SOLUTIONS DE RECHANGE AUX ANIMAUX MODIFIÉS PAR GÉNIE GÉNÉTIQUE

MARS 2014

TABLES DES MATIÈRES

PRÉFACE 2

1. Techniques de production d'animaux modifiés par génie génétique 2
1.1 Injection pronucléaire 2
1.2 Transgenèse ciblée et mutagenèse dans des cellules souches embryonnaires 4
1.2.1 Transgenèse ciblée 4
1.2.2 Mutagenèse ciblée 6
1.3 Transfert génique à médiation virale (transgenèse par lentivirus) 6
1.4 Chromosomes artificiels bactériens (BAC) 6
1.5 ZFN (nucléases à doigts de zinc) et TALEN (acronyme pour Transcription Activator-Like Effector Nuclease) 7

2. Raffinements pour contrôler l'expression du transgène 7

2.1 Technologies de knock-out conditionnel et de transgenèse (p. ex. les systèmes de recombinaison FLP/FRT et Cre-loxP) 7
2.2 Isolants 9
2.3 Sélection du promoteur pour la transgenèse 9
2.4 Vecteurs de piégeage 9

3. Raffinements pour le transfert d'embryons 10

3.1 Transfert non chirurgical d'embryons (NSET) chez la souris 10
3.2 Transfert génique par des spermatozoïdes 10

RÉFÉRENCES 11

PRÉFACE[1]

La méthode utilisée pour la production d'une lignée d'animaux modifiés par génie génétique dépendra essentiellement du type de modification génétique nécessaire. Néanmoins, il faut également tenir compte, lors du choix de la méthode, des questions de bien-être et des possibilités de raffinement pour nuire le moins possible au bien-être des animaux et améliorer l'efficacité de la production. La production d'un animal modifié par génie génétique doit être précédée d'une confirmation que la lignée n'est pas disponible ailleurs, car la répétition inutile de toute production est un gaspillage d'animaux.

La section 1 de ce document propose un panorama des méthodes employées pour produire des animaux modifiés par génie génétique. Chaque méthode succinctement décrite est accompagnée des préoccupations pour le bien-être animal soulevées ainsi que des possibilités de raffinement afin de réduire le nombre d'animaux requis ou d'améliorer le bien-être des animaux utilisés. Les solutions proposées sont complétées par une discussion sur d'autres méthodes ou des améliorations de celles en usage, en dégagent le raffinement du contrôle de l'expression génique (section 2) et des techniques de reproduction (section 3). Pour de l'information sur les méthodes d'identification, les pratiques exemplaires actuelles pour l'obtention de matériel génétique et les possibilités de raffinements pour le génotypage, consulter *Solutions de rechange pour le génotypage des animaux modifiés par génie génétique* (en préparation).

1. Techniques de production d'animaux modifiés par génie génétique

1.1 Injection pronucléaire

L'injection pronucléaire est utilisée pour produire des animaux qui expriment les séquences de gènes sous le contrôle d'un promoteur hétérologue. Le promoteur et les séquences de gènes peuvent provenir d'une même espèce ou d'espèces différentes. Il s'agit d'une technique courante dans les études sur les effets d'une surexpression ou d'une mauvaise expression de certaines séquences génétiques. Toutefois, les transgènes qui expriment des constructions dites négatives (Levin et coll., 1993, Inoue et coll., 2010) ou les ARN interférents (petit ARNi, microARN, ARNi) (Casola, 2010) peuvent être utilisés pour produire des knock-out chez les organismes ne pouvant faire l'objet d'une mutagenèse ciblée, comme solution de rechange à cette approche pour affecter le fonctionnement des complexes multiprotéiques ou comme technique de mutagenèse conditionnelle lorsque combiné à des recombinaisons dirigées ou autres technologies.

Préoccupations pour le bien-être animal

- Comme les transgènes s'intègrent de façon aléatoire dans le chromosome, leur expression peut varier en fonction du site d'insertion (effet de position) ou provoquer une mutagenèse insertionnelle lors d'une insertion dans des gènes natifs. Cela peut affecter la survie des embryons injectés ou avoir des effets imprévus sur le bien-être des animaux produits (Robinson et coll., 2003; Kirkwood et Hubrecht, 2010).

[1] Ce document de meilleures pratiques a été rédigé par un comité, dirigé par le CCPA, qui a participé à l'élaboration des lignes directrices sur les animaux modifiés par génie génétique.

