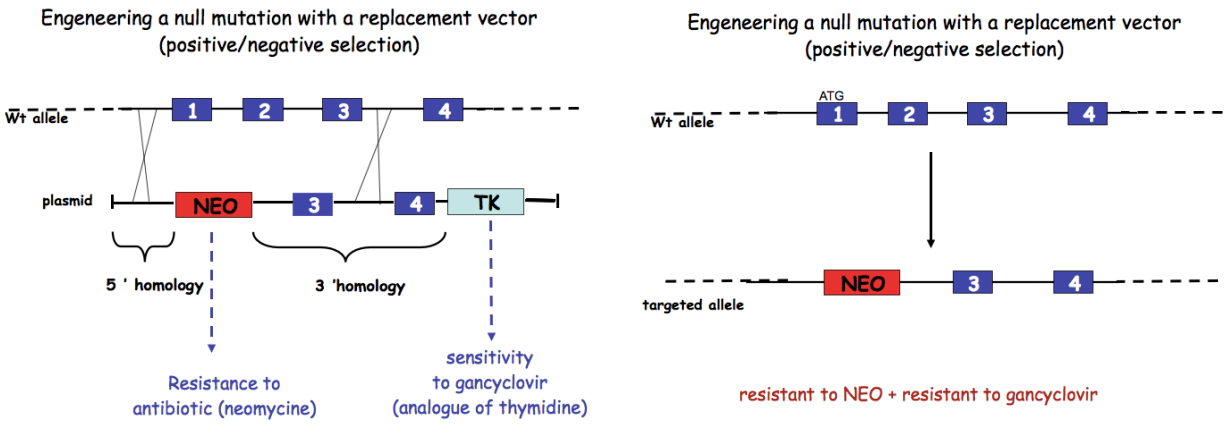
- Deuxième étape: Modification du génome des ESC

- Le but est de réaliser une <u>mutation nulle</u> (= mutation qui élimine complètement la fonction d'un gène)

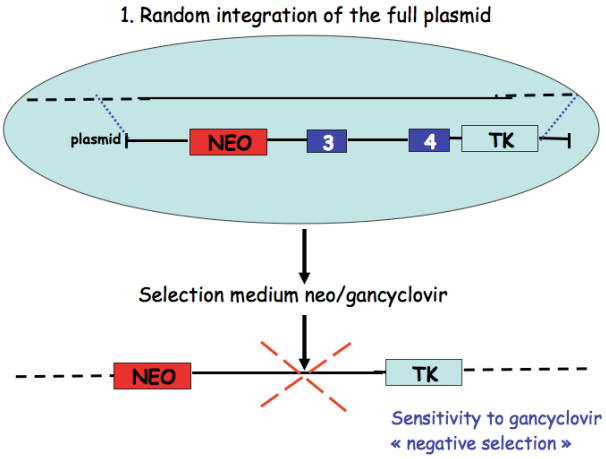
- La Recombinaison Homologue (= crossing over) est un évènement ultra fréquent chez la levure et ultra rare chez la souris. La Recombinaison Homologue va être l'outil qui va permettre la mutation nulle.
- On fait des cultures



