

Module optionnel génétique
Cours 9

Modèles animaux

La nouvelle génétique expérimentale

- Génomique fonctionnelle: étude de la fonction par la dysfonction
- Validation d'une hypothèse: gène ou mutation candidate
- Créer un modèle expérimental de maladie humaine
 - Etudier les mécanismes physiopathogéniques de la maladie
 - Tester des stratégies thérapeutiques (élaboration et validation préclinique)

*Ex : les modèles animaux permettent de comprendre la fonction d'un gène par la dysfonction en l'invalidant, ou valider une hypothèse vérifier si une mutation conduit à la maladie ou est un simple polymorphisme du gène
Ici on s'intéresse aux modèles qui vont reproduire les maladies humaines pour comprendre ses mécanismes et tester les stratégies thérapeutiques.*

Pourquoi on ne peut le faire chez l'homme ?

Certaines maladies sont très fréquentes et donc on ne peut proposer aux malades des thérapies sans avoir des bases sur leurs résultats.

D'autres maladies sont dites rares ou la maladie évolue lentement on ne peut se permettre de tester des thérapies sur les quelques malades et sans avoir fait des tests préalables.

Modèle de la souris

- Facilités d'élevage
 - Lignées pures : *tous les chromosomes sont identiques à tous les locis.*
 - Croisements faciles
 - Temps de génération court (~21 jours)
 - Physiologie pas trop éloignée de celle de l'homme : *sauf quelques exceptions, par exemple le cœur d'une souris bat beaucoup plus vite que l'homme et donc l'étude des troubles du rythme n'est pas significative.*
 - Connaissance complète du génome
 - Manipulation du génome de la souris techniquement
- Accessible : Manipulation qui n'est pas aussi accessible chez les autres animaux.*

.

Modèle animal spontané ex de la Myopathie de Duchenne (DMD)

- DMD chez l'homme
 - La plus grave et la plus fréquente des dystrophies musculaires progressives > mort par l. Resp~20 ans
 - Récessif liée à l'X (1 garçon sur 3500 naissances mâles)
 - Gène de la dystrophine -> absence quasi complète de la protéine dystrophine. *C'est une mutation « perte de fonction ».*

C'est une des rares maladie pour laquelle des modèles animaux existent de façon spontanée. Dans la suite du cours nous verrons comment l'homme procède pour créer des modèles animaux de maladies.

- Mutation mdx de la souris
 - Forme très modérée de DMD (fatigabilité augmentée à l'exercice)
 - mutation non sens (CAA>TAA exon 23) > déficit complet en dystrophine

La mutation mdx est une mutation non sens (codon stop) qui est trouvable chez un enfant atteint. Le problème est que le phénotype est différent chez la souris car c'est une fatigabilité (seul symptôme).

C'est le problème de certains modèles où il ne suffit pas d'introduire la même mutation pour avoir le même phénotype. En générale pour la souris, toutes les maladies comprenant une perte de fonction la souris n'est pas un très bon modèle.

- Mutation GRMD du Chien Golden retriever
 - forme sévère > décès
 - mutation site d'épissage exon 8 > > déficit complet en dystrophine

Le chien est un modèle plus proche ici, car il est grand et donc physiologiquement est plus proche de l'homme au niveau du muscle.

Modèles créés expérimentalement

Il existe trois façons de créer des modèles animaux :

1. Mutation chimique aléatoire
2. Transgénèse insertionnelle classique par microinjection d'ADN dans les ovocytes fécondés (transgénique)
3. Ciblage génique par recombinaison homologue dans les cellules ES (knock-out, knock-in)

I) Modèle créé par mutation chimique (pas important).

- Agents mutagènes (Ethyl-N-NitrosoUrea: agent alkylant > mutation ponctuelle ADN spermatogonie) *c'est un agent chimique qui introduit des mutations ponctuelles dans les spermatozoïdes.*

- Mutations au hasard

- Collection de mutants > phénotypage > identification du gène muté

En pratique on donne cet agent aux males générant ainsi des mutations au hasard et donc l'intérêt est de générer une collection de mutants. C'est-à-dire regrouper les mutants qui auront tel ou tel phénotype et ainsi pouvoir proposer aux chercheurs d'une certaine maladie des modèles déjà prêts.

Par conséquent, ce n'est pas une approche ciblée sur une maladie particulière (on peut s'en douter vu le caractère aléatoire des mutations engendrées)

- Exemples: souris Agouti, Souris ApcMin (cancer intestin), souris « sourdes » (souris Shaker > Myosin VIIA)...

II) Transgénèse insertionnelle classique

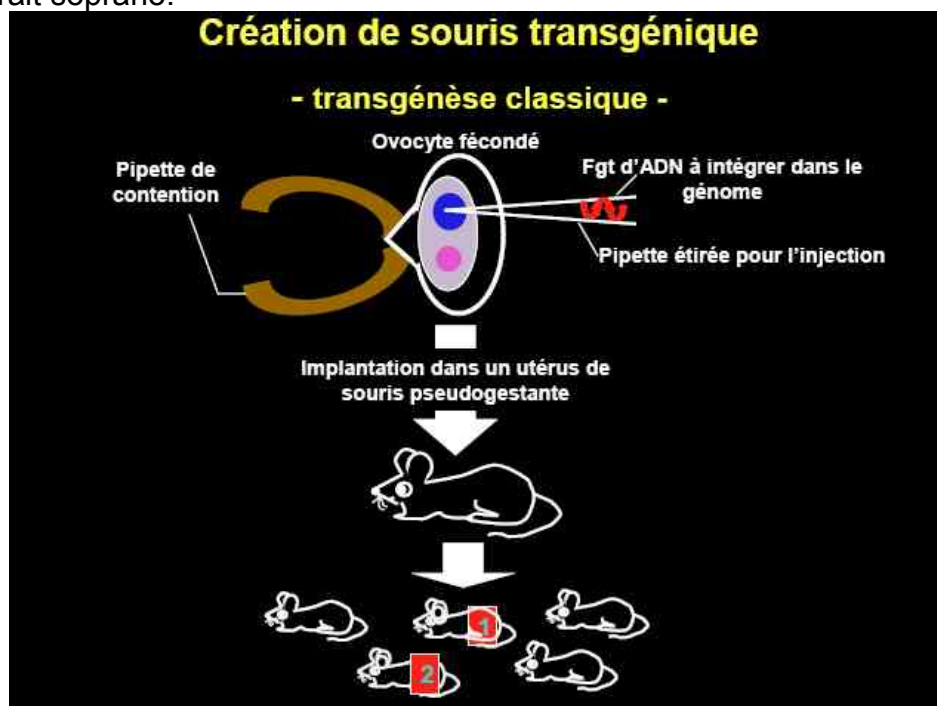
- But: addition d'un gène donné

- Application: Faire surexprimer un gène donné avec ou sans modification génétique dans un type cellulaire donné

