

MODÈLES EXPÉRIMENTAUX : NOUVEAUX HORIZONS POUR LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

MARDI
5 DÉCEMBRE
2023



Edition génomique CRISPR/Cas9 chez la souris pour produire des modèles de pathologies thyroïdiennes

Frédéric FLAMANT Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon. Ecole Normale Supérieure de Lyon. INRAE.

COLLOQUE RECHERCHE
FIRENDO - 7^{ème} ÉDITION -

MODÈLES EXPÉRIMENTAUX :
NOUVEAUX HORIZONS POUR
LES MALADIES RARES ENDOCRINIENNES

MARDI 5 DÉCEMBRE 2023





Les gènes *THRA* et *THRB* codent pour, les récepteurs nucléaires de l'hormone thyroïdienne TR α 1 et TR β 1

RXR

TR

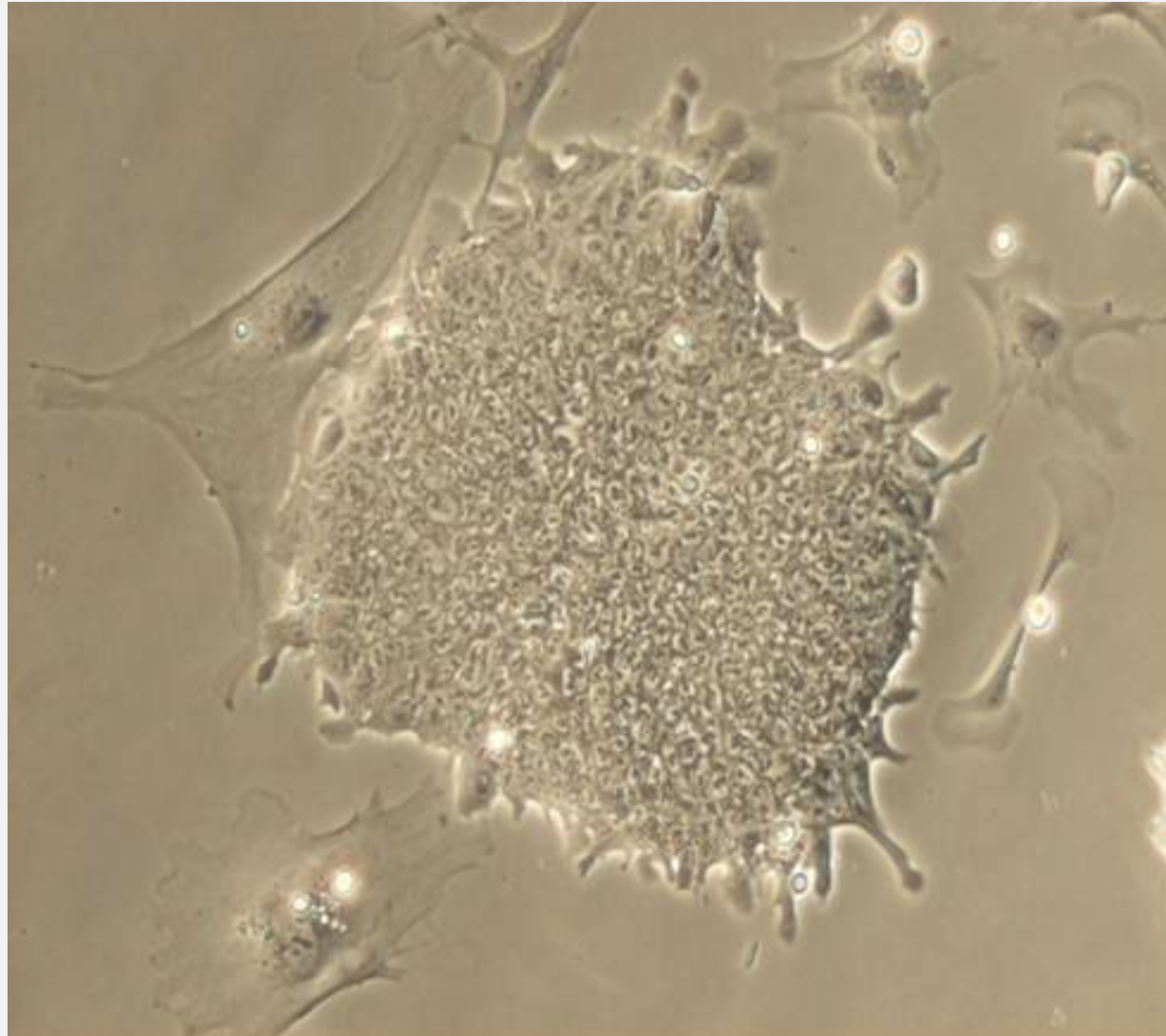
Domaine de fixation de l'hormone

Domaine de fixation à l'ADN

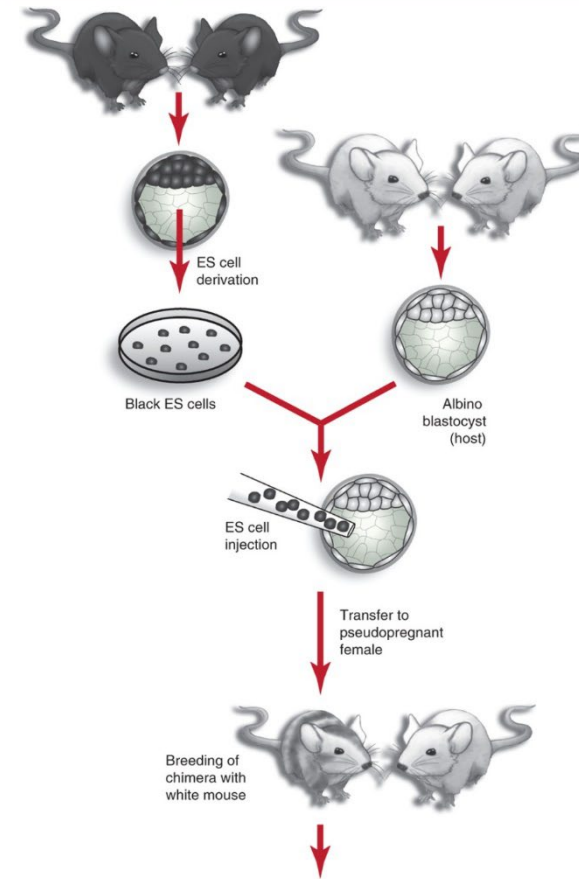




La préhistoire de la génétique du gène *Thra* de souris

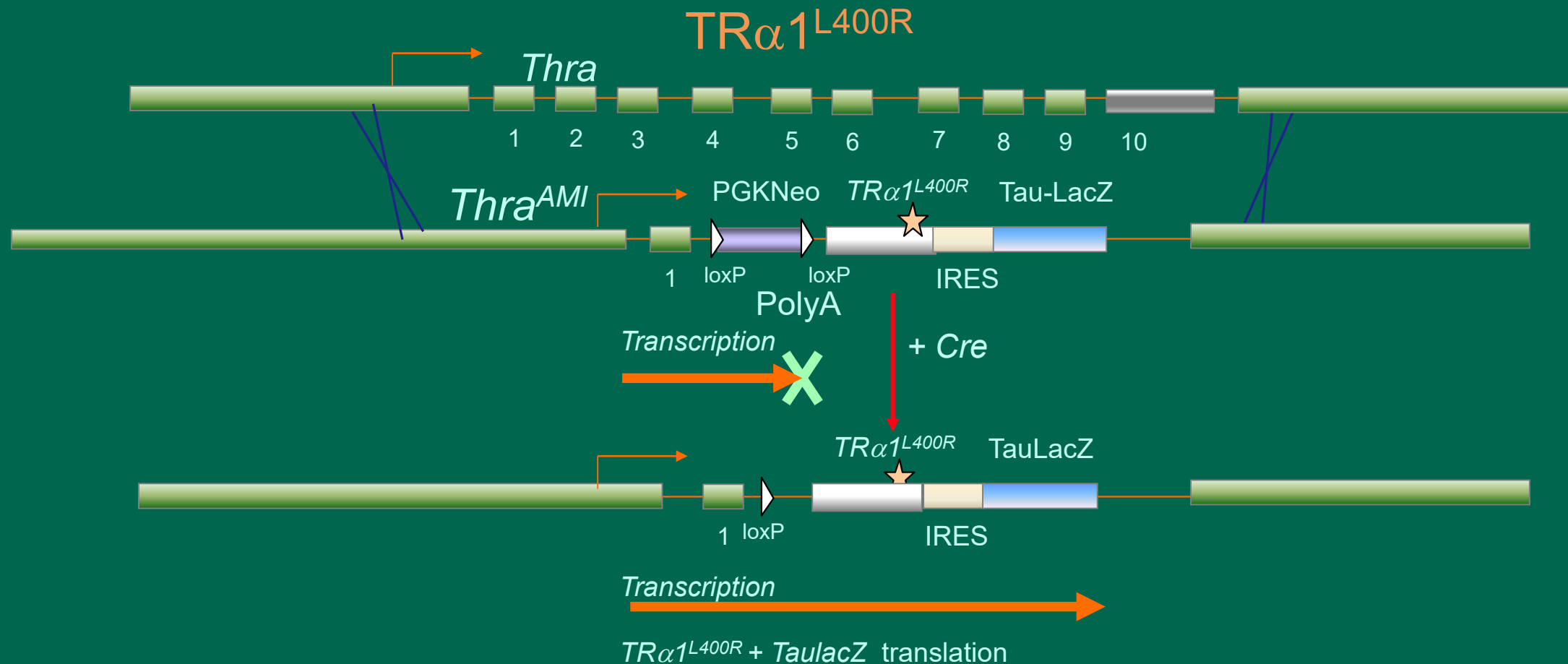


Production de chimères et dérivation d'animaux transgéniques.



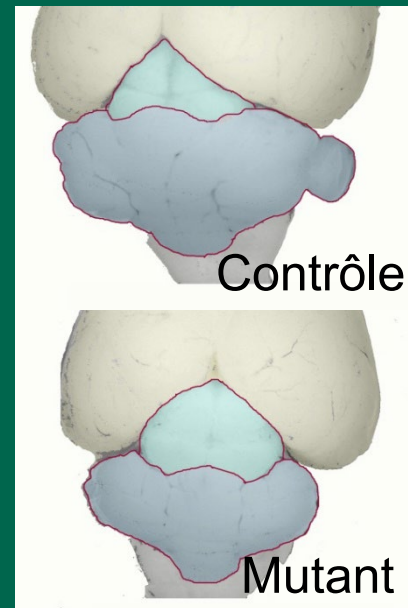
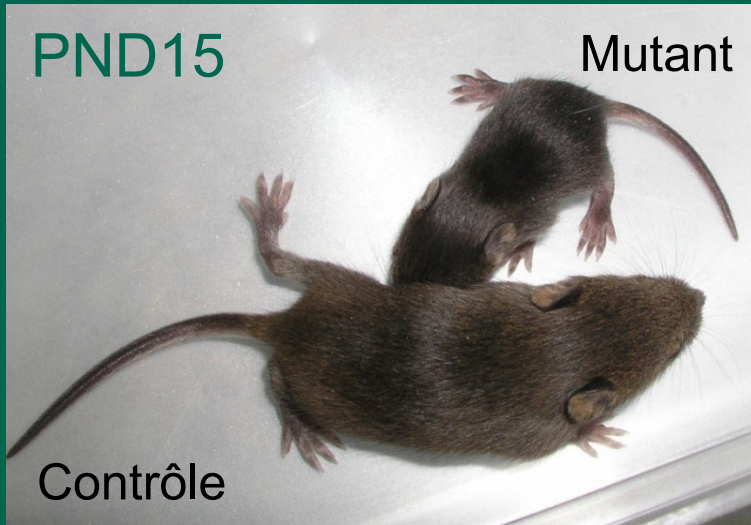


Thra^{AMI}: Un allele knock-in pour exprimer le récepteur dominant-négatif





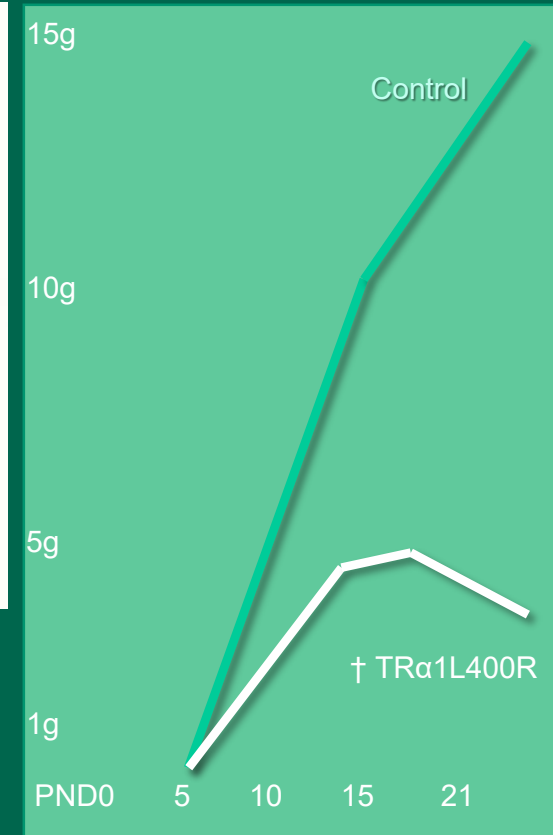
L'expression ubiquitaire de $TR\alpha 1^{L400R}$ est létale



Contrôle Mutant



Contrôle Mutant





2012: Identification de patients porteurs de mutations du gène THRA.