- De multiples lignées fondatrices sont nécessaires pour un contrôle efficace des effets de position et de mutagenèse insertionnelle, ce qui augmente le nombre d'animaux nécessaires (notamment pour la comparaison de plusieurs promoteurs ou de séquences exprimées).

- Certains sites d'intégration peuvent entraîner l'échec de l'expression ou de la transmission ultérieure du transgène, ce qui signifie que les animaux utilisés ont été gaspillés (Robinson et coll., 2003).

- Pour produire relativement peu d'animaux possédant les niveaux et les profils d'expression désirés du transgène, il faut un assez grand nombre d'embryons (Robinson et coll., 2003).

- Un grand nombre de donneuses et de receveuses d'embryons peut être nécessaire (Robinson et coll., 2003).

Considérations expérimentales

- Le taux de succès varie d'un animal à l'autre. Cette méthode est actuellement inefficace chez les médakas, les xénopus et les poulets, où l'ADN étranger ne peut généralement pas s'intégrer dans le génome de l'animal (Houdebine, 2002).

- L'expression transgénique peut s'éteindre après plusieurs générations en raison d'un silençage épigénétique du promoteur du transgène.

Possibilités de raffinement

Les méthodes suivantes peuvent aider à résoudre les problèmes liés à l'intégration aléatoire du transgène : la transgenèse ciblée dans des cellules souches embryonnaires (section 1.2), le transfert de gènes par médiation virale (section 1.3), les chromosomes artificiels bactériens (BAC) transgéniques (section 1.4) et la transgenèse ciblée au moyen de nucléases à doigts de zinc (ZFN) ou de nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) (section 1.5), ainsi que des possibilités de raffinement comme les procédés d'expression transgénique inductible et conditionnelle (sections 2.1 et 2.2), l'utilisation d'isolateurs (section 2.3) et la sélection rigoureuse des promoteurs (section 2.4).

D'autres techniques peuvent également traiter de problèmes liés au bien-être des animaux utilisés pour la production d'animaux modifiés par génie génétique, comme le transfert non chirurgical d'embryon (NSET) (section 3.1) et le transfert de gènes par des spermatozoïdes (section 3.2).

De plus, il convient de tenir compte de certaines variables pouvant être liées à la conception et préparation d'une construction ainsi que de l'expression et la transmission du transgène lors du recours à l'injection pronucléaire. Les variables en question sont décrites par Robinson et coll. (2003).

Pour réduire le risque de perte de l'expression du transgène après plusieurs générations, des sujets de la première génération de transgéniques devraient être cryoconservés. Il est alors possible de récupérer la lignée en cas de perte d'expression du transgène, sans devoir la créer de nouveau. Toute lignée fondatrice supplémentaire non sélectionnée pour une utilisation expérimentale devrait également être cryoconservée; il est inutile de la reproduire sur plusieurs générations.

1.2 Transgenèse ciblée et mutagenèse dans des cellules souches embryonnaires

1.2.1 Transgenèse ciblée

Le ciblage désigne l'insertion ou la délétion de séquences d'ADN génomique à un endroit précis. Il se pratique le plus souvent par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires de souris. Cependant, l'ingénierie par nucléases dirigées a permis le ciblage dans des cellules souches embryonnaires de souris (Osiak et coll., 2011) et dans les embryons de divers animaux, dont les rats, les lapins et les poissons-zèbres (Ben et coll., 2011; De Souza, 2012; Duranthon et coll., 2012; Jacob et coll., 2010) (section 1.5). Les recombinases (p. ex. Cre et FLP) et les intégrases (p. ex. PhiC31) à site spécifique sont également utilisées pour le ciblage dans les cellules souches embryonnaires et les embryons (Lister, 2011; Monetti et coll., 2011; Osterwalder et coll., 2010; Tasic et coll., 2011). Ces méthodes permettant une transgenèse ciblée, c'est-à-dire une intégration du transgène dans un locus choisi, sont adaptées de la mutagenèse ciblée (Tchorz et coll., 2012). Comme la transgenèse ciblée permet un meilleur contrôle de la modification génétique que l'injection pronucléaire, elle peut être utilisée pour minimiser les effets négatifs sur le bien-être des animaux produits (Robinson et coll., 2003).

Préoccupations concernant le bien-être

- La contamination de cellules souches embryonnaires par des mycoplasmes affecte différents paramètres des cellules, la transmission germinale et le développement postnatal des chimères créées. Il est donc important, avant d'utiliser des cellules souches embryonnaires, d'effectuer un dépistage des mycoplasmes (Markoullis et coll., 2009).