- Principe: microinjection d'un transgène dans des ovocytes fécondés réimplantés chez une souris

- Histoire: 1980-1981 > 1ère souris transgéniques (micro-injection d'ADN dans le pronucléus du zygote)

Principe de la technique avec intégration à la hollywoodienne de diapo, à la bien comme dirait soprano.



Opération on injecte dans le pro nucleus (= noyau du spermatozoïde ou de l'ovocyte) male (car il est plus gros), tout en maintenant l'ovocyte fécondé via une pipette de contention.

On réimplante l'ovocyte fécondé dans l'utérus d'une souris.

Pb : Le phénomène d'intégration du transgène est un événement rare (environ 3%)

Donc pour avoir des souriceaux transgéniques, il faut avoir injecter une centaines d'œufs lesquels seront réimplantés, chaque œuf donnant une souris.

Le plus souvent l'adn ne s'est pas intégrer dans le génome de la souris, seulement 3 à 5% des œufs donneront des souris transgéniques si les œufs ne sont pas morts avant (à cause du choc de l'injection, si le transgène s'est intégrer dans un gène capitale pour le développement,...).

Pq sur le schéma les souris transgéniques portent des brassards différents ?

*Pour chaque souris où le transgène a réussi à s'intégrer, **l'insertion s'est faite à différents endroits du génome**. La conséquence étant des taux d'expressions différents pouvant aller jusque une absence d'expression causée par des phénomènes « silencer ». (comme le nom l'indique le gène est mis sous silence, merci MR henkel pour l'anglais)*

En résumé de cette technique.

Transgénèse classique avantages – inconvénients

L'idée est que l'avantage vient du fait qu'on peut intégrer un gène d'intérêt, les inconvénients venant eux du fait qu'on ne maîtrise rien de son intégration (la réussite, le locus, le taux d'expression,...)

- Fragment d'ADN injecté = Transgène

- Toute séquence d'ADN peut être injecté
- promoteur -séquence codante -signal de polyA

- Intégration du transgène

- Événement rare (3-10% selon la qualité de l'ADN et de l'expérimentateur)

- Aléatoire dans le génome (site le plus souvent unique)

- En nombre de copies variable --> conditionne le niveau d'expression. (elle n'a pas expliqué mais je pense que dans la pipette on a des tonnes de fragment et que donc plusieurs d'entre eux peuvent s'intégrer dans le génome sans pouvoir prédire combien le feront).

- Possible dans un gène essentiel.

Nb : cette technique permet une application aux maladies dues à des mutations autosomiques dominantes causant un « gain de fonction » d'une protéine.

Application à la maladie d'Alzheimer

- 1ère cause de démence (12 Millions dans le monde)
- Clinique: Démence corticale (Aphasie, Apraxie, Agnosie)
- Anapath: Plaques séniles (β A4), dégénérescence NFT (Tau)
- Génétique: Rares formes familiales (< 1%)
 - Autosomique dominant
 - Gènes PS1, PS2, APP
 - Mutations faux sens (*En générale maladie al Z due à une mutation faux sens aboutissant au gain de fonction.*)



(à la bien, promis c'est la dernière fois que je fais cette blague)

Il existe une dizaine de modèles murins qui reproduisent les lésions histologiques de la maladie d'al Z.

Ces modèles diffèrent par le promoteur du transgène (séquence informant sur la taux d'expression et la localisation de l'expression) et par l'apport de la maladie : c'est à dire pour certains modèles on introduit une mutation ponctuelle du gène APP, d'autres en ont plusieurs, pour d'autres on croise des souris portant chacune un type de modèle particulier (mutation APP+ TSA) , etc

Pq fait on cela ?

Chez la souris quand on fait sur-exprimer (jusque 10 fois la quantité normale exprimée) par exemple le gène APP portant une mutation, on observe seulement une partie des lésions histologiques de la maladie, et ce en attendant longtemps. Donc les chercheurs accélèrent le processus en introduisant deux mutations, ... ; aboutissant à divers modèles reproduisant assez bien à la maladie d'al Z, c'est-à-dire sur le plan histologiques (plaque amyloïdes) et sur le plan de la mémoire. Sur le plan de la mémoire ?!!!

Mais comment les troubles de la mémoire s'explorent ils chez la souris ?

(Car si on veut tester des traitements il faut être sûr qu'ils améliorent la maladie sur le plan histologique et de la mémoire.)

Un exemple, on prend une piscine remplie d'une eau opaque sur laquelle on immerge des petites plateformes. Au début on met des drapeaux sur celles-ci et on apprend à la souris à trouver un chemin dans la piscine vers ces plateformes. Puis on retire ces drapeaux et on mesure le temps mis par la souris pour retrouver les plateformes.

Mise en pratique du modèle.

Dans cette maladie il y a une accumulation de plaques amyloïde et une dégénérescence, donc l'hypothèse est que l'accumulation de plaques serait à l'origine de beaucoup des symptômes, et donc si on parvient à éliminer ces plaques on pourrait guérir de la maladie.

Pour cela l'idée des chercheurs est d'utiliser un vaccin pour immuniser le corps contre le peptide responsable de l'accumulation des plaques.