- RTH α :
- 50 cas connus à ce jour.
 - Des symptômes similaires à ceux de l'hypothyroïdie congénitale.
 - Pas d'anomalie majeure des niveaux circulants d'hormone (rapport T3/T4 élevé)
 - Sévérité très variable (Revue: van Gucht et al. Curr Top Dev Biol. 2017;125:337-355).





Les résultats conflictuels du phénotypage: quel est le modèle pertinent pour la maladie RTH α ?

(Mittag et al Heart Fail Rev 2010)

Mutation	Phénotype	Reference
TR α 1 ^{R384C}	Pas de nanisme. Sensibilité résiduelle à l'hormone	Tinnikov et al EMBO J. 21 (2002) 5079–5087.
TR α 1 ^{PV}	Niveau d'hormone élevé. Létalité partielle. Nanisme.	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 15095–15100
TR α 1 ^{P398H}	Obésité. Pas de nanisme.	Liu J. Biol. Chem. 278 (2003) 38913–38920
TR α 1 ^{L400R}	Nanisme. 100% létalité (P15-P21)	Quignodon Mol. Endocrinol. 21 (2007) 2350–2360.



www.sciencemag.org on February 16, 2013

Targeted human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease

Seung Woo Cho¹⁻³, Sojung Kim¹⁻³, Jong Min Kim^{1,2} &
Jin-Soo Kim^{1,2}

sequence or
is cleaved by
insertions o
prone nonh
We found th
ing from 59

Biology Graduate Program and Koch Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. ²Laboratory of Bacteriology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10065, USA.

