

COMMENT LA SOURIS EST DEVENUE, TIMIDEMENT, UNE ESPÈCE MODÈLE POUR LA RECHERCHE EN GÉNÉTIQUE ANIMALE ET HUMAINE

HOW THE MOUSE HAS BECOME, TIMIDLY, A MODEL FOR ANIMAL AND HUMAN GENETIC RESEARCH

Par Jean-Jacques PANTHIER⁽¹⁾ et Jean-Louis GUENET⁽²⁾
(Communication présentée le 16 Février 2017
Manuscrit accepté le 06 Janvier 2017)

RÉSUMÉ

Depuis le début du vingtième siècle, le modèle souris est l'un des plus communément utilisés par les généticiens. Cet article retrace les origines des recherches en Génétique de la Souris, et présente ses liens avec les travaux les plus actuels en Biologie expérimentale. Après les premières analyses formelles par Lucien Cuénot, William E. Castle, Clarence C. Little, et John B. S. Haldane, les généticiens se sont lancés dans la production de lignées consanguines. Cette histoire se prolonge jusqu'à nos jours avec la production de nouvelles populations de référence présentant une diversité génétique très élevée : le Collaborative Cross, et le Diversity Outbred. Dans le même temps, Leroy Stevens, Martin Evans, Gail Martin, et Barry Pierce réalisent une série d'expériences cruciales sur une tumeur rare : le tératocarcinome. Ces tumeurs vont être placées au cœur de recherches passionnantes qui se poursuivent de nos jours encore avec les travaux qui visent à comprendre les mécanismes de la reprogrammation des cellules somatiques adultes en cellules pluripotentes.

Mots-clés : génétique formelle, embryologie, biologie du développement, cellules souches, lois de Mendel, pluripotence, reprogrammation.

ABSTRACT

From the early twentieth century onwards, the mouse is one the most popular model amongst geneticists. This article dedicates the origins of scientific work on mouse genetics and reports their links with current research in experimental biology. Following the first formal analyses by Lucien Cuénot, William E. Castle, Clarence C. Little, and John B. S. Haldane, geneticists plunged into the production of inbred strains. This history continues today with the development of new resource populations with high levels of genetic diversity: the Collaborative Cross, and the Diversity Outbred. At the same time, Leroy Stevens, Martin Evans, Gail Martin, and Barry Pierce performed a series of crucial experiments on a rare tumour: testicular teratocarcinoma. These tumours became the focus of a great deal of research that continues today through the works aimed at understanding the mechanisms of somatic adult cell reprogramming into pluripotent cells.

Key words: formal genetics, embryology, developmental biology, stem cells, Mendel's laws, pluripotency, reprogramming.

(1) Professeur de Génétique - École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex.
Institut Pasteur, CNRS UMR 3738, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

Tel +33-1 45 68 85 55

Courriel : jean-jacques.panthier@pasteur.fr

(2) Chef de Service honoraire, Institut Pasteur.

INTRODUCTION

Bien qu'il n'y ait jamais fait allusion de manière explicite dans ses publications, on a de sérieuses raisons de penser que Gregor Mendel a fait des expériences impliquant des croisements entre souris de phénotypes différents. Mendel aimait tous les animaux, hormis les serpents qu'il avait en horreur, et comme beaucoup de naturalistes du 19^{ème} siècle il en élevait plusieurs espèces, des oiseaux en particulier. Grâce au témoignage de Franz Hornisch, membre du chœur de l'Église de l'Assomption de la Vierge Marie, voisine de l'abbaye augustinienne de Saint Thomas, et élève de Mendel au lycée moderne de Brno, on sait que le Père Gregor Mendel élevait des souris pigmentées et des souris blanches. Ce fait a été confirmé par un collègue laïc de Mendel, Adolf Nowotny, à Hugo Iltis, le premier biographe de Mendel (Iltis, 1924). Hélas, il ne reste pas de traces de ces expériences car la plupart des documents écrits par Mendel ont été brûlés après sa mort. Il subsiste donc un doute sur la nature précise des expériences effectuées par Mendel avec les souris. Des recherches sont actuellement entreprises au Musée Mendel de Génétique de Brno pour retrouver la copie d'une commande de souris blanches qu'aurait pu faire Gregor Mendel vers 1853. Si l'existence de cette commande devait être confirmée, ce serait un indice supplémentaire de l'intention qu'avait Mendel de croiser les souris blanches avec des souris pigmentées sans doute dans le but d'étudier la transmission de la couleur du pelage de génération en génération.

Le programme de recherche de Mendel à cette époque de sa vie est mal connu, par contre on sait avec certitude que l'évêque du diocèse de Brno, Anton Ernst Schaffgotsch, a imposé à Mendel de mettre un terme à ses élevages arguant du fait qu'il n'était pas convenable pour un moine de partager ses quartiers avec des créatures qui ont des relations sexuelles et copulent. Obtempérant à ces ordres, Mendel a donc abandonné l'espèce *Mus musculus* pour travailler sur un organisme à la sexualité moins exubérante : le pois cultivé, *Pisum sativum*. Ainsi, la Souris a manqué l'occasion d'être la première espèce utilisée dans des expériences de Génétique. Mais les injonctions de l'évêque de Brno n'eurent d'autres effets que de retarder l'émergence du modèle souris parce que ce mammifère, comme nous allons l'expliquer dans cette revue, s'est révélé avec le temps comme étant parfaitement adapté aux analyses génétiques.

LES PREMIERES ANALYSES DE GÉNÉTIQUE FORMELLE CHEZ UN ANIMAL

La représentation symbolique des génotypes rend difficile la lecture des publications du premier tiers du 20^{ème} siècle. Ainsi, le génotype d'une souris portant les mutations *dilute* et *pink-eyed* était-il noté YBrBdpA par Clarence C. Little en 1915, en accord avec le schéma de Mendel. Aujourd'hui nous l'écrivons *Myo5a^{dl}Oca2^{blp}*, où *Myo5a* désigne le gène codant la myosine Va et *Oca2* celui qui est responsable, lorsqu'il est muté, de l'albinisme oculo-cutané de type 2, tandis que les exposants *d* et *p* indiquent les allèles mutants à chacun des deux locus.