- Les cultures de cellules souches embryonnaires sont une source possible d'infection pathogène et elles sont susceptibles à une infection persistante par le virus de l'hépatite murine (VHM) ou d'autres virus murins (Nicklas et Weiss, 2000).

- L'échec de la transmission germinale peut signifier un gaspillage de souris et une utilisation inutile de femelles pour fournir des embryons-hôtes et de mères porteuses (Robinson et coll., 2003).

- La littérature rapporte plusieurs cas de mutagenèse induite hors cible dans la cellule souche embryonnaire soit par des réarrangements génomiques, des duplications ou des délétions (Liang et coll., 2008), ou encore par des insertions multiples du vecteur. Ce type de mutagenèse peut entraîner des problèmes de bien-être involontaires ou imprévus.

Considérations expérimentales

- Cette procédure délicate à réaliser exige des taux constamment élevés de transmission de la lignée germinale du génome des cellules souches embryonnaires, d'excellentes techniques de culture cellulaire afin de maintenir la pluripotence des cellules souches embryonnaires et au moins deux générations de sélection pour produire des homozygotes (Robinson et coll., 2003).

- Une mutation constitutive délétère peut être mortelle ou le gène peut affecter d'autres voies, ce qui rend difficile l'étude de la physiologie ou du gène d'intérêt.

Possibilités de raffinement

Le ciblage de gènes dans l'embryon (p. ex. à l'aide de recombinases, de nucléases ou d'intégrases à site spécifique) est un moyen de surmonter les difficultés liées à la pluripotence résultant de l'utilisation des cellules souches embryonnaires, mais l'efficacité réduite avec laquelle les génomes embryonnaires sont modifiés peut ne pas mener à la réduction du nombre d'animaux utilisés. Pour réduire le nombre d'animaux nécessaires à la production de lignées d'animaux visées, le criblage doit être effectué au moyen de lignées parentales de cellules souches embryonnaires possédant un haut taux de succès de transmission germinale.

Le contrôle peut être optimisé par l'utilisation d'animaux knock-out conditionnels (section 2.1) et de transgènes inductibles (section 2.2) et peut également limiter les répercussions sur le bien-être des animaux issus de la biotechnologie.

Les cellules souches embryonnaires peuvent présenter des anomalies génomiques ou chromosomiques au cours de leur mise en culture (p. ex. l'aneuploïdie) pouvant réduire leur pluripotence et leur taux de transmission de la lignée germinale. Le comptage des chromosomes permet de déterminer si les cellules souches embryonnaires sont euploïdes ou aneuploïdes et peut aider à la sélection des clones les plus susceptibles de contribuer à la lignée germinale. Par conséquent, il convient de procéder au comptage avant la microinjection de cellules souches embryonnaires. Selon le consensus chez les chercheurs du domaine, la propagation chromosomique de référence pour produire des chimères correspond à au moins 50 % des euploïdes au cours de la mitose (évaluation d'au moins 20 transmissions). Cependant, certains établissements ne permettent leur utilisation que lorsqu'un taux entre 60 % et 70 % est atteint. Lorsque tous les clones descendent du même ancêtre pour une mutation dirigée donnée et que les normes de ploïdie ne sont pas atteintes, il est possible de produire des sous-clones euploïdes isolés par sous-clonage. Pour cela, il faut par contre veiller à maintenir la pluripotence des cellules souches embryonnaires pendant le sous-clonage et un deuxième comptage des chromosomes devrait être effectué pour vérifier le pourcentage de cellules euploïdes.

L'utilisation de cellules souches embryonnaires co-isogéniques (des cellules souches embryonnaires provenant de la lignée visée par l'expérimentation animale) élimine le besoin de recourir au rétrocroisement pour atteindre le statut congénique. Dans la mesure du possible, le ciblage doit être effectué dans des cellules souches embryonnaires coisogéniques.

Chez la souris, les méthodes de production de chimères à partir d'embryons hôtes exogames (p. ex. l'agrégation ou la microinjection d'un embryon à 8 blastomères) peuvent réduire le nombre de donneuses d'embryons nécessaires, puisque les femelles exogames produisent des embryons plus utilisables que ceux produits par de nombreuses lignées consanguines courantes (Gertsenstein et coll., 2010; Kiyonari et coll., 2010; Poueymirou et coll., 2007). Il est également possible d'augmenter le nombre d'embryons utilisables en modifiant le nombre de cellules souches embryonnaires injectées.