*These authors contributed equally to this work.
*To whom correspondence should be addressed: zhang@broadinstitute.org

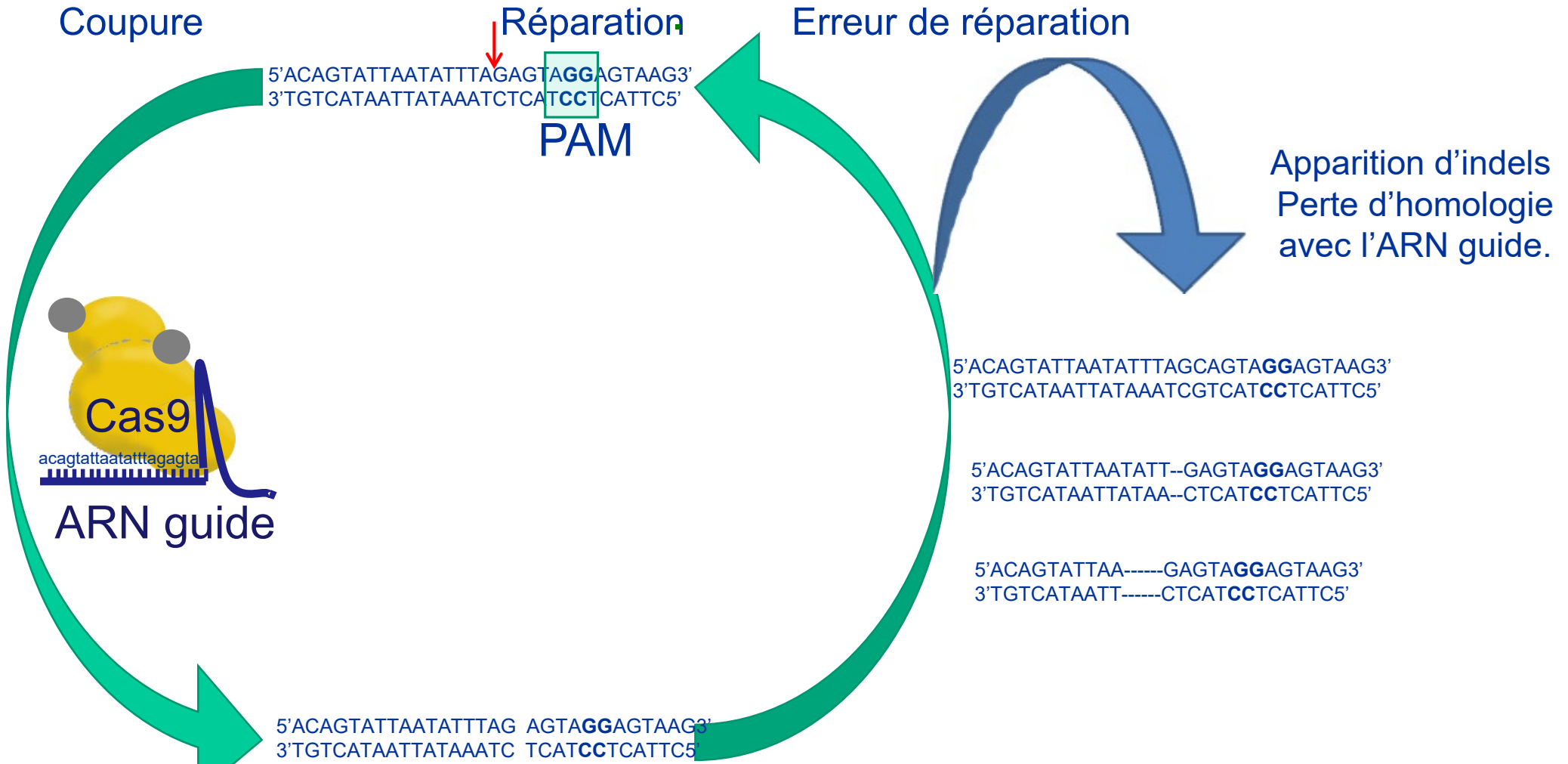
Functional elucidation of causal genetic variants and elements requires precise genome editing technologies. The type II prokaryotic CRISPR (clustered regularly

(SpCas9, SpRNase III, tracrRNA, and pre-crRNA) can achieve targeted cleavage of mammalian chromosomes. we transfected 293FT cells with different combinations of CRISPR components. Since DSBs in mammalian DNA are partially repaired by the indel-forming non-homologous end joining (NHEJ) pathway, we used the SURVEYOR assay (Fig. S3) to detect

January 3, 2013



Edition génomique: génération aléatoire de mutations après coupure de l'ADN par la nucléase Cas9 guidée par un ARN.





Choix d'une cible dans l'exon 9 de *Thra*

PAM			PAM PAM PAM						PAM		PAM		PAM									
ctc	cac	atg	aaa	gtc	gaa	ctc	ttc	ccc	cca	ctc	ttc	ctg	gag	gtc	ttt	gag	gat	cag	gaa	gtc	taa	
Gag	gtg	tac	ttt	cag	ctt	gag	aag	ggg	ggt	gag	aag	gac	ctc	cag	aaa	ctc	cta	gtc	ctt	cag	att	
F	L	H	M	K	V	E	L	F	P	P	L	F	L	E	V	F	E	D	Q	E	V	*

