

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2011

Thèse n° 1814

THÈSE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 1^{er} juin 2011

Par Rosina Giordano-Santini

Née le 3 juillet 1983 à Montevideo, Uruguay

Développement d'un nouveau marqueur de transgénèse pour la transformation de nématodes

Membres du jury

M. Christophe Cullin (Professeur Université Bordeaux 2)	Président
Mme Marie-Anne Félix (Directrice de Recherche, CNRS)	Rapporteur
M. Jean-Louis Bessereau (Directeur de Recherche, INSERM)	Rapporteur
Mme Martine Maïbèche (Professeur Université Paris VI)	Examineur
M. John Simmers (Directeur de Recherche, CNRS)	Membre invité
M. Denis Dupuy	Directeur de thèse

*Courage doesn't always roar. Sometimes courage is the quiet voice at the end of the day
saying,
"I will try again tomorrow."
Mary Anne Radmacher*

A mi abuela Tata Dora

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Denis Dupuy, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir confié ce projet. Durant ces deux ans et demi passés dans son laboratoire, il m'a permis de reprendre le goût pour la recherche et de regagner confiance en moi. Je le remercie pour sa confiance et pour m'avoir entraînée à des exercices des plus difficiles comme l'écriture de l'article et de la revue scientifique. Je le remercie aussi pour les opportunités qu'il m'a offertes de participer à des congrès européens et internationaux.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse et en particulier aux deux rapporteurs Marie-Anne Félix et Jean-Louis Bessereau, qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit.

Je remercie aussi les laboratoires de la communauté *C. elegans* qui ont accepté de m'accueillir et ont mis à ma disposition le matériel pour l'injection des vers : Ian Hope et Sophie Bamps à l'Université de Leeds (Angleterre), Jean-Louis Bessereau et Valérie Robert à l'École Normale Supérieure à Paris et Jonathan Ewbank à l'Université de Marseille Luminy. Sans eux, mon projet de thèse n'aurait certainement pas pu avancer aussi vite. Merci à Domena Tu et David Baillie, de la Simon Fraser University (Canada), d'avoir été à l'écoute de nos besoins et d'avoir construit les lignées transgéniques dont nous avons besoin dans l'urgence. Je remercie aussi nos collaborateurs I. Mori et K. Kobayashi de l'Université de Nagoya (Japon). Finalement, je remercie toutes les autres personnes qui m'ont permis d'avancer dans mon projet de thèse, en me donnant des conseils pratiques ou en me dépannant dans l'urgence avec des réactifs ou des protocoles : Hélène Dumay-Odelot, Cécile Monfoulet, Lionel Minvielle Sébastia et Thierry Leste-Lasserre.

Aux membres du laboratoire Régulation du génome et évolution, je leur dit un grand merci pour ce temps passé ensemble, pour les discussions de fin journée sur quel superpouvoir il vaudrait mieux avoir et pour les longues balades touristiques qui nous ont fait mal aux pieds. Merci à Karine pour les petits conseils à la paillasse, les nombreuses relectures de documents et les discussions «entre filles». Merci à Ilyass d'être venu à mon secours à chaque fois que le COPAS faisait des siennes et aussi pour ses super blagues et sa bonne humeur. Et merci à Léo pour créer des logiciels informatiques pour les nuls, surtout quand le fichier qui permet de les lancer s'appelle «CLIQUE ICI». Finalement, je remercie aussi Esther, notre post-doc adoptive, pour sa générosité et sa disponibilité.

Et je n'oublie pas les membres du laboratoire Relations neurones-glie, ni ceux de la Société des Neurosciences. En particulier Jean-Marc Israel, qui a réussi à me faire comprendre (au moins un peu...) l'électrophysiologie, qui m'a montré qu'il est encore possible de faire de la science pour le plaisir et parce qu'on y croit, et qui a su me soutenir dans les moments les plus difficiles. Valérie Fénelon, je la remercie pour son amitié et sa générosité et pour avoir été un des catalyseurs qui m'a permis de tourner la page. Un énorme merci à Dominique Poulain, pour qui j'éprouve beaucoup de respect, de m'avoir appris autant de choses sur les relations humaines et de m'avoir montré qu'il était possible de rebondir. Je le remercie surtout de m'avoir interdit d'abandonner la recherche. Je remercie aussi John Simmers, d'avoir été à l'écoute et de m'avoir aussi aidée à tourner la page.

Je n'oublie surtout pas les amis qui m'ont soutenue de loin et de près. Ce serait impossible de tous les nommer ici. Aux potes de Bordeaux, à ceux de Toulouse, ceux qui sont éparpillés en France et ceux qui sont à l'autre bout du monde. Je remercie du fond du cœur mes parents et mes frères, pour leur soutien inconditionnel depuis l'autre côté de l'océan. Et

merci, merci et encore merci à Fabrice, d'être toujours là pour les hauts et les bas, pour partager son chemin avec moi et pour me montrer qu'à deux on est toujours plus fort.

Résumé

La construction d'animaux transgéniques est une technique clef qui a permis l'étude de nombreux aspects de la biologie du nématode *Caenorhabditis elegans*. Les animaux transgéniques peuvent être construits soit en injectant l'ADN exogène dans les gonades syncytiales de l'hermaphrodite adulte, soit en bombardant une population de vers avec des microbilles enrobées d'ADN. Dans les deux cas, l'utilisation de marqueurs génétiques est indispensable pour l'identification des individus transgéniques et la maintenance des lignées. Nous avons développé un vecteur d'expression pour les nématodes contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo*), qui fonctionne comme marqueur génétique. Le gène *neo* confère la résistance au G-418, un antibiotique qui inhibe la synthèse de protéines chez les eucaryotes et qui est létal pour les nématodes sauvages. Nous avons montré que le marqueur *neo* est un marqueur génétique très puissant qui permet l'identification rapide des animaux transgéniques et qui permet l'enrichissement des populations transgéniques en présence de l'antibiotique, facilitant ainsi la maintenance des lignées. Ce système ne nécessite aucun contexte génétique particulier pour fonctionner et est donc compatible avec des lignées receveuses mutantes, ainsi que des lignées transgéniques ayant été transformées avec d'autres marqueurs génétiques. De plus, le gène *neo* est sous le contrôle du promoteur du gène de *C. elegans* *rps-27*, codant pour une protéine ribosomale dont la séquence est hautement conservée entre les nématodes. Nous avons utilisé ce gène comme marqueur génétique pour la transgénèse de l'espèce *Caenorhabditis briggsae*, ce qui suggère que le système *neo* pourrait aussi être utilisé pour d'autres espèces de la famille *Caenorhabditis*. Finalement, nous avons aussi montré que le système *neo* peut être utilisé dans le contexte des techniques d'ingénierie génétique basées sur le transposon *Mos1*. En conclusion, la sélection en présence de G-418 offre des nouvelles possibilités d'expériences pour la transgénèse de *C. elegans* et d'autres espèces proches. Les avantages du système *neo* devraient ainsi contribuer à développer des techniques de transgénèse du ver plus flexibles et efficaces.

Abstract

The generation of transgenic animals has been instrumental to study many biological aspects of *Caenorhabditis elegans* biology. Transgenic animals can be obtained by either microinjection of the exogenous DNA into the syncitial gonad of the hermaphrodite or by bombardment of a population of worms with DNA coated microparticles. Both techniques rely on the use of genetic markers to facilitate the recovery of transformed animals and the maintenance of transgenic lines. We developed a nematode expression vector carrying the neomycin resistance gene (*neo*) as a selection marker. This gene confers resistance to G-418, an antibiotic that normally inhibits protein synthesis in eukaryotes and is lethal for wild-type nematodes. We showed that the *neo* marker is a potent tool that allows a clear-cut selection of transgenic animals and hands-off maintenance of non-integrated populations on G-418 plates. This system does not imply any prerequisite on the original genotype of the recipient strain and can therefore be used on mutants lines as well as transgenic strains obtained with common markers. Moreover, we placed the *neo* gene under the control of the *C. elegans rps-27* promoter, a highly conserved ribosomal protein throughout the nematode phylogeny. We were able to provide resistance to *Caenorhabditis briggsae* using this vector; this likely indicates that *neo* can be used in any species from the *Caenorhabditis* family. Finally, we demonstrated that this powerful selection system can be used in the context of *Mos1* transposon excision-repair methods. Therefore, the *neo* system offers a wide range of new possibilities for transgenesis both in *C. elegans* and in other related species. We therefore believe that the benefits of the *neo* system should contribute to the development of more flexible and efficient techniques for nematode transgenesis.

