

# Les modifications génétiques chez les animaux

## Utilisation des « nouvelles » biotechnologies

Geneviève Jolivet

Biologie du Développement et Reproduction

# Pourquoi vouloir modifier le patrimoine génétique d'un organisme?

- ❖ Amélioration de l'espèce
- ❖ Correction d'un caractère porté par une marque génétique
  - Il faut connaître l'origine génétique du caractère
  - Un seul gène ou multigénique
- ❖ Thérapie génique
  - Aucun droit à l'erreur
- ❖ Recherche fondamentale : étudier le rôle d'un gène

# Quelles méthodes?

- ❖ Introgression d'un caractère par croisements successifs et sélection des individus qui portent le phénotype d'intérêt

Lent et résultats parfois négatifs

On peut co-sélectionner un ou plusieurs caractères sans intérêt ou même délétère

- ❖ Mutagénèse

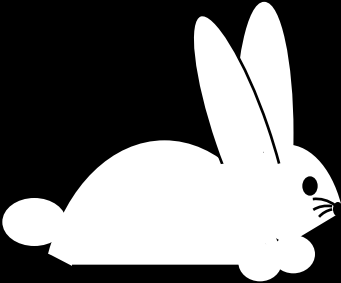
Les agents mutagènes : chimiques (on plonge les graines dans une solution d'éthyl-methanesulfonate) ou on expose la plante ou les graines à des rayonnements ionisants

Aucune spécificité : il faut trier en aval selon le phénotype recherché. Valable chez les plantes (plus de 180 espèces ont été ainsi produites, 2500 variants, voir la « mutant variety database ») ou les micro-organismes

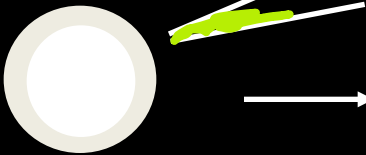
- ❖ Transgénèse additive : on rajoute un gène dans le génome pour obtenir l'expression d'une protéine à l'origine d'un caractère

Si on ne choisit pas le site d'intégration, on risque de provoquer de la « mutation insertionnelle »

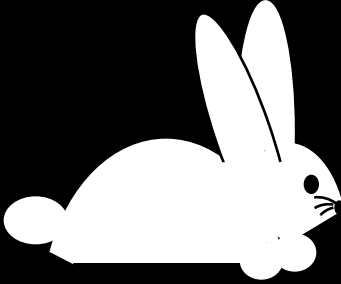
Injection d'une  
solution  
d'ADN



Femelle  
« donneuse »



Embryon  
unicellulaire



Femelle  
« receveuse »

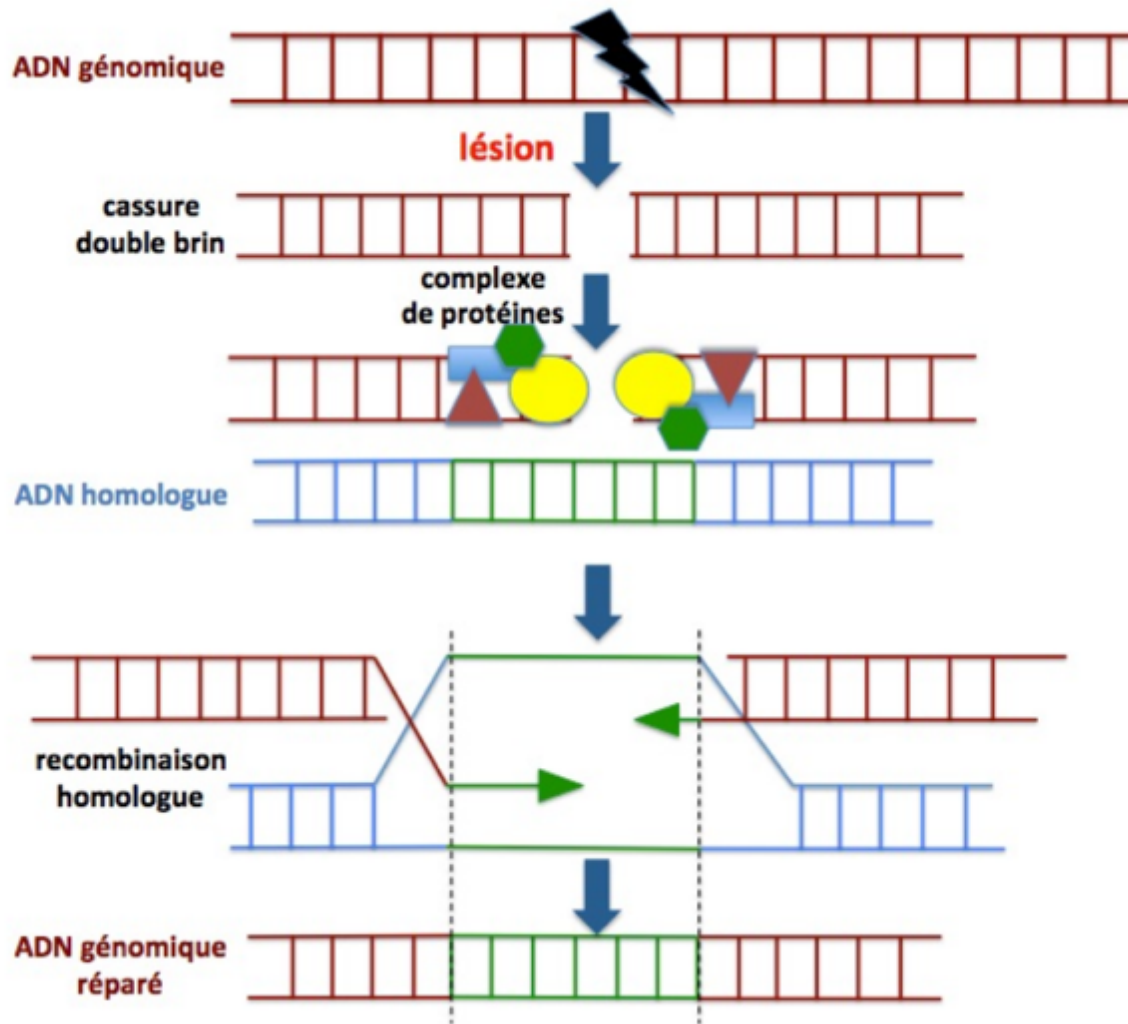


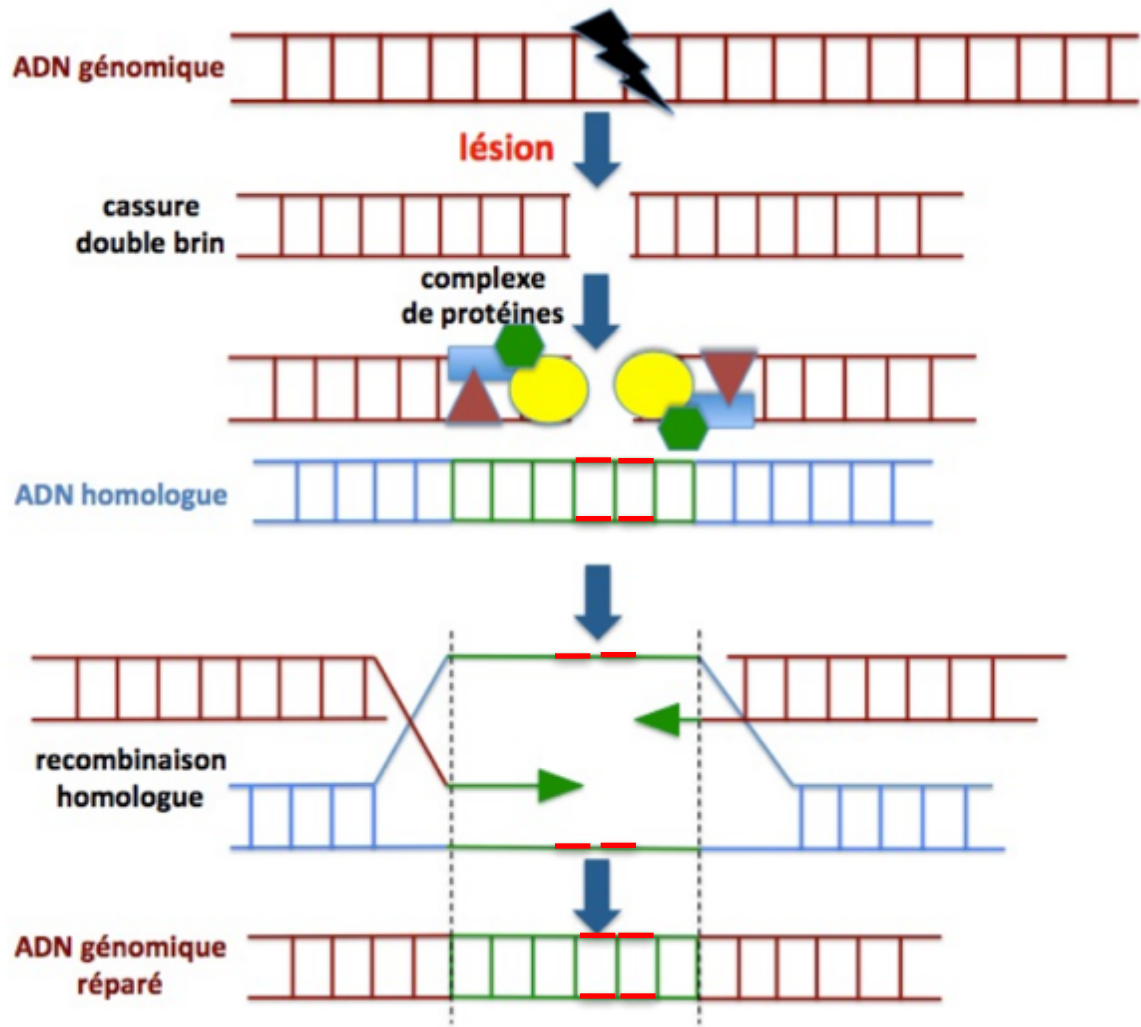
Depuis les années 70-80, les objectifs sont de travailler avec le plus de précision possible :

Cibler la localisation de la modification génétique

Utiliser le mécanisme de la recombinaison homologue

# La recombinaison homologue et la réparation d'une lésion dans l'ADN

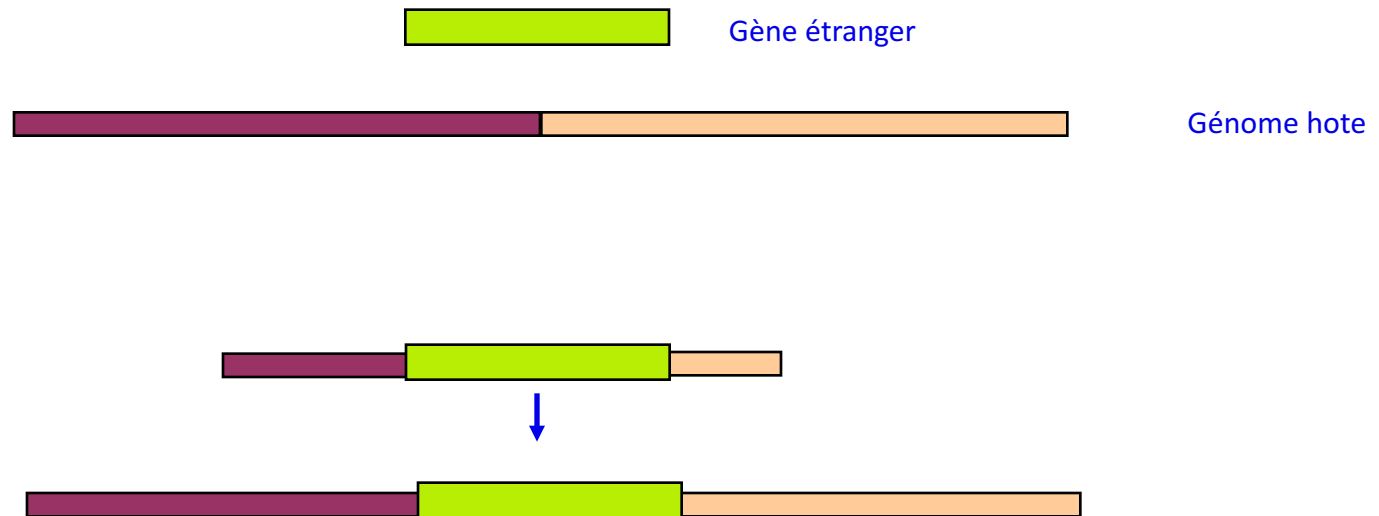




Si l'ADN « homologue » possède une séquence différente de l'ADN génomique de départ, c'est cette séquence qui est introduite après « réparation ».