Sequence génomique exon 9 *Thra*

PAM

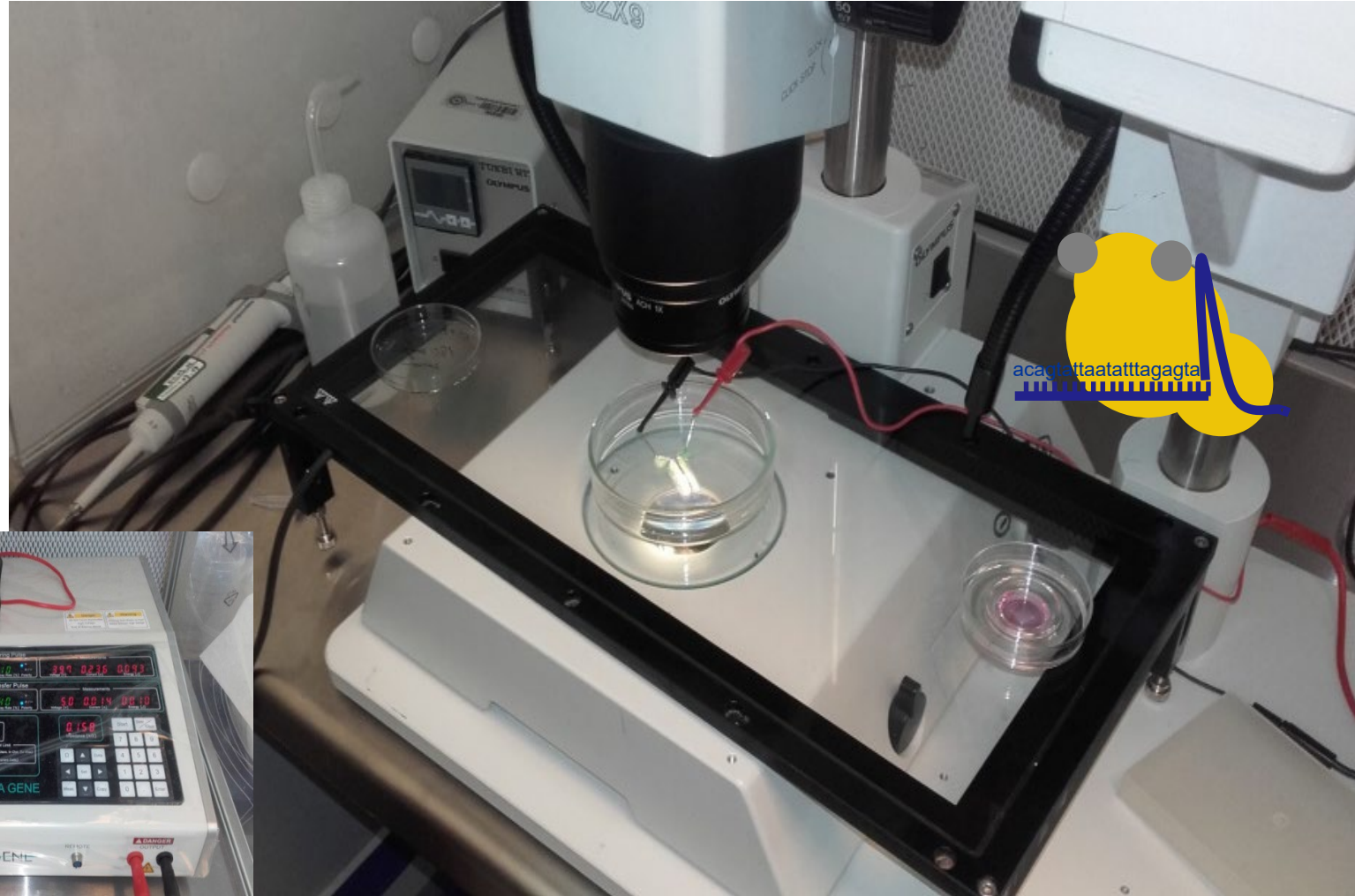
5' AAGACCTCCAGGAAGAGTGG/GGG

3' TTCTGGAGGTCCTTCTCACC/CCC

Extrémité 5' de l'ARN guide.

5' AAGACCUCCAGGAAGAGUGG----

Utilisation d'une procédure sans clonage couplée à l'électroporation pour l'édition génomique dans le zygote de souris.





Quatre nouvelles mutations de *Thra* chez la souris en une seule expérience.

wt RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFEDQEV

Helix 11

Helix 12

Mutations humaines

N359Y RKH**N**IPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFEDQEV

R384C RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHAS**C**FLHMKVECPTELFPPLFLEVFEDQEV

A380Pfs387XRKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIG**TPAASST**

A382Pfs393XRKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHA**LSATTLRATP**

E403X RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLF**E**

F397fs406X RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPP**TLPRGL**

Modèles knock-in précédents

PV RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVEC**HRTLPPFVLG****SVRGLD**

R384C RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHAS**C**FLHMKVECPTELFPPLFLEVFEDQEV

P398H RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELF**H**PLFLEVFEDQEV

L400R RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPP**R**FLEVFEDQEV

CRISPR

E395fs401X RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPT**TLPGGL**

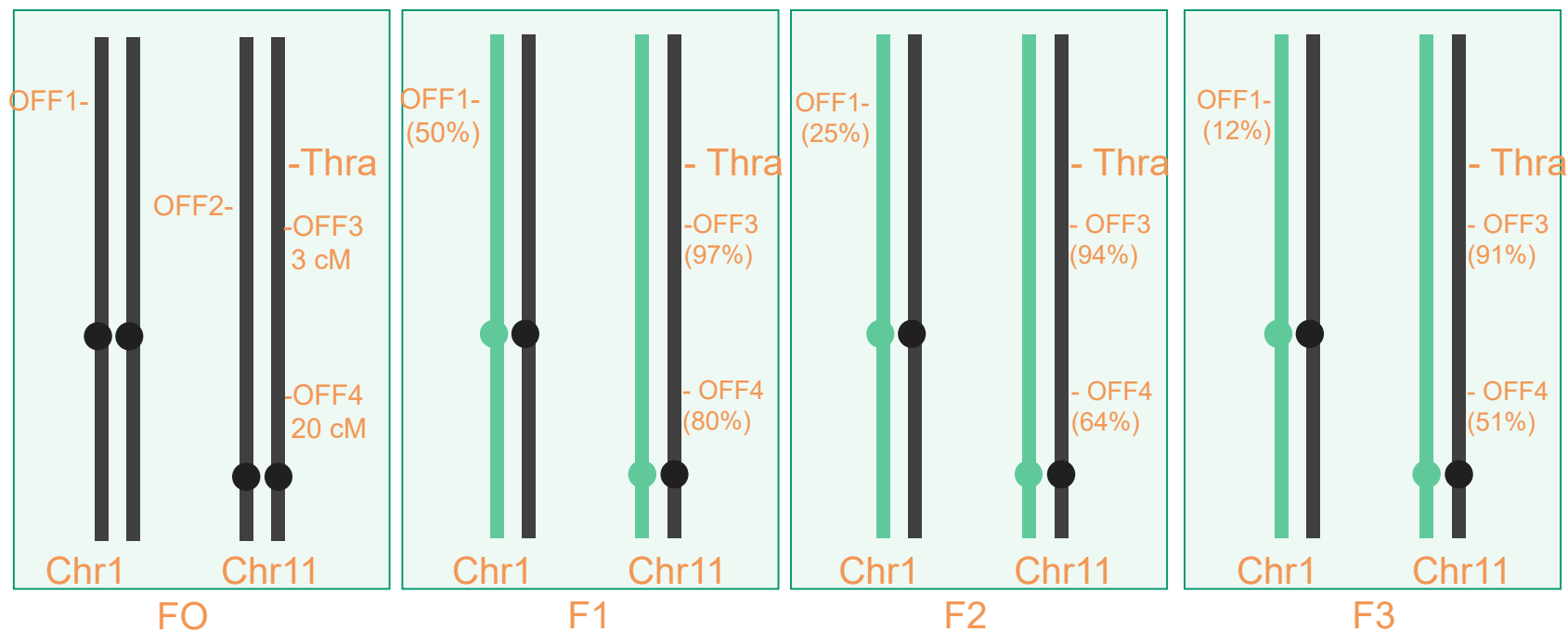
E395fs406X RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPT**RTLPP****TLPGGL**

E395fs485X RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPT**NSS...PQTLQPLDRAINELAMKGS****MGG**

K389fs479X RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHM**NS**.....**PQTLQPLDRAINELAMKGS****MGG**

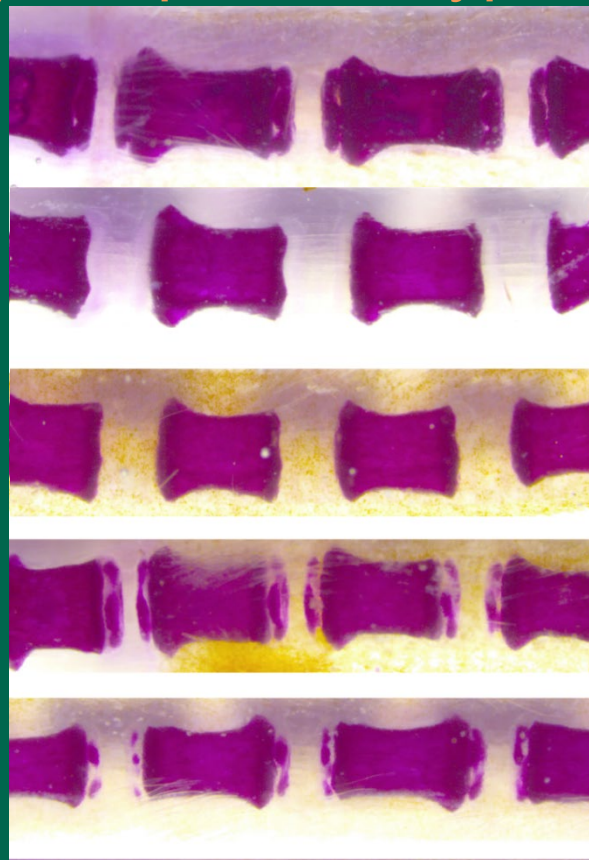


La ségrégation génétique permet d'éliminer d'éventuelles mutations « hors cible ».