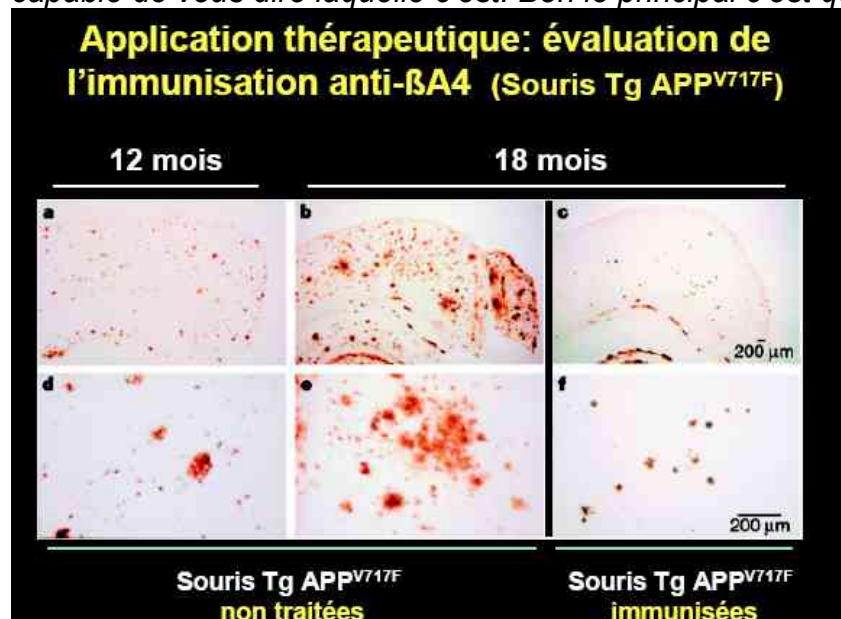
Résultat : en immunisant des souris transgéniques pour la protéine APP (qui auront donc une accumulations de plaques) en injectant des anticorps contre le peptide bêta A4 ou en injectant directement le peptide (pour forcer l'immunisation) on observe dans le temps une diminution des plaques mais aussi une amélioration du test de la mémoire.

Voici la piscine de la torture.

**Exploration des troubles cognitifs chez la souris:
« morris water maze »**



Et ici on peut voir une diminution des plaques chez la souris immunisée, sans être capable de vous dire laquelle c'est. Bon le principal c'est que les plaques diminuent.



Nb : ces modèles ont été faits à partir de la connaissance des formes familiales de la maladie d'al Z, mais les résultats thérapeutiques valent pour toutes les formes de cette maladie.

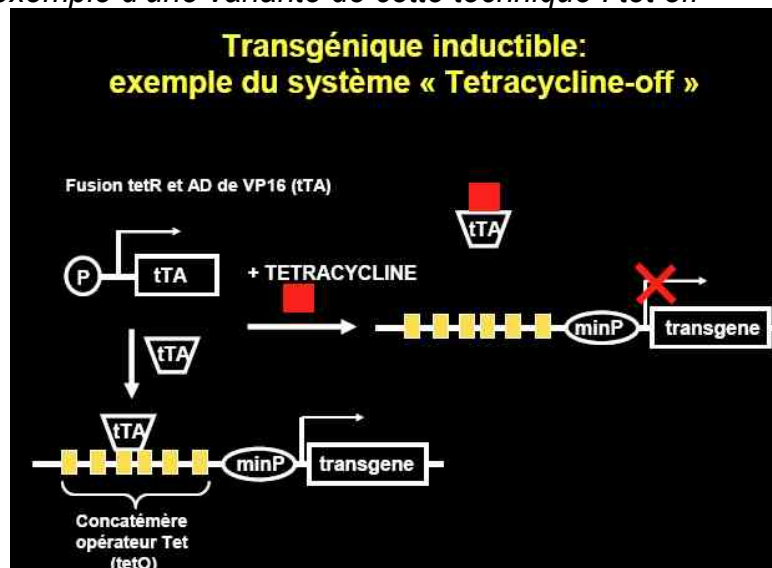
Les tests sont en cours chez l'homme.

Transgénique inducible

- But: « éteindre » ou « allumer » l'expression du transgène (quand on veut, où on veut)
- Applications:
 - Contourner une éventuelle mortalité par surexpression du Transgène au cours du développement
 - Etude des mécanismes physiopathogéniques: étude de la réversibilité des lésions à l'arrêt de l'expression de la protéine mutée

Transgénique inducible est adaptée à l'étude de la physiopathologie des maladies neuro dégénératives car une partie des symptômes a pour cause la dysfonction des neurones et non pas leur mort, ce qui est plus facile d'accès à la thérapeutique. (logique)

Voici un exemple d'une variante de cette technique : tet off



Explication: l'important est de comprendre que l'on va faire deux transgènes. D'abord on fait une première souris transgénique portant le gène d'intérêt avec un promoteur dans lequel il y a une séquence sensible à une clef (ici le tTa). Dans le schéma c'est le gène en bas à gauche.

Donc pour la première souris portant ce transgène, le gène ne s'exprime pas car il manque la clef.

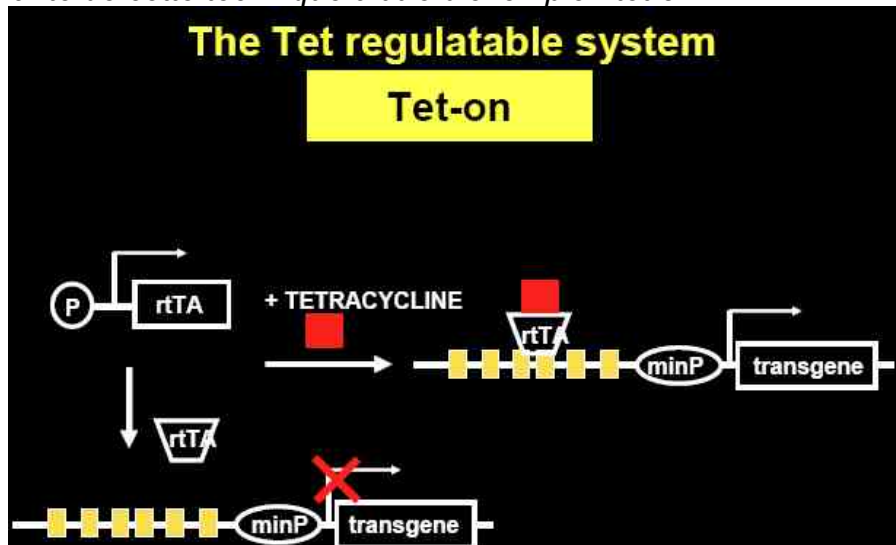
Puis on fait une deuxième souris transgénique portant le gène codant pour la clef (ici le tTa). Dans le schéma c'est le gène en haut à gauche.