# Cibler la localisation de la modification génétique

La recombinaison homologue comme outil pour introduire une séquence nouvelle à un endroit précis, choisi, du génome

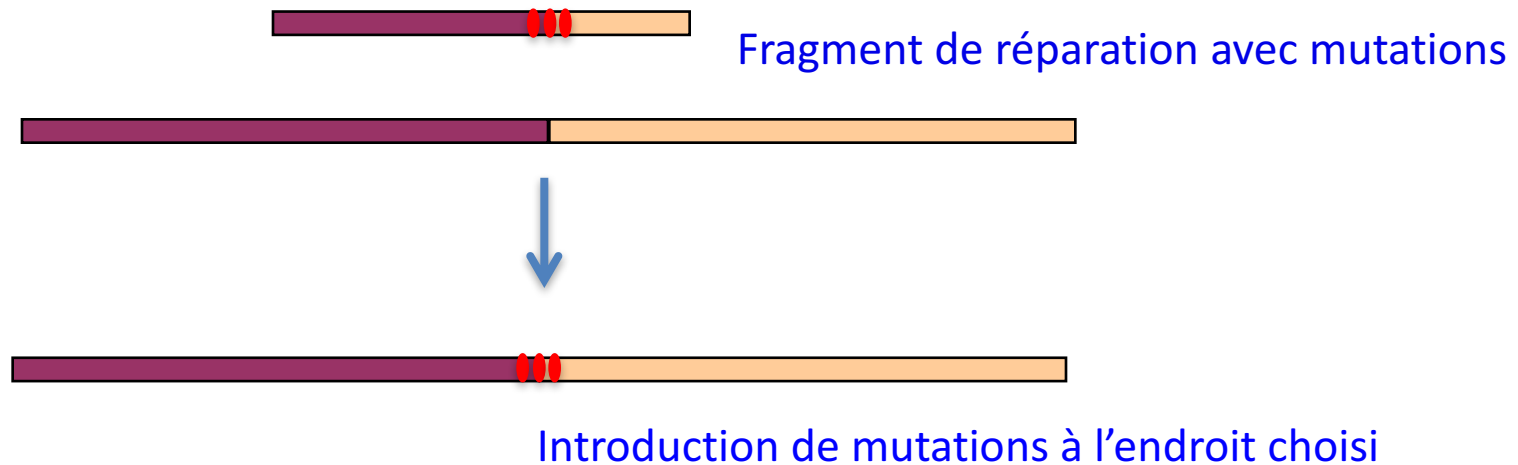


Mais événement très rare puisqu'il faut attendre qu'une lésion de l'ADN se produise de façon spontanée au point ciblé



## Cibler la localisation de la modification génétique

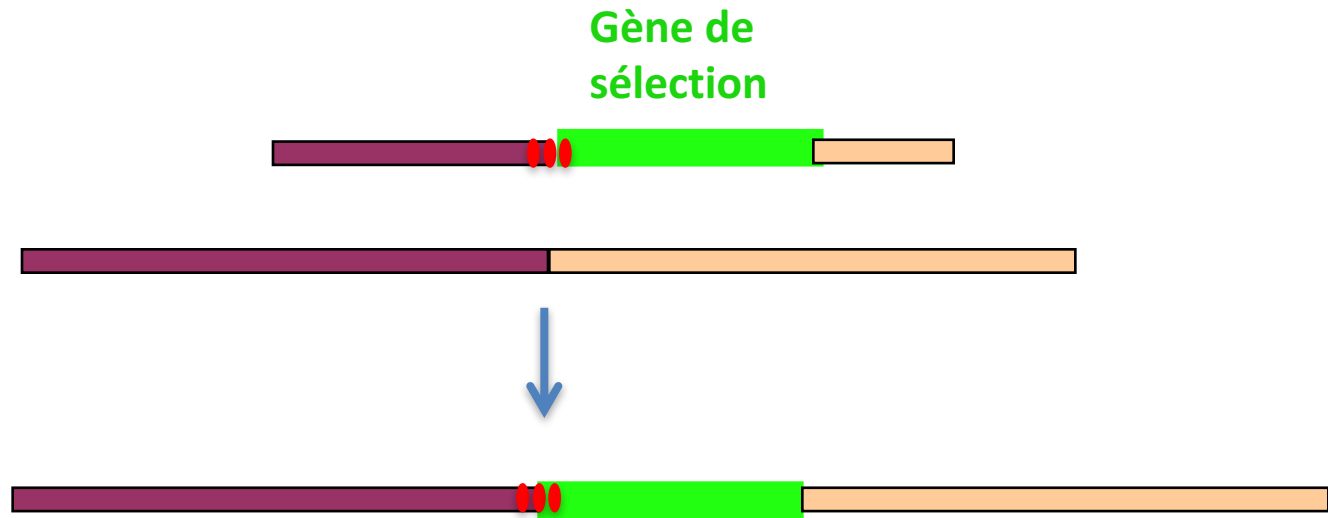
La recombinaison homologue comme outil pour introduire une séquence nouvelle à un endroit précis, choisi, du génome



Mais événement très rare puisqu'il faut attendre qu'une lésion de l'ADN se produise de façon spontanée au point ciblé

## Cibler la localisation de la modification génétique

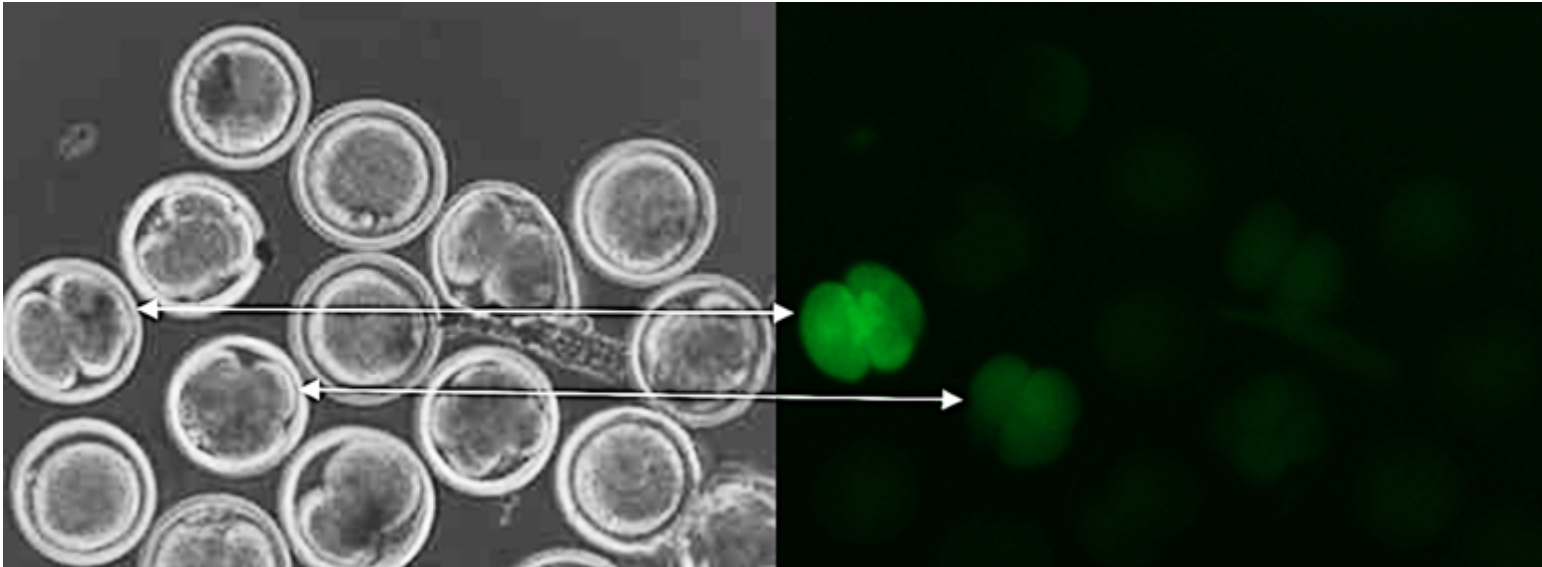
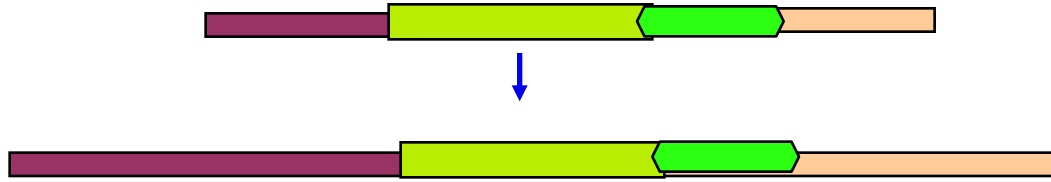
La recombinaison homologue comme outil pour introduire une séquence nouvelle à un endroit précis, choisi, du génome



Le gène de sélection permet de sélectionner la cellule où a eu lieu l'événement de recombinaison homologue

Mais introduction d'un gène qui n'a aucun intérêt pour le phénotype recherché....

Gène de sélection



Détection de la fluorescence dans des embryons en culture

Le gène de sélection permet de sélectionner **la cellule** où a eu lieu l'événement de recombinaison homologue

Stratégie qui est utilisable dans le cas où on travaille sur des cellules

Comment faire pour modifier le génome d'un organisme?

Soit injecter des milliers d'embryons avec le fragment de recombinaison homologue, pas de sélection, puis transférer ces embryons dans des femelles receveuses, attendre la naissance de l'individu porteur de LA mutation voulue.....

Soit travailler avec des cellules ES, les modifier génétiquement (utilisation de la sélection pour isoler les cellules portant la mutation voulue) puis reconstituer un organisme à partir de ces cellules ES

**Mais les cellules ES n'existent que chez la souris ou l'humain**

Depuis les années 70-80, les objectifs sont de travailler avec le plus de précision possible :

- ❖ Cibler la localisation de la modification génétique

  - Utiliser le mécanisme de la recombinaison homologue

  - Événement très rare

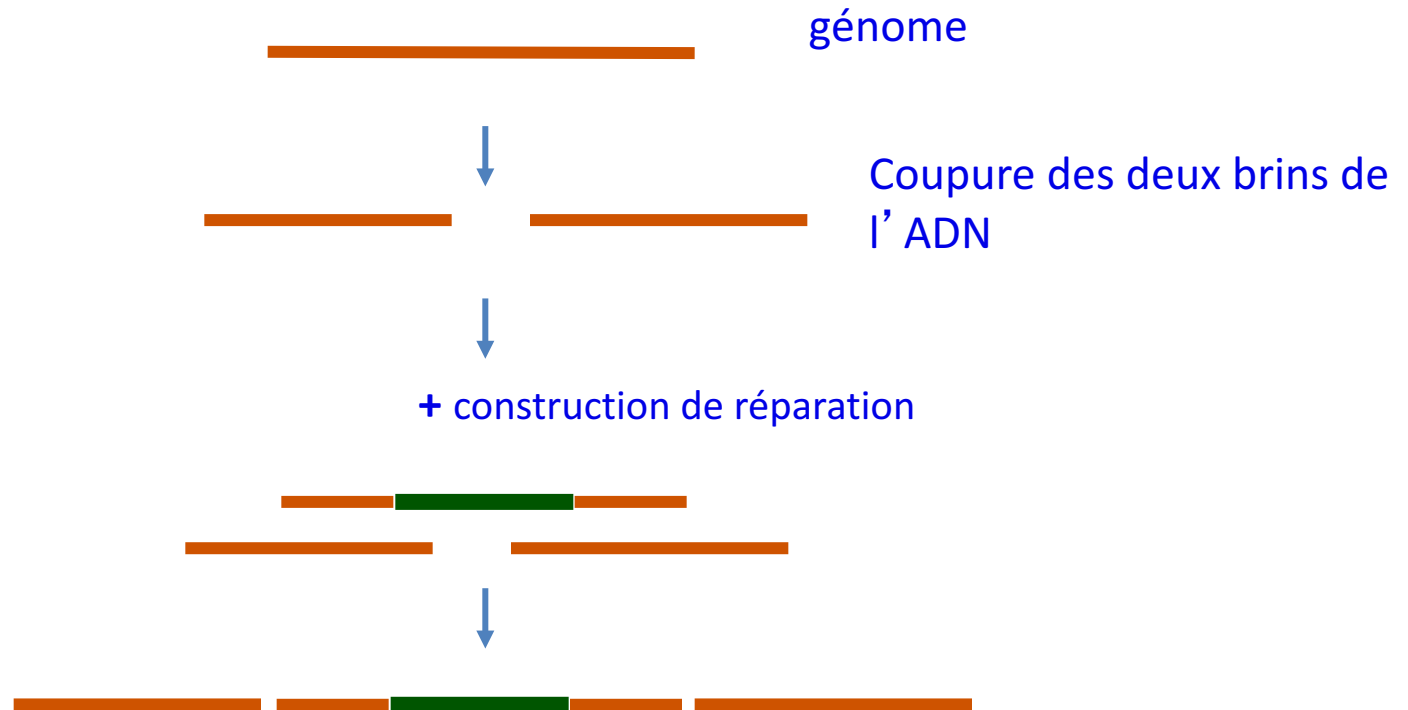
- ❖ Déterminer précisément quelle modification génétique on veut introduire dans ce site