Délai d'ossification: un effet variable qui dépend du type de décalage de trame



Contrôle

E395fs401X

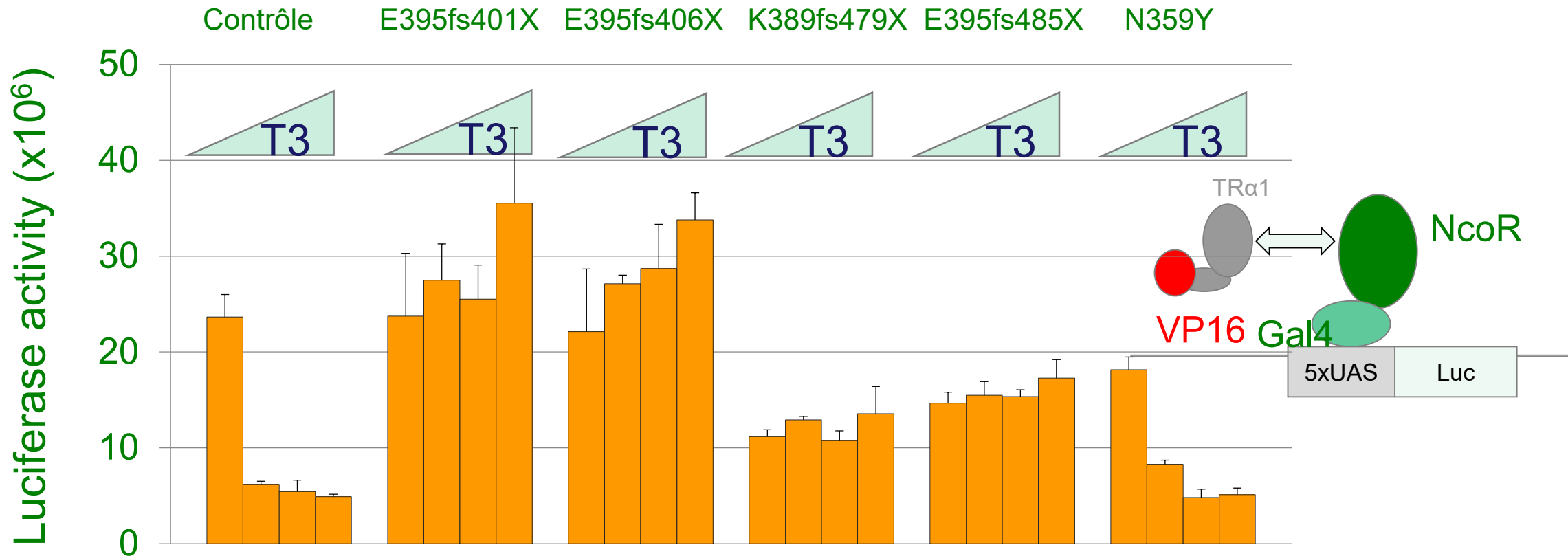
E395fs406X

K389fs479X

E395fs485X

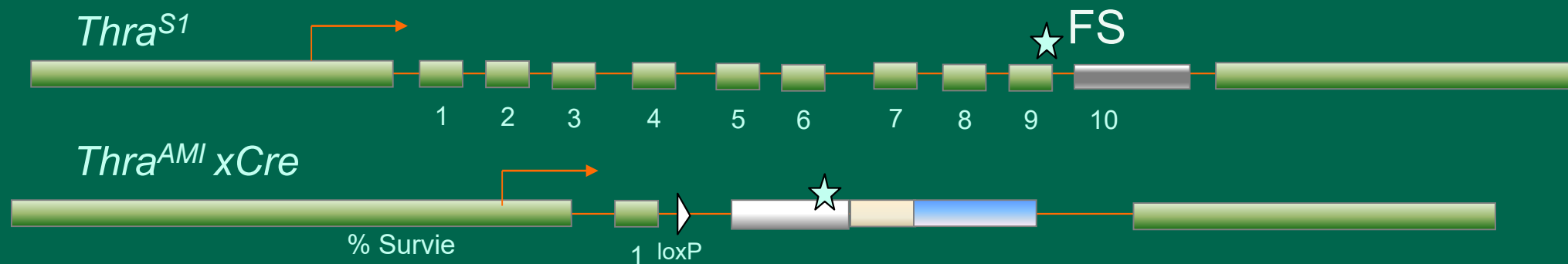


La sévérité du phénotype reflète la capacité du récepteur à interagir avec le corépresseur NcoR en présence d'hormone

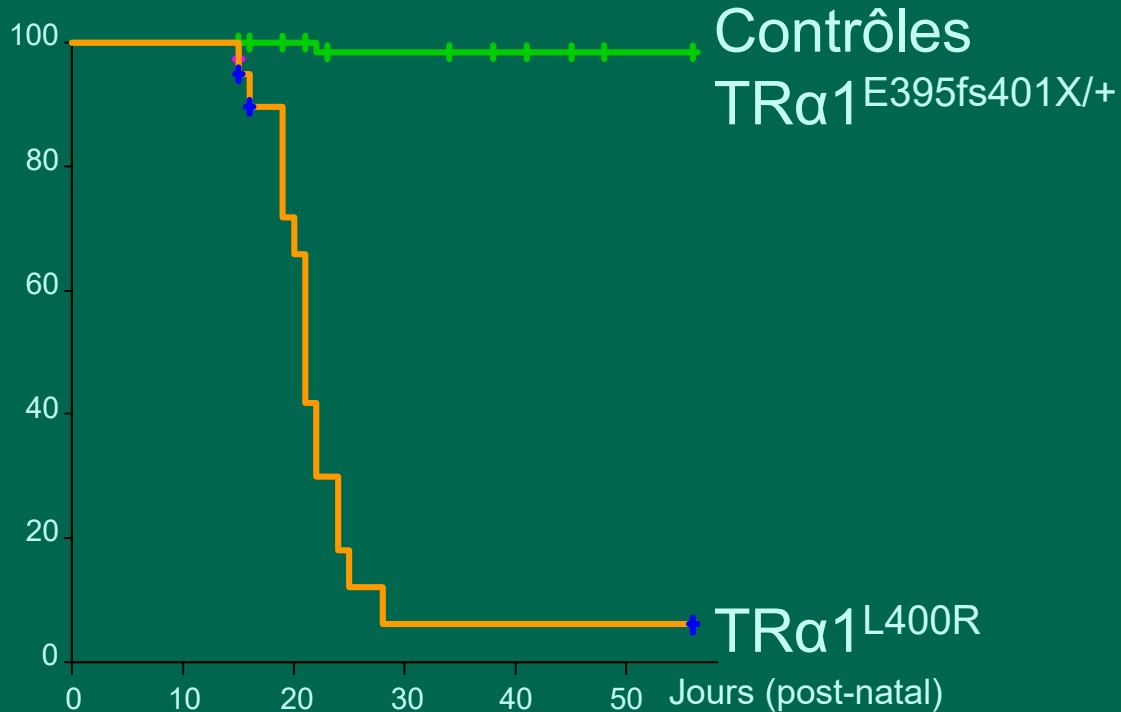




Pourquoi la mutation $TR\alpha 1^{L400R}$ est-elle létale?