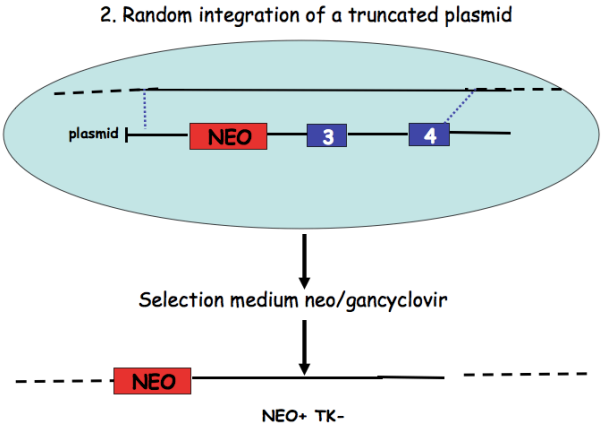
- En haut de l'image on a le gène que l'on veut inactiver
- Il a quatre exons
- On veut inactiver les exons 1 et 2
- On va dans une banque de gène chercher des morceaux de gènes homologues qui vont permettre le crossing over
- On va donc prendre fragment d'homologie en 5' et un fragment d'homologie en 3'
- Le fragment d'homologie en 5' correspond à un fragment génomique qui est homologue à la région du gène ciblé située en 5' (= en amont) des exons 1 et 2 que l'on veut supprimer.
- Le fragment d'homologie en 3' correspond à un fragment génomique qui est homologue à la région du gène ciblé située en 3' (= en aval) des exons 1 et 2 que l'on veut supprimer. Dans notre exemple le fragment d'homologie en 3' est composé des exons 3 et 4.
- Ensuite, on sous-clone ces fragments d'homologie génomiques dans un plasmide
- On veut obtenir une situation où il y aura reconnaissance par homologie entre le gène cible et le plasmide, ce qui entrainera une recombinaison par crossing over entre ces derniers
- Si ce crossing over se produit, on aura exclusion des exons 1 et 2
- Pour que cette réaction ait plus de chance d'avoir lieu, on va utiliser des cassettes de sélection qui vont améliorer la reconnaissance en culture des éléments homologues
- Première cassette de sélection = NEO qui va conférer à l'ESC la résistance à la néomycine (= antibiotique) => On va donc placer les ESC en présence de néomycine, et si la cellule survit c'est que la cassette est entrée dans le génome
- Deuxième cassette de sélection = TK qui donne une sensibilité au gancyclovir. Cette cassette est placée dans une partie du plasmide qui ne sera pas intégré au génome de l'ESC. => On va donc mettre les ESC en présence de gancyclovir, et si la cellule meurt c'est que la cassette est entrée dans le génome
- Le but est donc est donc que NEO rentre dans le génome et que TK ne rentre pas.
- Si la recombinaison homologue s'est déroulée de telle sorte à obtenir une mutation nulle des exons 1 et 2, alors l'ESC sera résistante à la néomycine et résistante au gancyclovir (l'ESC sera NEO+ et TK-). Attention, ceci est un implication, ce n'est pas une équivalence => cf cas n°2



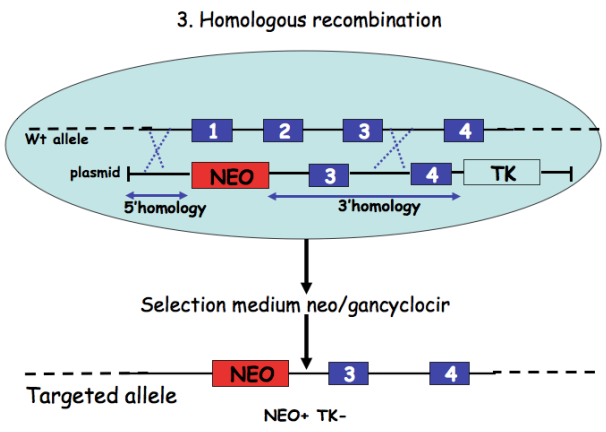
- Cas n°1: <u>Intégration aléatoire du plasmide en entier</u> => TK entre dans le génome => sensibilité au gancyclovir présent dans le milieu => la cellule meurt => vrai négatif. Schéma ci-dessous.



- Cas n°2: <u>Intégration aléatoire d'un plasmide tronqué</u>. Dans les cellules, il existe des nucléases qui commencent à manger les plasmides. Il peut donc arriver que le gène TK soit tronqué. Si ce plasmide intègre le génome de l'ESC, on aura alors des cellules qui seront NEO+ et TK-. Ces cellules seront donc résistantes à la néomycine et au gancyclovir, elles survivent à la pression du milieu. Ce sont donc des faux positifs (car les exons 1 et 2 sont toujours présents dans le génome de l'ESC) qui engendrent un bruit de fond. Pour diminuer ce bruit de fond, il faut augmenter l'homologie des segments homologues pour augmenter leur reconnaissance et leur affinité. Schéma ci-dessous



- Cas n°3: <u>Recombinaison Homologue</u>. C'est l'évènement idéal qu'on recherche. C'est le vrai positif. ESC NEO+, TK-, résistance à la néomycine, résistance au gancyclovir, absence des exons 1 et 2 dans le génome. Schéma ci-dessous.