Table des matières

Liste des abréviations	14
Préface	15
Introduction	17
Partie I : La transgénèse	18
1. Définitions	18
2. Histoire de la transgénèse : apparition et évolution du génie génétique	19
2.1. De l'étude de l'organisme à l'étude du gène	19
2.2. Du gène <i>in vitro</i> au gène <i>in cellulo</i>	20
2.3. Du gène <i>in cellulo</i> au gène <i>in vivo</i>	21
2.4. Les premiers pas vers la transgénèse	22
2.5. Un gène, son expression, un phénotype	24
3. Les techniques de transgénèse	25
3.1. Méthodes d'introduction physique de l'ADN recombinant dans les cellules et organismes	26
3.2. Vecteurs recombinants	26
3.3. Les marqueurs de transgénèse	30
3.3.a. Marqueurs génétiques conférant un phénotype visible	30
3.3.b. Marqueurs génétiques sélectifs	32
4. Les applications de la transgénèse	34
4.1. Analyses fonctionnelles des gènes	34
4.1.a. Surexpression, perte de fonction, compensation génétique	34
4.1.b. Gènes rapporteurs et étude de la régulation transcriptionnelle	35
4.1.c. Vecteurs pièges et identification de nouveaux gènes	36
4.1.d. La transgénèse dans l'ère génomique	37

4.2. Recherche biomédicale	38
4.2.a. Modèles de maladies humaines	38
4.2.b. Xénogreffes	39
4.3. Biotechnologie animale	40
4.3.a. Agronomie et industrie agroalimentaire	40
4.3.b. Production pharmaceutique	40
Partie II : Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>, présentation de l'organisme modèle	42
1. Généralités sur <i>Caenorhabditis elegans</i>	42
2. <i>C. elegans</i> au laboratoire	45
3. <i>C. elegans</i> comme modèle biologique	45
4. La puissance du modèle <i>C. elegans</i>	46
4.1. Ressources biologiques, informationnelles et bases de données sur <i>C. elegans</i>	48
4.2. Méthodes génétiques	48
4.2.a. Génétique classique	49
4.2.b. Génétique inverse	49
4.2.c. La transgénèse	52
Partie III : La transgénèse de <i>C. elegans</i>	53
1. Les applications de la transgénèse	53
1.1. Validation fonctionnelle d'un gène	53
1.2. Caractérisation du profil d'expression spatiotemporel	54
1.3. Analyse fonctionnelle des séquences régulatrices	55
1.4. Utilisation de la transgénèse pour des études fonctionnelles	56
2. Méthodes de transformation	57
2.1. Transformation par microinjection	57
2.2. Transformation par bombardement	61

2.3. Transformation micromécanique	63
3. Marqueurs de transgénèse	63
3.1. Sauvetage d'un phénotype par compensation génique	64
3.1.a. Suppresseur d'ambre <i>sup-7(st5)</i>	64
3.1.b. <i>dpy-5</i> et <i>dpy-20</i> : sauvetage du phénotype Dumpy	65
3.1.c. <i>lin-15</i> : sauvetage du phénotype Multivulva	66
3.1.d. <i>unc-119</i> : sauvetage du phénotype Uncoordinated et Dauer formation-defective	66
3.1.e. <i>pha-1</i> : sauvetage du phénotype Lethal	67
3.2. Marqueurs conférant des phénotypes dominants	68
3.2.a. L'ADN antisens de <i>unc-22</i> confère un phénotype Twitcher	68
3.2.b. <i>rol-6(su1006)</i> confère un phénotype Roller	69
3.3. Gènes codant pour des protéines fluorescentes	69
4. Génération de lignées transgéniques intégrées	70
4.1. Intégration du transgène par microinjection	71
4.2. Intégration du transgène par bombardement	72
4.3. Intégration du concatémère extrachromosomique dans le génome par mutagenèse	72
5. Insertion d'une copie unique du transgène dans le génome de <i>C. elegans</i>	74
5.1. Les transposons de la famille <i>Tc1/mariner</i> chez <i>C. elegans</i>	74
5.2. Introduction d'altérations ciblées dans le génome de <i>C. elegans</i> suite l'excision du transposon endogène <i>Tc1</i>	76
5.3. Introduction d'altérations ciblées dans le génome de <i>C. elegans</i> suite l'excision du transposon de <i>Drosophila</i> <i>Mos1</i>	78
5.4. Insertion d'une copie unique du transgène dans le génome du ver par <i>Mos1</i> -mediated Single-Copy Insertion (<i>MosSCI</i>)	79

1. La transgénèse de nématodes libres de la famille Rhabditidae	85
1.1. La transgénèse de <i>C. briggsae</i>	85
1.2. La transgénèse d'autres espèces de <i>Caenorhabditis</i>	86
1.3. Transmission transitoire du transgène chez <i>Oscheius tipulae</i>	87
2. La transgénèse de <i>P. pacificus</i>, de la famille Diplogasteridae	87
3. La transgénèse de nématodes parasites	87
3.1. La transgénèse d' <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , parasite d'insectes de la famille Heterorhabditidae	88
3.2. La transgénèse transitoire de <i>Strongyloides stercoralis</i> et la transgénèse héréditaire de <i>Parastrongyloides trichosuri</i> , parasites intestinaux de la famille Strongyloididae	89
4. L'expression transitoire de gènes dans des nématodes parasites	91
4.1. Expression transitoire d'un transgène dans les embryons du parasite intestinal <i>Ascaris suum</i> de la famille Ascarididae	92
4.2. Expression transitoire d'un transgène dans les parasites responsables de la filariose lymphatique <i>B. malayi</i> et <i>Litomosoides sigmodontis</i> de la famille Onchocercidae	91
Partie V : Les gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueurs génétiques	94
1. Antibiotiques à spectre large : marqueurs de sélection de systèmes eucaryotes	94
2. G-418 et le gène de résistance <i>neo</i> : marqueur de sélection d'insectes transgéniques	96
2.1. <i>phsp-70::neo</i> marqueur de sélection pour la transgénèse de <i>D. melanogaster</i>	96
2.2. Utilisation du marqueur <i>neo</i> pour la transgénèse d'autres insectes	98
Objectif des travaux de thèse	100
Matériel et Méthodes	101
1. Nématodes et méthodes associées	102
2. Préparation de boîtes NGM/G-418	104

3. Méthodes de transgénèse	105
4. Insertions par <i>MosSCI</i>	108
5. Biologie Moléculaire	113
5.1. Constructions de plasmides	113
5.2. Divers	116
Résultats	118
Partie I : Le gène <i>neo</i>, marqueur de transgénèse pour la microinjection de <i>C. elegans</i> et <i>C. briggsae</i>	119
1. <i>C. elegans</i> et quatre autres espèces de nématodes sont sensibles à l'antibiotique G-418	119
1.1. Détermination de la concentration critique en G-418 pour <i>C. elegans</i>	119
1.2. Détermination de la concentration critique en G-418 pour d'autres espèces de nématodes	121
2. Le gène de résistance <i>neo</i> confère la résistance à l'antibiotique G-418 à <i>C. elegans</i> et <i>C. briggsae</i>	122
2.1. Le transgène <i>p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54</i> confère la résistance à l'antibiotique G-418 à <i>C. elegans</i>	122
2.2. Le transgène <i>p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54</i> confère la résistance à <i>C. elegans</i> dès la première génération après la microinjection	124
2.3. Le transgène <i>p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54</i> confère la résistance à <i>C. briggsae</i> dès la première génération après la microinjection	125
3. Caractérisation des lignées Neo <i>C. elegans</i> et <i>C. briggsae</i>	126
3.1. Phénotype adverse des lignées Neo: morphologie anormale des gonades	126
3.2. Les lignées Neo extrachromosomiques stables de <i>C. elegans</i> et <i>C. briggsae</i> ont une croissance normale en présence de l'antibiotique G-418	130
3.3. Étude du niveau de résistance des lignées extrachromosomiques Neo de <i>C. elegans</i>	130
3.3.a. Survie et reproduction	131
3.3.b. Développement	131