Les contaminants infectieux peuvent être un facteur de confusion dans les études in vivo. Conséquemment, le dépistage des agents pathogènes est recommandé comme pratique exemplaire avant la microinjection de cellules souches embryonnaires (Peterson, 2008).

1.2.2 Mutagenèse ciblée

La mutagenèse ciblée est utilisée pour muter un gène spécifique dans des cellules souches embryonnaires. Le vecteur de ciblage est constitué de fragments d'ADN identiques à ceux du gène d'intérêt, un marqueur et un promoteur. Il est ensuite introduit dans les cellules souches embryonnaires par électroporation ou par l'entremise d'un virus. Les fragments d'ADN étant identiques, le vecteur de ciblage s'intègre dans l'ADN du gène de la cellule souche embryonnaire. Le marqueur perturbe le gène d'intérêt, ce qui inactive (knock-out) ce dernier. Les embryons knock-out sont ensuite prélevés chez des chimères (Festing et Lutz, 2012). Deux consortiums internationaux, KOMP et EUCOMM, utilisent le ciblage et le piégeage de gènes pour inactiver chacun des gènes de la souris afin de découvrir leur fonction.

1.3 Transfert génique à médiation virale (transgenèse par lentivirus)

Le transfert génique à médiation virale permet un transfert efficace des gènes et une expression soutenue des transgènes (Clark et Whitelaw, 2003; Fässler, 2004; Hofmann et coll., 2003; Park, 2007). Cette méthode est utile lorsqu'une évaluation rapide du phénotype associé à l'expression ou à la dérégulation d'un gène précis est nécessaire (Le Provost et coll., 2009). Elle assure le transfert efficace de gènes chez le bétail; le nombre d'espèces appropriées à certaines études se trouve ainsi accru (Le Provost et coll., 2009). Des lentivirus ou des constructions d'ARNi suffisamment courtes pour s'intégrer facilement dans des vecteurs lentiviraux sont des solutions de rechange à la production de d'animaux knock-out.

Considérations expérimentales

- Il peut être difficile de partager les protocoles compte tenu des variations de résultats obtenus dans différents laboratoires.
- La taille des vecteurs viraux actuels est limitée, car la technique du transfert génique à médiation virale requiert de très petits transgènes.
- L'évaluation in vitro de l'efficacité des constructions d'ARNi (p. ex. la mesure de la variation de la quantité des ARNm ou du taux de protéines ou de l'activité protéique) devrait être considérée comme obligatoire, car les différentes séquences d'ARNi ont des degrés très différents d'efficacité (revue dans Podolska et Svoboda, 2011).
- Il est souvent nécessaire de comparer diverses constructions d'ARNi pour contrôler les effets hors cible (Campeau et Gobeil, 2011). Lorsque des épreuves peuvent être effectuées, les essais in vitro permettent la sélection d'un petit nombre de constructions pour usage in vivo.

1.4 Chromosomes artificiels bactériens (BAC)

La création d'animaux transgéniques avec une construction de BAC peut protéger le transgène d'intérêt des promoteurs endogènes et autres éléments de régulation. Cette méthode peut réduire les effets de position (Robinson et coll., 2003), et le type de construction utilisée comprend très souvent tous les éléments de régulation requis pour l'expression du transgène d'intérêt (Giraldo et Montoliu, 2001; Heintz, 2001).

Considérations expérimentales

- Les chercheurs qui utilisent des BAC pour la transgenèse doivent être conscients des effets possibles des copies supplémentaires de gènes passagers, notamment si des régions riches en gènes du génome sont source de BAC.
- Les séquences activatrices présentes dans les BAC peuvent influer sur l'expression des gènes au niveau ou à proximité du site d'insertion du transgène dans des BAC.
- La qualité de l'ADN des BAC est un facteur de réussite déterminant, autrement les animaux utilisés comme donneurs et receveurs d'embryons sont gaspillés.

1.5 ZFN (nucléases à doigts de zinc) et TALEN (acronyme pour Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

Les ZFN (Carbery et coll., 2010) et TALEN (Miller et coll., 2011) sont des solutions de rechange efficaces et pratiques au classique ciblage de gènes (Carbery et coll., 2010). Ces méthodes, applicables à des cellules de nombreux types dont l'embryon au stade unicellulaire (Smits et Gould, 2009), peuvent être utilisées pour inactiver un gène cible chez des espèces où les cellules souches embryonnaires sont absentes (dont la drosophile et le poisson-zèbre; Smits et Gould, 2009) ou lorsqu'il est impossible de recourir à une technique de clonage (p. ex. chez les rats). Lors de l'injection chez des zygotes ou des embryons, la méthode peut être adaptée selon les caractéristiques génétiques, ce qui élimine la nécessité du rétrocroisement pour obtenir des animaux congéniques (Carbery et coll., 2010). Les ZFN sont répertoriées dans des bases de données publiques et il est possible de se procurer des endonucléases et des constructions de ZFN ou de TALEN à prix raisonnable.