  - Identifier le gène responsable du phénotype recherché

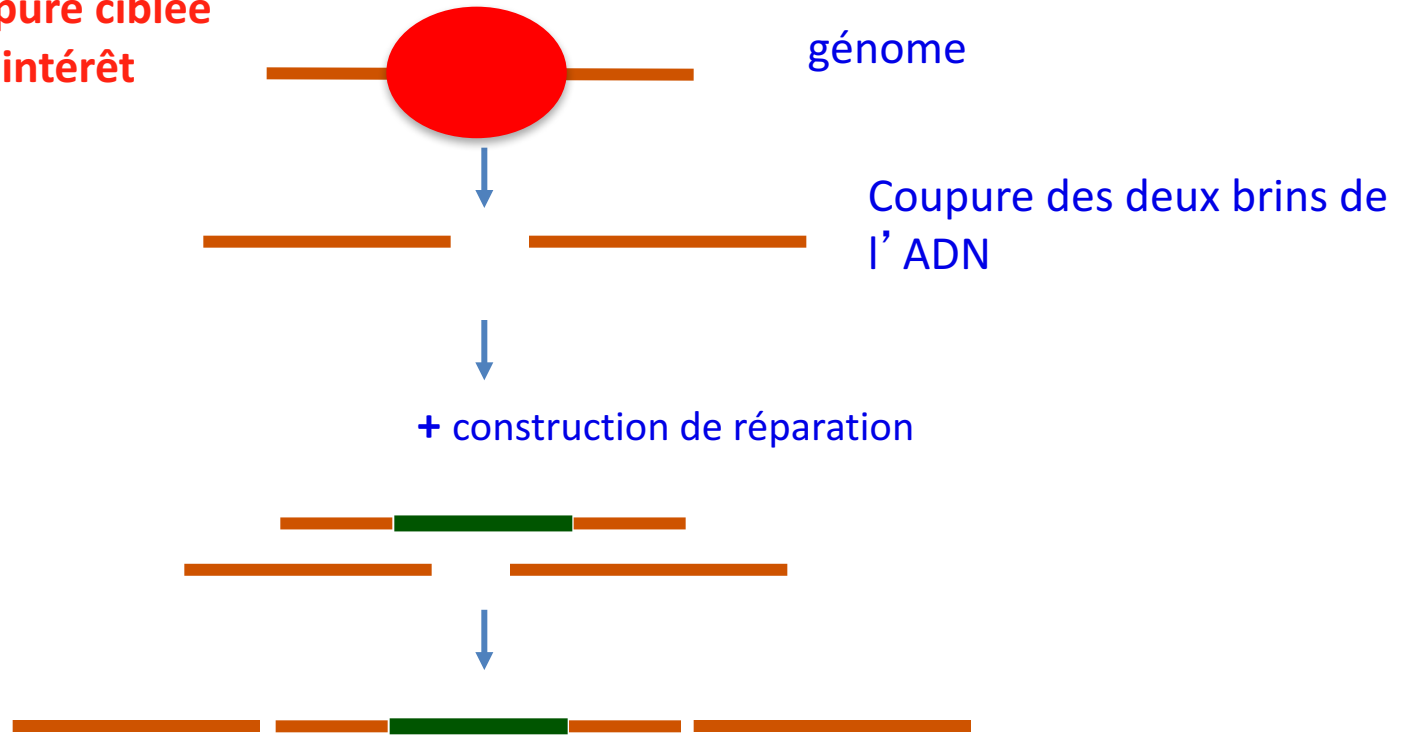
- ❖ Ne pas introduire des fragments de génome qui sont sans intérêt

- ❖ Ne pas introduire d'autres modifications

La fréquence de recombinaison homologue est augmentée de 10x ou même 100x si on provoque une coupure de l'ADN au point ciblé!

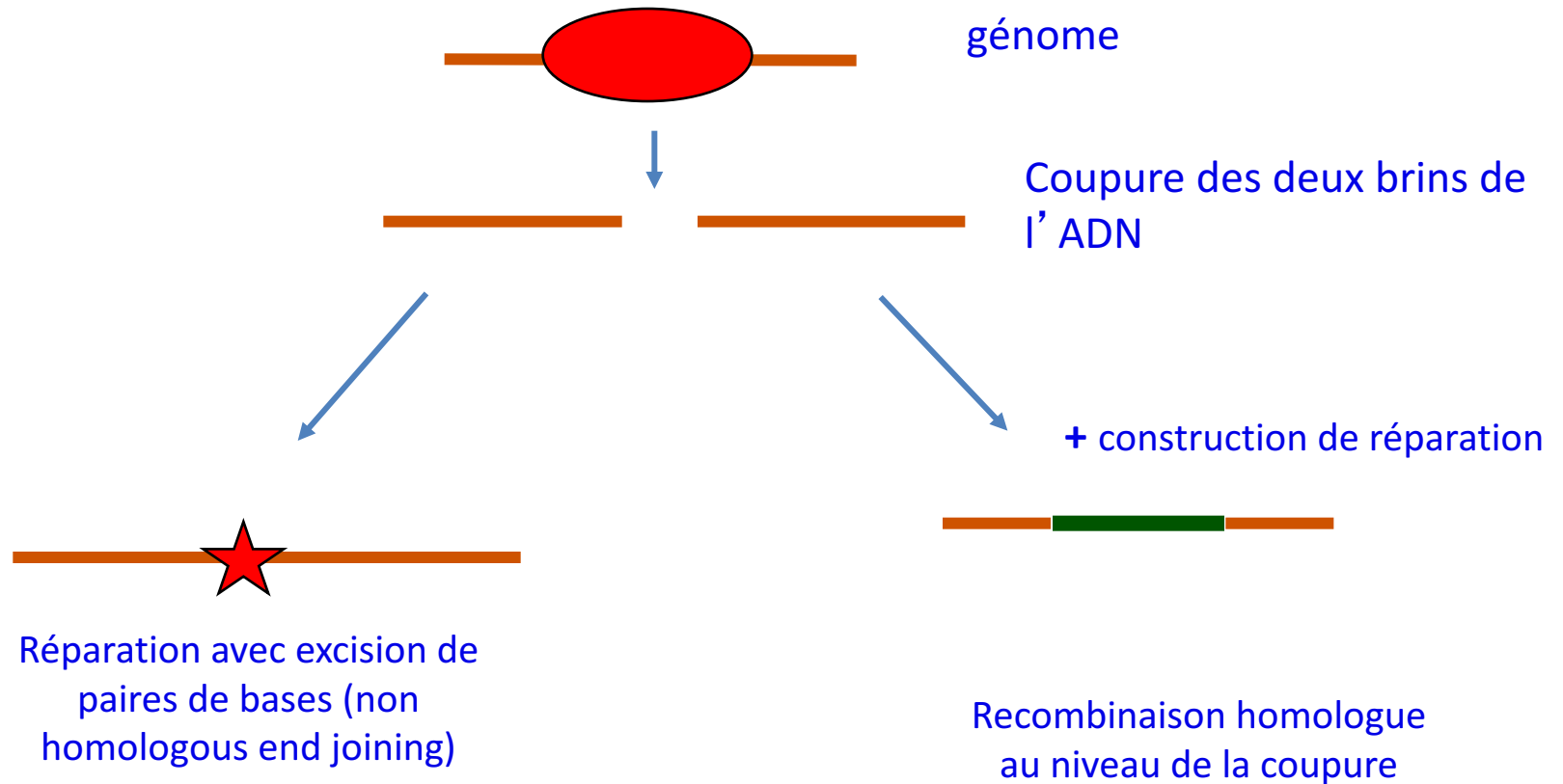


Enzyme de coupure ciblée  
sur la région d'intérêt



La fréquence de recombinaison homologue est augmentée de 10x ou même 100x!!

# Enzyme de coupure ciblée sur la région d'intérêt

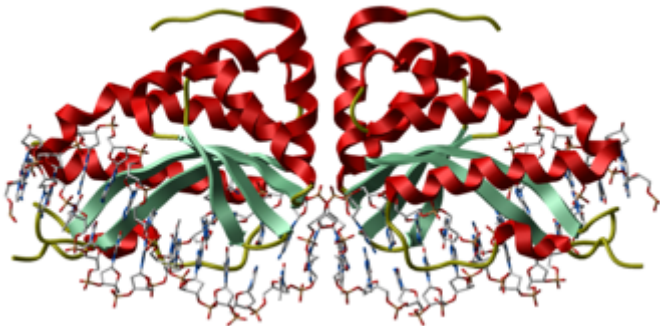


La région perd son fonctionnement (par exemple, pas de transcription, pas de régulation de l'expression d'un gène etc....)

Technologie qui est connue depuis les années 80 mais qui a revu le jour à partir de 2007

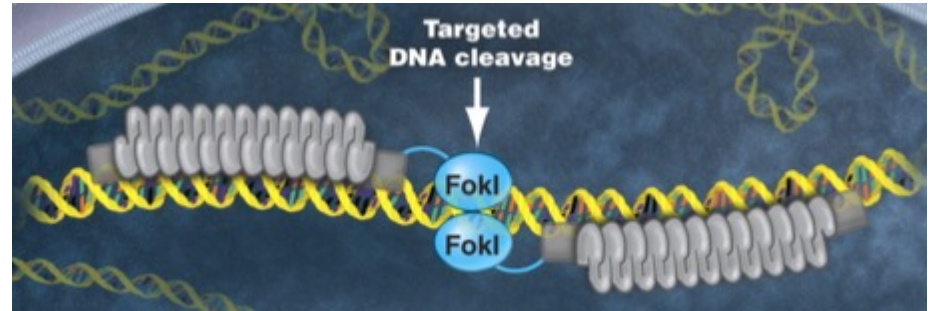


# Meganuclease

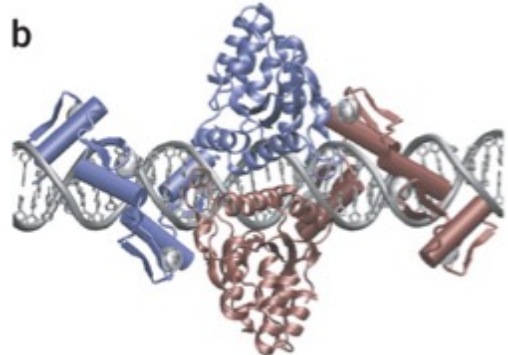
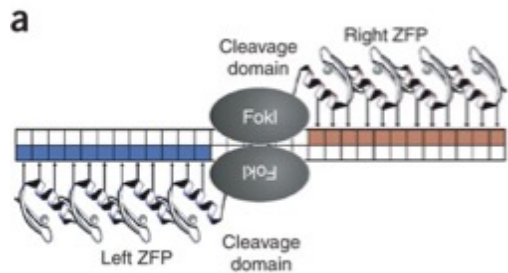


T A G G G A T A A      C A G G G T A A T  
A T C C C      T A T T G T C C C A T T A

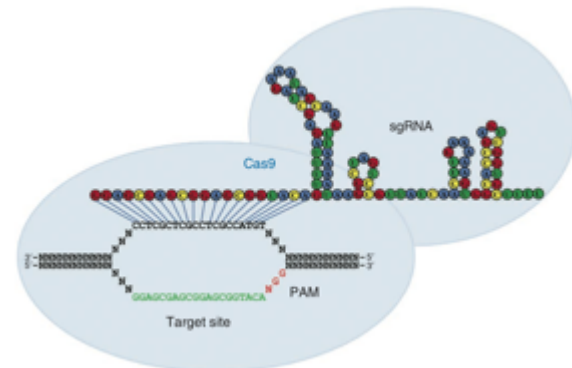
# TALE Nuclease

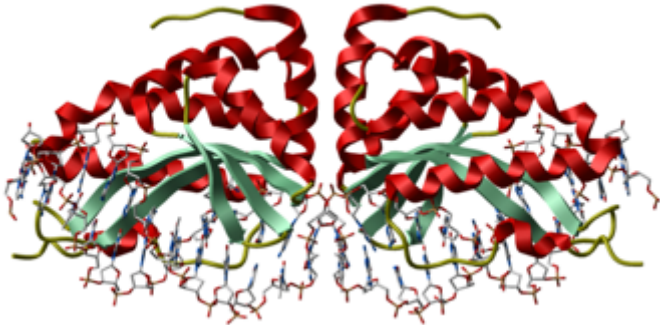


# Zinc Finger Nuclease



CRISPR/ Cas9  
(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)





T A G G G A T A A      C A G G G T A A T  
A T C C C      T A T T G T C C C A T T A

Même principe de fonctionnement qu'une enzyme de restriction

Enzymes qui n'existent pas chez les levures

Pas de site de coupe chez les mammifères

**SYSTEME PERFORMANT** mais peu d'utilisations possibles

... artificielle d'une « banque » d'enzymes

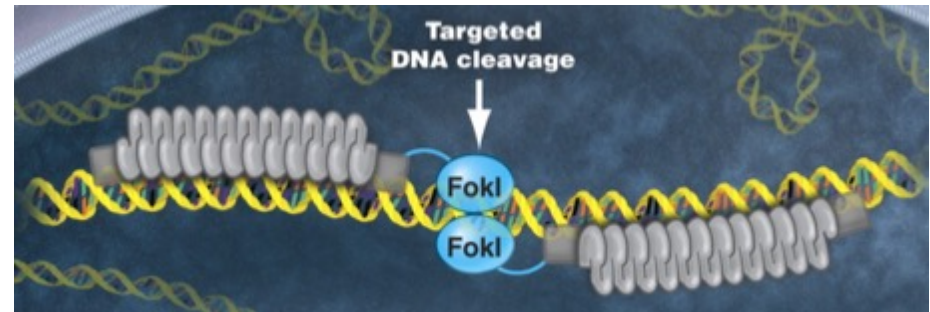
capables de reconnaître un motif du génome d'intérêt : système pas adaptable.

Si on trouve une enzyme qui peut reconnaître le site d'intérêt, on est gagnant!

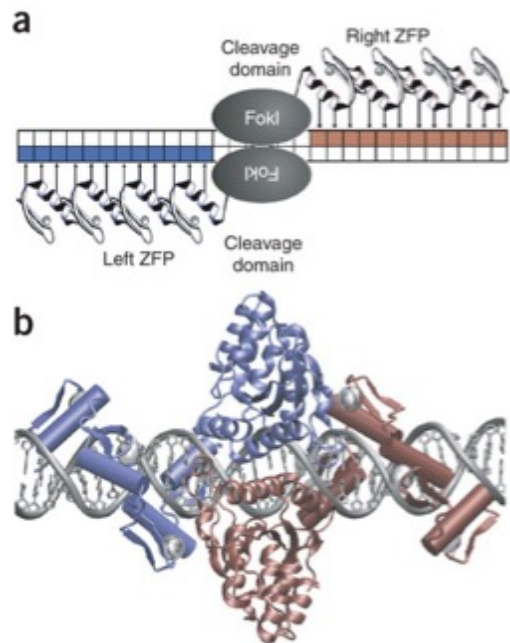
Sinon.....