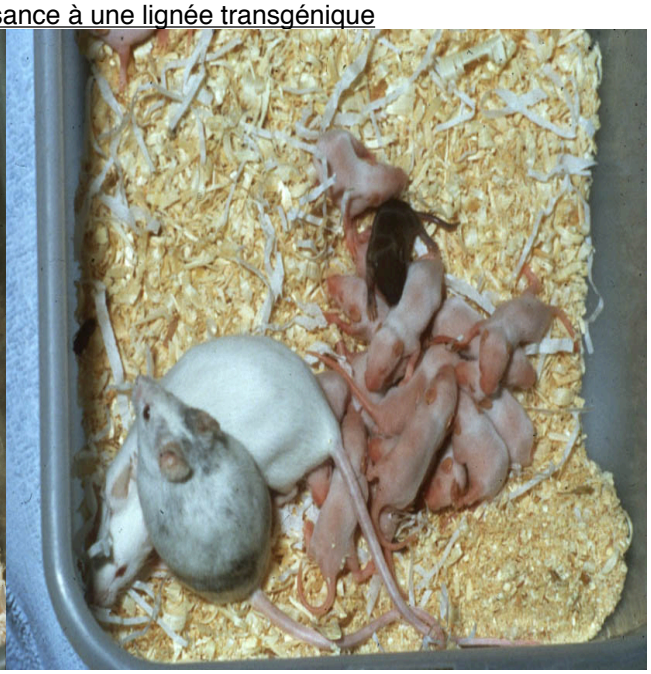
- Donc en pratique quand on a décidé d'aller inactiver un gène:
- On isole les morceaux d'homologie dans les banques de données ce qui peut prendre quelques semaines
- On construit un plasmide dont on va essayer d'optimiser les longueurs d'homologie pour aider la reconnaissance
- Il faut bien prévoir que le chromosome que l'on va avoir à l'arrivée aura bien subit une mutation nulle, qu'on aura enlevé l'ATG si possible ou fait quelque chose de délétère pour cette protéine
- On fait pousser 2 x 10^7 ESC, ce qui prend moins de dix jours
- On prépare 15 microgrammes d'ADN plasmidique
- On électropore ces cellules = En une fraction de seconde on leur fait subir un choc électrique et sous cette impulsion l'ADN plasmidique va rentrer dans l'ESC (≠ injection)
- Beaucoup de cellules meurent à cause de l'électroporation
- Après quelques temps, certaines cellules commencent à pousser et à récupérer de cette épreuve.
- Ensuite on applique la double sélection Néomycine / Gancyclovir pour repérer les clones qui ont survécu
- On prélève les clones et on amplifie ce qui prend quinze jours.
- On congèle les clones qui ont bien voulu résister à la double sélection mais avant de les congeler on en garde un petit peu pour préparer de l'ADN
- Avec l'ADN des cellules que l'on n'a pas congelées, on va aller voir par PCR si l'évènement désiré c'est véritablement produit. C'est comme cela qu'on élimine les faux positifs
- En moyenne il y a 5% des clones sélectionnés qui sont le résultat d'un évènement de recombinaison homologue. (donc 5% de réussite)
- Parfois certains loci sont extrêmement résistants à la recombinaison homologue. On pense que c'est dû au fait qu'ils soient dans des conformations chromatiniennes très particulières. (On ne sait pas encore très bien pourquoi parfois il y a une grande résistance à la recombinaison homologue pour un site). Il faut des kilomètres d'homologie pour que la recombinaison homologue ait quand même lieu.
- «Et parfois ça rentre tout seul»
- Après avoir réalisé toutes ces étapes la question qui se pose est: Est-ce que la cellule dans laquelle il s'est produit l'évènement désiré est toujours une cellule ES?
- Aussi, quand on fait une recombinaison homologue, on ne cible qu'un seul des deux allèles du génome. On a donc une cellule qui est hétérozygote pour la mutation nulle.

- Troisième étape: Injection des ESC modifiées dans un embryon

- Cette opération est réalisée avec l'aide d'un microscope
- On récupère un embryon au troisième jour après la fertilisation
- On perfore la Zona Pellucida et le Trophectoderme
- On injecte à l'intérieur de la cavité de l'embryon une quinzaine de Cellule ES dont on aura modifié le génome (inactivation du gène spécifique)
- Ces Cellules ES réarrangées vont venir se mélanger avec les cellules de la Masse Cellulaire Interne (MCI) et ensemble elles vont construire un nouvel individu auquel les Cellules ES réarrangées vont contribuer
- Et tout le jeu consiste à espérer que ces ESC modifiées vont contribuer suffisamment à la formation du nouvel individu pour obtenir une contribution germinale, une contribution à la descendance et une nouvelle lignée de souris
- On transfert ensuite l'embryon injecté dans une souris femelle pseudo-gestante
- Par convention on utilise uniquement des cellules ES mâles