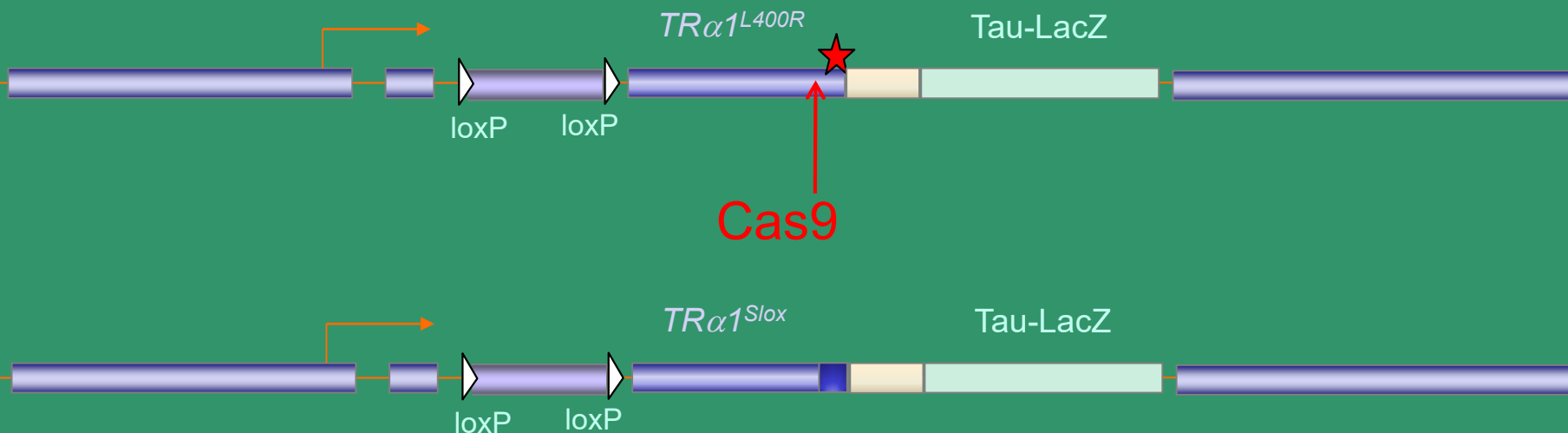


% Survie





Expression Cre/loxP dépendante de TR α 1^{E395fs401X}



↓
cccaccgaactcttccccccactcttctctggagggtctttgaggatcaggaagtctaa

P T E L F P P L F L E V F E D Q E V * Wild-type

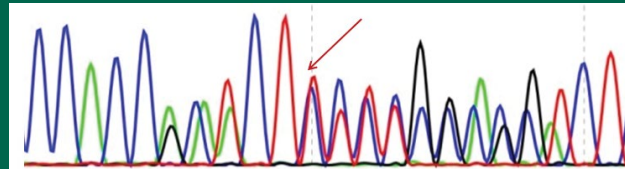
P T E R F P P **R** F L E V F E D Q E V * TR α 1^{L400R}

P T **T L P G G L *** TR α 1^{E395fs401X}



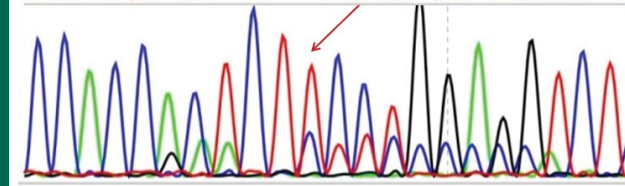
L'élimination de l'épissage alternatif augmente l'expression de TR α 1^{L400R}