À partir de 2007...

## TALE Nuclease



## Zinc Finger Nuclease



Enzymes créées par l'utilisateur

Par association de motifs protéiques capables de se lier à l'ADN

Système efficace (+/-) mais assez lourd à produire

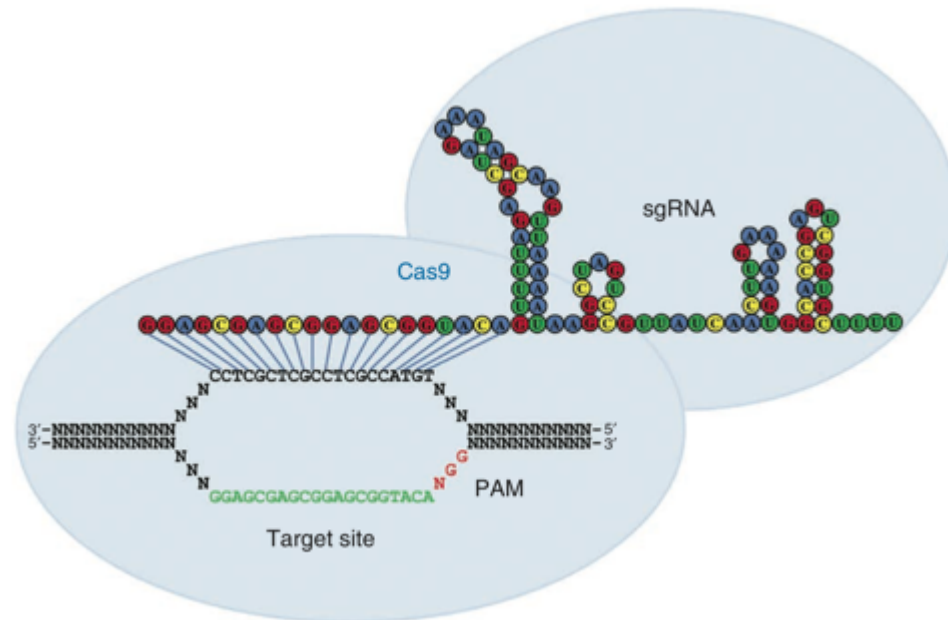
**Beaucoup de succès**

# La « mémoire immunitaire » chez les bactéries

Mécanisme soupçonné depuis longtemps (années '90) mais il a fallu attendre jusqu'aux années 2010 pour en décrire le véritable support

Permet aux bactéries de couper l'ADN d'un phage infectieux et donc d'éliminer le phage

CRISPR/ Cas9  
(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)



Patrick Maurel

🏠 Accueil / Dossiers scientifiques / CRISPR/Cas9 édition génomique

## CRISPR/Cas9 édition génomique

**Un outil basé sur le système immunitaire adaptatif des bactéries et archées**

Présentation

CV Patrick Maurel

Nouvelles scientifiques

Art Neanderthalien ?

NEW

<http://www.scienceaujourlejour.fr/pages/pages-scientifiques-1/crispr-cas-edition-genomique.html>

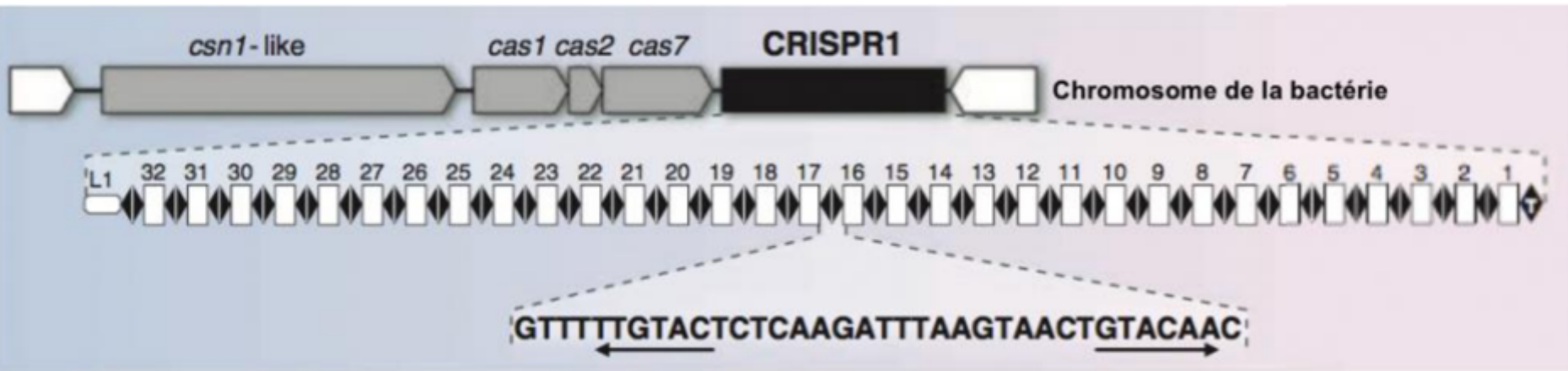
### **CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea**

Philippe Horvath, Rodolphe Barrangou

*Science* 08 Jan 2010:

Vol. 327, Issue 5962, pp. 167-170

Il existe des loci très particuliers dans les génomes des bactéries et des archées

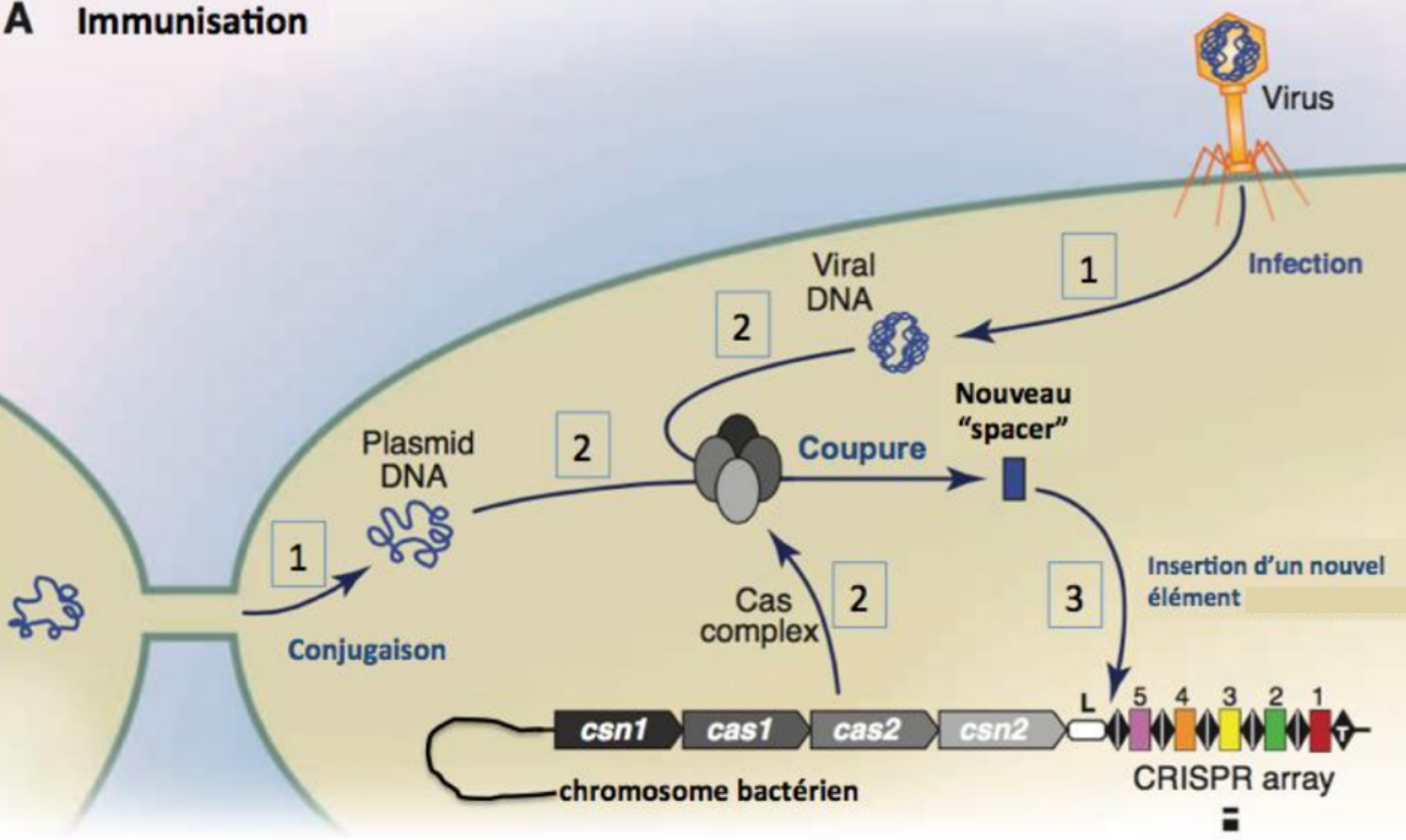


*Systeme CRISPR1 de la bactérie S. thermophilus*

Adapté de Horvath 2010

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat

# A Immunisation



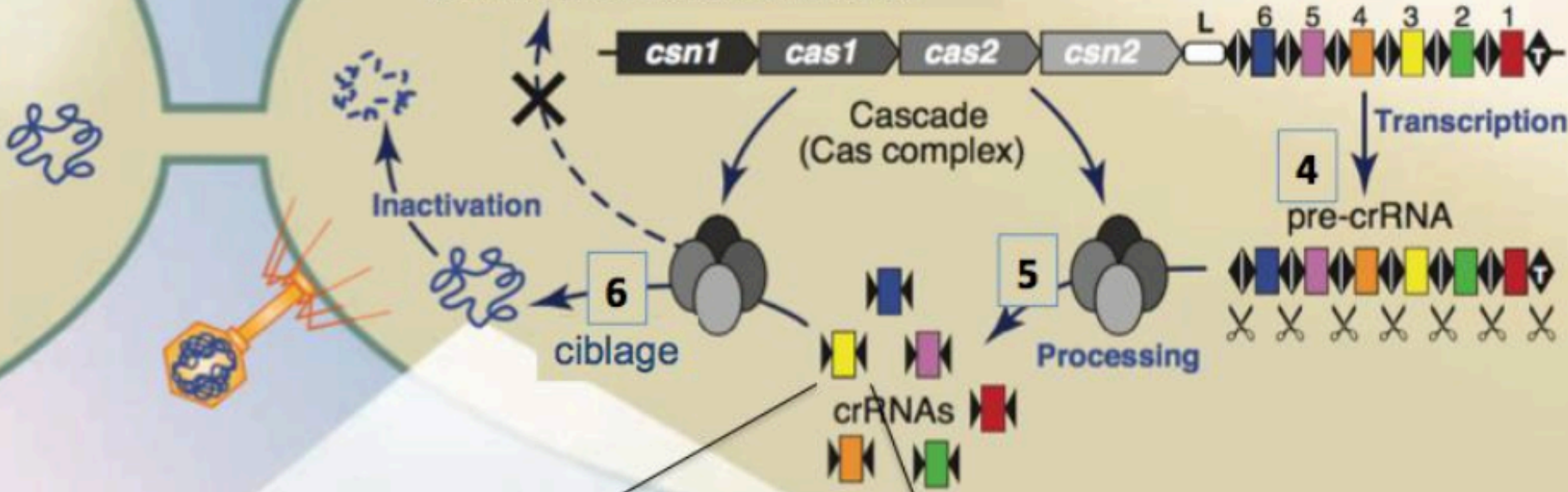
Adapté de Horvath 2010.