- Mise en évidence de la capacité des ESC à donner naissance à une lignée transgénique:

- Pour mettre en évidence la contribution des ESC modifiées à la formation de la nouvelle souris, on utilise des ESC provenant de lignées de souris noires et le blastocyste dans lequel on va injecter ces ESC provient d'une lignée de souris blanches
- On prend donc des ESC provenant de lignées de souris noires
- On injecte ces ESC dans un blastocyste provenant d'une lignée de souris blanches
- On transfert l'embryon dans une femelle pseudo-gestante
- Si on obtient une souris possédant uniquement des poils blancs, on peut penser que les ESC injectées n'ont pas contribué à la formation de la nouvelle souris
- Si on obtient une souris possédant à la fois des poils noirs et des poils blancs, les ESC injectées ont contribué à la formation de la nouvelle souris. On appelle cette souris «souris chimérique».
- Cette souris chimérique a donc quatre parents
- Cette souris chimérique est par convention un mâle
- Cette souris chimérique a donc un chimérisme somatique
- Cette souris possède-t-elle un chimérisme germinal?
- Pour répondre à cette question, on accouple la souris chimérique mâle avec une souris blanche femelle
- Si tous les souriceaux sont blancs, on peut penser que les ESC injectées n'ont pas contribué à la formation des cellules germinales de la souris chimérique => la souris chimérique ne possède pas de chimérisme germinal
- Si certains souriceaux sont noirs, les ESC injectées ont contribué à la formation des cellules germinales de la souris chimérique => la souris chimérique possède un chimérisme germinal
- Les souriceaux noirs sont les animaux transgéniques d'intérêt
- Si on obtient un souriceau noir fertile, cela suffit pour établir la lignée
- <u>En conclusion: Une cellule ES peut donner naissance à une lignée transgénique</u>



Expérience 1: Cas particulier	Expérience 2
- Ici on a injecté des ESC XY (noires) dans un blastocyste XX (blanc) - Comme il y a présence du gène Sry dans l'embryon, le phénotype de la souris chimérique est une phénotype mâle - De plus les spermatozoïdes de la souris chimérique proviennent tous des ESC XY (noires) car seules les cellules XY sont capables de former des spermatozoïdes donc les seules cellules germinales qui peuvent développer proviennent des ESC - Ainsi, tous les souriceaux sont noirs	- Un souriceau est noir - Les ESC modifiées ont donc contribué à la formation des cellules germinales de la souris chimérique - La souris chimérique possède un chimérisme germinal à 5%

(On aurait aussi pu complètement foirer l'expérience 1 en utilisant par exemple des ESC de mauvaise qualité ce qui aurait donné lieu à des souris chimériques hermaphrodites)

- Résultats:

- On a actuellement des centaines de lignées de souris avec des mutations nulles
- Prix Nobel de 2007 accordé à Martin Evans, Oliver Smithies et Mario Cappechi (les deux premiers ont construit les ESC en Angleterre et en Ecosse et le dernier a imaginé les astuces de recombinaison homologue aux USA)
- Rappel: Quand on fait une recombinaison homologue, on ne cible qu'un seul des deux allèles du génome. On a donc une ESC qui est hétérozygote pour la mutation nulle. Donc le souriceau noir (enfant de la souris chimérique) qui vient de la cellule ESC est hétérozygote pour la mutation nulle. Il est fort rare, chez la souris, d'avoir de la létalité au stade hétérozygote. Pour former la lignée transgénique, on aura, à la génération suivant le souriceau noir, un souris homozygote pour la mutation nulle.
- Au stade homozygote pour la mutation nulle, on aura:
  - ✓ 25% des lignées transgéniques ont donné des létalités embryonnaires
  - ✓ 10% ont donné des létalités au moment du sevrage
  - ✓ Et dans la grande majorité, lorsqu'on enlève un gène, la souris survit => le gène n'est pas indispensable à la souris dans les conditions ultra-protégées du laboratoire
- Exemples:

Validation des prédictions	Mutation Nulle	Conséquence
Oui	Insuline -/- (Remarque: Il y a deux gènes de l'insuline chez la souris. Dans cette expérience, on a inactivé les deux gènes)	Souris diabétiques
Oui et Non	Src -/- Abréviation pour Sarcoma Gène soi-disant extrêmement important dans le développement En réalité forte expression dans l'os	Souris viables mais atteintes d'ostéopétrose
Non	MyoD -/- Rôle musculaire (Remarque: On est dans un cas de redondance fonctionnel: Il y a un autre gène qui a la même fonction que MyoD. Dans cette expérience on a seulement inactivé MyoD)	Survie des souris (si on inactive le deuxième gène, on aura des anomalies musculaires)
Non	HNF3beta -/- Facteur Nucléaire Hépatique	La Gastrulation ne se produit pas Tous les mouvements cellulaires importants pour fabriquer l'Endoderme et l'Ectoderme sont bloqués Les chercheurs n'ont donc pas pu voir les conséquences de cette inactivation sur le foie
Non	FosB -/- Gène soi-disant important dans le développement	Souris viables mais atteintes de troubles comportementaux Si la maman souris a une mutation nulle du gène FosB, alors elle ignore ses bébés et ne les allaite pas (même si elle possède des glandes mammaires fonctionnelles) On s'est rendu compte que FosB s'exprime dans une région précise de l'Hippocampe On pense que cette région contrôle le comportement maternel

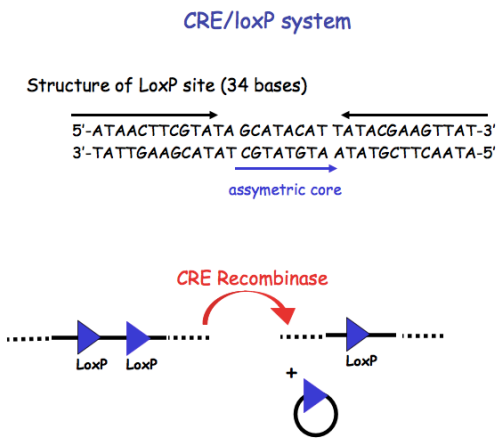
Note:
Malgré tout ce qui a été dit par Françoise Poirier je vous rappelle les caractéristiques des ESC:
➡ Cellules Pluripotentes
➡ Cellules qui ne peuvent pas à elles seules aboutir à la création d'un individu complet
➡ Exemple d'ESC: Cellules de la MCI
(Selon Françoise Poirier les ESC sont des cellules Totipotentes capables de former à elles seules un individu complet, ce qui est faux, j'ai donc légèrement modifié son cours)
(Aussi, Françoise Poirier est partie en live total sur cette partie en distribuant des notions d'une manière complètement aléatoire et incompréhensible exhibant ainsi un majestueux bras d'honneur à la chronologie, c'est pour cette raison que le semblant de plan auquel je me suis essayé ne suit pas l'achronologie des diapos)
(Si j'avais retranscrit le cours mot pour mot vous auriez eu droit à ça par exemple : «Et alors donc voila c'est là où on voit l'inter la réponse à la question c'est pour augmenter la taille d'homologie pour favor pour être l'évènement idéal qu'on recherche il ça c'est le vrai positif celui qu'on veut donc on va se retrouver soi-même avec un certain degré de val de bruit de fond» Ce n'est pas un exemple isolé: elle s'auto-interrompt toute seule et ne termine pas ses phrases elle n'est pas toute seule dans sa tête et je ne dit pas ça gratuitement)
(Françoise Poirier a aussi un gros problème de concordance des temps)
(Et si vous pouviez arrêter de tousser pendant les cours ça faciliterait le travail des ronéotypeurs)