Dès 1913, Thomas H. Morgan réclame une simplification de la nomenclature, en particulier pour introduire la notion d'allèle sauvage, c'est-à-dire d'allèle non muté (Morgan, 1913). Un débat sur la nomenclature s'engage alors entre Thomas H. Morgan et William E. Castle, bientôt rejoint par la communauté des généticiens, qui se concrétise après plus de vingt ans par la création en 1939 d'un comité international de nomenclature de la Souris composé de Francis A. E. Crew, Leslie C. Dunn et George D. Snell (Castle, 1913; Gruenberg, 1939). Il était prévu que ce comité se réunisse pour la première fois en 1937 à Moscou, à l'occasion du 7^{ème} congrès international de Génétique, mais l'événement fut d'abord reporté *sine die* par le Politburo et finalement annulé. Il faut dire qu'à cette époque on était en pleine affaire Lyssenko (Soyfer, 2003). Ce congrès, qualifié de tragique, se tint à Edinburgh du 23 au 30 août 1939, quelques jours avant la déclaration de guerre de la Grande-Bretagne et de la France à l'Allemagne : le 3 septembre 1939. Alors qu'à Paris les monuments se parent de leurs couleurs de guerre, et sont entourés de sacs de sable, les généticiens de la souris réunis en Ecosse, se mettent enfin d'accord sur des règles et sur l'attribution de symboles aux mutations, dans une ambiance que l'on peut imaginer bien particulière (Dunn *et al.* 1940). Précisons que le comité international de nomenclature de la souris existe toujours. Les règles qu'il édite sont en accès libre sur le site *Mouse Genome Informatics* (MGI). Dans un souci de clarté, nous utiliserons dans cette revue les règles de la nomenclature actuellement en vigueur.

La première véritable expérience de génétique réalisée avec la Souris a été effectuée par Lucien Cuénot, un professeur de biologie de l'Université de Nancy, qui étudia la descendance de croisements impliquant, d'une part des souris blanches, albinos (*Tyr^{cl}*), qui portaient à l'état homozygote une mutation faux-sens (*c*) dans la séquence codante du gène tyrosinase (*Tyr*), et d'autre part des souris pigmentées (*Tyr^{+/+}*) (Cuénot, 1902). Les individus de première génération (F1) étaient tous pigmentés. Cuénot en conclut que l'allèle sauvage (+) est dominant sur l'allèle mutant (*c*). Il croisa alors les individus F1 entre eux et obtint, en seconde génération (F2), 270 souris parmi lesquelles 198 (environ $\frac{3}{4}$) étaient pigmentées tandis que 72 (environ $\frac{1}{4}$) étaient blanches. Cuénot démontrait ainsi que la première loi de Mendel (la loi dite d'uniformité des hybrides de première génération) s'appliquait aussi bien au caractère albinos de la souris qu'à la couleur des fleurs de pois cultivés par Mendel.

Il est intéressant de constater que l'expérience de Cuénot a précédé l'utilisation du mot « génétique ». Ce terme a été employé pour la première fois le 18 Avril 1905 dans une lettre écrite par William Bateson à Alan Sedgwick pour désigner la nouvelle chaire que souhaitait créer l'Université de Cambridge (Royaume-Uni). La conférence internationale organisée l'année suivante à Londres par la Société Royale d'Horticulture a été l'occasion pour Bateson d'officialiser le nom de ce nouveau domaine de recherche dédié à l'élucidation des phénomènes d'hérédité et de variation des caractères phénotypiques.

Une seconde expérience fut réalisée quelques années plus tard à l'Université d'Harvard par William E. Castle et Clarence C. Little qui croisèrent des souris *dilute* (*Myo5a^{dl/d}*) avec des souris *pink-eyed* (*Oca2^{pl/p}*). Les chercheurs américains observèrent que tous les individus F1 présentaient un même phénotype sauvage. Ils en conclurent que les mutations *dilute* et *pink-eyed* étaient elles aussi récessives. Ils croisèrent ensuite, comme Cuénot, les souris F1 entre elles et observèrent qu'en F2 les individus pouvaient avoir une des quatre robes suivantes :

- 1) sauvage,
- 2) dilute,
- 3) pink-eyed, et
- 4) dilute et pink-eyed à la fois,

et ils émirent l'hypothèse que ces quatre phénotypes devaient vraisemblablement correspondre aux génotypes suivants :

- 1) *Myo5a^{+/+}* ; *Oca2^{+/+}*, *Myo5a^{+/dl}* ; *Oca2^{+/+}* ; *Myo5a^{+/+}* ; *Oca2^{+/p}*, ou *Myo5a^{+/dl}* ; *Oca2^{+/p}*
- 2) *Myo5a^{dl/dl}* ; *Oca2^{+/p}*, ou *Myo5a^{dl/dl}* ; *Oca2^{+/+}*
- 3) *Myo5a^{+/dl}* ; *Oca2^{pl/p}*, ou *Myo5a^{+/+}* ; *Oca2^{pl/p}*
- 4) *Myo5a^{dl/dl}* ; *Oca2^{pl/p}* respectivement.

Leur conclusion fut qu'il s'agissait d'un cas de 'dihybridisme Mendélien', où la pigmentation est modifiée de deux façons différentes (Castle & Little, 1909), ce qui établissait que la seconde loi de Mendel (la loi dite de ségrégation indépendante des caractères héréditaires) s'appliquait aux caractères *dilute* et *pink-eyed*. D'une façon plus générale, les expériences de Cuénot, Castle et Little montrèrent que les lois de Mendel s'appliquaient à la souris et probablement à tous les mammifères.