# B Immunité

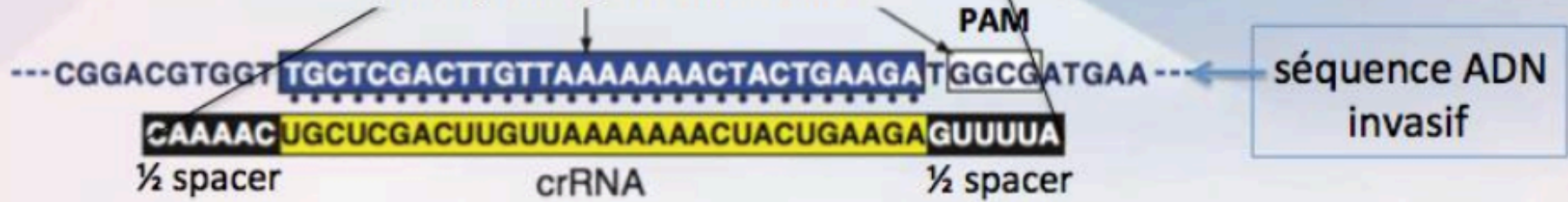
Immunité acquise contre les infections virales ou plasmidiques



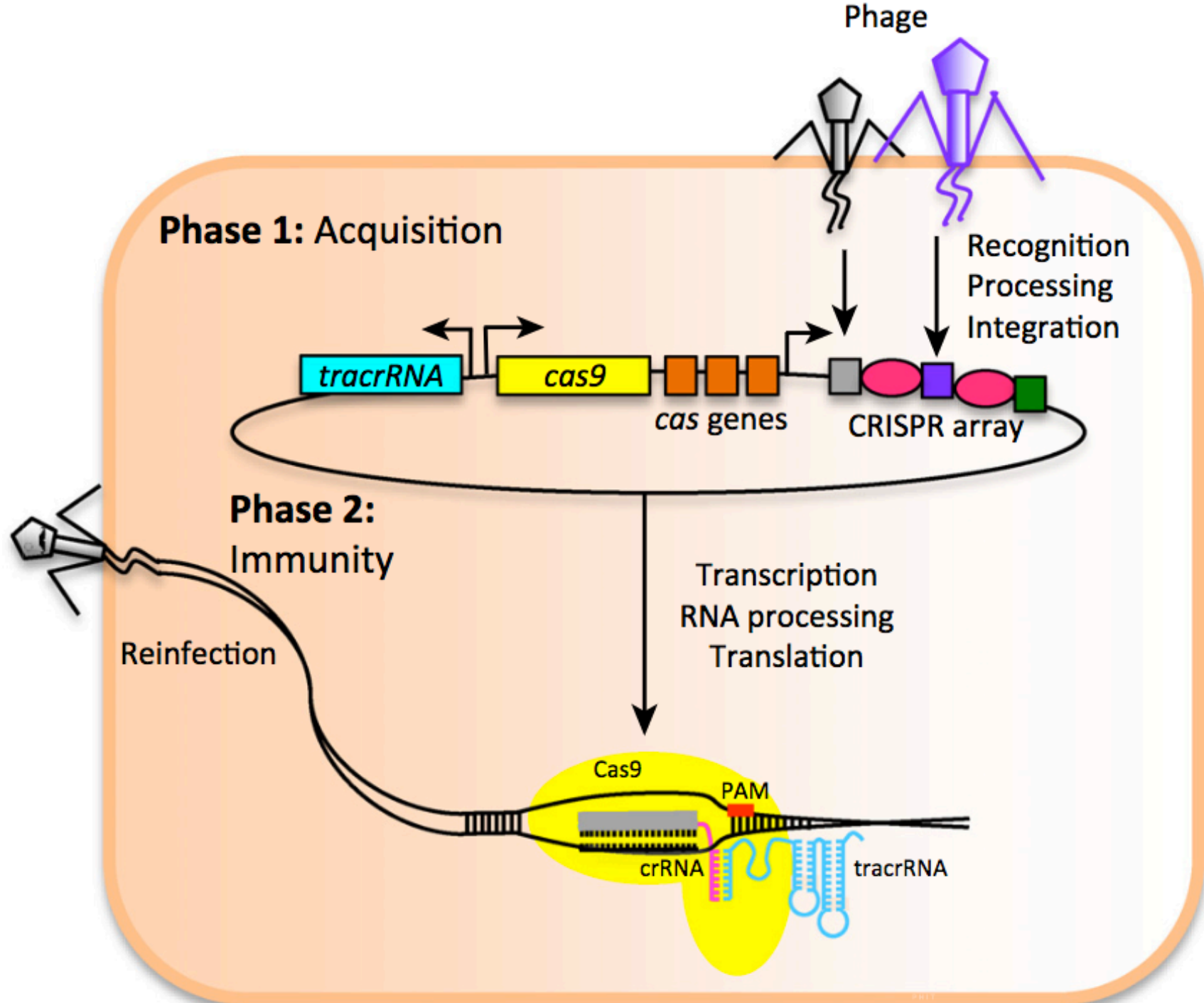
L'absence de PAM dans le locus CRISPR prévient l'autoimmunité

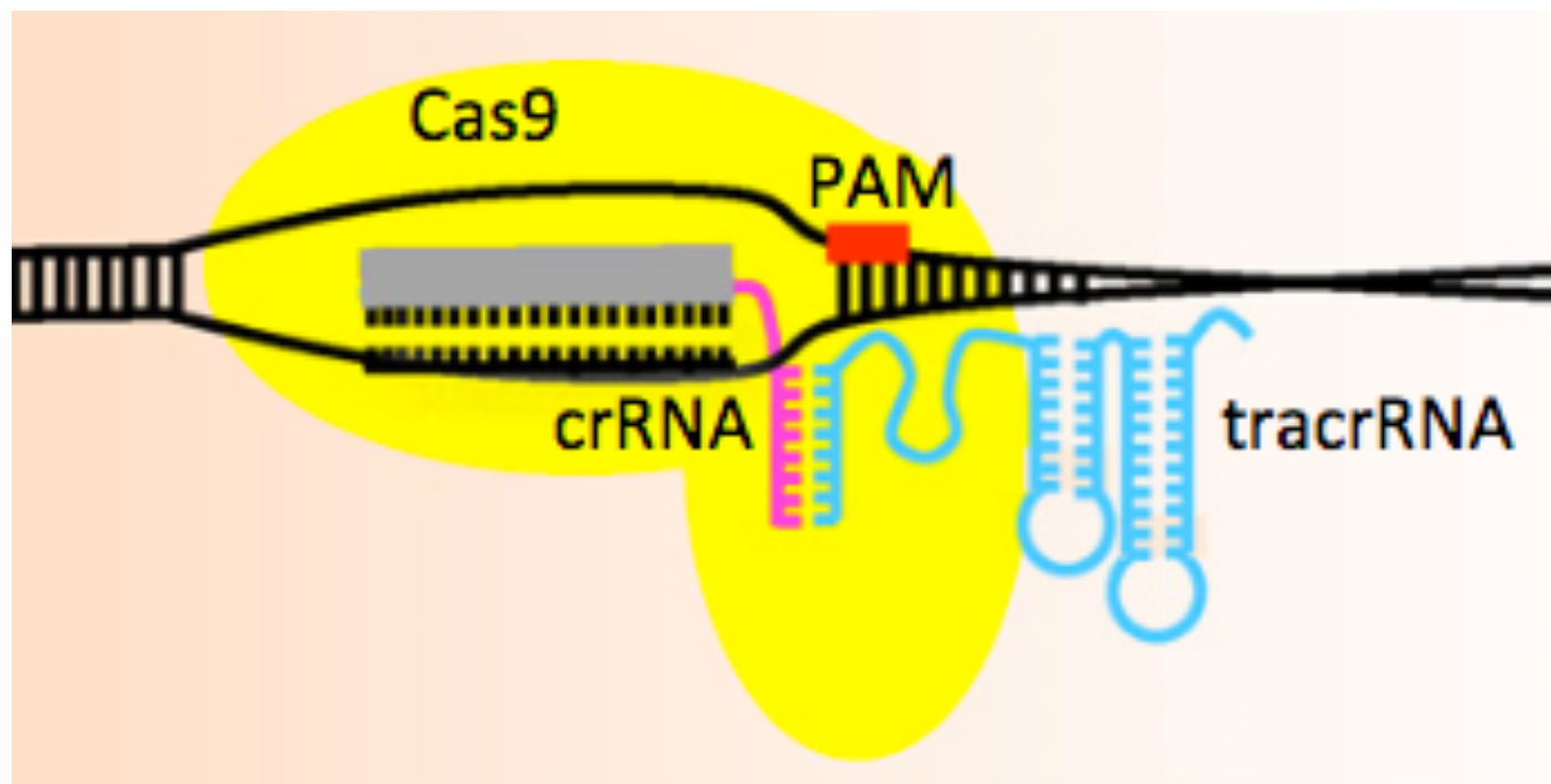


Interaction avec un ADN invasif portant une séquence proto-spacer et un PAM

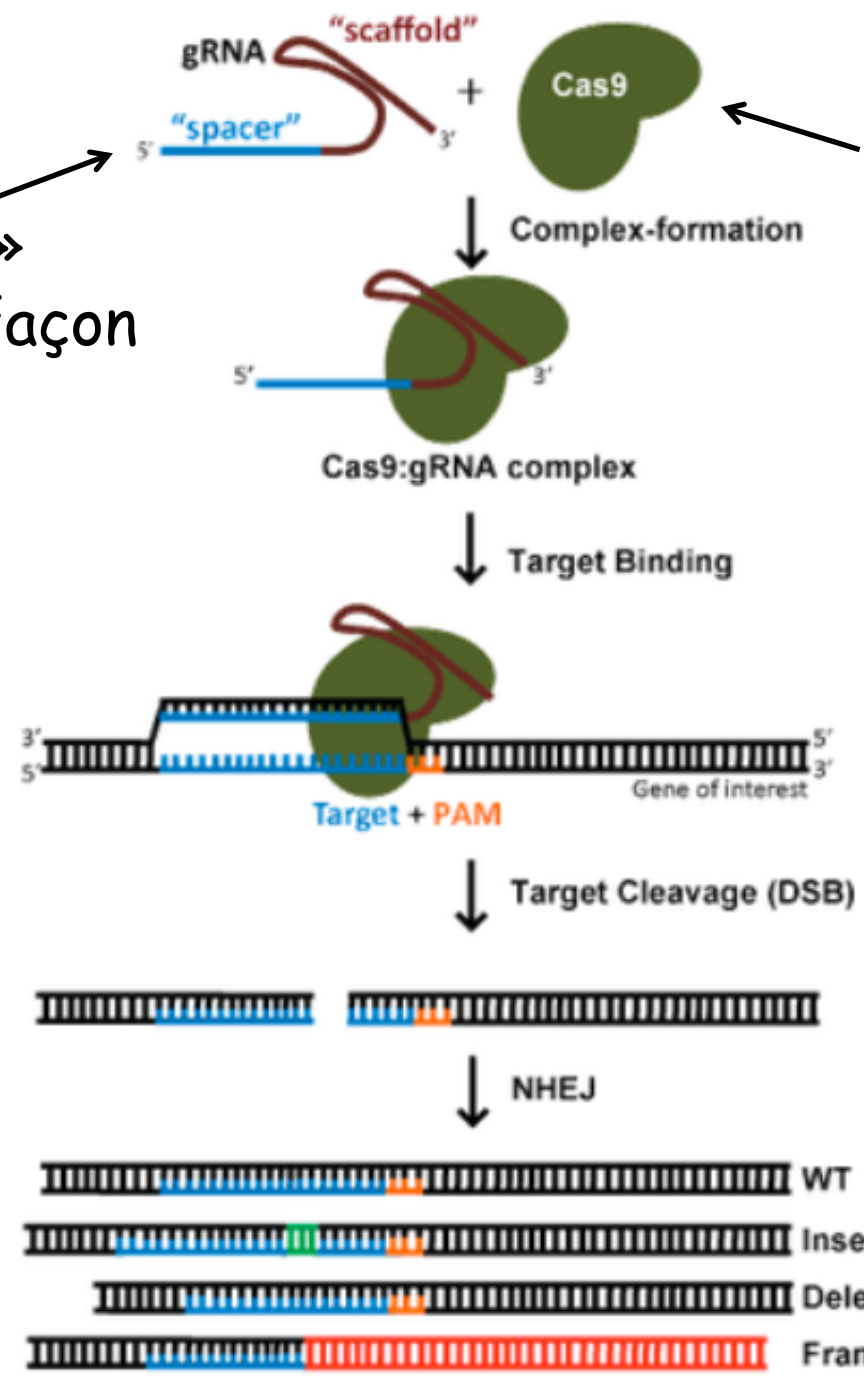








ARN « guide »  
(Synthèse à façon  
Possible)



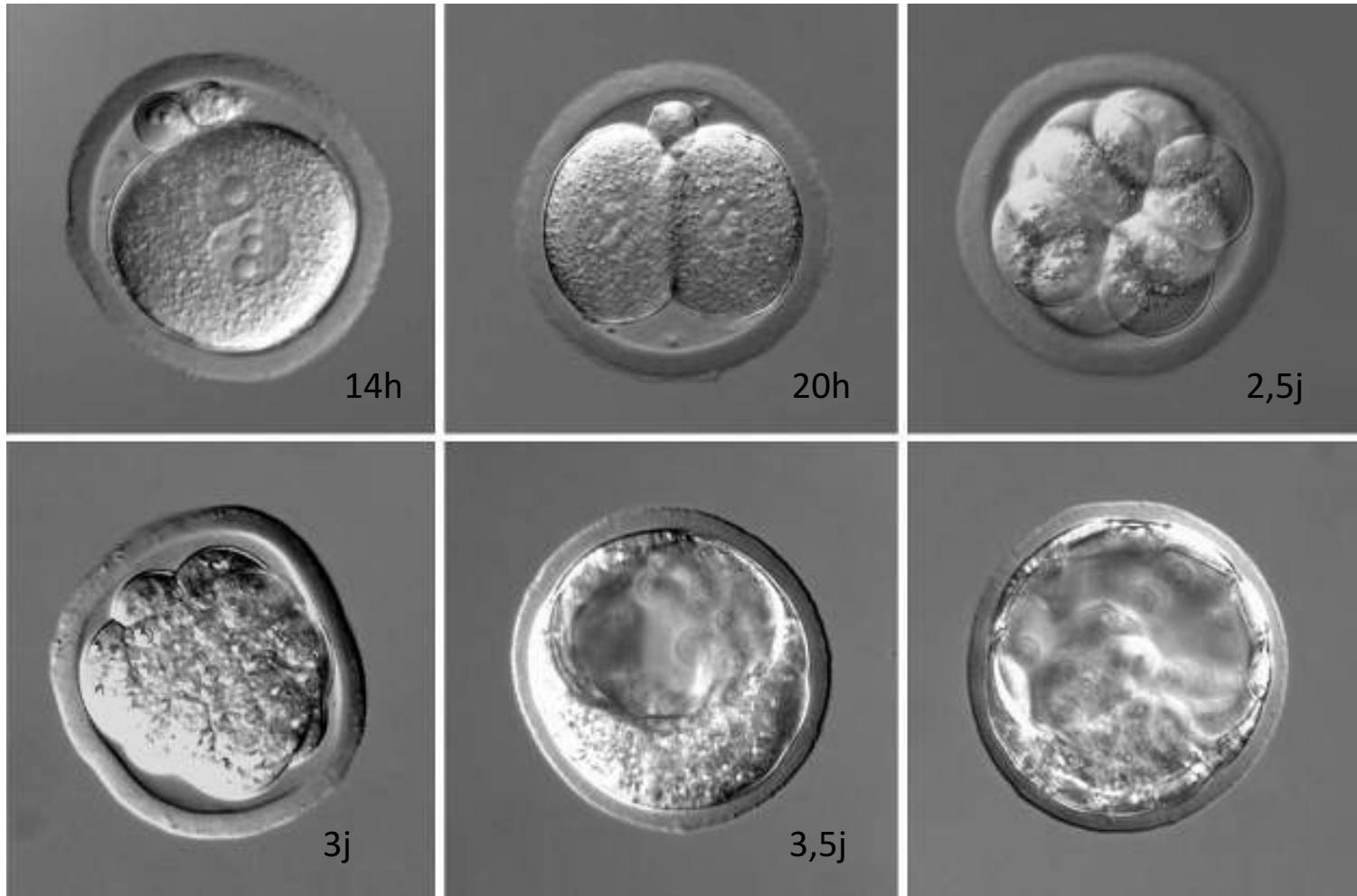
Protéine  
bactérienne  
(synthèse à  
façon ou  
produite par  
traduction d'un  
ARNm ou par  
transcription  
d'un ADN)

Comment utiliser ces technologies pour générer un animal génétiquement modifié?