4. Enrichissement de populations transgéniques Neo de <i>C. elegans</i> et <i>C. briggsae</i> en présence de G-418	133
4.1. Analyse des populations transgéniques au COPAS Biosort	134
4.2. Enrichissement des populations Neo sur milieux sélectif	136
4.3. Enrichissement des populations Neo en fonction de la concentration de G-418	138
4.4. Présence d'individus échappant à la sélection en présence de G-418	140
4.5. Présence d'individus échappant à la sélection en présence de contaminations bactériennes	140
5. Application du système <i>neo</i> comme marqueur de sélection et caractérisation de la sélection	141
5.1. Différents degrés de résistance observés parmi les F ₁	142
5.2. Différents degrés de résistance observés parmi les lignées	143
5.3. Caractérisation du profil d'expression du transgène <i>p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54</i> nécessaire pour conférer la résistance au G-418	144
Partie II : Adaptation du système <i>neo</i> à la transgénèse par bombardement	147
1. Optimisation des conditions de sélection	147
1.1. La concentration critique de G-418 n'est pas adaptée aux conditions de bombardement	147
1.2. Enrichissement d'une population transgénique à partir d'un seul individu parmi des milliers de vers sauvages	148
1.3. Enrichissement sur G-418 après choc thermique	149
2. Transgénèse par bombardement et sélection sur G-418 après choc thermique	150
Partie III : Le système <i>neo</i>, marqueur de co-insertion pour l'intégration par <i>MosSCI</i>	153
1. Insertion suivant le protocole de choc thermique	154
1.1. Adaptation du protocole à la sélection sur la base du phénotype Neo	154
1.2. Caractérisation des insertions putatives	156
1.3. Bilan du protocole d'insertion par choc thermique	160

2. Insertions suivant le protocole direct	162
2.1. Adaptation du protocole à la sélection sur la base du phénotype Neo	162
2.2. Caractérisation des insertions putatives	164
2.3. Bilan du protocole direct	166
3. MosSCI-biotic : une nouvelle approche de l'insertion par MosSCI	167
Discussion	170
1. Le système <i>neo</i> , un nouveau marqueur génétique	171
2. Autres marqueurs génétiques basés sur la résistance aux antibiotiques	172
3. Application à la transgénèse d'autres nématodes	174
4. Application à la transgénèse par bombardement	176
5. Application du système <i>neo</i> aux techniques basées sur l'excision du transposon <i>Mos1</i>	177
6. Application à la culture <i>in vitro</i> de cellules de <i>C. elegans</i>	178
7. Conclusion	181
Bibliographie	183
Annexes	210
Annexe 1 : Liste complète des souches et lignées de nématodes	211
Annexe 2 : Liste des plasmides	214
Annexe 3 : Liste des amorces	216
Annexe 4 : Analyse des populations des lignées DUD0007 à DUD0011 au COPAS Biosort	218
Annexe 5 : Analyse des populations des lignées DUD0001 à DUD0004 au COPAS Biosort	219
Annexe 6 : Analyse des populations des lignées BC8949 à BC8951 au COPAS Biosort	220
Annexe 7 : Analyse des populations des lignées DUD0005 et DUD0006 au COPAS Biosort	221
Annexe 8 : News and Views	222
Annexe 9 : Article	225
Annexe 10 : Communication	229
Annexe 11 : Revue scientifique	231
Annexe 12	243

Liste des abréviations

ARNm : ARN messenger

CFP : *Cyan Fluorescent Protein*

Daf-d : phénotype *Dauer formation defective*

DMGT : *DNA-mediated gene transfer* ou *DNA-mediated genetic transformation*

Dpy : phénotype *Dumpy*

dsRNA : *double stranded DNA* (ARN double brin)

Egl : phénotype *Egg Lying Defective*

EMS : éthylméthanesulfonate

ES : *embryonic stem cell* (cellule souche embryonnaire)

GFP : *Green Fluorescent Protein*

Let : phénotype *Embryonic Lethal*

MosDEL : *Mos1-mediated deletion*

MosSCI : *Mos1-mediated single-copy insertion*

MosTIC : *Mos1 excision-induced transgene-instructed gene conversion*

Muv : phénotype *Multivulva*

neo : gène de résistance à la neomycine

Neo : phénotype de résistance au G-418

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

puro : gène de résistance à la puromycine

qPCR : PCR quantitative

RFP : *Red Fluorescent Protein*

RNAi : ARN interférence

Roll : phénotype *Roller*

siRNA : *small interfering RNA* (petit ARN interférant)

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SOD-1 : superoxide dismutase - 1

TK : thymidine kinase

TMP-UV : triméthylpsoralène combiné aux rayons ultraviolets

tRNA : ARN de transfert

Unc : phénotype *Uncoordinated*

YFP : *Yellow Fluorescent Protein*

Préface

Mes travaux de thèse ont consisté au développement d'une nouvelle technique dans le cadre de la transgénèse de *Caenorhabditis elegans*. La transgénèse du nématode est une technique clef qui a permis de nombreuses avancées dans l'étude des processus biologiques chez le ver. Malgré son grand succès, les méthodes de transgénèse souffrent encore de quelques limites intrinsèques, relatives à la nature même de la genèse des individus transgéniques. La plupart des marqueurs génétiques utilisés pour la transgénèse du ver ne permettent pas de palier à ces inconvénients. Mes travaux de thèse ont donc eu comme objectif de mettre au point un nouveau marqueur génétique qui permette de contourner la plupart de ces limites.

Les techniques utilisées dans les laboratoires de recherche sont issues de l'accumulation et la combinaison de nombreuses techniques développées au cours du temps, dans des laboratoires travaillant dans différents domaines de la science. Elles sont soumises à une amélioration constante, nécessaire à l'adaptation de chaque technique aux besoins d'une expérience ponctuelle où à un autre niveau, aux besoins de toute une communauté de chercheurs. Travaillant sur la transgénèse, j'ai été curieuse de connaître les besoins qui ont mené au développement des techniques qui nous permettent aujourd'hui de manipuler les génomes d'autres espèces à notre guise, et il m'a paru important de valoriser le travail des nombreux chercheurs qui les ont développées.

La première partie de ce manuscrit de thèse présente donc l'histoire de la transgénèse, à travers laquelle je présente les principales techniques qui ont permis l'évolution du génie génétique et qui ont abouti aux techniques actuelles. Puis, je présente le modèle biologique *C. elegans*, modèle extrêmement flexible et puissant, avec lequel j'ai pris énormément de plaisir à travailler. Je présente aussi la transgénèse du ver, en essayant de montrer à quel point cette technique est devenue indispensable à la recherche du nématode. En identifiant ses limites, je montre qu'il est encore possible d'apporter des améliorations à cette technique. Finalement, à travers les Résultats et la Discussion, je présente les différentes étapes du développement du marqueur génétique, de manière plus ou moins chronologique, afin de présenter la méthodologie qui nous a permis d'aboutir à la mise au point du marqueur, ainsi que les difficultés que nous avons rencontrées et comment nous les avons surmontées.

J'espère surtout être capable de transmettre la motivation et le plaisir que j'ai pu éprouver tout au long de mon travail de thèse, à contribuer au développement d'une

nouvelle technique qui est d'ores et déjà utilisée par d'autres laboratoires de la communauté *C. elegans*.

Introduction

Partie I : La transgénèse

1. Définitions

Le génome d'un organisme peut être modifié par mutagenèse ou par transgénèse. Dans le cas de la mutagenèse, des agents mutagènes (souvent des composés chimiques ou des rayonnements γ ou X) sont utilisés pour induire l'apparition de nouveaux allèles issus de la délétion, l'insertion ou la substitution d'une ou plusieurs bases nucléiques dans un gène natif. Ces mutations induites par l'expérimentateur et suivies de la sélection d'organismes, conduisent à l'établissement de lignées de mutants ayant un phénotype recherché. Dans le cas de la transgénèse, il s'agit d'introduire du matériel génétique exogène dans un organisme de manière à ce qu'il soit également transmis à sa descendance. Ce matériel génétique exogène peut être ajouté au génome, remplacer des gènes ou des séquences régulatrices ou introduire des mutations, entre autres.

Lors de la transgénèse, le matériel génétique d'intérêt introduit dans l'organisme (transgène) est le plus souvent un gène capable de s'exprimer dans l'organisme hôte. Le transgène est rarement introduit tout seul dans l'organisme ; en général il est accompagné de séquences nécessaires à son intégration dans le génome (remplacement, délétion ou modification de gènes...). Il est souvent contenu dans un plasmide bactérien permettant son amplification en culture de *Escherichia coli*. La molécule d'ADN contenant le transgène et l'ensemble des séquences est appelée vecteur. On parle aussi d'ADN recombinant car ces vecteurs sont créés *in vitro* et contiennent souvent des séquences provenant d'espèces différentes.

Dans les médias, l'expression organisme génétiquement modifié (OGM) est généralement réservée aux plantes et aux animaux transgéniques utilisés en agriculture. Pourtant, ce terme est très générique et peut-être appliqué aussi bien aux bactéries et levures qu'aux animaux et plantes transgéniques ou mutants obtenus pour la recherche en laboratoire. Le mot transgénèse ne s'applique qu'aux organismes pluricellulaires (plantes et animaux). Des levures, bactéries ou cellules en culture ayant reçu du matériel génétique exogène sont dites recombinantes. Dans cette partie, je parlerai exclusivement

de la production d'organismes transgéniques, en développant l'histoire de la transgénèse, ses méthodes et ses applications.