Enfin on croise ces deux types de souris, le résultat est que les souris issues vont pouvoir exprimer le gène d'intérêt puis qu'elles possèdent la clef.

Là où on peut jouer sur le caractère inducible est que si on donne à ces souris de la tétra cycline, cette drogue se lie à la clef et donc on inhibe indirectement l'expression du transgène.

(les détails techniques ne sont pas à savoir, il faut juste comprendre que l'on peut décider à quel moment on peut éteindre un gène, exemple de cette technique, ou l'allumer, c'est le cas de la Tet on).

Autre variante de cette technique à titre d'exemple : *tet on*

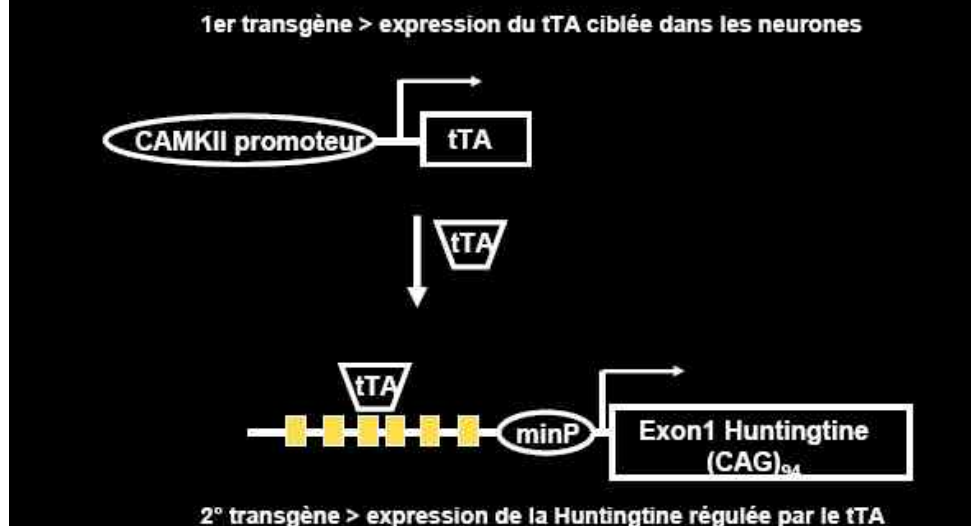


On passe à la pratique : **Application à la Chorée de Huntington**

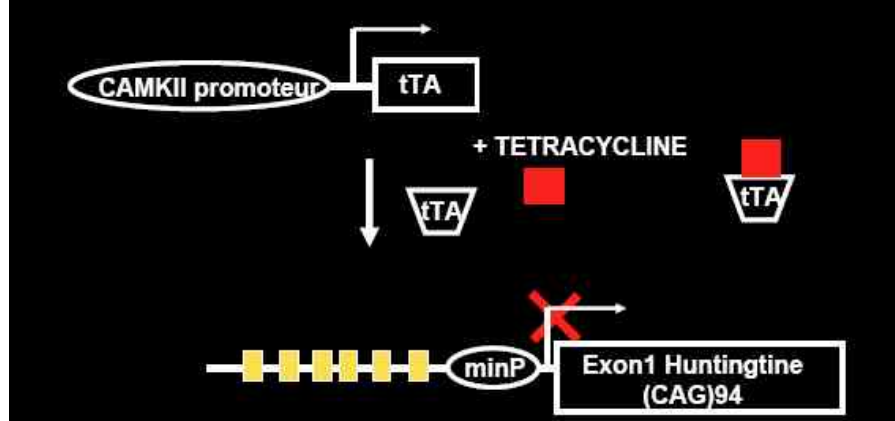
- Maladie neurodégénérative de l'adulte (~ 1/10.000)
- Clinique: Mouvements choréiques, troubles du comportement, démence - Pas de traitement
- Anapath: Dégénérescence des noyaux gris, inclusions intraneuronales
- Génétique
 - autosomique dominant
 - Expansion CAG (polyglutamine) (> 36) dans le gène de la Huntingtine
- Question: phénotype causé par une dysfonction ou mort neuronale?
- Stratégie d'exploration: **étude de la réversibilité des lésions à l'arrêt de l'expression de la protéine Huntingtine**

Création du modèle : on fait une transgénèse inducible de type « tet off » où la clef ne s'exprime que dans les neurones (car le promoteur indique qu'elle doit s'exprimer dans les neurones). Après l'apparition des premiers symptômes on traite les souris à la tétra cycline (induisant l'arrêt de l'expression de la protéine mutée) afin de pouvoir conclure quant à la réversibilité des symptômes .voir les diapos en dessous.