Considérations expérimentales

- Cette solution est exigeante sur le plan technique.
- L'efficacité des nucléases peut varier en fonction du type de cellules et du locus cible.
- Des embryons ou des cellules souches embryonnaires peuvent être utilisés pour cette méthode. Par conséquent, le choix de l'approche doit tenir compte des résultats expérimentaux désirés et des Trois R.

2. Raffinements pour contrôler l'expression du transgène

2.1 Technologies de knock-out conditionnel et de transgenèse (p. ex. les systèmes de recombinaison FLP/FRT et Cre-loxP)

Les systèmes Cre-loxP et FLP/FRT peuvent réduire les effets défavorables résultant de l'ablation du gène ou de l'expression transgénique dans un espace-temps inapproprié, ce qui fournit un mécanisme pour minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal et de limiter les décès prénataux ou postnataux pouvant être associés aux animaux knock-out constitutifs ou à la surexpression transgénique (Robinson et coll., 2003). Un positionnement adapté des promoteurs en fonction du site d'insertion permet une régulation étroite de l'expression génique dans l'espace-temps (Lambert, 2006). La technologie Cre-lox requiert la production d'une souris Cre-lox, généralement par le croisement d'une souris qui exprime la protéine Cre avec une souris portant le gène loxP flanqué du transgène d'intérêt (Lambert, 2006), tandis que le système de

recombinaison FLP/FRT est une solution de rechange à la recombinase Cre. Les rapports préliminaires indiquent que la recombinase Cre est plus efficace que la recombinase FLP (Bailey et coll., 2009). Cependant, selon une publication récente, un FLPo semble être presque aussi efficace que la recombinase Cre (Kranz et coll., 2010).

Le contrôle dans l'espace-temps peut être accru à l'aide d'une recombinase spécifique à un tissu sous la dépendance d'un ligand d'activation d'origine exogène (p. ex. un tissu spécifique à l'expression du Cre-ERT2 [récepteur des oestrogènes] et le tamoxifène [ligand pour les récepteurs des oestrogènes, le promoteur régulé par la tétracycline pour l'expression du gène Cre]).

Préoccupations concernant le bien-être

- Dans le cadre du système Cre-loxP (Bailey et coll., 2009), l'efficacité variable de l'expression du gène Cre, la recombinaison variable et la génotoxicité (résultant de la recombinaison hors cible) peuvent avoir des effets néfastes sur le bien-être animal ou entraîner une augmentation du nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation.

- La régulation de la suppression de gènes et de l'expression transgénique dans l'espace-temps est favorisée par la recombinase Cre dépendante d'un ligand (Bailey et coll., 2009), mais cela exige l'optimisation de la dose et de la voie d'administration du ligand. Certains ligands peuvent entraîner des préoccupations concernant le bien-être, comme la dystocie due au tamoxifène chez la souris (communication personnelle de Simpson en 2010).

Considérations expérimentales

- La génération de lignées de souris exprimant la recombinase Cre doit être bien planifiée, notamment l'emplacement de l'insertion du transgène, le promoteur utilisé pour en assurer l'expression et le choix du ligand et de sa voie d'administration.

- Deux lignées congéniques doivent être produites, l'une possédant les séquences cibles loxP et l'autre exprimant la recombinase Cre selon des critères précis d'espace-temps.

- Des séquences similaires à loxP (cibles Cre) peuvent être présentes dans les génomes de vertébrés, ce qui peut entraîner une recombinaison non ciblée.

- L'utilisation de la mutagenèse insertionnelle pour produire des transgènes exprimant Cre ou flanqués de sites loxP peut produire un allèle mutant, ce qui peut fausser les résultats expérimentaux (Bailey et coll., 2009).

- Une séquence similaire à loxP peut être présente et brouiller la lecture; dans ce cas, l'enzyme Cre peut exciser l'ADN au mauvais endroit, provoquant ainsi une mutation inattendue. Les scientifiques disposent d'outils moléculaires pour l'identification de mutations non ciblées.