Les premières données indiquant l'existence d'une liaison génétique chez la Souris ont été obtenues quelques années plus tard à l'Université d'Oxford par John B. S. Haldane, avec un ami, Alexander D. Sprunt, et une étudiante, qui n'était autre que sa propre sœur, Naomi Haldane (qui deviendra, après son mariage, Mme Mitchison, une écrivaine écossaise de renom) (Haldane *et al.* 1915). Haldane et ses collègues croisèrent des souris blanches, homozygotes pour la mutation *albinos* (*Tyr^{cl/c}*), et des souris *pink-eyed* (*Oca2^{pl/p}*). Les souris F1 obtenues furent toutes normalement pigmentées, comme attendu, puisque les mutations *albinos* et *pink-eyed* sont récessives. En revanche, ils observèrent dans la population F2 un nombre de souris homozygotes pour les deux mutations récessives (c'est-à-dire *Tyr^{cl/c}* *Oca2^{pl/p}*) bien plus petit qu'attendu. On sait aujourd'hui que ce résultat est dû au fait que les gènes *Tyr* et *Oca2* sont assez proches l'un de l'autre sur le même chromosome 7 de la Souris, séparés par seulement 15 centimorgans (cM). Les allèles *Tyr⁺* et *Oca2^p* d'une part, *Tyr^c* et *Oca2⁺* d'autre part, sont donc transmis ensemble par les animaux F1, sauf dans les cas où une recombinaison intervient entre les deux locus conduisant à la formation de gamètes *Tyr⁺* ; *Oca2⁺* et *Tyr^c* ; *Oca2^p*, ce qui se produit dans 15% des méioses seulement. John Haldane écrivit la publication présentant ses données en 1915 alors qu'il combattait l'armée allemande dans le Nord de la France comme Lieutenant du régiment royal des fusiliers des Highlands. Alexander Sprunt, son ami et co-auteur, avait déjà été tué au combat. Cet article est vraisemblablement

l'un des plus importants parmi ceux qui ont été écrits dans les tranchées. John Haldane interpréta le résultat de ses croisements à l'aune de l'hypothèse du dédoublement (*reduplication hypothesis*) imaginée par William Bateson et Reginald Punnett pour rendre compte des proportions non-mendéliennes dues à la liaison génétique. Selon cette hypothèse, la division cellulaire qui produit les gamètes est asymétrique et des individus de génotype *A/a* ; *B/b* peuvent produire plus de gamètes *AB* et *ab*, que de gamètes *Ab* et *aB*. Ainsi, John Haldane a bien identifié une liaison entre deux gènes de la souris, mais il n'en a pas expliqué le mécanisme. *A posteriori*, cela peut apparaître étonnant, car Thomas Morgan avait proposé dès 1911, dans un article de *Science*, que si certaines mutations apparaissent comme associées c'est parce qu'elles sont localisées l'une près de l'autre sur un même chromosome (Morgan, 1911). La situation dans laquelle était le Lieutenant John Haldane au moment où il écrivait l'article est très probablement un élément d'explication même si ce n'est peut-être pas la seule raison. L'hypothèse d'un arrangement strictement linéaire des gènes a fait l'objet de débats entre généticiens jusqu'en 1919 (Castle, 1919; Sturtevant *et al.* 1919), alors même que la première carte génétique a été établie chez la Drosophile par Alfred Sturtevant dès 1913 (Sturtevant, 1913). Ainsi, la principale raison qui amenait William Castle à douter qu'un arrangement linéaire des gènes puisse être possible était qu'il ne pensait pas qu'il puisse exister une molécule organique ayant la forme d'une simple chaîne (Castle, 1919). Précisons que la structure de la macromolécule d'ADN était bien sûr totalement inconnue en 1919. Leslie C. Dunn, un élève de Castle, fournira une interprétation correcte des résultats de John Haldane et collaborateurs. Il fera également un bilan des données expérimentales alors disponibles démontrant l'existence de liaisons génétiques chez la Souris et le Rat (Dunn, 1920).

LES PREMIÈRES POPULATIONS GÉNÉTIQUES DE RÉFÉRENCE : LES LIGNÉES CONSANGUINES DE SOURIS

De nos jours, les généticiens de la souris utilisent des lignées consanguines, c'est-à-dire des populations d'individus obtenues en accouplant, pendant au moins 20 générations, uniquement des frères et des sœurs descendants d'une seule paire de géniteurs primaires. Ces croisements strictement consanguins ont pour effet de faire diminuer progressivement le nombre d'allèles à chaque locus jusqu'à ce qu'il n'en reste plus qu'un seul, ce qui signifie que tous les individus d'une lignée consanguine possèdent, à chaque locus, un seul et même allèle. Les individus d'une même lignée consanguine sont alors identiques. Mais pourquoi de telles lignées consanguines ont-elles été produites ? En fait, c'est Clarence Little qui ressenti le premier le besoin de fabriquer des lignées génétiquement homogènes. Little était intéressé par la génétique du cancer et, en 1915, il se trouva très mal à l'aise devant des données publiées par Maud Slye, une généticienne de l'Université de Chicago, qui travaillait sur l'hérédité des cancers spontanés. Cette dernière avait publié un article dans lequel elle mettait en parallèle deux séries de