Modèle murin de Huntington conditionnel: Possibilité d' éteindre l'expression de la Huntingtine mutée



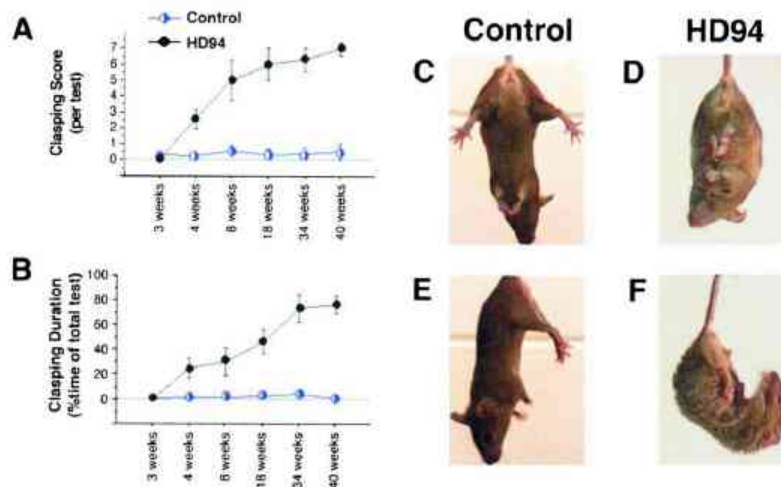
Extinction de l'expression de la huntingtine mutée par traitement à la tétracycline



Conséquence : Les souris exprimant la huntingtine mutée reproduisent des troubles moteurs caractéristiques de l'atteinte des noyaux gris (ex : quand on attrape une souris normale par la queue elle écarte les pattes, alors que les transgéniques les ramènent vers le corps c'est le clasping) et certaines lésions histologiques de la maladie.

Diapo : souris normales = control, souris mutées = hd94 pour qui le score de clasping s'aggrave dans le temps.

Expression de la Huntingtine mutée « on »: anomalies motrices

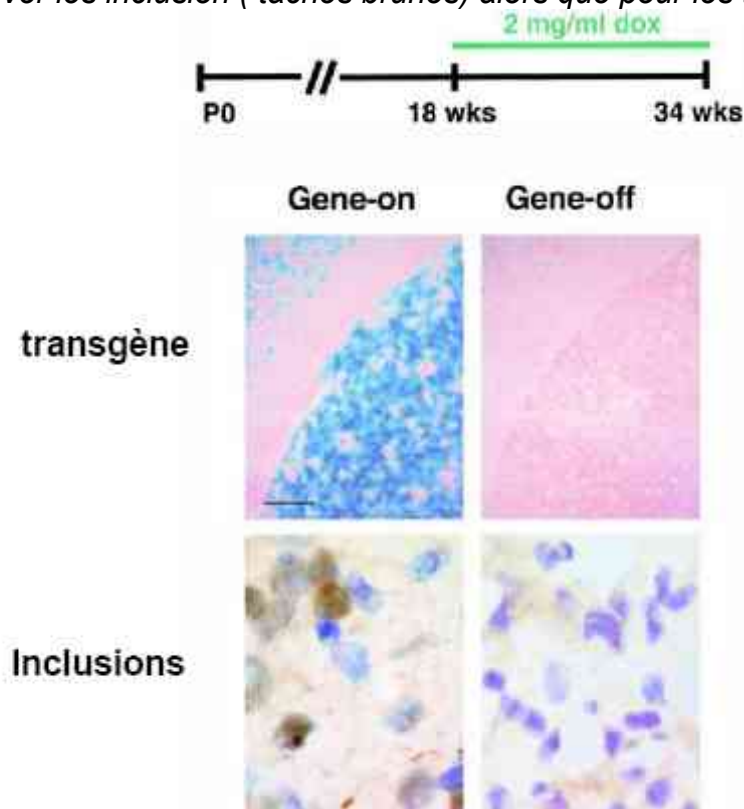


Résultat de l'expérience: chez les souris transgéniques on établit deux lots : un premier, dit contrôle, pour lequel on ne fait rien, un second où à 18 semaines on traite à la tétra cycline. (on rappelle que cela arrête l'expression de la protéine mutée). Chez les traités, après observation des premiers symptômes, on remarque d'abord un arrêt de l'expression de la protéine mutée (ce qui est recherché), puis une amélioration de la motricité (score de clasping diminuant) et une absence d'inclusion sur le plan histologique.

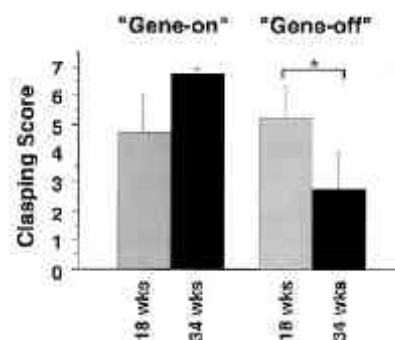
Alors que pour la souris contrôle, l'état va en se dégradant sur tous les plans.

Voir les diapos ci-dessous

Diapos des lésion histologiques après traitement: chez les contrôles on peut observer les inclusion (tâches brunes) alors que pour les traités il n'y en a pas.



Diapo troubles moteurs : chez les control (gène on) le clasping score augmente, chez les traités (gène off) le clasping score diminue.



Conclusion : dans les maladies neuro dégénératives, il y a une phase importante où les symptômes sont liés à une dysfonction cellulaire et donc peuvent être réversibles, avant d'observer une mort cellulaire (irréversible). Ce qui constitue une avancée importante dans la compréhension de ces maladies et donc de leur traitements.

III) Ciblage génique

- But: intégrer un gène donné dans ou à la place de son homologue génomique chez la souris
- Application: « détruire » un gène (knock-out) ou introduire une mutation dans un gène de la souris
- > étude de la fonction d'un gène, modèle de maladie récessive
- Principe: modification génétique introduite dans le génome de cellules totipotentes par **recombinaison homologue** et réimplantation des cellules dans un blastocyste de souris
- Histoire
 - 1981: établissement de lignées de cellules souches embryonnaires
 - 1989: obtention des 1ères souris mutantes
 - 2007: Prix Nobel MR Capecchi, M Evans & O. Smithies

On utilise comme support les cellules ES (Embryonic Stem)