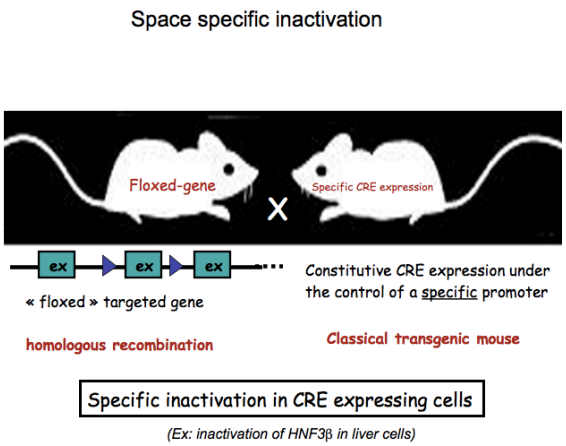
Mutations conditionnelles

- Principe

- Intéressant, par exemple, pour l'inactivation d'HNF3beta qui, si elle a lieu trop tôt dans le développement, est létale => Ajouter une condition temporelle ou spatiale à l'inactivation d'HNF3beta va permettre d'étudier ses effets sur le foie
- Comment faire pour obtenir des mutations conditionnelles?
- On peut obtenir des mutations conditionnelles grâce au <u>système CRE/lox</u>
- Le système CRE/lox est l'utilisation de la particularité d'une enzyme d'un bactériophage qui a une spécificité absolue pour une région <u>lox</u>
- Un site lox est une structure de 34 bases
- Il existe une recombinase qui s'appelle <u>CRE</u> qui reconnait spécifiquement et uniquement ces 34 bases. CRE est hautement spécifique. Statistiquement dans le génome de la souris par exemple il n'y a nulle part ces 34 bases.
- Cette recombinase ultra particulière va reconnaître deux sites loxp séparés par n'importe quoi au milieu.
- il y aura ensuite excision de la partie entre les deux sites loxp et il ne restera sur le génome qu'un site loxp.
- On peut donc encadrer le gène que l'on veut enlever par les sites loxp.
- Par conséquent on va être capable de ne pas enlever gène cible tout de suite dans la cellule ES => On va pouvoir décider où et quand la recombinase CRE va être exprimée => on va donc pouvoir décider où et quand l'excision va se produire => On va donc pouvoir décider où et quand la mutation aura lieu

- Spécificité spatiale de l'inactivation

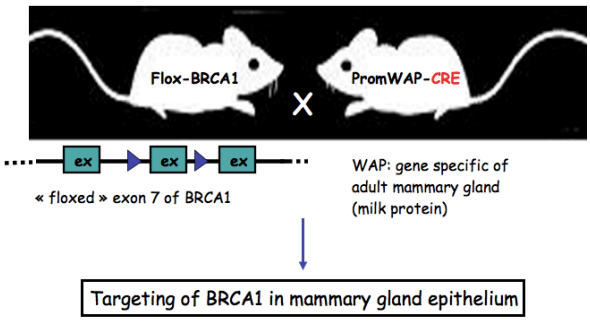




- On a ici un gène théorique avec trois exons et dans les deux introns, on a inséré de façon ultra précise deux site loxp.
- On a donc deux site loxp de part et d'autre d'un exon dont on sait qu'il est très important pour la protéine que l'on veut inactiver.
- A partir de cette ESC dont on a «floxé» un exon on fabrique une souris A. (Si on ne fait rien de plus on aura une souris normal sans inactivation du gène floxé.)

- Parallèlement, on fabrique une souris B transgénique classique qui surexprime CRE. (Cette souris sera elle aussi normale car il n'existe pas normalement de site de reconnaissance pour la CRE chez la souris.)
- Dans la souris B, on va faire en sorte que l'expression de CRE se fasse sous le contrôle d'un promoteur donné présent dans des cellules spécifiques et à un moment spécifique du développement
- On croise les deux souris entre elles
- Dans les cellules où le promoteur que l'on a choisi est actif, la CRE va être spécifiquement exprimée et il va y avoir une inactivation du gène que l'on a floxé.
- Exemple n°1: HNF3beta
  ✓ On floxe HNF3beta chez une souris A (qui aura donc un développement normal).
  ✓ On met le gène CRE sous le contrôle d'un promoteur hépatique chez une souris B (qui aura donc un développement normal).
  ✓ Lorsque l'on va croiser ces souris, on va se retrouver avec HNF3beta qui sera inactivé uniquement dans le foie.