pedigrees de souris. La première série était composée de descendants de croisements entre souris pigmentées et souris albinos. La seconde était composée de souris atteintes de cancers et des souris saines. Maud Slye compara visuellement les deux séries de pedigrees, et conclut de leur similitude que la prédisposition au développement du cancer ségrégeait de façon récessive, comme la mutation *albinos* (Slye, 1915a). Si Little est irrité, c'est d'abord parce dans les pedigrees des animaux pigmentés et albinos que publie Slye, la mutation *albinos* ne ségrége pas de façon mendélienne (Little, 1915a). Slye distingue en effet deux types d'animaux F1 (de génotype $Tyr^{+/c}$) : certains transmettent la mutation *albinos*, d'autres pas. Selon elle, ces derniers ne produisent que des animaux pigmentés ($Tyr^{+/+}$) (Slye, 1915a). Ce résultat est en contradiction avec la première loi de Mendel. Little soupçonne une erreur, et attire l'attention de Slye sur le fait qu'une des conditions requises pour étudier la transmission des caractères est de commencer les croisements avec des animaux ayant des constitutions génétiques homogènes, ce que Mendel a pris garde de faire en réalisant ses croisements avec des lignées 'pures' de pois cultivés. Slye se défend en affirmant que les animaux qu'elle a utilisés sont sauvages contrairement aux souris de laboratoire classique. Leur pelage est « gris sauvage », alors que celui des souris utilisées par Little et d'autres est « gris artificiel de laboratoire ». Les lois de Mendel ne s'appliquent pas au caractère gris sauvage, pense-t-elle (Slye, 1915b). Le débat sur les lois de Mendel n'est pas clos, écrit-elle (Slye, 1916). Little réclame par deux fois à Slye la communication de toutes ses données mais il ne l'obtiendra jamais (Little, 1915b). Ce conflit convainc Little de l'absolue nécessité de disposer de lignées pures, autrement dit consanguines. Il poursuit donc des croisements frères-sœurs qui aboutiront à la première lignée consanguine, la lignée DBA, ainsi désignée car les animaux étaient homozygotes pour trois mutations récessives ayant un effet sur la coloration de la robe : d (*dilute*, dont nous avons déjà parlé), b (*brown*) et a (*non agouti*).

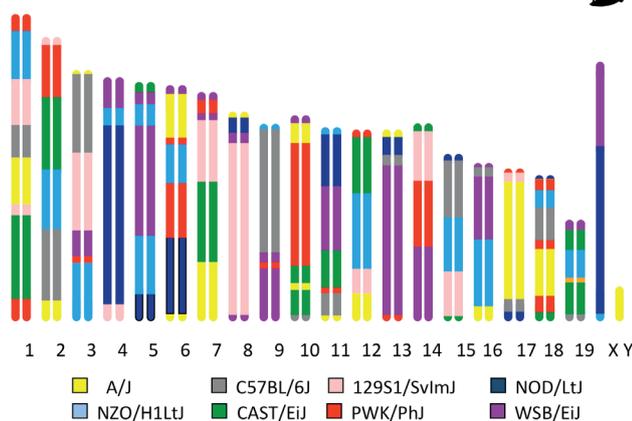
Les motivations de Leonell C. Strong pour fabriquer des lignées consanguines sont d'un autre ordre. Strong considère que les mesures effectuées sur les souris varient de façon si importante d'une souris à l'autre qu'un expérimentateur ne peut parfois pas confirmer ses propres observations. La vérification des mesures obtenues par un chercheur travaillant dans un autre laboratoire semble encore plus désespérée. Strong soupçonne que cela est dû à la variété des fonds génétiques dans les populations naturelles de souris et considère qu'un moyen de réduire la variance des valeurs mesurées serait de contrôler le fonds génétique des animaux de laboratoire, de le rendre identique pour tous les individus étudiés. La variance phénotypique devrait alors être réduite. Ces réflexions l'amène à croiser pendant plusieurs générations une série de frères-sœurs, ce qui aboutira à la fabrication de la lignée consanguine C3H (Strong, 1978). Strong effectue ce travail dans des conditions très difficiles. La crise de 1929 ayant réduit de façon drastique les crédits alloués à la recherche scientifique, Strong est parfois obligé de loger des cages de souris dans sa propre chambre, ce qui avait été interdit à Mendel ! Les lignées consanguines ont joué un rôle fondamental dans

l'analyse du déterminisme de la compatibilité tissulaire et la découverte du complexe majeur d'histocompatibilité par George D. Snell (Snell, 1948). Il existe aujourd'hui plusieurs centaines de lignées consanguines de souris et de nouvelles lignées sont régulièrement créées.

LES NOUVEAUX OUTILS DE LA GÉNÉTIQUE FORMELLE

Les analyses du début du 20^{ème} siècle ont fourni la plupart des concepts de la Génétique formelle de la souris. Les recherches actuelles ont abouti à la création de nouvelles ressources. L'une des plus importantes découle du séquençage complet du génome de 17 lignées consanguines (Keane *et al.* 2011). Parmi celles-ci figurent treize des lignées de laboratoire les plus classiques, parmi lesquelles DBA/2 (la lignée historique de C. C. Little), C3H (la lignée de L. C. Strong), C57BL/6 (également développée par C. C. Little, et aujourd'hui la lignée consanguine de référence), plus quatre lignées qui sont dérivées de progéniteurs sauvages capturés dans la nature et représentant les sous-espèces *Mus musculus castaneus*, *Mus musculus musculus*, *Mus musculus domesticus*, et le taxon *Mus spretus*. Ces séquences génomiques donnent des informations utiles sur la diversité génétique dans le genre *Mus*. L'ensemble de ces séquences fournit surtout des données de polymorphisme très utiles pour l'analyse fonctionnelle des gènes. Ces données sont adossées à deux nouvelles populations de référence : le *Collaborative Cross* (CC) et le *Diversity Outbred* (DO). Le CC est un panel de lignées consanguines dérivées de 8 lignées parentales, elles-mêmes consanguines, mais très différentes quant à leurs origines (**figure 1A**) (Collaborative Cross, 2012). Les séquences génomiques de chacune d'entre elles sont connues. Les 8 géniteurs du CC ont été croisés de façon séquentielle de telle sorte que chaque lignée du CC représente 12,5% (soit $\frac{1}{8}$) du génome de chacun des parents et que son génome soit une combinaison unique des allèles parentaux. En d'autres termes, il s'agit de lignées recombinantes consanguines issues de huit parents (Panthier & Montagutelli, 2012). L'analyse d'un caractère complexe, par exemple l'observation d'un comportement naturel ou induit, la mesure d'une constante physiologique ou d'une sensibilité à une maladie infectieuse, chez une centaine de lignées provenant du CC, permet de se faire assez vite une opinion à propos du déterminisme génétique de ce caractère, c'est-à-dire du nombre approximatif de locus concernés, de leur localisation chromosomique et de l'importance relative de chacun de ces locus dans le phénotype analysé. L'utilisation du CC ne permet pas, sauf lorsque l'on est chanceux, d'identifier les gènes correspondants. Pour cela il faut avoir recours au DO, une population en ségrégation dérivée des mêmes huit lignées parentales que le CC (Churchill *et al.* 2012) (**figure 1B**). Dans cette population, chaque individu est unique. Son génome est composé de tout petits fragments provenant des 8 génomes parentaux, parfois à l'état homozygote parfois seulement hétérozygote. Pour utiliser une représentation imagée, on peut dire que les 8 génomes parentaux ont été fragmentés menu et distribués au hasard dans une multitude de combinaison chez