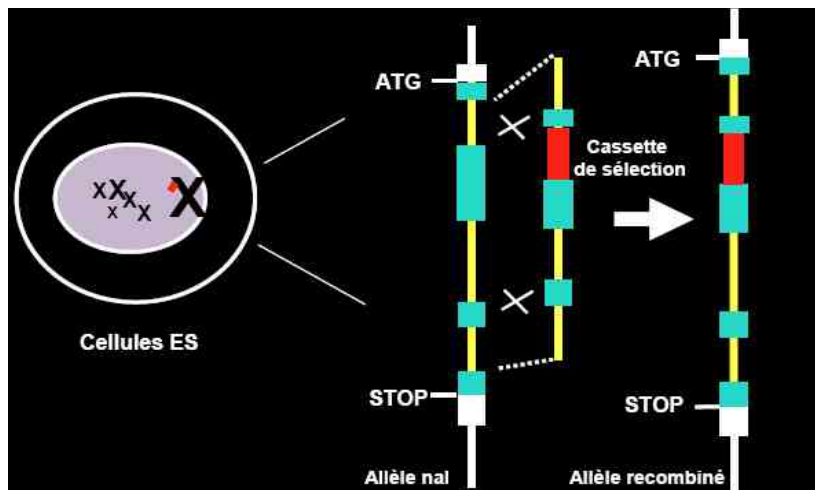
- Cellules embryonnaires indifférenciées provenant de la masse cellulaire interne d'un blastocyste (Embryon E4.5 : trophoctoderme (annexes) + masse cellulaire interne (embryon)
- Totipotentes
- Croissance (quasi) illimitée en culture avec maintien de la totipotence
- Génome est modifiable in vitro
- Réimplantables dans un blastocyste, colonisation des tissus d'un embryon hôte y compris sa lignée germinale

principe :

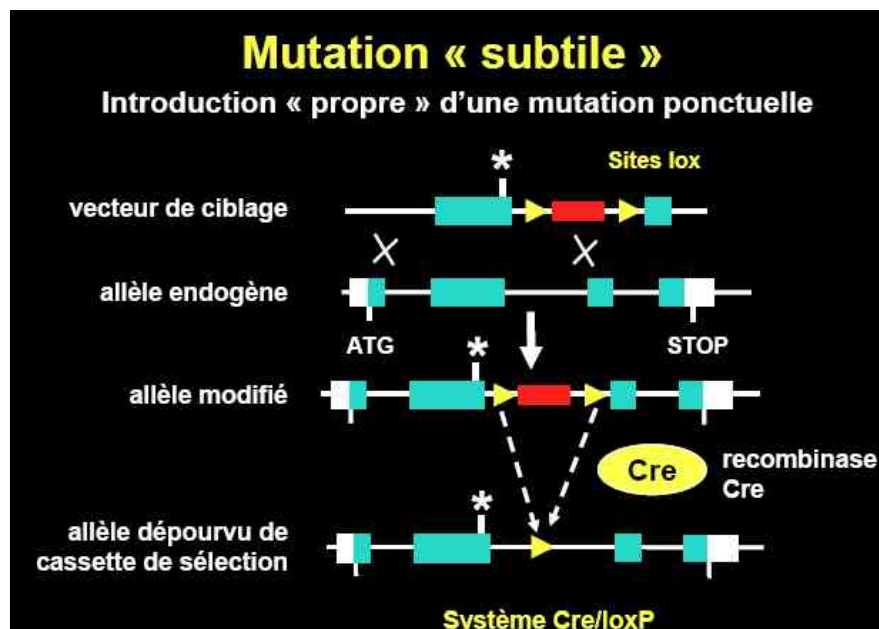
Dans un chromosome donné d'une cellule ES, on veut détruire un gène donné car on veut l'invalider.

Pour cela on fabrique un brin d'adn en tout point homologue au gène sauf qu'il contient une cassette de sélection portant un stop codon. (ceci est un exemple) Conséquence ce brin se recombine à la place du gène donné.

Problème : cet évènement est encor plus rare que de réussir une transgénèse. Pour cela on utilise une autre fonction de la cassette de sélection, par exemple , la capacité à la cellule qui a recombiné (donc qui contient cette cassette) la possibilité de se diviser en présence d'une drogue.



Exemple de l'utilité de cette technique est d'introduire une mutation ponctuelle. C'est la même stratégie sauf que l'on va retirer la cassette de sélection par un système d'enzyme cre-lox (pas à savoir comment mais est expliqué plus bas).



Autre utilité vue en détail, l'exemple du knock out d'un gène A (voir schéma ci-dessous).

D'abord on réalise la recombinaison homologe et on réimplante les cellules ES dans un blastocyste. Ce qu'il faut comprendre est que l'on va obtenir des souris qui peuvent avoir dans leurs organismes un pourcentage variable de cellules récombinées. Or on recherche les souris comportant un pourcentage élevé de ces cellules.

Pour cela il y a une astuce : les cellules ES proviennent d'une souris ayant un pelage blanc-jaune, alors que le blastocyste accepteur code pour un pelage noir.

Par conséquent on obtient des souris au pelage agouti (noire et blanche) et donc plus une souris est blanche mieux est le pourcentage de cellules recombinées qu'il contient.

Finalité : pour établir une descendance de façon stable ce qu'il faut est d'avoir des cellules germinales qui ont toutes la modification. Donc on croise les souris agoutis avec des souris normales pour générer des souris qui auront dans toutes leurs cellules germinales la modification.

Ces souris sont de génotype $A^{-/+}$, on les recroise ensemble et on obtient un quart des souris de génotypes $A^{-/-}$, un quart sont sauvages $A^{+/+}$ et la moitié sont hétérozygotes.

(Bon désolé mais j'ai recopié ce qu'a dit la prof, avec le schéma c'est plus compréhensible après ce qu'il retenir je pense, c'est qu'on cherche à avoir des souris $A^{-/-}$).



Voyons l'application à un cas concret: la Mucoviscidose.

- Très fréquente (~1/4000 naissance)
- Clinique: Pathologie des sécrétions exocrines > Manifestations respiratoires (surinfection bactérienne) et digestives (pancreas et intestin)
- Génétique
 - Autosomique récessif
 - Mutation du gène CFTR qui régule le transport du chlore à travers les cellules > perte de fonction.