2. Histoire de la transgénèse : apparition et évolution du génie génétique

2.1. De l'étude de l'organisme à l'étude du gène

Au cours du XIX^e siècle, la vision de l'homme sur les organismes vivants a radicalement changée avec la découverte des lois de l'hérédité par Gregor Mendel, la théorie de l'évolution proposée par Charles Darwin et la découverte de l'existence universelle de cellules chez tous les êtres vivants par M. Schleiden et T. Schwann. Ces avancées commençaient à expliquer les ressemblances entre les êtres vivants, leur évolution et leur diversité. Mais il a fallu attendre la découverte des principales molécules qui constituent les organismes vivants (protéines, acides nucléiques, lipides, sucres...) et leurs interactions, pour commencer à comprendre les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'existence de la vie.

En 1941, G. W. Beadle et E.L. Tatum, tout en ignorant la nature chimique des éléments qu'ils étudiaient, mirent en évidence deux types d'éléments qui gouvernent la vie : les enzymes qui contrôlent le métabolisme et les gènes qui gouvernent leur synthèse (Beadle et Tatum 1941). Ils créèrent des mutants du champignon *Neurospora* par irradiation, dont trois étaient incapables de se développer sur milieu minimum. Après avoir montré que cette caractéristique était héréditaire, ils en conclurent que l'absence d'éléments de synthèse de métabolites était la conséquence directe de la mutation d'un ou plusieurs gènes. Ils montrèrent ainsi que des variations dans l'information génétique se traduisent en modifications phénotypiques héréditaires.

Quelques années plus tard, la nature chimique des gènes était déterminée : les gènes sont constitués d'acide desoxyribonucléique (ADN) (Avery et al. 1944). Puis, les travaux de J. D. Watson et F. H. C. Crick montrèrent la structure en double hélice de la molécule d'ADN (Watson et Crick 1953). Il a fallu très peu de temps pour que d'autres molécules et leurs interactions soient identifiées, avec la découverte de l'ARN messager (ARNm) (Pardee et al. 1958; Brenner et al. 1961) et du code génétique (Martin et al. 1962; Nirenberg et al. 1963) entre autres. Désormais, le gène, initialement connu comme l'unité

de l'hérédité, était devenu une affaire de molécules : le gène est une séquence d'ADN qui spécifie la synthèse d'une protéine ou d'un ARN fonctionnel. Ces découvertes ont été à l'origine d'une compréhension sans précédent du fonctionnement des organismes vivants et ont placé les gènes à l'origine des propriétés inhérentes d'une espèce.

2.2. Du gène *in vitro* au gène *in cellulo*

Le développement de techniques pour l'étude de l'expression des gènes dans des conditions physiologiques n'aurait jamais été possible sans le développement d'outils de manipulation des séquences d'ADN *in vitro*. Les premiers pas du génie génétique furent des travaux de construction de molécules d'ADN recombinantes, composées de molécules d'ADN provenant d'organismes différents (Jackson et al. 1972). Grâce à l'utilisation d'enzymes de restriction et de ligases, l'équipe de P. Berg réussit à lier l'ADN du virus simien SV40 avec celui du phage λ . Ces outils furent repris par H. Boyer et S. N. Cohen, qui en 1973 publièrent leurs travaux sur la construction de plasmides bactériens (Cohen et al. 1973). Ces plasmides contenaient des séquences issues de bactéries résistantes à des antibiotiques et qui, ré-introduites dans d'autres plasmides, pouvaient conférer la résistance à des bactéries sauvages. Ainsi, ils montrèrent que des séquences d'ADN assemblées *in vitro* gardent leurs propriétés biologiques.

L'utilisation d'ADN recombinant pour la transformation de bactéries rendit possible l'utilisation de celles-ci pour l'étude de l'expression de gènes eucaryotes. En effet, des gènes eucaryotes préalablement manipulés *in vitro* pouvaient être répliqués et transcrits dans un organisme procaryote comme le montraient les travaux de J. F. Morrow et collègues (Morrow et al. 1974) : des fragments d'ADN de *Xenopus laevis* insérés dans un plasmide bactérien se répliquent de manière stable et s'expriment dans *E. coli*. Cet outil devait permettre d'étudier l'expression des gènes et ses séquences régulatrices dans des organismes simples et facilement manipulables.

Un autre modèle pour l'étude de l'expression des gènes ayant bénéficié des techniques de constructions d'ADN recombinant fut la culture de cellules eucaryotes. Il était devenu possible d'introduire de l'ADN exogène dans des cellules en culture grâce à différentes techniques. La première technique à être développée fut appelée "transfert de gènes par l'ADN" (*DNA-mediated gene transfer* ou *DNA-mediated genetic transformation*, DMGT). Le DMGT était défini comme la propriété des cellules mammifères à incorporer du matériel génétique exogène présent dans le milieu de culture et à exprimer ces gènes

(Szybalska et Szybalski 1962). D'autres systèmes de transfert de gènes ont été développés tels que l'introduction par microinjection dans le noyau cellulaire (Mueller et al. 1978), par fusion entre des liposomes chargés en transgène et la cellule cible (Ostro et al. 1978), par fusion entre une cellule donneuse et la cellule cible (Rechsteiner 1978) et finalement par infection avec des particules virales recombinantes (Mulligan et al. 1979) (Tableau 1).

Ces expériences de transfert de gènes nécessitent que l'expérimentateur ait un moyen de distinguer les cellules transgéniques des cellules natives, c'est à dire qu'il dispose d'un marqueur conférant une caractéristique particulière aux cellules transformées. Le premier système à être développé fut un système basé sur le sauvetage d'un phénotype létal. Le système des cellules D98S IMPase-négatives est basé sur l'utilisation d'une lignée cellulaire de moelle osseuse humaine, déficiente pour l'enzyme pyrophosphorylase d'acide inosinique qui métabolise l'hypoxanthine dans la voie de synthèse des purines (Szybalska et Szybalski 1962). En présence d'hypoxanthine mais en absence de toute autre source de purines, ces cellules ne peuvent pas se multiplier. Cependant, l'incubation de ces cellules avec de l'ADN extrait de cellules IMPase-positives pouvant pousser dans de telles conditions, aboutit à l'apparition de nouvelles cellules IMPase-positives. Ainsi, dans du milieu sélectif, seules les cellules transformées peuvent pousser. Ce système donna lieu à un des premiers marqueurs de transformation basés sur le sauvetage d'un phénotype par compensation génique.

Les systèmes du type IMPase-négatif, associés à la possibilité de transformer plus d'un gène à la fois, ont jeté les bases pour l'utilisation de compensation génétique comme marqueur pour le transfert d'autres gènes d'intérêt (Pellicer et al. 1980). Ce type de protocole, combiné à la manipulation de l'ADN *in vitro* pour modifier des séquences régulatrices et codantes, ouvrait des nouvelles perspectives pour l'étude des mécanismes d'expression des gènes *in cellulo*.

2.3. Du gène *in cellulo* au gène *in vivo*

Le modèle d'expression des gènes eucaryotes dans des cellules mammifères n'était pas complètement satisfaisant. Les nombreuses études de l'expression du gène codant pour la β -globuline de lapin, réalisées vers la fin des années 70, illustrent une des principales limites de l'étude des gènes *in cellulo* (Mantei et al. 1979; Mulligan et al. 1979; Wigler et al. 1979; Wold et al. 1979). Dans ces travaux, le gène de la β -globuline de lapin

était transféré dans des fibroblastes de souris (Mantei et al. 1979; Wigler et al. 1979; Wold et al. 1979) et dans des cellules de rein de singe (Mulligan et al. 1979). Les différents groupes montrèrent que l'ARNm du gène était présent dans le cytoplasme des différentes lignées cellulaires et donc que le gène pouvait être transcrit. Mais il était bien connu à l'époque que la β -globuline n'était exprimée *in vivo* que par les érythrocytes (Hunt 1976), ce qui suggérait que des cellules non-érythrocytes d'espèces hétérologues expriment des gènes qui devrait normalement être inhibés dans le type cellulaire concerné. L'expression du gène dans des cellules en culture ne reflétait donc pas l'expression physiologique. L'étude des éléments régulateurs responsables de l'expression différenciée de la β -globuline de lapin n'était donc pas possible dans les modèles *in cellulo* disponibles.