A. Le génome d'une lignée du Collaborative Cross



B. Le génome d'une souris de la population Diversity Outbred

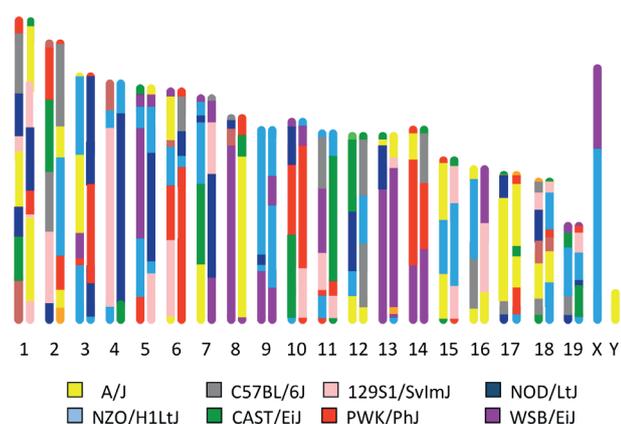


Figure 1 : A. Exemple de la composition génétique d'une lignée consanguine du Collaborative Cross. Les 20 paires de chromosomes d'une lignée sont composés d'environ 140 segments chromosomiques provenant d'une des huit lignées parentales (A/J, C57BL/6, 129S1/SvImJ, NOD/Ltj, NZO/H1Ltj, CAST/Ei, PWK/PhJ, WSB/EiJ). La couleur utilisée pour chaque segment indique son origine parentale. Les lignées ont une composition génétique indépendante les unes des autres, unique et non reproductible. Elles ne portent qu'un seul allèle à une position donnée. Tous les individus d'une même lignée sont génétiquement identiques. Ces lignées sont utilisées sous la forme de panel de lignées, dans le cadre d'études d'association. Le principe est le suivant : si les individus des lignées portant un segment d'origine A/J sur un chromosome donné sont plus résistantes à une infection que les lignées portant à cette position un segment d'une autre origine parentale, un locus contrôlant, en partie, la résistance à cette infection existe à cette localisation, et la lignée parentale A/J porte un allèle de résistance à cet endroit. Ces lignées, dites recombinantes consanguines, se prêtent particulièrement bien à l'étude des caractères quantitatifs. B. Exemple de la composition génétique d'un individu de la population Diversity Outbred. Chaque individu à une composition génétique unique et non reproductible. Le principe d'utilisation des souris du Diversity Outbred est le même que celui des lignées du Collaborative Cross.

chaque souris du DO. Il est inutile d'élever les souris du DO, il suffit de les commander au Jackson Laboratory. La mesure du phénotype d'intérêt chez quelques centaines d'individus du DO permet d'identifier des gènes ségrégant avec le phénotype d'intérêt (Logan *et al.* 2013). Dans les années à venir, l'utilisation combinée du CC et du DO devrait faciliter dans l'analyse génétique des caractères complexes, un des domaines les plus difficiles de la génétique formelle (Chesler, 2014).