- Bien que l'effet des œstrogènes endogènes ne semble pas s'exercer sur la recombinaison Cre-ER, les récepteurs des oestrogènes sont activés par le principal ligand utilisé, soit le tamoxifène. Il faut utiliser des témoins lors de la mutagenèse conditionnelle impliquant Cre, notamment pour chaque transgène individuellement (transgène Cre et allèles « floxés ») et, dans le cas de l'enzyme Cre dépendante du ligand, pour les traitement avec ou sans ligand (p. ex. les effets du tamoxifène chez les souris dans Chen et coll., 2002; Esmaeili et coll.,

2009; Hardman et coll., 2008; Ishii et coll., 2008; Mehasseb et coll., 2010; Perry et coll., 2005).

2.2 Isolants

Les isolants peuvent réduire les effets de position (Robinson et coll., 2003) en bloquant les interférences entre le vecteur intégrant et la cellule cible (Emery, 2011).

2.3 Sélection du promoteur pour la transgenèse

La sélection de promoteurs favorables permet un meilleur contrôle de la délétion et de l'expression géniques dans le temps et dans l'espace (Bailey et coll., 2009). Les promoteurs de spécifiques de tissus sont souvent utilisés pour créer des souris transgéniques exprimant Cre, qui seront croisées avec des souris chez lesquelles l'ADN est flanqué de deux sites loxP pour contrôler l'expression ou la suppression génétique. Ce type de promoteurs permet un meilleur contrôle de l'expression transgénique (Robinson et coll., 2003).

Préoccupations concernant le bien-être

- Un promoteur inductible doit être bien caractérisé afin d'éviter les effets néfastes d'une expression inattendue du transgène (Robinson et coll., 2003).
- Comme l'activité de certains promoteurs varie en fonction du contexte, il peut être nécessaire de mettre à l'essai plusieurs constructions différentes pour l'identification d'un bon promoteur.

Considérations expérimentales

- L'insertion de promoteurs ailleurs dans le génome peut ne pas reproduire les profils d'expression génique attendus en raison de l'influence de séquences activatrices ou d'autres séquences génomiques, au site d'insertion.

2.4 Vecteurs de piégeage

Les vecteurs de piégeage constituent une stratégie pangénomique utilisée dans le cadre de la mutagenèse aléatoire à haut débit dans les cellules souches embryonnaires (au moyen de vecteurs plasmidiques ou viraux) ou dans des embryons (au moyen de vecteurs viraux ou transposons). Avant d'entreprendre la production de nouveaux cribles de piégeage chez l'animal, il faut consulter les ressources publiques sur les vecteurs de piégeage qui peuvent être utiles pour les études de génomique structurale ou fonctionnelle (p. ex. www.knockoutmouse.org pour les souris, http://zfin.org/zf_info/catch/catch.html pour les poissons-zèbres, et www4.utsouthwestern.edu/hamralab/hamra_rats.htm pour les rats).

Préoccupations concernant le bien-être

- L'utilisation de vecteurs de piégeage est un processus d'insertion aléatoire qui convient particulièrement à la production de ressources pangénomiques publiques, mais non à l'acquisition de mutations dans des gènes particuliers, en raison du grand nombre d'animaux utilisés pour le criblage à partir d'embryons ou de cellules germinales.

- Les approches axées sur les cellules souches embryonnaires, les techniques de ciblage des embryons ou d'autres méthodes pour générer des mutations d'un gène ou d'un ensemble de gènes sont plus susceptibles de respecter les Trois R.

3. Raffinements pour le transfert d'embryons

Le transfert de l'embryon dans l'oviducte ou l'utérus à travers la paroi du corps est une procédure invasive.

3.1 Transfert non chirurgical d'embryons (NSET) chez la souris

Le transfert non chirurgical d'embryons (NSET), technique semblable à celle de l'insémination artificielle, élimine la douleur et la détresse liées aux interventions chirurgicales invasives. Cette méthode, aussi efficace que la technique conventionnelle du transfert dans l'oviducte pour produire une souris transgénique par microinjection, permet d'éviter les complications comme les infections postopératoires ainsi que le recours à l'anesthésie ou aux analgésiques. Elle a été utilisée avec succès pour le transfert de blastocystes produits par agrégation de morulas avec des cellules souches embryonnaires (souche R1) et pour le transfert d'embryons cryoconservés (Green et coll., 2009).

Considérations expérimentales

- La transillumination est nécessaire à la visualisation précise du col.
- Le débat n'est pas clos quant à l'efficacité de cette méthode par rapport au transfert chirurgical d'embryons pour la production de souris nées vivantes.
- Cette méthode ne permet pas le transfert d'embryons avant le stade de blastocyste.