Mucoviscidose: des modèles murins

mais pas de modèle pertinent

- 11 Modèles murins (2007)
 - Stratégie: Invalidation du gène CFTR ou introduction mutation $\Delta F508$ (70% des patients) ou autre mutation ponctuelle dans le génome de la souris
 - Manifestations intestinales et rarement pulmonaires *Ce n'est donc pas un bon modèle puisqu'on ne peut étudier le versant le plus important de cette maladie qui est la sensibilité aux infections.*
- Un début d'explication à cela serait la différence histologique structurelle et fonctionnelle de la souris (en particulier la teneur en glande sous muqueuse qui serait moins grande) et la présence d'un autre canal chlore qui suppléerait le cftr. Donc ces modèles ont été peut utiliser pour évaluer des stratégies thérapeutiques mais pour étudier la physiopathologie.*

Autre application :Amyotrophie spinale infantile et modèles murins

- Clinique: Paralysie et atrophie musculaire , (1/6000 naissances) - Pas de traitement
- Anapath: dégénérescence des motoneurons
- Génétique:
 - Autosomique récessif
 - Gène SMN (délétion homozygote emportant au moins l'exon 7 chez 93% patients) > perte de fonction
 - Protéine SMN: expression ubiquitaire, fonction mal connue
- Souris SMN knock-out - > létalité embryonnaire très précoce au stade blastocyste : *la mortalité précoce a conduit à entreprendre une nouvelle stratégie pour la contourner.*

Stratégie : (voir schéma ci-dessous) pour éviter la mortalité on cherche à produire un modèle où l'exon 7 serait délété (car c'est la cause la plus fréquente) **seulement** dans les neurones.

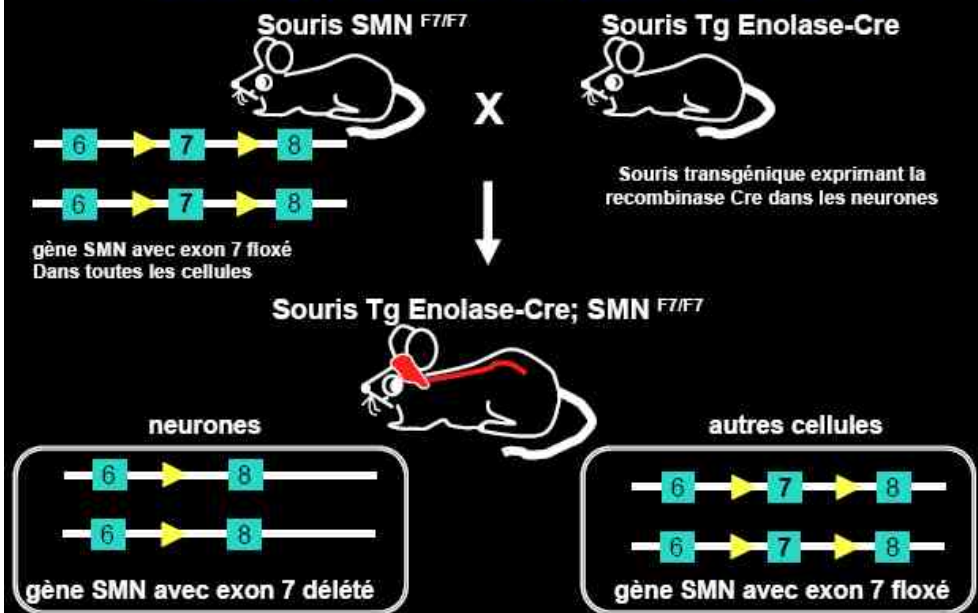
Pour cela on utilise le système cre-lox, qui selon la prof n'est pas à savoir mais juste pour notre culture générale.

D'abord on fait une première souris où la recombinaison homologue sert à introduire des séquences lox autour de l'exon 7 dans les deux allèles. Ces séquences de 34 nucléotides, qui sont dans le même sens, en présence d'une cre-recombinase vont servir à délimiter l'excision par cette enzyme.

*Puis on fait une souris transgénique qui comporte le gène de la recombinaise et un promoteur (ici celui de l'enolase) conduisant à l'expression de la recombinaise **seulement** dans les neurones.*

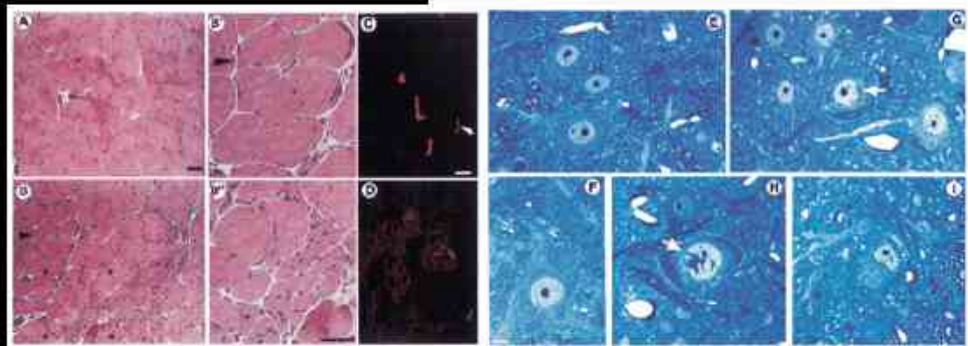
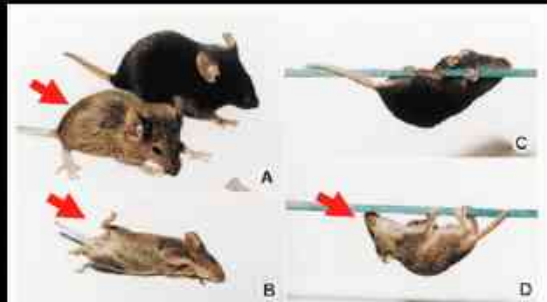
On croise ces souris et on obtient une souris qui va délété son exon 7 du gène smn seulement dans les neurones, par conséquent une souris reproduisant l'amyotrophie spinale infantile.