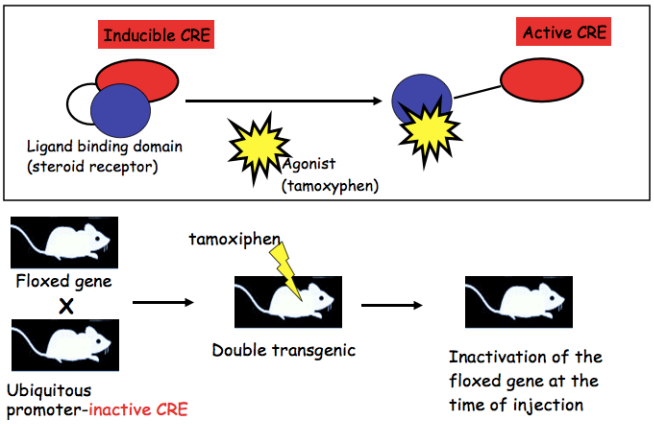
Space specific inactivation



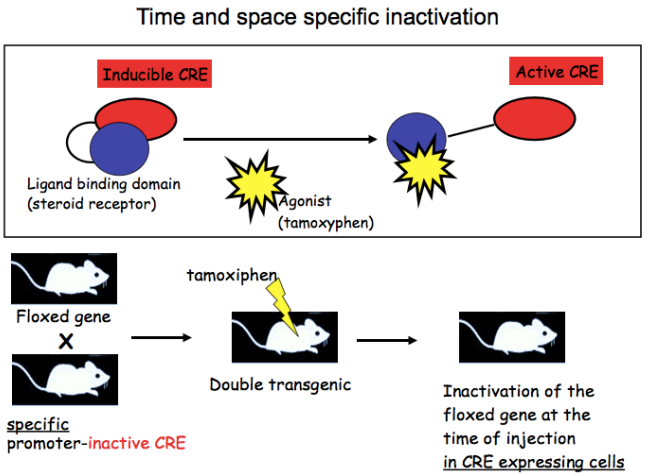
- Exemple n°2: BRCA1 (schéma ci-dessus)
  ✓ Exon 7 de BRCA1
  ✓ Certaines études on montré que le gène BRCA1 était responsable de certains cancers du sein. (c'est son inactivation qui provoque des cancers du sein)
  ✓ On fabrique une souris CRE dont l'expression est contrôlée par un gène de la glande mammaire adulte: le gène WAP
  ✓ La souris de droite exprime des quantités massives de CRE dans les cellules de la glande mammaire lorsqu'elle atteint l'âge adulte
  ✓ Dans la souris de gauche, on a floxé l'exon 7 du gène BRCA1
  ✓ Par croisement, on obtient des souris dans lesquelles le gène BRCA1 est inactivé => l'exon 7 de BCRA1 est donc crucial pour son expression
  ✓ Résultat: le gène BRCA1 est inactivé spécifiquement dans la glande mammaire (et seulement dans la glande mammaire) et ces souris ont effectivement développé une tumeur ce qui valide l'hypothèse.

- Spécificité temporelle de l'inactivation

Time specific inactivation



- Les biochimistes ont eu l'idée de mettre l'expression de la protéine CRE sous la dépendance de l'ajout d'un agoniste.
- Ce qu'ils voulaient c'est qu'il y ait un produit X qui soit capable de transformer une CRE inactive en CRE active.
- Modèle: Une souris a une expression de CRE inactive => On la met en présence d'un agoniste => CRE devient active
- Cela a été fait en couplant la CRE naturelle de départ provenant du phage avec un domaine de liaison à un récepteur des stéroïdes
- La protéine CRE inactive synthétique de fusion dans sa conformation de gauche a donc été construite, elle est inactive: elle n'a plus d'activité CRE.
- Et c'est uniquement lorsqu'on injecte le Tamoxiphen qu'il y aura activation CRE.
- Injection de Tamoxiphen => Reconnaissance et liaison du Tamoxiphen avec le récepteur aux stéroïdes => Le complexe protéique change de conformation et devient «CRE positif»



- Donc en résumer pour avoir le contrôle de l'espace et du temps de l'inactivation: (cf schéma ci-dessus)
  ✓ On fabrique une souris avec une expression de CRE inactive dépendante d'un promoteur présent à un moment donné dans une cellule donnée
  ✓ On fabrique une autre souris floxée pour le gène que l'on souhaite inactiver
  ✓ On croise les deux souris => double transgénie
  ✓ Mais comme c'est une CRE inactive qu'on a clonée ici, il ne se passe toujours rien
  ✓ Ce n'est qu'après l'injection de Tamoxiphen qu'il va y avoir inactivation du gène floxé.