3.2 Transfert génique par des spermatozoïdes

Le transfert génique par des spermatozoïdes consiste à introduire de l'ADN dans les spermatozoïdes d'un mâle vivant. Le mâle est ensuite accouplé avec des femelles, ce qui permet la transmission germinale de la modification génétique recherchée à une partie de la progéniture.

Considérations expérimentales

- Les résultats sont irréguliers : le nombre d'animaux transgéniques produits est généralement faible et leur caractère est imprévisible; l'ADN intégré est le plus souvent fortement remanié et non fonctionnel (Houdebine, 2002).

Possibilités de raffinement

L'électroporation in vivo de spermatogonies indifférenciées (transgenèse sans sacrifice de la femelle) (Dhup et Majumdar, 2008) réduit le nombre d'animaux nécessaires pour produire des fondateurs transgéniques et le temps requis pour ce faire (Dhup et Majumdar, 2008). Cette méthode peut également faciliter la transgenèse chez les animaux de grande taille dont la période de gestation est longue (Dhup et Majumdar, 2008).

RÉFÉRENCES

Bailey J.M., Creamer B.A. et Hollingsworth M.A. (2009) What a Fish Can Learn from a Mouse: Principles and Strategies for Modeling Human Cancer in Mice. *Zebrafish* 6(4):329–337.

Ben J., Elworthy S., Ng A.S., van Eeden F. et Ingham P.W. (2011) Targeted mutation of the talpid3 gene in zebrafish reveals its conserved requirement for ciliogenesis and Hedgehog signalling across the vertebrates. *Development* 138(22):4969–4978.

Campeau E. et Gobeil S. (2011) RNA interference in mammals: behind the screen. *Briefings in Functional Genomics* 10(4):215–226.

Carbery I.D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E.J., Liaw L. et Cui X. (2010) Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 186(2):451–459.

Casola S. (2010) Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. *Methods in Molecular Biology* 667:145–163.

Chen D., Wu C.F., Shi B. et Xu Y.M. (2002) Tamoxifen and toremifene impair retrieval, but not acquisition, of spatial information processing in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72(1-2):417–421.

Clark J. et Whitelaw B. (2003) A future for transgenic livestock. *Nature Review Genetics* 4(10):825–833.

de Souza N. (2012) Primer: genome editing with engineered nucleases. *Nature Methods* 9(1):27–27.

Dhup S. et Majumdar S.S. (2008) Transgenesis via permanent integration of genes in repopulating spermatogonial cells in vivo. *Nature Methods* 5(7):601–603.

Duranthon V., Beaujean N., Brunner M., Odening K.E., Santos A.N., Kacskovics I., Hiripi L., Weinstein E.J. et Bosze Z. (2012) On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Research* 21(4):699–713.

Emery D.W. (2011) The use of chromatin insulators to improve the expression and safety of integrating gene transfer vectors. *Human Gene Threapy* 22(6):761–774.

Esmaeili B., Basseda Z., Gholizadeh S., Javadi Paydar M. et Dehpour A.R. (2009) Tamoxifen disrupts consolidation and retrieval of morphine-associated contextual memory in male mice: interaction with estradiol. *Psychopharmacology (Berlin)* 204(2):191–201.

Fässler R. (2004) Lentiviral transgene vectors. *European Molecular Biology Organization* 5(1):28–29.

Gertsenstein M., Nutter L.M., Reid T., Pereira M., Stanford W.L., Rossant J. et Nagy A. (2010) Efficient generation of germ line transmitting chimeras from C57BL/6N ES cells by aggregation with outbred host embryos. *PLoS One* 5(6):e11260.

Giraldo P. et Montoliu L. (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Research* 10(2):83–103.

Green M.A., Bass S. et Spear B.T. (2009) A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications. *BioTechniques* 47(5):919–924.

Hardman M.J., Emmerson E., Campbell L. et Ashcroft G.S. (2008) Selective estrogen receptor modulators accelerate cutaneous wound healing in ovariectomized female mice. Endocrinology 149(2):551–557.

Heintz N. (2001) BAC to the future: The use of BAC Transgenic mice for neuroscience research. *Nature Reviews Neuroscience* 2(12):861–870.

Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogg B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhauve M., Brem G., Wolf E. et Pfeifer A. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Reports* 4(11):1054–1060.

Houdebine L.M. (2002) The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. J*ournal of Biotechnology* 98(2-3):145–160.