Une solution possible pour palier à cette limite était l'utilisation de lignées cellulaires plus adaptées, comme par exemple l'utilisation d'érythrocytes pour l'étude de la β -globuline de lapin. Mais la construction de lignées cellulaires recombinantes était dépendante de l'existence de systèmes de sauvetage de phénotype par compensation génétique (utilisés comme marqueurs de co-transformation), pas toujours disponibles.

Alors que les nombreuses études sur l'expression de gènes suggéraient l'existence d'éléments régulateurs en *cis* et/ou en *trans* responsables de l'expression différentielle des gènes non seulement entre les tissus, mais aussi au cours du développement, les cellules en culture ne permettaient pas de répondre à ces questions. Il devenait primordial de concentrer les efforts sur le développement de techniques pour l'étude de l'expression des gènes *in vivo*.

2.4. Les premiers pas vers la transgénèse

Construire un organisme porteur d'un transgène dont l'expression puisse être étudiée dans tous les tissus et à toutes les étapes du développement n'était pas un projet facile. Il a fallu une dizaine d'années de travail et l'effort de nombreux groupes pour aboutir dans les années 80 aux premiers animaux transgéniques qui remplissent ces critères.

Les souris transgéniques produites par R. Jaenisch et B. Mintz en 1974 furent le premier exemple de transgénèse (Jaenisch et Mintz 1974). L'objectif de leurs travaux était d'étudier les mécanismes de transmission verticale des tumeurs virales et leur activation durant la vie adulte. La stratégie consistait à infecter un animal tôt dans le développement pour mimer la transmission du virus par les parents. Ainsi, l'ADN du virus SV40 était injecté dans des blastocystes de souris, puis, ces blastocystes étaient re-implantés dans

l'utérus de femelles porteuses. Les souriceaux issus de cette manipulation étaient suivis pour détecter l'apparition d'une tumeur, puis sacrifiés au bout d'un an pour rechercher la présence de l'ADN viral dans leurs tissus. Grâce à des expériences d'hybridation *in vitro* avec une sonde d'ADN viral radioactive, les auteurs montrèrent que ces animaux portaient l'ADN exogène uniquement dans certaines organes. Ces animaux étaient donc des mosaïques. Bien que cette étude ait montré que l'ADN exogène peut se répliquer dans les tissus d'un organisme, elle n'a pas permis de déterminer si l'ADN exogène pouvait être transmis à la descendance et s'il pouvait s'exprimer correctement dans l'organisme hôte.

Quelques années plus tard, les travaux de J. W. Gordon et collaborateurs, montraient qu'il est aussi possible d'introduire de l'ADN exogène dans des souris par microinjection de l'ADN dans le pronucléus mâle de l'ovocyte fécondé (Gordon et al. 1980). Cette technique était développée dans l'objectif de diminuer les probabilités de formation d'animaux mosaïques. En effet, les auteurs affirmaient que l'introduction de l'ADN au stade d'une seule cellule assurerait l'intégration du transgène très tôt dans le développement embryonnaire, contrairement à l'injection dans le blastocyste. La technique de microinjection était validée : deux souriceaux sur 78 oeufs injectés portaient le transgène. Mais malgré ces efforts, l'analyse par hybridation de l'ADN extrait des nouveaux-nés entiers n'avait pas permis de déterminer avec certitude l'absence d'animaux mosaïques. Dans le cadre de ces travaux, l'ADN injecté était constitué de fragments de génome viral insérés dans un plasmide bactérien. Il a tout de même été conclu qu'il était possible d'introduire des molécules recombinantes dans des organismes supérieurs.

Cette technique fut reprise pour transformer des souris avec une molécule d'ADN recombinante composée d'ADN du phage λ et du gène codant pour la β -globuline de lapin (Costantini et Lacy 1981). Dans cette étude, les auteurs montrèrent que non seulement le transgène était présent dans le foie des animaux adultes, mais qu'il était aussi présent dans leurs cellules germinales. En effet, après croisement de quatre mâles transgéniques avec des femelles sauvages, une partie des souriceaux de chaque portée portait aussi le transgène. Ces résultats montraient l'héritabilité de la transformation et permettaient d'envisager la possibilité de créer des lignées transgéniques.

Il restait cependant une dernière étape à franchir avant que la transgénèse devienne l'outil de référence pour l'étude de l'expression des gènes *in vivo* : démontrer l'expression du transgène dans l'organisme hôte. Très rapidement, différents groupes ont traité cette question. Le groupe de B. Mintz montra que des souris transformées avec le

gène viral du HSV-1 codant pour la thymidine kinase (TK) exprimaient l'enzyme virale très tôt dans le développement du fœtus (Wagner et al. 1981). En parallèle, le groupe de J. B. Gault montra par des études de sérologie que la β -globuline de lapin s'exprimaient chez les souris transformées par ce gène et chez la descendance de certaines d'entre elles (Wagner et al. 1981).

Toutes les conditions étaient réunies pour que la transgénèse devienne l'outil indispensable qui allait transformer les approches expérimentales des biologistes. En 1982, pour la première fois, un animal transgénique porteur d'un gène recombinant présentait un phénotype inductible héréditaire (Palmiter et al. 1982). Des souris transgéniques avaient été obtenues après injection dans des zygotes d'un plasmide recombinant contenant le gène viral de la TK sous le contrôle des séquences promotrices du gène murin de la métallothionéine. Il était connu que ce dernier est régulé *in vivo* par des métaux lourds et des hormones glucocorticoïdes. Sur dix animaux analysés porteurs du transgène, sept exprimaient l'enzyme virale au même niveau que l'expression basale du gène de la métallothionéine (niveau dit endogène). Parmi ces derniers, quatre avaient le phénotype attendu : le traitement avec du sulfate de cadmium induisait l'expression de la TK virale à un niveau 10 à 50 fois plus élevé que le niveau d'enzyme endogène. Pourtant, ils ne répondaient pas de la même manière après un traitement aux glucocorticoïdes, ce qui laissait penser que des séquences de régulations essentielles à la régulation par ces hormones avaient été perdues lors des manipulations génétiques. Le transgène était héréditaire et des lignées transgéniques ont pu être établies. Les auteurs montraient ainsi que l'effet des séquences régulatrices sur un gène pouvait être étudiés *in vivo* grâce à la construction de molécules recombinantes reliant les séquences régulatrices d'intérêt à un gène rapporteur. Inversement, l'expression d'un gène d'intérêt pouvait être contrôlée au cours du développement en combinant le gène à des séquences régulatrices connues.

2.5. Un gène, son expression, un phénotype

À la fin de l'année 1982, les expériences de transgénèse qui allaient marquer un tournant dans l'histoire du génie génétique étaient publiées (Palmiter et al. 1982). Dans le cadre de ces travaux, des ovocytes fécondés de souris étaient injectés avec un plasmide contenant la séquence codante pour l'hormone de croissance du rat sous le contrôle des séquences promotrices du gène murin de la métallothionéine. À partir du jour 33 après la

naissance, les souriceaux transgéniques ainsi obtenus étaient mis sous un régime sec accompagné d'eau enrichie en sulfate de zinc afin d'induire l'expression du transgène. Les résultats montraient que non seulement les animaux transgéniques avaient des niveaux d'ARNm de l'hormone de croissance élevés au niveau du foie mais que la quantité de cette hormone dans le sang pouvait aller jusqu'à 100 à 800 fois celle des animaux non transgéniques soumis au même régime. Ce niveau d'expression surélevé de l'hormone s'accompagnait d'une croissance accélérée et anormale des animaux. Les souris transgéniques pouvaient aller jusqu'à peser 1,8 fois plus que les souris contrôles. Un gène artificiellement surexprimé pouvait donc causer un phénotype. Il s'agissait là de la première preuve concrète de la puissance potentielle de la transgénèse.

Ainsi, bien que les mécanismes d'intégration du transgène étaient très mal connus à l'époque, la technique devint très vite un outil à la mode. Les possibilités d'expériences dépassaient les limites de l'imagination, tant dans les laboratoires de recherche que dans l'industrie. Rapidement, des laboratoires commencèrent à développer des techniques de transgénèse adaptées pour leur modèle biologique d'intérêt et en quelques années seulement, les organismes modèles les plus utilisés avaient leurs techniques de transgénèse attitrées (Figure 1). L'organisme entier était devenu le système expérimental de choix pour étudier l'expression et la fonction des gènes, en particulier dans le cadre des processus complexes comme le développement.