LE DÉBUT DES RECHERCHES SUR LES CELLULES SOUCHES

Il existe une autre branche à cette histoire compliquée : les recherches conduites sur la biologie des cellules souches. Tout a commencé dans les années 1950 lorsque Leroy C. Stevens, alors postdoctorant au Jackson Laboratory, observe que 30 individus sur 3557 mâles de la lignée consanguine 129 (environ 1%) portent une tumeur bizarre : un tératocarcinome testiculaire (Stevens & Little, 1954). Ces tumeurs sont composées d'une variété de tissus embryonnaires et adultes que l'on ne trouve pas normalement dans le testicule : du tissu nerveux, des épithéliums de types variés, du cartilage et des os, du muscle, du tissu adipeux, et des épithéliums glandulaires variés. Ces tumeurs peuvent être transplantées d'une souris 129 à une autre. Stevens a ainsi transplanté un tératocarcinome 16 fois de suite, et les tumeurs transplantées montraient toujours la même hétérogénéité tissulaire que la tumeur d'origine. Les tératocarcinomes renferment donc (i) des cellules capables de s'auto-renouveler (ii) et des cellules capables de donner naissance à tous les types cellulaires, autrement dit des cellules pluripotentes. En 1964, Lewis Kleinsmith et Barry Pierce, alors à l'Université du Michigan (Ann Harbor, Etats-Unis), réalisent une expérience clé : ils prélèvent des cellules de tératocarcinome qu'ils greffent isolément par voie sous-cutanée ou intrapéritonéale à des souris 129. Certaines cellules donnent naissance à des tératocarcinomes comprenant des cellules différenciées, ce qui confirme l'existence de cellules souches pluripotentes dans les tératocarcinomes (Kleinsmith & Pierce, 1964). Ces cellules furent nommées cellules de carcinome embryonnaire (ou cellules EC, pour *Embryonic Carcinoma cells*), en accord avec la nomenclature utilisée en histologie. En 1969, Leroy Stevens envoie à Martin Evans alors à l'University College de Londres (Grande-Bretagne) des souris 129 portant des tératocarcinomes. Martin Evans et Gail Martin, une stagiaire post-doctorante, parviennent à isoler en culture les cellules souches pluripotentes, et montrent qu'elles peuvent se différencier lorsqu'elles sont cultivées en monocouche (Martin & Evans, 1974). Gail Martin et Martin Evans observent que les cellules EC forment également lorsqu'elles sont cultivées en suspension dans des boîtes de Pétri des sphères connues sous le nom de corps embryoides (Martin & Evans, 1975). Cette dernière observation fait naître l'espoir qu'il devrait être possible d'induire les cellules EC à se différencier normalement en les exposant aux signaux morphogénétiques présents chez l'embryon. De très nombreuses expériences ont été faites par plusieurs scientifiques (Beatrice Mintz, Janet Rossant, Ralph Brinster, Richard Gardner, Virginia Papaioannou, et d'autres) pour tester l'hypothèse selon laquelle en plaçant des cellules EC dans un blastocyste hôte, il devrait être possible de produire des chimères, c'est-à-dire des individus comprenant des cellules dérivées du blastocyste hôte et des cellules EC. Les résultats furent très décevants. La contribution des cellules EC aux tissus de la chimère était très faible, et aucune de cellules EC n'avait conservé la capacité de former des cellules germinales (Brinster, 1974). En revanche les cellules dérivées des EC avaient bien conservé la capacité de former des tumeurs.

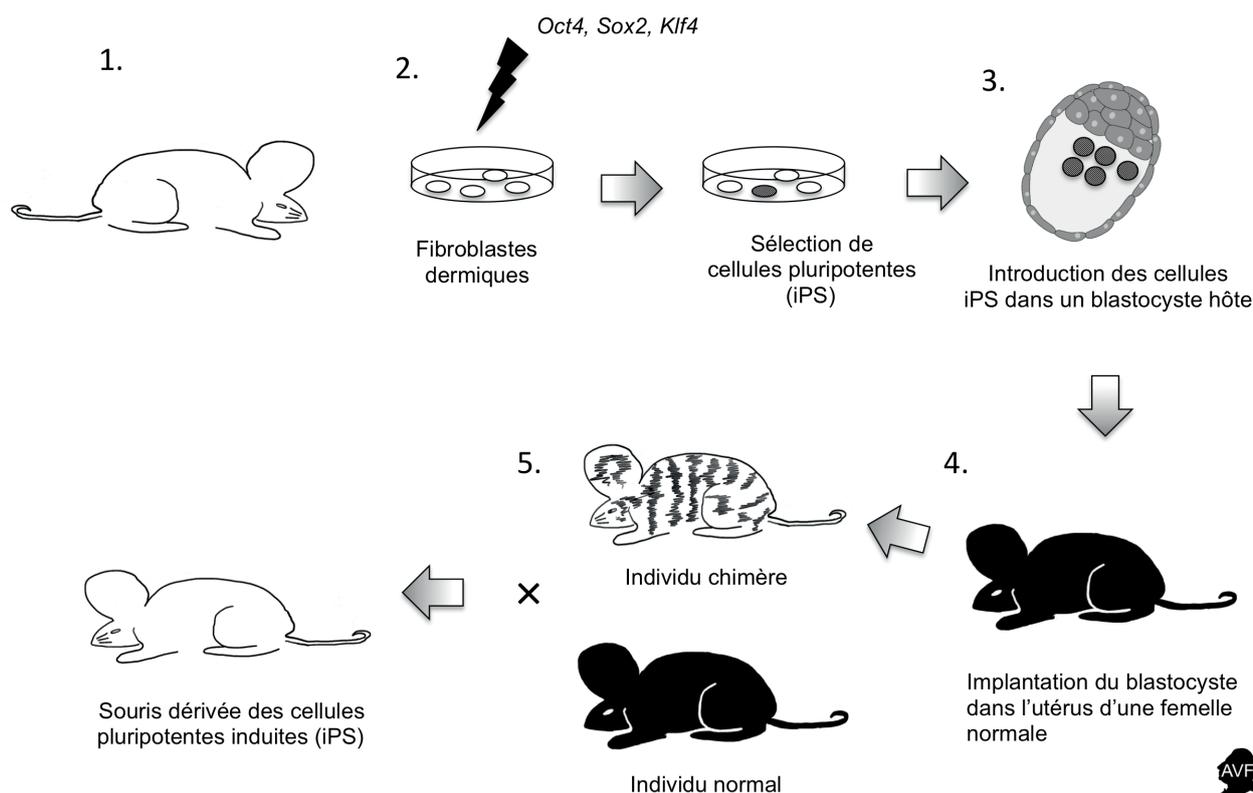


Figure 2 : La production d'un individu adulte dérivé de fibroblastes de la peau d'une souris implique plusieurs étapes : 1) La mise en culture de fibroblastes à partir d'une biopsie de peau. 2) L'introduction des trois gènes *Oct4*, *Sox2*, et *Klf4* (ou tout autre mélange capable d'induire la pluripotence), et la sélection de cellules pluripotentes. 3) L'introduction de cellules pluripotentes dans un blastocyste hôte. 4) Le transfert du blastocyste dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante pour obtenir un individu chimère composé de cellules dérivées des cellules cultivées *in vitro* et du blastocyste hôte. 5) Le croisement de l'individu chimère avec une souris normale pour produire une souris dérivée des cellules pluripotentes induites.