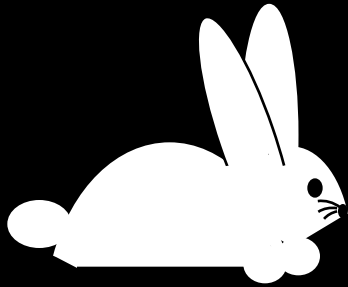
Les voies d'administration possibles

Quel tissu- organe utiliser?

## Développement préimplantatoire chez la souris



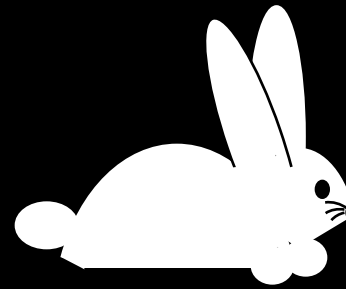
Introduction d'un mélange  
d'ARN Cas9 + sgRNA ou de  
protéine Cas9 + sgRNA



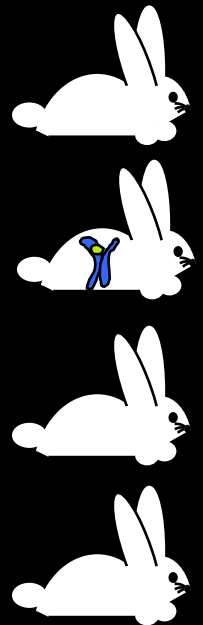
Femelle  
« donneuse »



Embryon  
unicellulaire



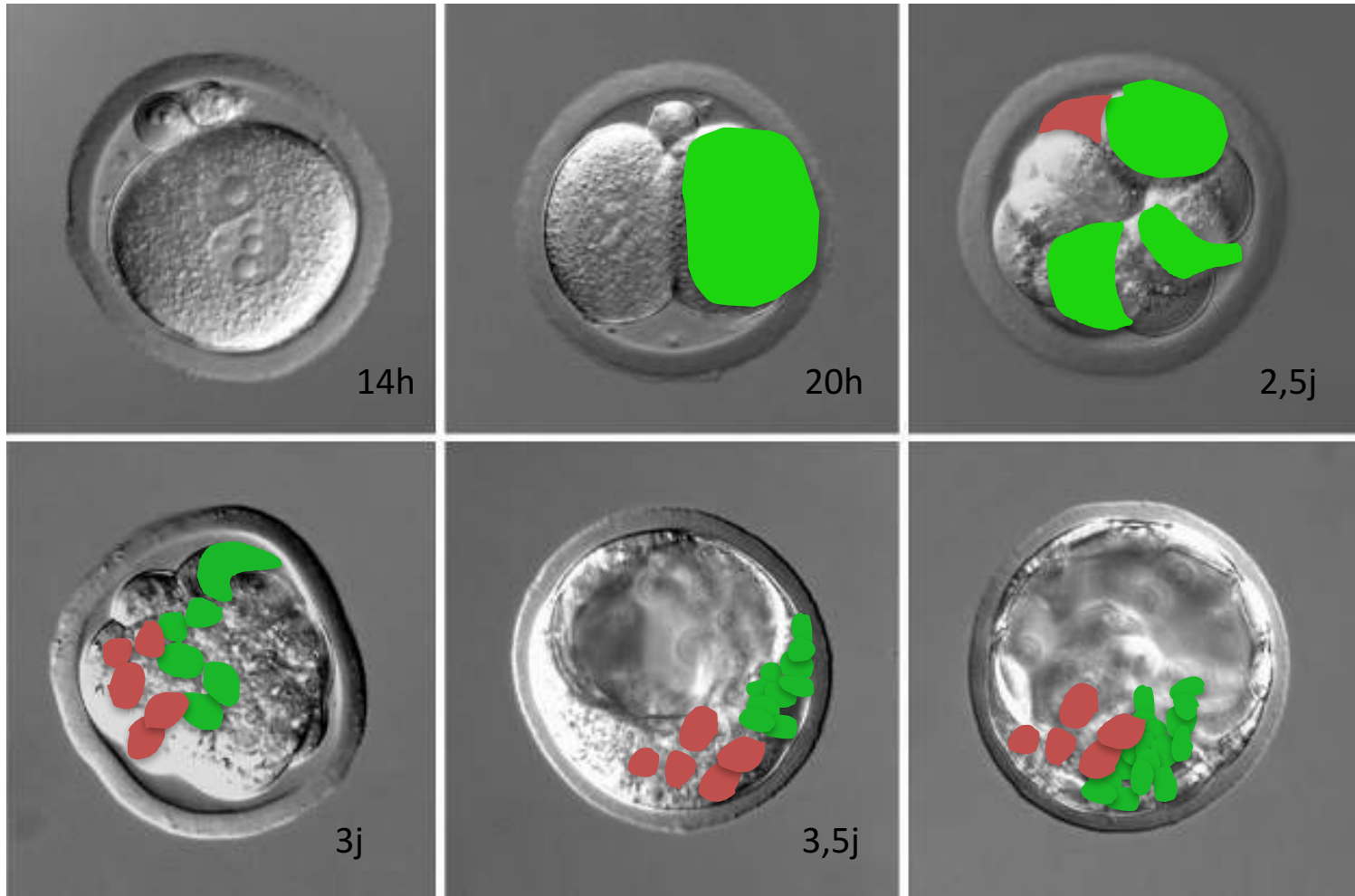
Femelle  
« receveuse »





Microinjection d'ADN dans un embryon unicellulaire de souris

## Développement préimplantatoire chez la souris

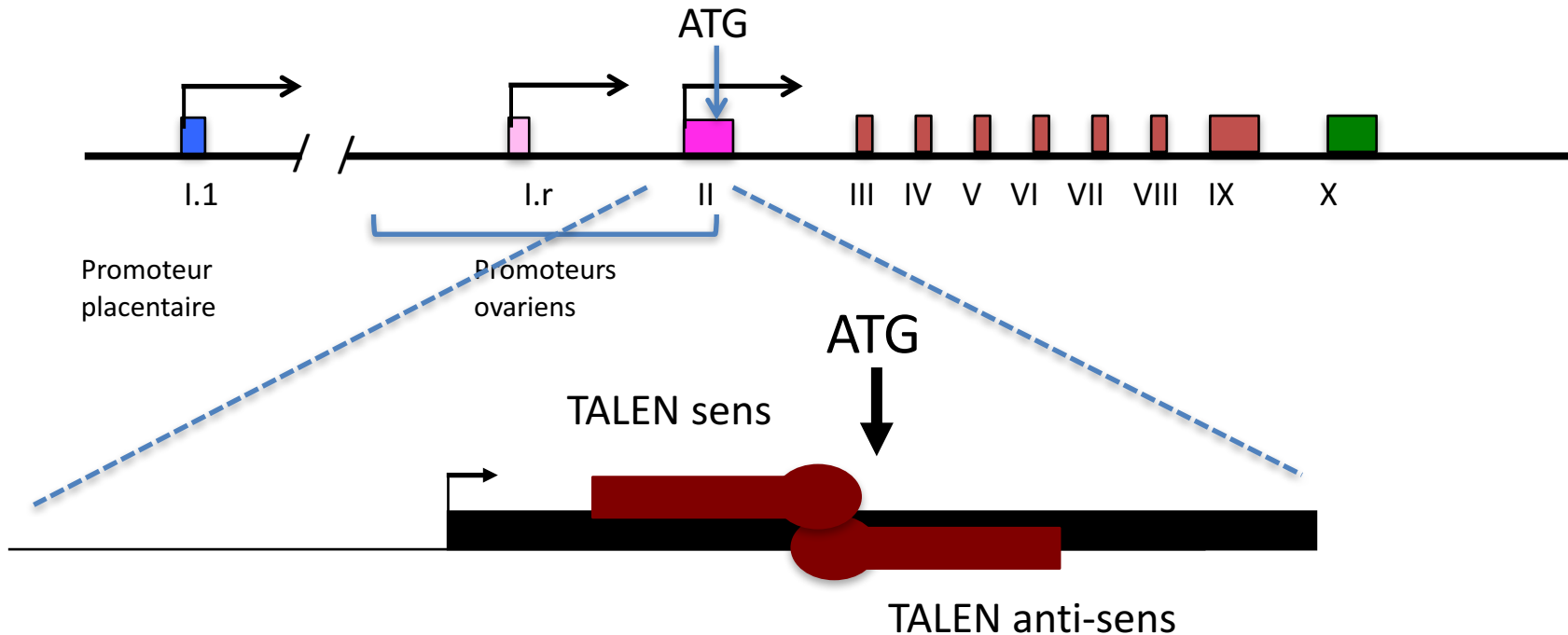




# Un exemple de mutation introduite à la faveur de l'utilisation d'une TALEN

Objectif du projet : supprimer le fonctionnement de l'aromatase chez le lapin

Stratégie : éliminer la traduction du gène



Construction d'une TALEN pour cibler l'ATG du gène de l'aromatase

$\Delta 829$

ATG

ttccacctctgaaatgagcttc.....tagggattttggctaatttttaagaacagattaaaattcttt

$\Delta 498$

ATG

F5

GACTTTAAGTTGCTTCATCTGAAGCCAAAGAGC.....tctc.....taaaattctttccaatttttgctctg

Séquence appariement « sens »

$\Delta 339$

ATG

GACTTTAAGTTGCTTCATCTGAAGCCAAAGAGCA....tgtgctc.....ttaaataaaaatatttttaattgcttaaa

Séquence appariement « sens »

F1

$\Delta 148$

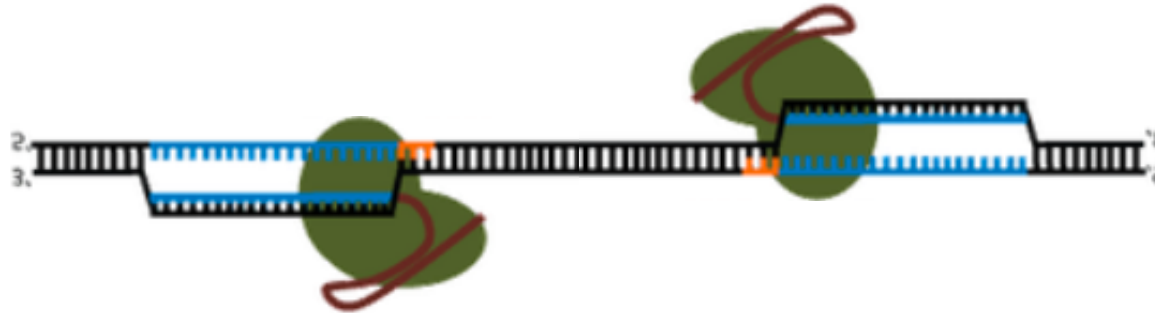
ATG

tgagtgccaaccgcactat.....GGTTTGGAAATACTGAACCCAATG

Séquence appariement « anti-sens »

Les mutations que nous avons caractérisées dans la descendance issue de deux fondateurs différents

# Exemple de mutation provoquée par l'action de Cas9/sgrRNA



gRNA antisens      gRNA sens

Exon 4

Gène X

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAATACATCAACCCGCCAGG**AAGCTTCTGTCAAGAT**GAGCTGG**gtgagtactatc – TX 31

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCAT**-----**CAACCC**-----**GCTGG**gtgagtactatc – X 32

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAATACATCAACCCGC**-----**CTGG**gtgagtactatc – X 33

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAATA**-----**AGCTGG**gtgagtactatc – X 410

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAA**a**TACATCAACCCGCCAGG**AAGCTTCTGTCAAGAT**GAGCTGG**gtgagtactatc – X 413