Ciblage de la délétion de l'exon 7 du gène SMN dans les neurones avec le système Cre-Lox



Souris porteuses d'une délétion de l'exon 7 du gène SMN exclusivement dans les neurones

- Survie moyenne ~28 jours
- Paralyse musculaire progressive
- Dénervation musculaire
- Anomalies structurales des motoneurones



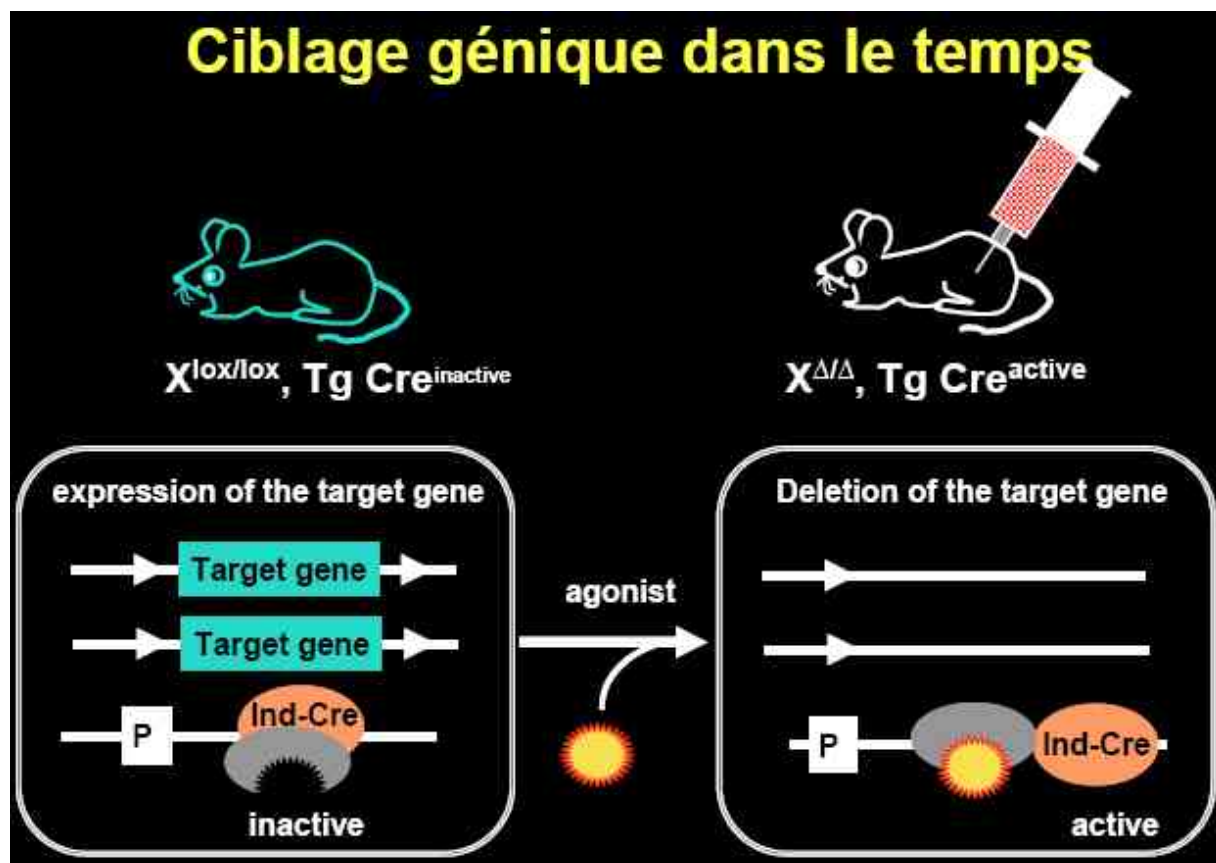
Frugier et al, HMG 2000

Nb : le problème est que cette maladie n'atteint pas que les neurones mais aussi les muscles. Donc le bon modèle murin est celui où l'exon 7 est délété dans ces deux types cellulaires.

Autre outils : après expression conditionnelle d'une anomalie dans l'espace (un tissu donné) on peut aussi le faire dans le temps.

Donc pour l'amyotrophie spinale infantile on aurait pu faire exprimer l'anomalie à partir de la naissance.

Pour cela on utilise aussi le système cre-lox où la souris transgénique portant la recombinaise présente un promoteur sensible à un agoniste. Par conséquent la recombinaise ne sera produite qu'en présence de l'agoniste lequel étant souvent du tamoxifène.



Nb : Pour toutes les maladies autosomiques dominantes, lorsque l'on crée des modèles par transgénèse, l'expérience montre qu'il faut faire sur exprimer l'anomalie pour pouvoir observer le phénotype. Ce qui est différent du ciblage génique où l'on modifie le génome et où le niveau d'expression est identique à celui du gène.

Voilà c'est fini puisque les dernières diapos parlent d'elle-même.

Modèles animaux de maladie humaine

	Transgénique classique	Ciblage génique
Technologie	Assez facile (~6 mois)	Plus Complexe et plus longue (> 18 mois)
Site d'expression	Conditionné par le choix du promoteur	Identique au gène endogène
Niveau d'expression	Modulable (Faible à élevé)	Identique au gène endogène
Applications	Maladies A. Dominantes (gain de fonction)	Maladies A. récessives (perte de fonction)

Autres Modèles animaux

- **Poisson:** le poisson zèbre (embryons transparents) (modèles de cardiomyopathie)
- **Insecte:** la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*, 137 Mb, 14.000 gènes) (modèles de maladie Parkinson)
- **Ver nématode:** *Caenorhabditis elegans* (100 Mb, 19.000 gènes) (modèles de myopathie)
- **Levure:** *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb, 6000 gènes) (étude de la fonction de la frataxine, ataxie de Friedreich)

Modèles animaux adaptés à l'étude d'une maladie génétique humaine

- Possibilités extrêmement diverses (technologie, espèce)
- Design du modèle animal conditionné par la maladie (mode de transmission/ nature des mutations) ET la question posée
- Modèle animal récapitulant la maladie humaine à l'identique RARE > intérêt analysée combinée de différents modèles