- Résultats

- On a maintenant de nombreux modèles de souris pour différentes maladies humaines

Genome Wide Phenotype Driven Screens

- Avec cette technique on change de dimension:
  - Techniques précédentes = Génétique Inverse
    ✓ Les techniques précédentes sont des expériences réalisables dans des laboratoires bien organisés et relativement bien soutenus financièrement (parce que c'est de la recherche rare et couteuse).
    ✓ Génétique inverse: On a un gène et on cherche le phénotype associé à l'invalidation de ce gène. Le point d'entrée est donc le gène.
  - Nouvelle technique = Genome Wide Phenotype Driven Screens
    ✓ Cette nouvelle technique concerne des choses qui ne se font pas dans des laboratoires, mais qui se font dans des énormes consortiums avec beaucoup plus de gens.
    ✓ On passe de l'artisanat à l'industriel.
    ✓ «Génétique à l'endroit»: On a un phénotype et on cherche la mutation qui va avoir un effet sur ce phénotype. Exemple de la réponse à la douleur: Ce qui nous intéresse c'est de connaître les nouveaux gènes qui sont important dans la réponse à la douleur. Alors pour ça, l'idéal c'est de faire de la mutagenèse au hasard de la manière la plus homogène possible (c'est-à-dire partout dans le génome) et essayer de fabriquer des lignées de souris systématiquement pour chaque mutation ponctuelle. On pourra ensuite rechercher parmi toutes les lignées de souris, une lignée qui possède des mutations qui affectent la réponse à la douleur.
- ENU (N-ethyl-N-nitrosourea)
  - C'est une drogue qui a l'avantage de fabriquer des mutations vraiment au hasard dans le génome => On va donc avoir des mutations de toutes sorte

    - Cette drogue a une très forte efficacité
    - Si on traite des mâle avec de l'ENU => On aura de mutagenèse effective dans les spermatogonies précoces => Des spermatozoïdes mutés seront produits pendant toute la vie de l'animal => Quand on screen les gamètes, on obtient une mutation dans un gène donné tous les 175-655 gamètes.
    - On peut donc se lancer dans l'idée de faire des mutations dans tous les gènes possibles.
- Des consortiums se sont mis en place
- Des programmes de mutation sont en route
- Evidemment on ne va pas se contenter lorsqu'on se lance dans un tel programme de ne regarder que la réponse à la douleur. Les souris vont donc être testées selon un programme précis par différents spécialistes qui vont chacun s'intéresser à un aspect particulier de l'expérience: certains vont regarder la tonicité de la peau, d'autres les performances neuro-musculaires, d'autres les fonctions neuro-sensorielles, d'autres les paramètres métabolique... => En gros tout ce qui n'est pas invasif.
- L'idée est de repérer l'effet de nouveaux gènes dans de nouvelles fonctions
- Lorsqu'on a trouvé une souris qui présente une anomalie dans le test que l'on a choisi, il faut aller rechercher dans les 3×10^9 bases du génome, quelle est celle qui a été mutée et qui est responsable de l'effet que l'on constate.
- On s'appuie donc sur des techniques d'étude du génome dans son ensemble.
- On commence par établir une <u>carte physique de l'intervalle dans lequel la mutation à du se placer</u>.
- Ensuite, il faut aller chercher dans des <u>banques de BAC</u> la partie du génome que l'on pense avoir muté, et on va voir si c'est bien le cas en essayant de <u>sauver la mutation avec un BAC donné</u> ou un autre. C'est un jeu de puzzle pour aller retrouver la base mutée qui est responsable du phénotype qui nous intéresse. C'est la seule façon d'aller chercher des gènes nouveaux.
- Comment est-ce qu'on va faire pour garder ces milliers de milliers de souris?
- <u>On peut congeler les embryons de souris et le sperme de souris</u>. On peut donc décongeler les lignées une par une et rechercher des mutants pour des phénotypes donnés au fur et à mesure. Si l'on ne congèle pas c'est complètement ingérable vu le nombre phénoménal de lignées qui sont fabriquées.

Conclusion:
- La force de l'outil génétique chez la souris et le fait que l'on puisse congeler les lignées de souris font de l'expérimentation murine un atout formidable pour la recherche mais cela demande du temps, des ressources et de la logistique
- Je vous baise

(Le dernier chapitre était inbitable. J'ai essayé de vous franciser quelque peu ce qu'elle a dit à l'orale, cependant, je ne sais pas de quoi elle parle puisqu'elle ne l'a pas précisé. Alors j'ai pris la liberté de mettre «Genome Wide Phenotype Driven Screens» en titre, et j'ai fait comme si c'était la technique dont on nous parlait.)