ADN génomique

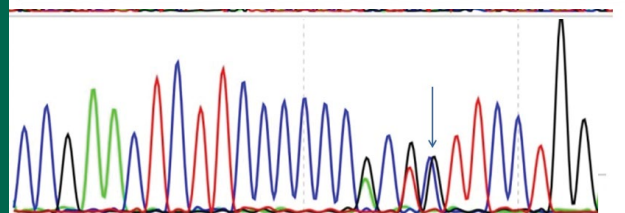


Thra^{E395fs401X/+}

ADNc cerveau

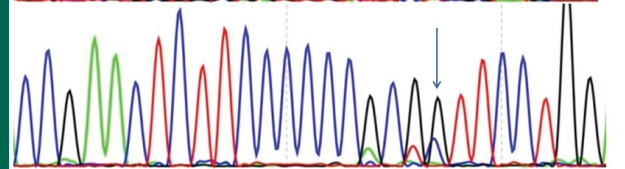


ADN génomique



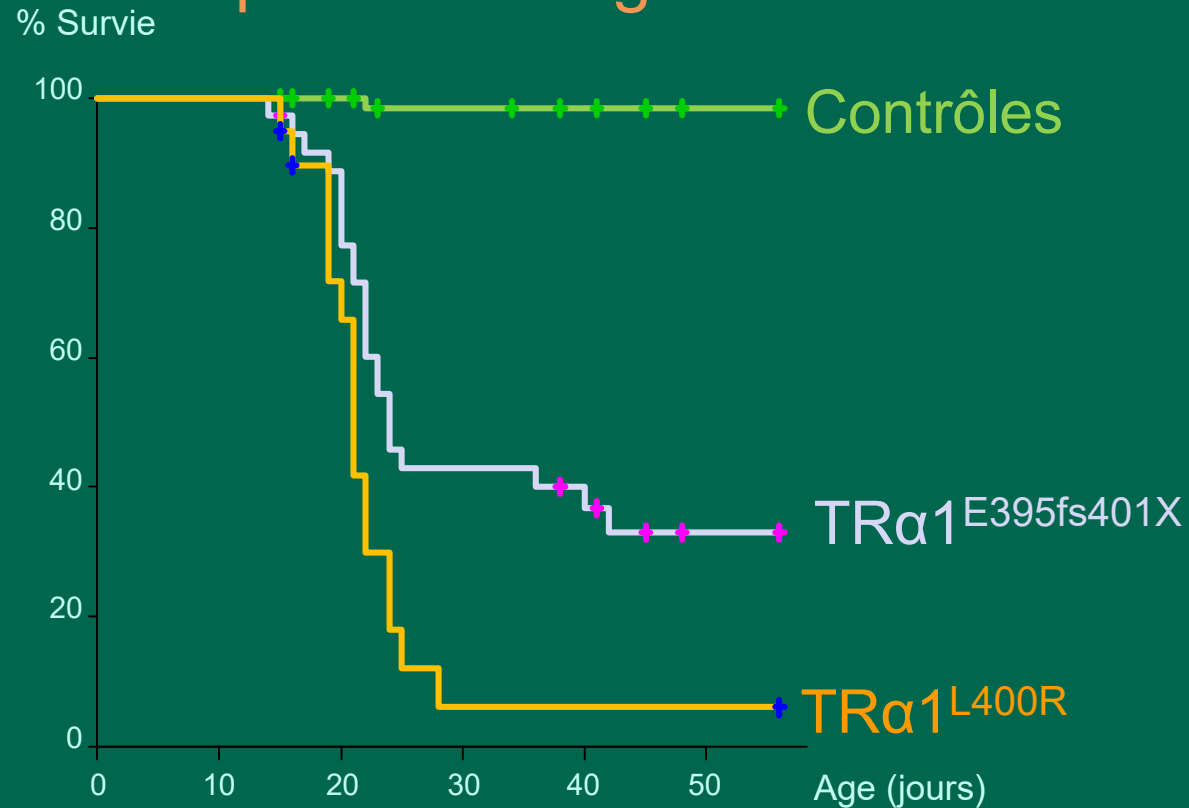
Thra^{AMI/+} x *nestin Cre*

ADNc cerveau





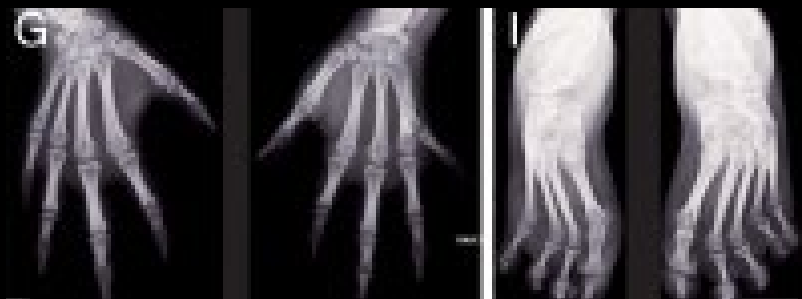
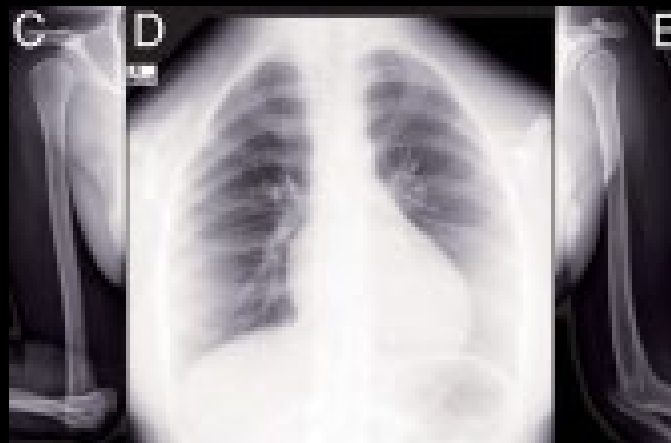
La mutation L400R a des conséquences plus sévères qu'un décalage de trame.





Une souris « avatar » pour modéliser un cas atypique de RTH α

(Espiard et al MCE 2015)



N359Y

RKHNIPHFWPKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTELFPPLFLEVFEDQEV



Utilisation de la recombinaison homologue pour générer la mutation N359Y dans le gène *Thra* de souris

Thra^{N359Y}

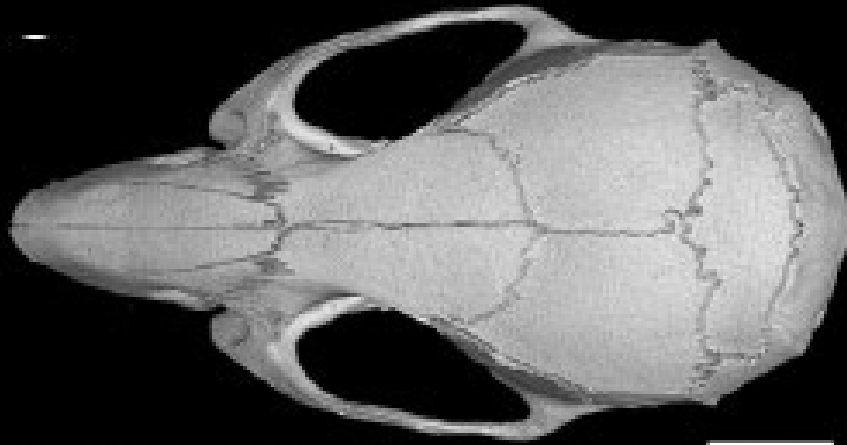
```
5' TAC GTC AAC CAC CGC AAA CAC TAC ATT CCG CAC TTC
3' ATG CAG TTG GTG GCG TTT GTG ATG TAA GGC GTG AAG
   Y  V  N  H  R  K  H  Y  I  P  H  F
```

```
Thra                                PAM          ARN guide  Antisens
5' TAC GTC AAC CAC CGC AAA CAC AAC ATT CCG CAC TTC
3' ATG CAG TTG GTG GCG TTT GTG TTG TAA GGC GTG AAG
   Y  V  N  H  R  K  H  N  I  P  H  F
```

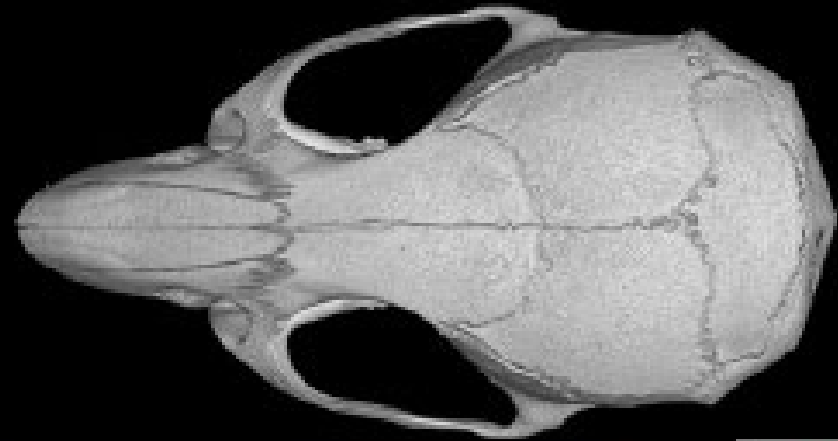
```
ssODN      TaqI
5' TAC GTC AAC CAT CGA AAA CAC TAC ATT CCG CAC TTC
   Y  V  N  H  R  K  H  Y  I  P  H  F
```



$TR\alpha 1^{N359Y}$ ne cause pas de malformation du squelette.