STOP

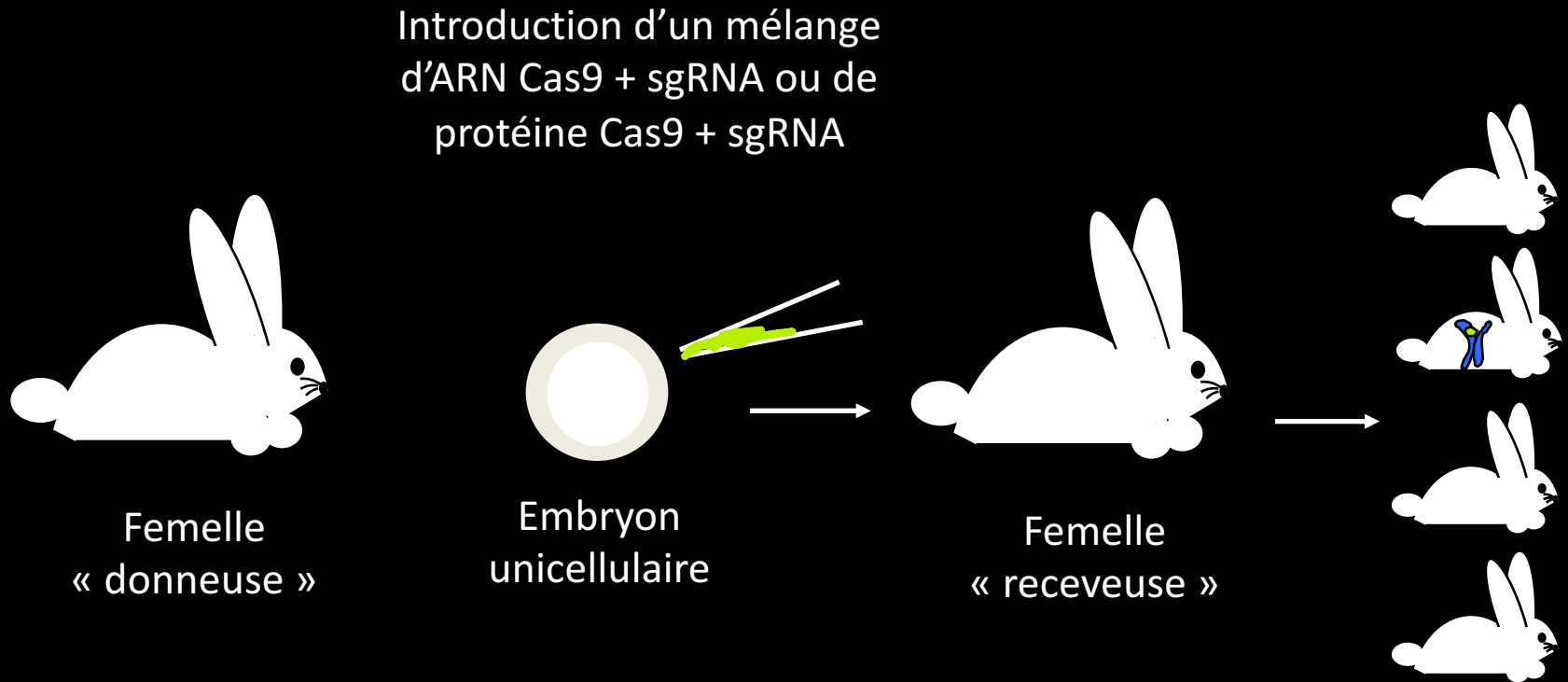
Fondateur 3

Fondateur 4

Cas9–RNA–DNA  
+ MgCl<sub>2</sub>

61 × 40 nm<sup>2</sup>  
0.2 s/frame  
× 3 speed

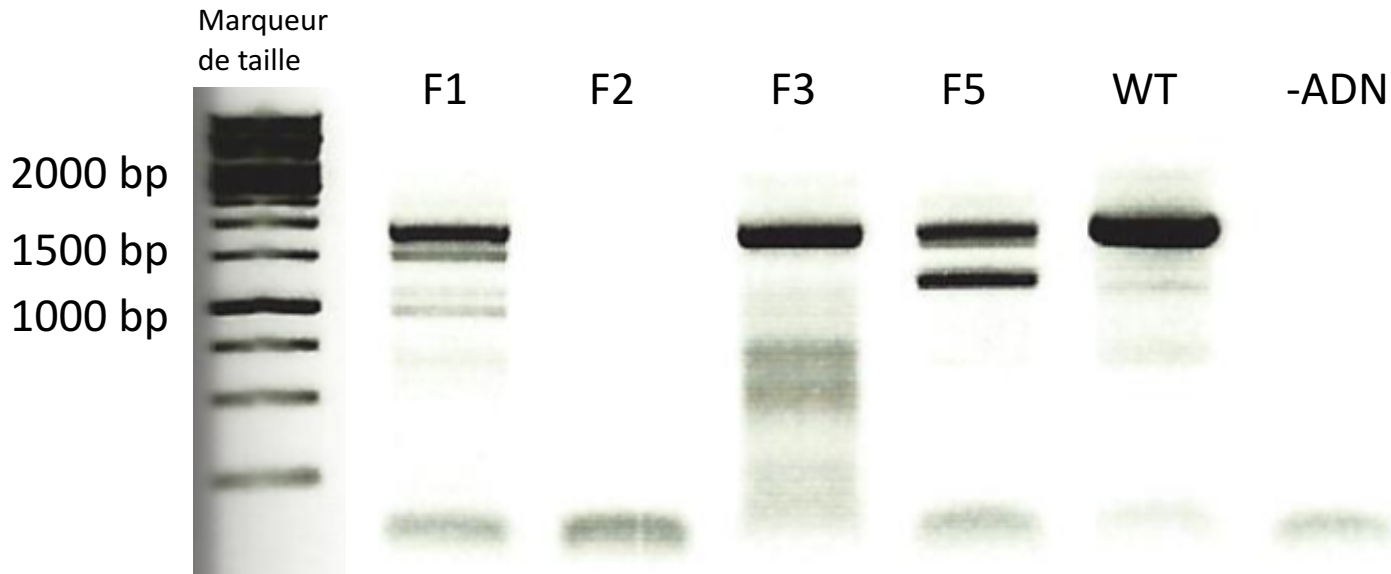
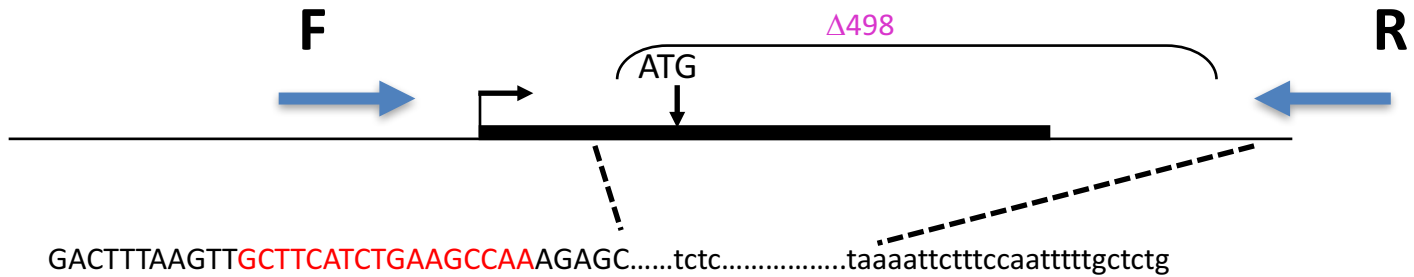
# Le génotypage des individus



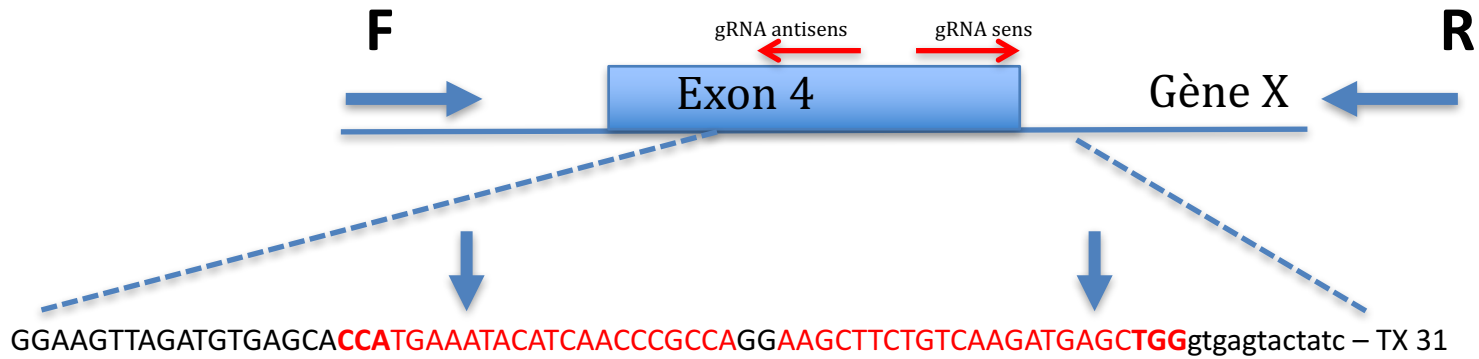
# Analyse de l'ADN génomique

Préparer l'ADN à partir d'un tissu prélevé in vivo sans mettre en cause la survie de l'animal : clip de queue, oreille (peau), sang

Amplifier par PCR la région ciblée.



# Exemple de mutation provoquée par l'action de Cas9/sgrRNA



GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAATACATCAACCCGCCAGG**AAGCTTCTGTCAAGATGAG**CTGG**gtgagtactatc – TX 31

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCAT**-----**CAACCC**-----**GCTGG**gtgagtactatc – X 32

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAATACATCAACCCGC**-----**CTGG**gtgagtactatc – X 33

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAATA**-----**AGCTGG**gtgagtactatc – X 410

GGAAGTTAGATGTGAGCA**CCATGAAA**<sub>a</sub>**TACATCAACCCGCCAGG**AAGCTTCTGTCAAGAT**GAG****CTGG**gtgagtactatc – X 413

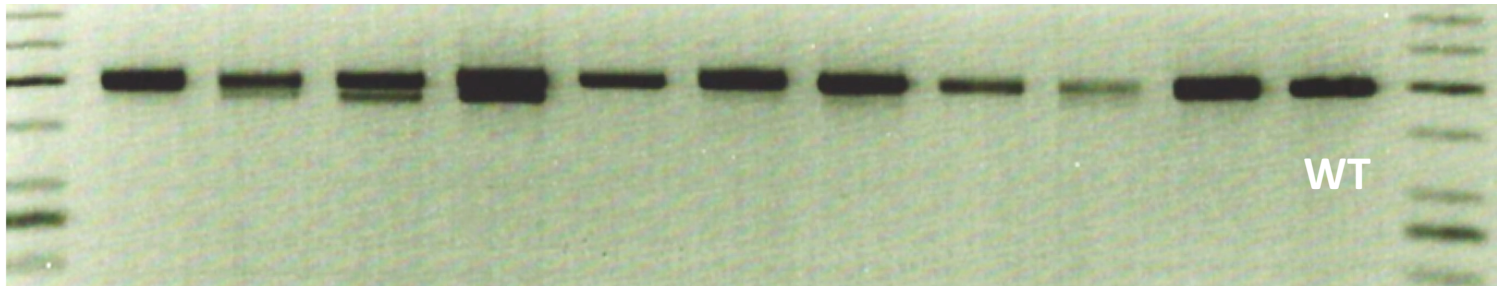
STOP

Fondateur 3

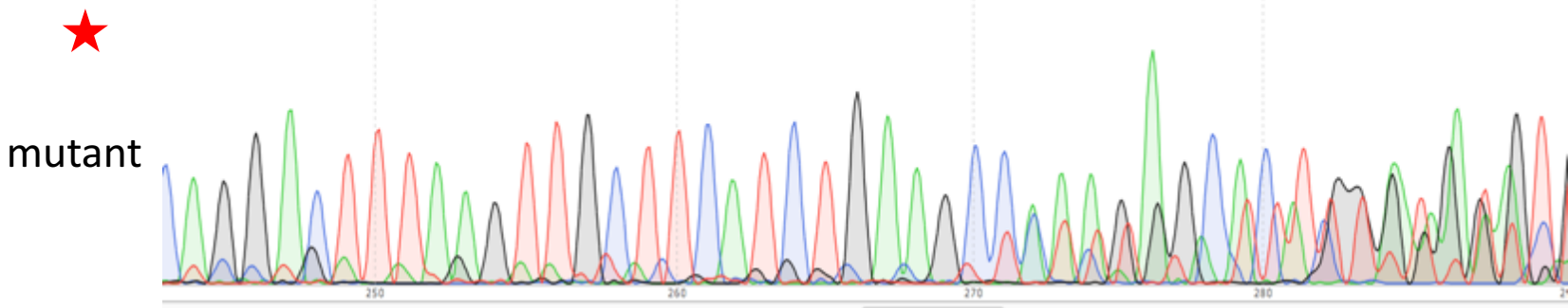
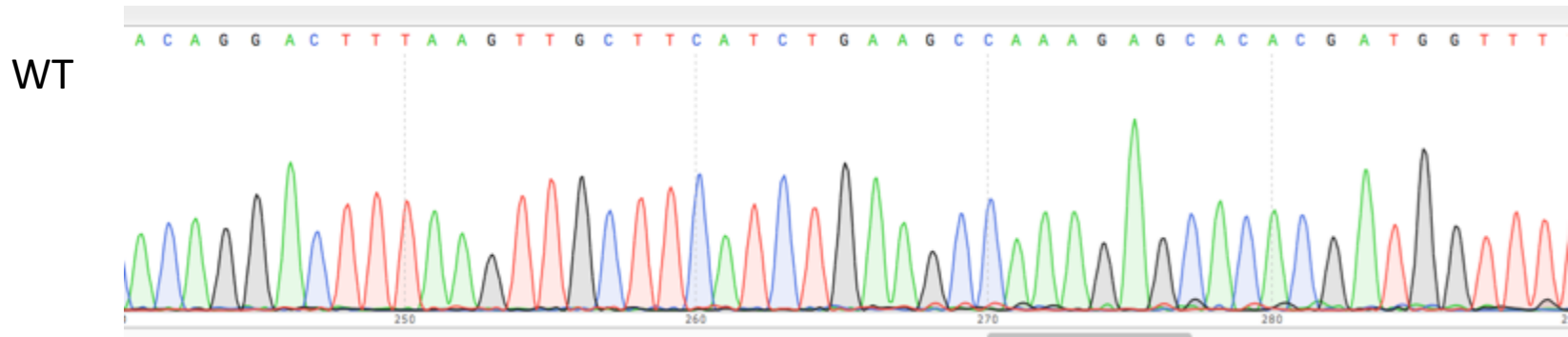
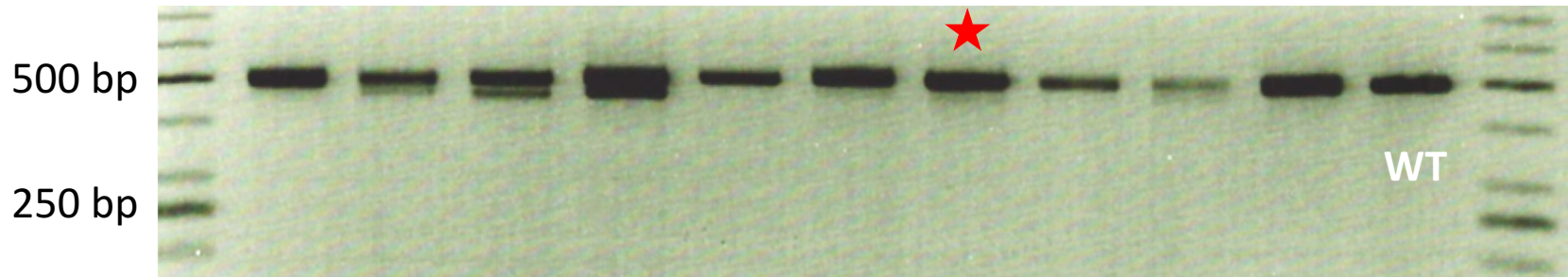
Fondateur 4