Ces recherches sur les cellules EC semblaient déboucher sur une impasse. Cependant, ces années de recherche sur le térato-carcinome ne furent pas inutiles, et au début des années 1980, plusieurs laboratoires se sont posés la question de savoir si la stratégie ayant permis de dériver des cellules EC à partir des térato-carcinomes pouvait éventuellement être utilisée pour dériver des cellules pluripotentes à partir de l'embryon précoce. Des résultats positifs furent obtenus simultanément dans deux universités différentes. A l'Université de Cambridge par le même Martin Evans et Matthew Kaufman, un expert de l'embryon précoce, et à l'Université de Californie de San Francisco où travaillait alors Gail Martin, de retour aux Etats-Unis (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Malgré des différences dans les techniques utilisées, les deux équipes parvinrent à dériver des cultures de cellules souches à partir de l'embryon précoce de souris. Gail Martin désigna ces cellules sous le terme de « cellules souches embryonnaires » (ou cellules ES, pour *Embryonic Stem cells*). Les cellules ES sont vraiment pluripotentes. Après avoir été injectées dans un blastocyste hôte, elles sont capables de contribuer à tous les tissus de l'adulte correspondant, y compris la lignée germinale. Il est donc possible de fabriquer des souris à partir de cellules cultivées *in vitro*. Gail Martin comme Martin Evans étaient parfaitement conscients des implications pratiques

de ce résultat. Comme l'a écrit Gail Martin : « des cellules ES pluripotentes portant des altérations génétiques spécifiques seront prochainement disponibles, ce qui rendra possible une variété de nouvelles approches pour étudier le développement de l'embryon précoce de mammifère ». On peut ajouter que la possibilité de cultiver des cellules ES *in vitro*, de modifier leur génome à façon, et de sélectionner les cellules ES de génotype convenable pour finalement re-fabriquer une souris a révolutionné le monde de la recherche en biologie.

LES DÉVELOPPEMENTS RÉCENTS SUR LA BIOLOGIE DES CELLULES SOUCHES

Les progrès de la biologie des cellules souches ont abouti en 2006 à l'identification par Shinya Yamanaka, un professeur de l'Université de Kyoto (Japon), de gènes dont l'expression confère la pluripotence à des cellules somatiques adultes (Takahashi & Yamanaka, 2006). Ainsi en forçant l'expression des trois gènes *Oct4*, *Sox2*, et *Klf4*, il est possible d'obtenir en culture *in vitro* des cellules souches pluripotentes induites (ou iPS, pour *induced-pluripotent stem cells*) à partir de simples fibroblastes de la peau (Nakagawa *et al.* 2008). De la même façon que pour les cellules ES, le génome des cellules iPS peut être modifié à

façon et il est possible d'injecter des cellules iPS ainsi modifiées génétiquement dans un blastocyste hôte pour dériver une lignée de souris portant la mutation intéressante (**figure 2**). Chez la Souris, l'utilisation de cellules iPS n'offre aucun avantage sur celle des cellules ES pour obtenir des animaux transgéniques. En revanche, il n'est pas actuellement possible d'obtenir des lignées de cellules ES à partir de blastocystes des mammifères domestiques. Chez ces espèces, les cellules iPS ouvrent de nouvelles perspectives, en particulier si leur utilisation peut être combinée au système d'édition CRISPR-Cas9 (Gilgenkrantz, 2014; Ezashi *et al.* 2016).

Les effets de l'expression des gènes *Oct4*, *Sox2*, et *Klf4* dans la cellule différenciée commencent à être connus : ils effacent les marques épigénétiques et activent les réseaux moléculaires de la pluripotente. Les perspectives de l'utilisation de la reprogrammation cellulaire en médecine régénérative expliquent l'intérêt actuel des cliniciens pour cette approche (Xiao *et al.* 2016). Des cellules iPS produites *in vitro* à partir de cellules différenciées obtenues sur un patient donné pourraient être induites à se différencier dans le lignage lésé avant d'être greffées dans un contexte autologue sur le donneur. Cette stratégie soulève encore de nombreuses difficultés. Chacun des facteurs de la reprogrammation, *Oct4*, *Sox2*, et *Klf4*, est aussi un acteur connu de la transformation cancéreuse. Aussi, de nombreuses équipes recherchent-elles un mélange idéal de petites molécules, d'ARNm, de miARNs, et/ou de protéines qui pourrait être utilisés pour reprogrammer les cellules différenciées en cellules pluripotentes sans manipuler pour autant des séquences proto-oncogènes et sans intervenir sur la séquence nucléotidique du génome de la cellule différenciée. La production de cellules iPS non mutées est critique pour les applications cliniques de la technologie de la reprogrammation cellulaire en médecine régénérative. La découverte de Shinya Yamanaka, qui lui valut le prix Nobel en 2012, est également importante par ses implications conceptuelles car elle démontre qu'une cellule différenciée peut regagner un état indifférencié. La différenciation cellulaire n'est donc pas un processus irréversible, contrairement à la fameuse illustration du paysage épigénétique proposée par Conrad Hal Waddington (Waddington, 1957).

CONCLUSIONS

On peut écrire de façon imagée que le modèle souris tient désormais solidement sur deux jambes : la génétique et la biologie du développement. Au départ, cette espèce animale a été choisie parce qu'elle était relativement proche de l'Homme et qu'elle permettait d'aborder la question de la transmission de caractères. Avec le temps, d'autres aspects se sont révélés importants qui expliquent eux-aussi le succès de cette espèce dans la recherche humaine et vétérinaire. L'existence d'une communauté de chercheurs de taille respectable, qui a produit des protocoles expérimentaux standard dans des articles, livres, et manuels, et qui les a diffusés au travers de séminaires, colloques et congrès, a permis de concentrer des efforts importants sur cet organisme. L'établissement d'un corpus de connaissances, aujourd'hui librement disponibles sur Internet, comprenant des atlas d'anatomie et d'embryologie, et des banques de données génomiques, physiologiques, et comportementales, évite la multiplication d'expériences inutiles. Pour tout cela, il a bien sûr fallu construire des animaleries très sophistiquées, et développer des méthodes de conservation sous forme congelée du sperme et des embryons pour limiter le nombre des génotypes et le coût de l'entretien des élevages sous forme « respirante ».