3. Les techniques de transgénèse

Lors de la production d'organismes transgéniques, l'objectif est d'introduire le transgène très tôt dans le développement et de manière stable, pour que celui-ci soit présent dans un maximum de cellules de l'organisme hôte tout au long de son développement. Chez les plantes, le transfert de gènes se fait généralement dans des tissus ou dans des cellules en culture qui sont ensuite traités aux hormones pour régénérer une plante entière fertile (Walden R. et R. 1995; Birch 1997). Chez les animaux, ce processus n'est pas possible, puisque les cellules différenciées sont incapables d'accomplir naturellement un nouveau programme de développement. Il est donc préférable d'introduire le transgène dans la lignée germinale et pour cela il doit être introduit dans les cellules totipotentes, avant le stade de développement auquel la lignée

germinale s'individualise. Ainsi, les techniques de transgénèse des animaux ont été développées pour introduire le transgène dans les gamètes en cours de maturation, dans l'oeuf fécondé ou dans l'embryon précoce (Gordon et al. 1980; Rubin et Spradling 1982; Hammer et al. 1985; Stinchcomb et al. 1985).

Les premières techniques de transgénèse ont été développées chez la souris et des progrès rapides ont été réalisés chez un certain nombre d'organismes modèles comme la mouche du vinaigre, la grenouille ou le nématode. Cependant, des essais de transgénèse chez des eucaryotes supérieurs, notamment chez le bétail et les primates non-humanoïdes, ont montré que le transfert de gènes n'était pas toujours aussi efficace. Les techniques de transgénèse aboutissant à des protocoles de routine chez certaines espèces ne sont pas toujours transférables à d'autres. Ainsi, au cours de ces 30 dernières années, différentes techniques de transgénèse se sont développées quasiment au cas par cas, permettant l'obtention d'organismes transgéniques pour des espèces très variées de plantes et d'animaux (Gama Sosa et al. 2010) (Figure 1).

Les techniques de transgénèse varient souvent en raisons du temps de génération de chaque espèce et de la capacité naturelle des différents génomes d'intégrer l'ADN étranger. Cependant, même si les protocoles de transgénèse varient d'une espèce à une autre, ils incluent tous : (i) une méthode pour l'introduction physique de l'ADN exogène dans la cellule, (ii) l'utilisation d'un vecteur porteur du transgène et (iii) l'utilisation de marqueurs génétiques, aussi appelés marqueurs de transgénèse, essentiels pour l'identification des animaux transgéniques parmi les animaux sauvages.

3.1. Méthodes d'introduction physique de l'ADN recombinant dans les cellules et organismes

Les différentes techniques d'introduction de matériel génétique dans les organismes sont présentées dans le tableau 1.

3.2. Vecteurs recombinants

Les principaux types de vecteurs recombinants utilisés pour la transgénèse des modèles biologiques sont présentés dans le tableau 2.



















1980	<i>Mus Musculus</i> (Gordon et al. 1980)	
1981	<i>Xenopus laevis</i> (Rusconi et Schaffner 1981)	
1982	<i>Drosophila melanogaster</i> (Rubin et Spradling 1982)	
1983	<i>Nicotiana tabacum</i> (Herrera-Estrella et al. 1983) <i>Petunia hybrida</i> (Fraley et al. 1983) <i>Helianthus annuus</i> (Murai et al. 1983)	
1984	<i>Gallus gallus</i> (Souza et al. 1984)	
1985	<i>Paracentrotus lividus</i> (Flytzanis et al. 1985) <i>Carassius auratus</i> (Zhu et al. 1985) <i>Caenorhabditis elegans</i> (Stinchcomb et al. 1985) <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Hammer et al. 1985) <i>Sus domestica</i> (Hammer et al. 1985)	
1986	<i>Oryzias latipes</i> (Ozato et al. 1986)	
1987	<i>Anopheles gambiae</i> (Miller et al. 1987)	
1988	<i>Danio rerio</i> (Stuart et al. 1988)	
1989	<i>Bos taurus</i> (Roschlau et al. 1989) <i>Ovis aries</i> (Rexroad et al. 1989)	
1990	<i>Rattus rattus</i> (Hammer et al. 1990)	
1991	<i>Capra hircus</i> (Ebert et al. 1991)	
2000	<i>Bombyx mori</i> (Tamura et al. 2000)	
2001	<i>Macaca mulatta</i> (Chan et al. 2001)	
2005	<i>Coturnix japonica</i> (Scott et Lois 2005)	
2006	<i>Hydra vulgaris</i> (Wittlieb et al. 2006)	
2008	<i>Felis catus</i> (Yin et al. 2008)	
2009	<i>Canis familiaris</i> (Hong et al. 2009) <i>Callithrix jacchus</i> (Sasaki et al. 2009)	

Figure 1 : Exemples d'organismes transgéniques. (Liste non exhaustive). Les espèces sont classées par ordre chronologique selon l'année d'apparition des premiers individus transgéniques. Pour la plupart des espèces, d'autres techniques de transgénèse parfois plus performantes sont apparues plus tard ; celles-ci ne sont pas représentées sur la frise.

Tableau 1 : Principales méthodes d'introduction physique de l'ADN recombinant dans les cellules et les organismes.
D'après (Tatar 2000; Houdebine 2007; Gama Sosa et al. 2010)

Méthode	Descriptif	Application
Microinjection	Introduction directe de l'ADN grâce à l'utilisation d'une fine aiguille dans un pronucléus de l'oeuf fécondé, dans le cytoplasme périnucléaire de l'oeuf ou dans les gonades.	Mammifères, oiseaux, poissons, insectes, nématodes, cellules mammifères.
Bombardement	Bombardement de tissus, cellules, embryons ou organismes entiers avec des microparticules enrobées d'ADN.	Plantes, nématodes, mollusques, cellules mammifères.
Électroporation	Application d'un champ électrique alternatif à des cellules en suspension, créant des pores dans la membrane par lesquels pénètre l'ADN.	Plantes, poissons, rongeurs.
Méthodes biochimiques	Incubation avec un agent chimique ou biochimique (phosphate de calcium, anticorps, hormones...) permettant l'entrée de l'ADN dans la cellule	Plantes, cellules mammifères.
Lipofection	Encapsulation de l'ADN dans des micelles de lipides qui fusionnent avec la cellule cible.	Plantes, rongeurs.
Perforation	La perforation des cellules à l'aide de poils en carbure de silice crée des pores permettant le passage de l'ADN.	Plantes.
Transfert de noyau	Transfert du noyau d'une cellule somatique contenant le transgène à un oeuf énucléé.	Mammifères, xénope.
Transfert de cellules pluripotentes dans l'oeuf	Injection d'une cellule souche contenant le transgène dans un blastocyste.	Souris, oiseaux.
Rétrovirus recombinant	Incubation d'embryons ou de cellules avec des virus recombinants portant le transgène.	Oiseaux, cellules mammifères.
Transfert de gènes par le spermatozoïde	Adhésion spontanée ou grâce à des anticorps de l'ADN à la surface des spermatozoïdes; ces derniers sont utilisés pour la fécondation <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> ou par injection directe dans le cytoplasme de l'ovocyte. Aussi, introduction de l'ADN dans les spermatozoïdes par affaiblissement de la membrane cellulaire avec des détergents, électroporation ou lipofection.	Xénope, rongeurs, cochons.

Tableau 2 : Exemples de vecteurs recombinants utilisés pour des techniques de transgénèse.
D'après (Tatar 2000; Houdebine 2007; Gama Sosa et al. 2010)

Vecteur	Description	Propriétés	Exemples
Vecteurs minimaux	Le transgène est contenu dans un vecteur de clonage qui permet son amplification dans des bactéries.	Intégration ou pas du transgène dans le génome suivant l'espèce. Taille du transgène limité à la capacité du plasmide.	
Vecteurs pour recombinaison homologue	Le transgène est placé entre des régions homologues à celles encadrant la position ciblée dans le génome. Ces régions permettent au transgène de s'insérer dans le génome par recombinaison homologue avec l'ADN.	La recombinaison homologue est un événement rare chez la plupart des espèces. Taille du transgène limitée à la capacité du plasmide.	Largement utilisés pour la transformation des cellules souches de souris grâce à des systèmes de sélection des cellules recombinantes efficaces.
Chromosomes artificiels	Le transgène est placé dans une construction contenant une origine de réplication, un centromère et des télomères, ayant le rôle de chromosome dans l'organisme choisi pour son amplification.	Taille du transgène importante (jusqu'à plus de 1 mégabase). Ne se répliquent pas de manière autonome dans des cellules mammifères.	BAC (Bacterial Artificial Chromosome) PAC (P1 artificial chromosome) YAC (Yeast Artificial Chromosome)
ADN de virus inactif	Le transgène est placé entre des séquences longues terminales répétées d'un virus, nécessaires à l'intégration du génome viral dans le génome hôte. Le génome viral porteur du transgène est introduit dans une cellule transcomplémentante qui synthétise les protéines virales. Les particules virales recombinantes ainsi obtenues sont utilisées pour infecter les cellules cibles.	Taille du transgène pouvant aller jusqu'à 6 à 7 kilo de paires de bases. Intégration du transgène en simple copie dans le génome.	Utilisation de rétrovirus pour l'obtention d'eucaryotes supérieurs transgéniques.
Transposons	Le transgène est placé entre les séquences répétées inverses du transposon et remplace donc la transposase. Le transgène est introduit avec un autre vecteur portant le gène de la transposase ou avec l'enzyme. Par l'action de la celle-ci, le transgène s'intègre en une seule copie dans le génome comme s'il s'agissait du transposon.	Haute efficacité d'intégration en simple copie. Taille limite des transposons : 40 kilo de paires de bases.	Élément-P (utilisé chez la drosophile) Sleepy Beauty (utilisé chez les mammifères, le médaka) Piggy Bac (utilisé chez le ver à soie)
Plasmides inducteurs de tumeurs (Ti)	Le transgène remplace les oncogènes dans la partie transférée du génome de la bactérie d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> à la plante hôte (ADN-T). Des plantes sont infectées avec la bactérie recombinante.	Haute efficacité d'intégration en simple copie.	Utilisé pour la transgénèse des plantes.

