

Techniques utilisées dans le cadre du plateau en microinjection

Microinjection pronucléaire

La technique de microinjection pronucléaire (Pronuclear microinjection - PN) est employée pour introduire l'ADN recombinant fait en laboratoire dans des embryons d'animaux (en particulier la souris). L'ADN introduit devient en contact étroit avec l'ADN chromosomique de l'animal et devient incorporé de façon aléatoire dans les lignées germinales et permet ainsi d'étudier la fonction ou la pathologie d'un transgène. Récemment, avec l'introduction de la technique crispr/cas9 (une puissante technologie d'édition de génome), la microinjection pronucléaire est également utilisée pour la livraison du système d'enzymes de restriction cas9, soit sous forme de protéines, d'ARN messenger, d'ADN ou toute autre combinaison, dans des embryons de souris. Ceci permet de couper et de modifier l'ADN chromosomique endogène à un point précis et basé sur une séquence particulière. Le résultat permet de produire des modèles animaux de type «knock-out ou knock-in ».

Références :

- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1980;77:7380–7384. Brinster RL,
- Chen HY, Trumbauer M, Senechal AW, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. Cell. 1981;27:223–231.
- Horvath P, Barrangou R "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". Science. (January 2010). 327 (5962): 167–70
- Zhang F, Wen Y, Guo X CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. Human Molecular Genetics. 2014. 23 (R1): R40–6.
- Wang H., Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, and Jaenisch R One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. , Cell May 9, 2013 153, 1–9
- Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Yusaku Wada, Kenji F Tanaka, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto and Kohichi Tanaka Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice Genome Biology 2015 16:87

Microinjection de cellules ES

Avant l'introduction de systèmes d'édition de génomes efficaces tels que crispr/cas9, les méthodes « zinc finger nucléases (ZFNs) », « transcription-activator like effector nucleases (talen) » et méganucléases étaient les standards au cours des trente dernières années. Ces méthodes d'édition génomique (knock-out ou knock-in) étaient principalement réalisées grâce à la création de souris chimères par microinjection de cellules ES. Plus de 10000 lignées cellulaires ES mutantes sont actuellement disponibles à partir de Eucomm (European Mouse Mutant Cell Repository). La microinjection de cellules ES demeure encore aujourd'hui un outil indispensable pour élucider la fonction in vivo d'un gène particulier dans les modèles animaux.

Références :

- Gardner RL. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature*. 1968;220:596–597.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 1987;51:503–512

Culture cellulaire de cellules ES et recombinaison homologue

Suite à l'union d'un ovule et d'un spermatozoïde, la cellule d'embryon formée est également appelée blastomère. Ces blastomères aux premiers stades de la division cellulaire sont totipotents jusqu'à ce qu'ils s'agglomèrent de façon compacte et deviennent une masse cellulaire appelée blastocyste dont l'intérieur contient des cellules pluripotentes. Les cellules ES utilisées dans le ciblage génique sont dérivées de la masse cellulaire interne cultivées sous des conditions de culture cellulaire bien définies. Grâce aux propriétés des cellules ES, le clonage de ces cellules est relativement facile. Des conditions particulières sont appliquées afin d'isoler de très petites fractions de clones de cellules ES correctement ciblées à partir de milliers de clones. Seulement 1 à 5 pour cent des colonies survivantes en moyenne sont avec le gène correctement visé dans l'une des allèles générés par la recombinaison homologue.

La recombinaison homologue est un processus d'échange des séquences de nucléotides naturel qui est commun pendant la méiose pour mélanger les gènes entre les deux allèles de chaque paire de chromosomes. Cependant, ce phénomène est difficile dans la division cellulaire normale sauf si elle est nécessaire dans la réparation de l'ADN.

Références :

- M.J. Evans, M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154 (1981).
- O. Smithies, R.G. Gregg, S.S. Boggs, M.A. Koralewski, R.S. Kucherlapati, Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. 1985 Nature 317, 230.
- T.R. Thomas, K.R. Folger, M.R. Capecchi, Knockout Mice and Steroid Receptor Research, 1986 Cell 44, 419
- B.H. Koller, et al., Toward an animal model of cystic fibrosis: Targetted interruption of exon 10 of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in embryonic stem cells PNAS 88, 10730 (1991).
- Bibikova, M.; Beumer, K.; Trautman, J.; Carroll, D. "Enhancing Gene Targeting with Designed Zinc Finger Nucleases". 2003Science. 300 (5620): 764

Redérivation

Plusieurs virus et parasites peuvent être présents dans les animaleries de tous les centres de recherche. Ceux-ci ont, non seulement une incidence sur les résultats des études en cours, mais peuvent aussi compromettre l'état de santé d'une installation animale propre après l'importation d'animaux infectés. La redérivation est un processus pour éliminer ces pathogènes principalement par le transfert d'embryon, mais peut également être faite par la fécondation in vitro. La redérivation est nécessaire lorsque des lignées de souris génétiquement modifiées sont obtenues à partir de sources externes ou de sources internes (comme pour passer d'un niveau propre SPF à très propre SPF+).

Cryopréservation

Avec l'avènement de la microinjection pronucléaire et des technologies de cellules ES, les lignées de souris mutantes sont presque créées quotidiennement. Un grand nombre de ces lignées mutantes de souris devront être périodiquement préservées lorsque n'étant pas activement étudiées pour sauver l'espace de cage et des coûts. Ceci satisfait également à l'exigence gouvernementale des 3R qui encadre l'utilisation des animaux de laboratoire dans les essais. La meilleure façon de préserver ces lignes de souris en toute sécurité et économiquement est par la congélation des embryons ou des spermatozoïdes.

Les embryons peuvent être cryopréservés en utilisant une congélation très contrôlée ou vitrification. Bien que la vitrification nécessite un contrôle précis du temps et de la température des solutions, cette technique est peu coûteuse et rapide.

L'embryon congelé peut préserver la totalité des caractéristiques génétiques d'une lignée, mais la technique nécessite un système d'accouplement ardu afin d'obtenir au moins 100 embryons et ainsi assurer une récupération réussie. D'un autre côté, la technique de congélation du sperme ne nécessite que deux souris mâles entièrement développées pour récupérer la lignée.

Références :

- Nakao, K., Nakagata, N., & Katsuki, M. (1997). Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Experimental animals Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 46(3), 231–234
- Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS, Taft RA. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation (2008) *PLoS ONE*.;3:e2792–e2792.
- Takeo T and Nakagata N Reduced Glutathione Enhances Fertility of Frozen/Thawed C57BL/6 Mouse Sperm after Exposure to Methyl-Beta-Cyclodextrin (2011) *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 85, 1066–1072
- Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa and in vitro fertilization. *Methods. Mol. Biol.* (2011) 693:57–73.