Thra^{N359/+}



Thra^{+/+}

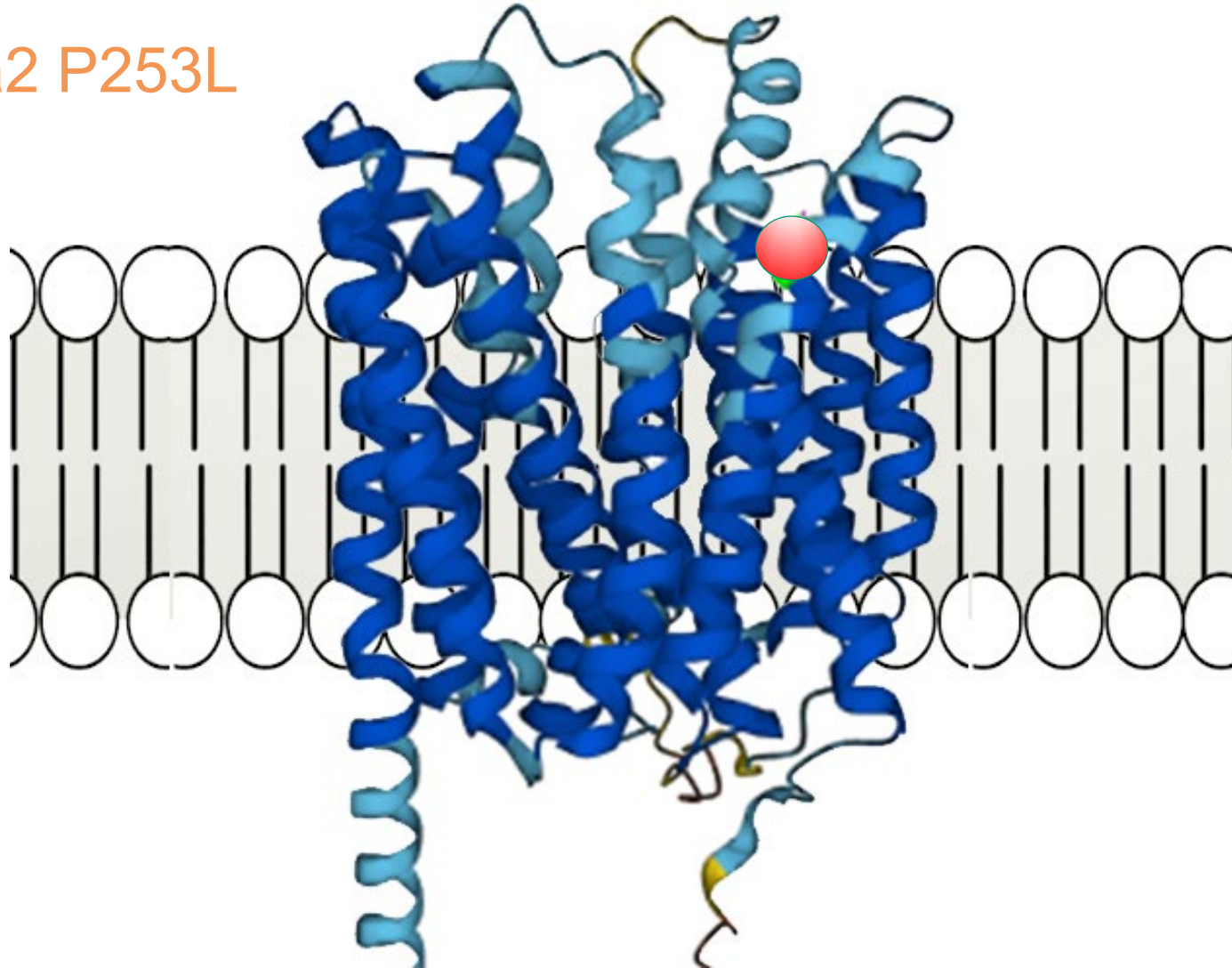


Le syndrome d'Allan-Herndon-Dudley: mutation du gène *Slc16a2/Mct8* codant pour un transporteur membranaire de l'hormone thyroïdienne



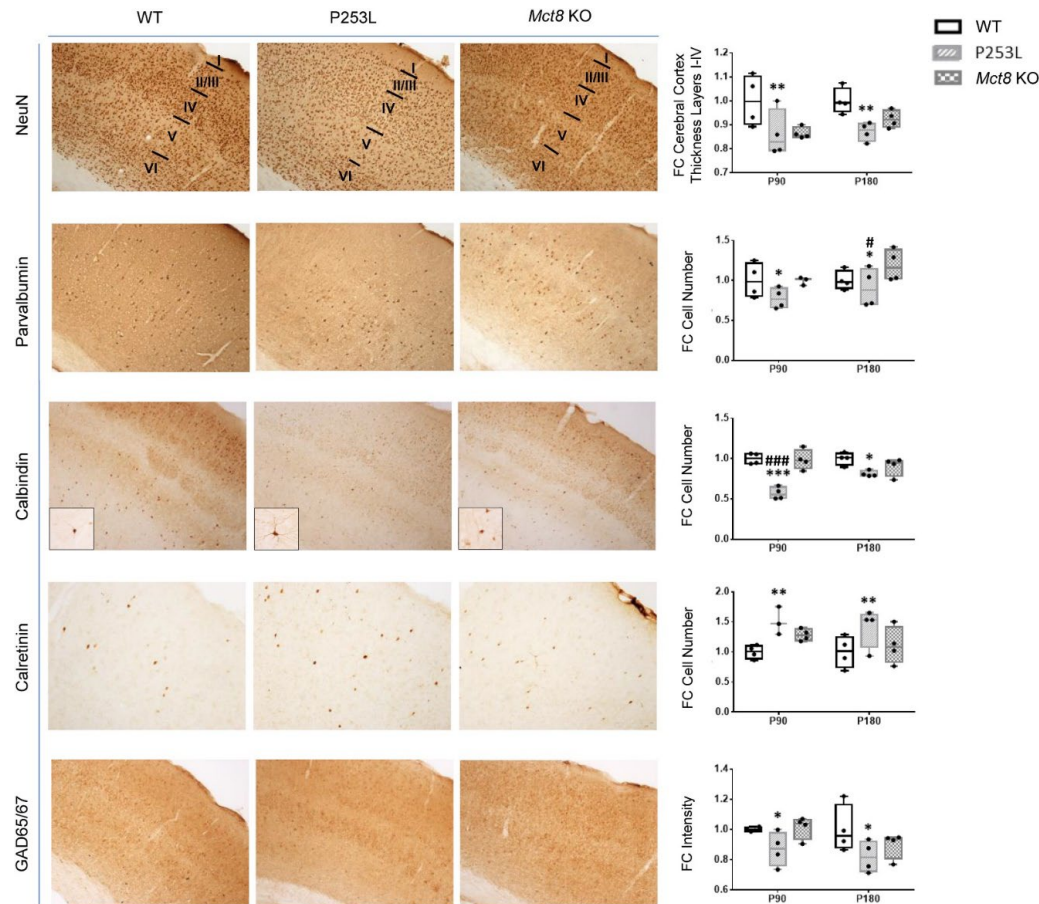


Mct8/Slc16a2 P253L





Souris $Mct8^{P253L/+}$: un modèle du syndrome Allan-Herndon-Dudley plus fidèle que le knock-out





Pourquoi l'édition génomique CRISPR/Cas9 est une révolution

Avant:

- ❑ 2 Janvier: design d'un plasmide de grande taille.
- ❑ 1^{er} Avril: Introduction dans les cellules ES.
- ❑ 15 Avril: Clonage cellulaire. Extraction d'ADN
- ❑ 30 Avril: génotypage de >100 clones cellulaires
- ❑ 1^{er} Juin: greffe des cellules ES.
- ❑ 21 Juin: naissance des chimères.
- ❑ 1^{er} Septembre: Transmission germinale de la mutation.

Après:

- ❑ 2 Janvier: design d'un ARN guide. Commande ARN + protéine Cas9 recombinante (+ matrice d'ADN simple brin)
- ❑ 5 Janvier: electroporation des zygotes.
- ❑ 26 Janvier: naissance des fondateurs (mosaïques)
- ❑ 1^{er} Mai: transmission germinale de la mutation.



Génomique Fonctionnelle des récepteurs de l'hormone thyroïdienne

Denise Aubert
Suzy Markossian
Frédéric Flamant
Karine Gauthier
Romain Guyot
Sabine Richard
Juan Ren
Jacques Samarut
Shijia Wu
Yanis Zekri

Plateau de biologie
expérimentale de l'ENS
Lyon
Marie Teixeira
Nadine Aguilera

CIBERER Madrid
Ana Guadano Ferraz
Soledad Barez Lopez
Victor Valcarcel