500 bp

250 bp

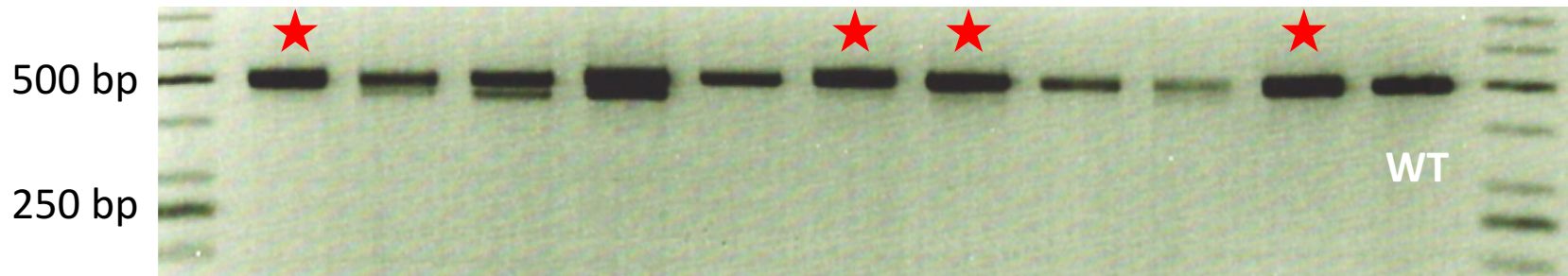


# Séquençage du fragment de PCR



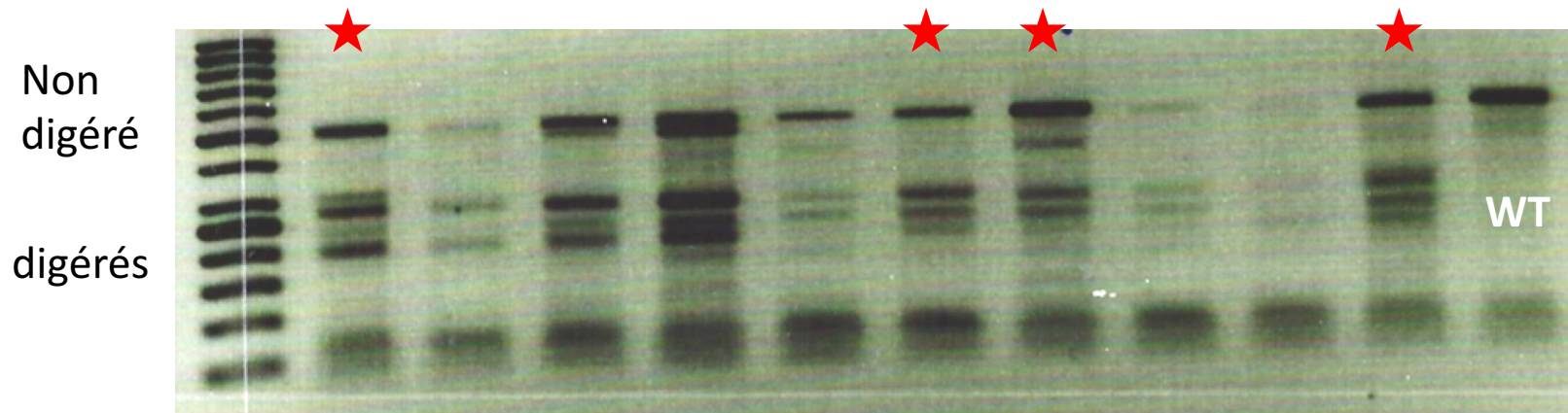
Mélange de plusieurs séquences





### Recherche de mutations (deletions, insertions) de petite taille

Dénaturation par la chaleur, suivie d'une renaturation lente : des brins d'ADN hybride (mutant/sauvage) se forment. Ces ADN double brins sont clivés par la T7 endonucléase au niveau du défaut d'appariement



# Efficacité de ces méthodes

❖ Délétion ou insertion au niveau ciblé par l'enzyme : efficace chez tous les organismes où la technologie a été testée

ZFN < TALEN < CRISPR/Cas9

❖ Il semble que les délétions provoquées par CRISPR/Cas9 soient plus courtes que celles provoquées par les autres systèmes

❖ Pas de contrôle de l'amplitude de la délétion ou de l'insertion

❖ Efficacité encore faible de l'introduction d'un fragment « de réparation » à la faveur de la recombinaison homologue

❖ **Il existe des mutations en dehors des sites choisis : « off targeting ».**

## Le problème du « off-targeting »

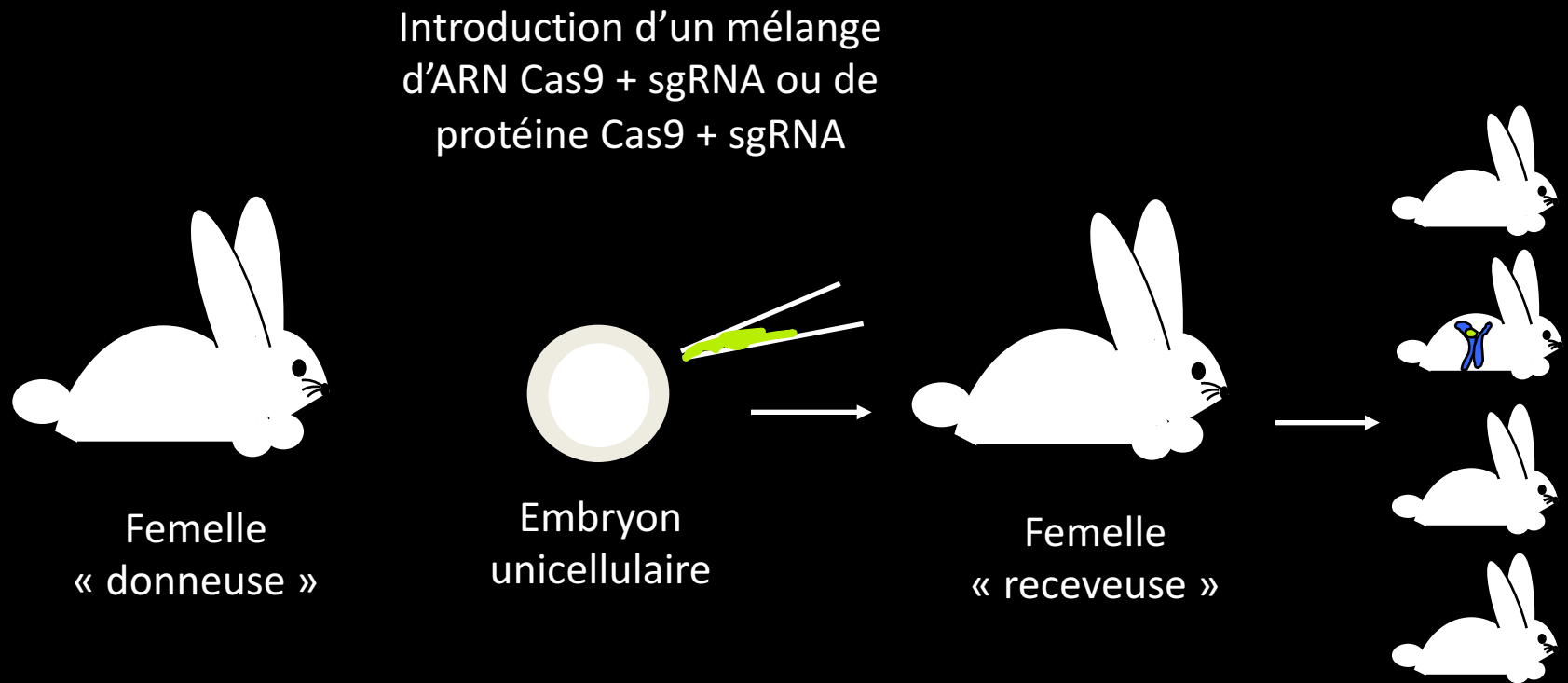
- ❖ Pas trop gênant quand on travaille sur l'animal entier avec la possibilité d'obtenir des descendants.
- ❖ À chaque reproduction, on espère (?) que le locus muté de façon non désiré n'est pas co-ségrégué avec le locus d'intérêt
- ❖ Intolérable quand on travaille sur des cellules en culture, dans le but de les utiliser en thérapie génique chez l'humain.

# Une remarque importante

Une fois l'animal mutant obtenu

- ❖ Aucune possibilité de détecter l'agent qui a provoqué la mutation!
- ❖ Injection d'un ARN messenger de Cas9 et du gRNA : les deux molécules disparaissent totalement en quelques jours.  
Pas d'autre trace que leur effet sur le génome.
- ❖ Injection de la protéine Cas9 + sgRNA = idem

# Les animaux utilisés dans le protocole : leur obtention, leur utilisation, leur devenir



# Comparison of reproductive cycles in the various vertebrates commonly used for transgenesis

	Number of embryos collected after superovulation of the donor female	number of embryos reintroduced in the tractus of each recipient	Length of gestation	Age of first possible gestation
mouse	15-20	15-20	21 days	5 weeks
rabbit	15-60	15-30	31 days	6 months
pig	20-60	50-80	3 months	6-8 months
sheep	9-10 In vitro maturation and fecondation if necessary	1-2	5 months	6-8 months
goat			5 months	6-8 months
cow			9 months	13-15 months
chicken			300 per year	6 months
Zebra fish	>100-1000 within one egg-laying		3 months, 1 mating / week	
trout			2 years (female), 3 years (male)	
xenopus			4-6 months	

## Pour conclure

- ❖ Technologies qui permettent de produire – enfin!!!- des animaux génétiquement modifiés chez des espèces autres que la souris
- ❖ Très efficace, depuis la bactérie jusque chez l'humain
- ❖ Simple : c'est la même protéine Cas9 qui est utilisable chez tous les organismes
- ❖ Les outils (ARN spécifique de la région ciblée, Cas9) sont faciles à produire (synthèse in vitro)
- ❖ Peu coûteux

## Les contraintes techniques (1)

- ❖ Il est nécessaire de connaître le locus responsable du phénotype ciblé et la séquence de la région ciblée
- ❖ Il est indispensable de s'appuyer sur une animalerie de qualité pour produire des embryons, pour pouvoir les transférer, suivre le déroulement de la gestation et enfin assurer l'établissement d'une lignée.
- ❖ Difficultés inhérentes à l'utilisation d'animaux. Plus facile chez la souris et le lapin que chez les petits ruminants ou les bovins



## Les contraintes techniques (2)

Il faut faire pénétrer l'agent responsable de la mutation (Cas9 + gRNA, TALEN, ZFN) dans l'embryon

Microinjection

Electroporation des embryons

# Les contraintes imposées par la réglementation (1)

## Les contraintes de l'expérimentation animale

- ❖ Déclarer le protocole au comité d'éthique local dont dépend le laboratoire; montrer que le protocole a été choisi avec le souci de respecter le bien être animal et la règle des « 3R »
- ❖ Obtenir un agrément d'expérimentation auprès du MENESR

On ne sait pas toujours si le phénotype sera dommageable ou pas, ce qui rend la déclaration nécessaire presque pour chaque modification

# Les contraintes imposées par la réglementation (2)

Aucune « signature » permettant de prouver que le génome de l'animal a été modifié par un expérimentateur!

Quel est le statut des organismes générés? Ce ne sont pas des OGM, mais quoi alors...

- ❖ Recommandation européenne en ce qui concerne le statut des végétaux obtenus par ces méthodes : ce sont des OGMs. **Et les animaux?**
- ❖ Par précaution (?) les animaux ainsi créés et leurs descendants sont élevés et utilisés avec les mêmes règles que les OGM « traditionnels »

Confinement

Pas d'utilisation pour la consommation alimentaire