3.3. Les marqueurs de transgénèse

Certaines méthodes de transgénèse se basent sur l'identification des animaux transgéniques par des techniques invasives, comme le génotypage par PCR. Par exemple, pour la transformation du rat, de la souris ou encore du lapin, une des techniques utilisées est l'injection de l'ADN recombinant dans le zygote (Gordon et al. 1980; Hammer et al. 1985; Hammer et al. 1990). Les zygotes injectés sont introduits dans des femelles porteuses sans savoir au préalable lesquels intégreront l'ADN recombinant. Il est ensuite nécessaire d'analyser l'ADN de chaque individu de la portée pour identifier les animaux transgéniques. De la même manière, lors de la maintenance de la lignée transgénique, les individus doivent être systématiquement analysés pour connaître leur génotype.

Ce type de démarche n'est pas praticable chez les espèces de petite taille avec un temps de génération rapide et une progéniture importante, tels les nématodes ou les insectes, pour lesquelles il est indispensable de différencier rapidement et de manière non invasive les individus transgéniques des individus sauvages.

Les marqueurs génétiques sont en général des gènes qui confèrent un changement facilement repérable dans le phénotype de l'organisme hôte. Le marqueur utilisé dépend bien entendu de l'espèce et de la technique de transgénèse choisie. Quelques exemples de marqueurs génétiques sont présentés dans les paragraphes suivants.

3.3.a. Marqueurs génétiques conférant un phénotype visible

3.3.a.(i) Pelage agouti pour la transgénèse de la souris

Une des techniques de transgénèse de la souris consiste à introduire une cellule souche (ou cellule ES pour *embryonic stem cell*) recombinante dans un blastocyste qui est ensuite implanté dans une mère porteuse (Bradley et al. 1984). Les cellules ES sont pluripotentes et ont donc la capacité de pouvoir participer à tous les tissus lors du développement de l'embryon, y compris les gonades. Les souris obtenues par cette méthode sont appelées chimères, car certains organes développés à partir de la cellule ES portent le transgène, alors que d'autres, développés à partir des cellules originellement présentes dans le blastocyste, ont un génome sauvage.

Lors de l'établissement de souris transgéniques par cette méthode, la participation de la cellule ES recombinante au développement de la lignée germinale peut être confirmée à l'aide d'un marqueur génétique visible (Stewart et Mintz 1981). La plupart des

cellules ES utilisées pour la transgénèse dérivent d'une souche de souris de couleur dominante agouti (marron/beige). Lorsque ces cellules sont injectées dans des blastocystes issus d'une souche de couleur de pelage noir récessive, la colonisation de l'embryon par la cellule ES aboutit à des souris chimères avec un pelage bicolore composé de cellules noires et agouties. Lorsque les cellules ES ont été incluses dans la lignée germinale, en accouplant des mâles chimériques avec des femelles noires par exemple, les descendants transgéniques hétérozygotes seront de couleur agouti, prouvant qu'il y a eu transmission du transgène dans la lignée germinale. Ainsi, grâce à la couleur du pelage agouti, il est possible d'identifier les animaux transgéniques.

3.3.a.(ii) Couleur des yeux pour la transgénèse des insectes

Lors de la transgénèse de la drosophile, l'ADN recombinant est injecté dans la partie postérieure de l'embryon, là où se trouvent les cellules précurseurs de la lignée germinale (Spradling et Rubin 1982). Les premières divisions cellulaires de l'embryon de la drosophile sont nucléaires et les noyaux baignent dans un cytoplasme commun (syncytium). Ainsi, l'injection dans le syncytium à la partie postérieure de l'embryon assure l'accès de l'ADN recombinant aux noyaux précurseurs de la lignée germinale. Celui-ci s'intègre dans une partie des cellules germinales et en conséquence, seulement une partie de la progéniture des individus injectés portent le transgène. Les individus injectés doivent donc être croisés avant d'isoler les individus transgéniques parmi leur progéniture.

Un type de marqueur utilisé pour l'identification des drosophiles transgéniques est le sauvetage de mutations qui modifient la couleur des yeux. Les yeux de *D. melanogaster* sont de couleur rouge brique. Les mutants du gène *rosy* (*ry*) homozygotes ont des yeux de couleur cramoisie (rouge foncé) à marron, phénotype qui peut être sauvé par le gène sauvage *ry* qui rétablit la couleur sauvage des yeux. Ainsi, lorsque la lignée hôte *ry* homozygote est transformée avec le gène sauvage *ry*, les insectes transgéniques sont facilement identifiables grâce à la couleur rouge brique de leurs yeux (Rubin et Spradling 1983). Dans le cas de ce marqueur, l'expression de *ry* n'étant pas autonome cellulaire (quelque soit le tissu où le gène est exprimé, le pigment caractéristique du phénotype sauvage sera présent dans l'oeil), il est donc possible d'identifier les insectes transgéniques dès que les embryons injectés G_0 mosaïques atteignent le stade adulte.

De la même manière, le gène *white* (*w*) est aussi utilisé comme marqueur génétique (Klemenz et al. 1987). Les individus homozygotes mutants nuls du gène *w* ont des yeux blancs et la transformation avec le gène *w* sauvage rétablit la couleur rouge

brique des yeux. Cependant, ce gène est autonome cellulaire : l'expression du marqueur dans des cellules hors de l'oeil ne rétablit pas la couleur sauvage des yeux. Ainsi, la sélection des individus transgéniques grâce à ce marqueur ne se fait qu'à partir de la première génération après l'injection (G_1).

Des marqueurs génétiques basés sur la couleur des yeux ont été développés pour d'autres insectes tel la mouche méditerranéenne *Ceratitis capitata* (Handler et al. 1998), la mouche du vinaigre orientale *Bactrocera dorsalis* (Handler et McCombs 2000) et le moustique vecteur de la fièvre jaune *Aedes aegypti* (Jasinskiene et al. 1998).

3.3.a.(iii) Les protéines fluorescentes

De nos jours, les gènes codants pour des protéines fluorescentes comme la *Green Fluorescent Protein* (GFP) sont couramment utilisés comme marqueurs génétiques. Les protéines fluorescentes émettent des photons lorsqu'elles sont excitées par une certaine longueur d'onde et ne nécessitent ni substrat ni co-facteur. Ainsi, elles sont particulièrement adaptées à la visualisation de l'expression des gènes *in vivo* (voir 4.1.b Gènes rapporteurs et étude de la régulation transcriptionnelle). Lorsque ces gènes sont exprimés sous le contrôle de promoteurs forts, ils donnent un phénotype facilement repérable (Figure 2).

Les protéines fluorescentes sont utilisées comme marqueurs génétiques chez des espèces aussi variées que le nématode *C. elegans* (Chalfie et al. 1994), la drosophile *D. melanogaster* (Berghammer et al. 1999), le scarabé *Tribolium castaneum* (Berghammer et al. 1999), l'anémone *Hydra vulgaris* (Wittlieb et al. 2006), le moustique *A. aegypti* (Kokoza et al. 2001), l'oursin *Strongylocentrotus pupuratus* (Arnone et al. 1997), la salamandre *Ambystoma mexicanum* (Sobkow et al. 2006) et le planaire *Girardia tigrina* (González-Estévez et al. 2003).

3.3.b. Marqueurs génétiques sélectifs

Les marqueurs génétiques visuels ne confèrent en général aucun avantage sélectif aux individus transgéniques vis à vis des individus sauvages. Pour des espèces de petite taille avec un temps de génération court et une progéniture importante, il est cependant avantageux de disposer d'un système de sélection qui permette d'éliminer les individus sauvages.