Inoue T., Takenaka T., Hayashi M., Monkawa T., Yoshino J., Shimoda K., Neilson E.G., Suzuki H. et Okada H. (2010) Fibroblast expression of an IκB dominant-negative transgene attenuates renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 21(12):2047–2052.

Ishii Y., Waxman S. et Germain D. (2008) Tamoxifen stimulates the growth of cyclin D1-overexpressing breast cancer cells by promoting the activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Research* 68(3):852–860.

Jacob H.J., Lazar J., Dwinell M.R., Moreno C. et Geurts A.M. (2010) Gene targeting in the rat: advances and opportunities. Trends in Genetics 26(12):510–518.

Kirkwood J. et Hubrecht R. (éd.) (2010) *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. 8e éd., UFAW/Wiley-Blackwell Animal Welfare Book Series. West Sussex, R.-U.: Wiley-Blackwell.

Kiyonari H., Kaneko M., Abe S. et Aizawa S. (2010) Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. *Genesis* 48(5):317–327.

Kranz A., Fu J., Duerschke K., Weidlich S., Naumann R., Stewart A.F. et Anastassiadis K. (2010) An improved Flp deleter mouse in C57Bl/6 based on Flpo recombinase. *Genesis* 48(8):512–520.

Lambert R. (2006) The Cre-lox and FLP-FRT Systems. Spring(501):8–9.

Le Provost F., Lillico S., Passet B., Young R., Whitelaw B. et Vilotte J.-L. (2009) Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Trends in Biotechnology* 28(3):134–141.

Levin S.D., Anderson S.J., Forbush K.A. et Perlmutter R.M. (1993) A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis. *The EMBO Journal* 12(4):1671–1680.

Liang Q., Conte N., Skarnes W.C. et Bradley A. (2008) Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(45):17453–17456.

Lister J.A. (2011) Use of phage PhiC31 integrase as a tool for zebrafish genome manipulation. *Methods in Cell Biology* 104:195–208.

Mehasseb M.K., Bell S.C. et Habiba M.A. (2010) Neonatal administration of tamoxifen causes disruption of myometrial development but not adenomyosis in the C57/BL6J mouse. *Reproduction* 139(6):1067–1075.

Monetti C., Nishino K., Biechele S., Zhang P., Baba T., Woltjen K. et Nagy A. (2011) PhiC31 integrase facilitates genetic approaches combining multiple recombinases. *Methods* 53(4):380–385.

Nicklas W. et Weiss J. (2000) Survey of embryonic stem cells for murine infective agents. *Comparative Medicine* 50(4):410–411.

Osterwalder M., Galli A., Rosen B., Skarnes W.C., Zeller R. et Lopez-Rios J. (2010) Dual RMCE for efficient re-engineering of mouse mutant alleles. *Nature Methods* 7(11):893–895.

Park F. (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological Genomics* 31(2):159–173.

Perry M.J., Gujra S., Whitworth T. et Tobias J.H. (2005) Tamoxifen stimulates cancellous bone formation in long bones of female mice. *Endocrinology* 146(3):1060–1065.

Podolska K. et Svoboda P. (2011) Targeting genes in living mammals by RNA interference. *Briefings in Functional Genomics* 10(4):238–247.

Poueymirou W.T., Auerbach W., Frendewey D., Hickey J.F., Escaravage J.M., Esau L., Dore A.T., Stevens S., Adams N.C., Dominguez M.G., Gale N.W., Yancopoulos G.D., DeChiara T.M. et Valenzuela D.M. (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nature Biotechnology* 25(1):91–99.

Robinson V., Morton D.B., Anderson D., Carver J.F.A., Francis R.J., Hubrecht R., Jenkins E., Mathers K.E., Raymond R., Rosewell I., Wallace J. et Wells D.J. (2003) Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Laboratory Animals* 37(supplément 1):S1–S49.

Simpson B. (2010) *CREATE meeting*. Rome, Mai 2010.

Smits B.M.G. et Gould M.N. (2009) “Gene Targeting in the Rat? Cut it out!”. *Molecular Interventions* 9(5):226–229.

Tasic B., Hippenmeyer S., Wang C., Gamboa M., Zong H., Chen-Tsai Y. et Luo L. (2011) Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(19):7902–7907.

Tchorz J.S., Suply T., Ksiazek I., Giachino C., Cloetta D., Danzer C.P., Doll T., Isken A., Lemaistre M., Taylor V., Bettler B., Kinzel B. et Mueller M. (2012) A modified RMCE-compatible Rosa26 locus for the expression of transgenes from exogenous promoters. *PLoS One* 7(1):e30011.