Lorsqu'on analyse avec un certain recul ces presque 120 ans d'histoire de recherches faites avec la souris comme modèle expérimental il est remarquable de constater que parmi les premières observations certaines aient pu être considérées à l'époque comme secondaires voire marginales (la pigmentation du pelage ou l'étude de tumeurs très rares par exemple), mais qu'elles ont finalement permis une meilleure compréhension de la façon dont les gènes contrôlent les processus biologiques normaux et pathologiques. Cet exemple renforce l'idée selon laquelle une recherche fondamentale motivée en premier lieu par la curiosité scientifique est généralement le meilleur moyen de faire des observations de valeur. Il n'est pas possible de prédire les découvertes des 10 prochaines années, encore moins des 120 années suivantes : qui aurait pu prédire par exemple que l'expression forcée de seulement trois gènes permettrait de transformer des cellules somatiques d'individus adultes en cellules souches pluripotentes ? Il n'est en revanche pas besoin d'être devin pour affirmer que le modèle souris continuera sans doute encore très longtemps d'être d'une grande aide pour résoudre des problèmes importants en biologie et en médecine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Michel Cohen-Tannoudji pour sa relecture critique du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- Brinster RL. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med.* 1974; 140(4):1049-56.
- Castle WE. Is the arrangement of the genes in the chromosome linear? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1919; 5(2):25-32.
- Castle WE. Simplification of mendelian formulae. *Am Nat.* 1913; 47(555):170-82.
- Castle WE & Little CC. The peculiar inheritance of pink eyes among colored mice. *Science.* 1909; 30(766):313-4.
- Chesler EJ. Out of the bottleneck: The Diversity Outcross and Collaborative Cross mouse populations in behavioral genetics research. *Mamm Genome.* 2014; 25(1-2):3-11.
- Churchill GA, Gatti DM, Munger SC, Svenson KL. The Diversity Outbred mouse population. *Mamm Genome.* 2012; 23(9-10):713-8.
- Collaborative Cross C. The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics.* 2012; 190(2):389-401.
- Cuénot L. La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez les souris. *C. r. hebd. séances Acad. sci.* 1902; 134:779-81.
- Dunn LC. Linkage in mice and rats. *Genetics.* 1920; 5(3):325-43.
- Dunn LC, Grüneberg H, Snell GD. Report of the committee on mouse genetics nomenclature. *J Hered.* 1940; 31(12):505-6.
- Evans MJ & Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292(5819):154-6.
- Ezashi T, Yuan Y, Roberts RM. Pluripotent stem cells from domesticated mammals. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016; 4:223-53.
- Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *Med Sci (Paris).* 2014; 12(30):1066-9.
- Gruenberg H. Men and mice at Edinburgh. *J Hered.* 1939; 30(9):371-4.
- Haldane JBS, Sprunt AD, Haldane NM. Reduplication in mice. *J. Genet.* 1915; 5:133-5.
- Ilitis H. Gregor Johann Mendel: Leben, Werk und Wirkung (english translation published as *The life of Mendel.* London: George Allen & Unwin 1932). Berlin: Springer; 1924.
- Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B *et al.* Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature.* 2011; 477(7364):289-94.
- Kleinsmith LJ & Pierce GB, Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 1964; 24:1544-51.
- Little CC. Cancer and heredity. *Science.* 1915a; 42(1076):218-9.
- Little CC. The inheritance of cancer. *Science.* 1915b; 42(1084):494-5.
- Logan RW, Robledo RF, Recla JM, Philip VM, Bubier JA, Jay JJ *et al.* High-precision genetic mapping of behavioral traits in the diversity outbred mouse population. *Genes Brain Behav.* 2013; 12(4):424-37.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78(12):7634-8.
- Martin GR & Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72(4):1441-5.
- Martin GR & Evans MJ. The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell.* 1974; 2(3):163-72.
- Morgan TH. Factors and unit characters in mendelian heredity. *Am Nat.* 1913; 47(553):5-16.
- Morgan TH. Random segregation versus coupling in mendelian inheritance. *Science.* 1911; 34(873):384.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(1):101-6.
- Panthier JJ & Montagutelli X. Le Collaborative Cross, un outil révolutionnaire à l'assaut des caractères complexes. *Med Sci (Paris).* 2012; 28(1):103-8.
- Slye M. Cancer and heredity. *Science.* 1916; 43(1100):135-6.
- Slye M. The incidence and inheritability of spontaneous cancer in mice (Third report.). *J Med Res.* 1915a; 32(1):159-200.
- Slye M. A reply to Dr. Little. *Science.* 1915b; 42(1077):246-8.
- Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet.* 1948; 49(2):87-108.
- Soyfer VN. Tragic history of the VII international congress of genetics. *Genetics.* 2003; 165(1):1-9.
- Stevens LC & Little CC. Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1954; 40(11):1080-7.
- Strong LC. Inbred mice in science. In: *Origins of inbred mice.* Morse HC (ed.) New York: Academic Press; 1978, pp. 45-67.
- Sturtevant AH. The linear arrangement of six sex-linked factors in drosophila, as shown by their mode of association. *J. Exp. Zool.* 1913; 14:43-59.
- Sturtevant AH, Bridges CB, Morgan TH. The spatial relations of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1919; 5(5):168-73.
- Takahashi K & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4):663-76.
- Waddington CH. *The strategy of the genes: A discussion of some aspects of theoretical biology.* London: George Allen & Unwin; 1957.
- Xiao X, Li N, Zhang D, Yang B, Guo H, Li Y. Generation of induced pluripotent stem cells with substitutes for Yamanaka's four transcription factors. *Cell Reprogram.* 2016; 18(5):281-97.