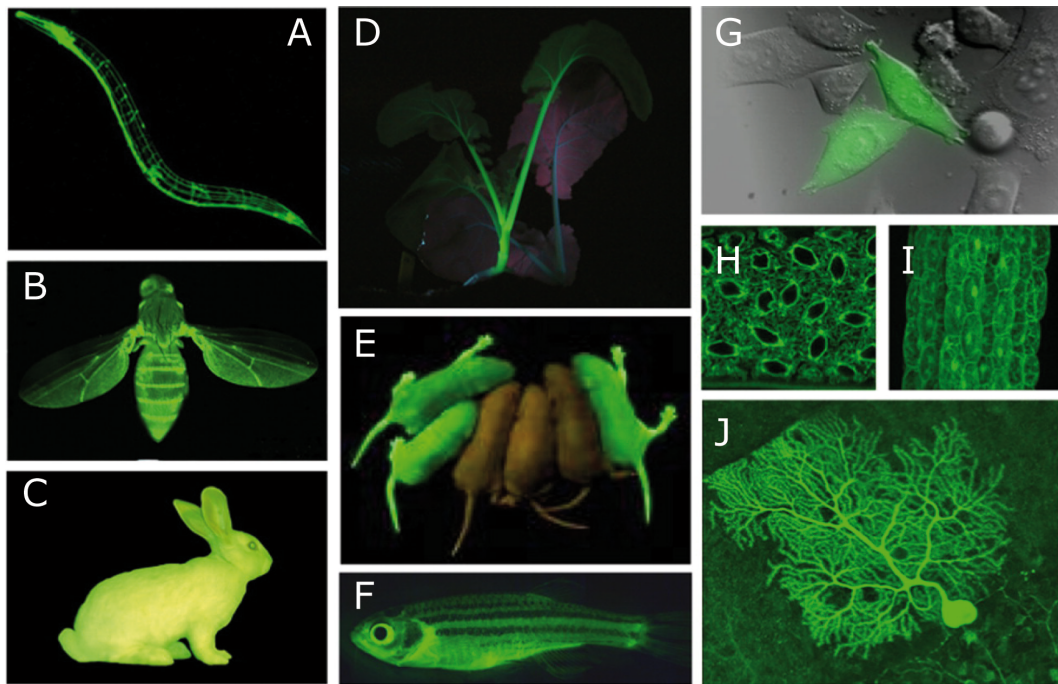


Figure 2 : Galerie d'images d'animaux et cellules exprimant la GFP. A *C. elegans*. **B** *Drosophila*. **C** Alba, le lapin GFP. **D** Plante de canola (colza). **E** Souriceaux transgéniques et ces frères et soeurs sauvages. **F** Poisson-zèbre. **G** Cellules en culture HeLa. **H** Cellules embryonnaires de la drosophile. **I** Cellules de l'hypocotyle d'*Arabidopsis thaliana*. **J** Cellules nerveuses murines (cellules Purkinje). Adapté de (Chalfie 2009).

Les marqueurs génétiques sélectifs sont pour la plupart basés sur la résistance à des drogues et en particulier à des antibiotiques. Les antibiotiques, associés aux gènes de résistances, sont largement utilisés pour la sélection de bactéries et de cellules eucaryotes recombinantes (Cohen et al. 1973; Davies et Jimenez 1980; Colbere-Garapin et al. 1981). Ces systèmes ont inspiré le développement d'un marqueur génétique basé sur la résistance à l'antibiotique G-418 chez la drosophile, qui permet la sélection des individus transgéniques en présence de l'antibiotique (Steller et Pirrotta 1985) (voir Partie V Les gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueurs génétiques).

D'autres marqueurs sélectifs ont été développés notamment pour la drosophile et le nématode, basés sur le sauvetage d'un phénotype létal. Chez la drosophile, les mutants nuls du gène *adh* codant pour la déshydrogénase alcoolique ne peuvent pas se développer en présence d'alcool. Ce phénotype est sauvé par le gène sauvage *adh* qui abolit la sensibilité à l'alcool des mutants, permettant ainsi de sélectionner les individus transgéniques en présence d'alcool (Goldberg et al. 1983). Chez le nématode *C. elegans*, la mutation du gène *pha-1* est létale à 25°C ; la transformation des vers mutants avec le gène sauvage rend possible la croissance des vers transgéniques à cette température (Granato et al. 1994) (voir Partie III La transgénèse de *C. elegans*).

4. Les applications de la transgénèse

Les applications de la transgénèse permettent d'une part, de comprendre la fonction des gènes pour accéder aux mécanismes fondamentaux qui gouvernent la vie, et d'autre part, d'exploiter les gènes et leurs produits avec des fins thérapeutiques et agronomiques. Depuis les débuts du génie génétique dans les années 80, 95% des animaux transgéniques ont été créés pour l'étude des gènes et de leurs mécanismes moléculaires et pour la création de modèles animaux de maladies humaines (Houdebine 2007).

4.1. Analyses fonctionnelles des gènes

La transgénèse était initialement un outil de recherche pour les biologistes pour l'étude de la fonction et de l'expression des gènes et du rôle de ses éléments régulateurs. Les études fonctionnelles ont tout d'abord eu lieu sur la souris. Depuis les débuts de la transgénèse, 1322 allèles de gènes ont été générés par recombinaison homologue dans cette espèce dans le but de déterminer le rôle des gènes concernés (Mouse Genome Database 2011). Mais d'autres modèles biologiques sont aussi largement utilisés. C'est le cas de la drosophile et du nématode *C. elegans*. Les apports de la transgénèse appliquée à ces organismes sur le fonctionnement des gènes du développement sont considérables. Le médaka et le xénope, sont également devenus des modèles d'étude importants.

L'application initiale de la transgénèse était l'ajout d'un gène d'intérêt pour générer un «gain de fonction» et étudier ainsi le rôle du gène dans un processus biologique. Mais au fur et à mesure que les techniques de transgénèse et les connaissances sur la structure des gènes ont évolué, d'autres possibilités d'études se sont rajoutées.

4.1.a. Surexpression, perte de fonction, compensation génétique

La surexpression d'un gène consiste à exprimer plusieurs copies du gène d'intérêt (ce qui, en général, augmente son expression) ou à exprimer le gène d'intérêt sous le contrôle de séquences hétérologues connues, ce qui permet d'augmenter son niveau d'expression. Ce type de manipulation permet entre autres d'étudier le rapport entre la surexpression des gènes et des maladies ou d'étudier l'effet de surdosage des produits des gènes.

La perte de fonction d'un gène, comme son nom l'indique est l'absence totale ou partielle de la fonction d'un gène. Cela peut arriver par l'apparition aléatoire de mutations dans les deux copies du gène d'intérêt natif, par mutagenèse ou par transgénèse. L'avantage de la transgénèse par rapport à la mutagenèse est qu'elle permet chez certaines espèces de cibler le gène d'intérêt. On parle alors de «*knock-out*» ou invalidation du gène. Les mutations peuvent avoir lieu dans la région codante ou dans les séquences régulatrices. Pour permettre l'étude de la fonction de gène dont les mutations "nulles" sont létales, il est également possible, chez certaines espèces, de réduire le niveau d'expression en modifiant les séquences régulatrices ou encore de générer des animaux *knock-out* conditionnels. Chez ces derniers, le gène d'intérêt est invalidé à un stade tardif du développement. Les études de perte de fonction permettent également d'étudier le rôle du gène dans un processus biologique donné à travers des tests de compensation.

La compensation génique consiste à inverser un phénotype mutant par l'introduction par transgénèse du gène sauvage. En faisant des tests de compensation avec différents gènes (ou fragments de gènes) il est possible d'identifier des gènes avec des fonctions similaires

4.1.b. Gènes rapporteurs et étude de la régulation transcriptionnelle

Les gènes rapporteurs sont des gènes dont le produit génère un signal visible, soit en catalysant une réaction chimique dont le produit est un composé coloré, comme la β -galactosidase (Silhavy et Beckwith 1985), ou une émission de photons, comme la luciférase (Silhavy et Beckwith 1985; De Wet et al. 1987), soit lorsque le produit du gène est lui-même excitable par une source de lumière et émet des photons (protéines fluorescentes) (Chalfie et al. 1994; Matz et al. 1999). La GFP, originellement isolée de la méduse *Aequora victoria*, a été la première protéine fluorescente à être utilisée comme gène rapporteur (Chalfie et al. 1994). Comme cette protéine ne requiert aucun substrat exogène ni co-facteur pour s'exprimer, elle est particulièrement adaptée à la visualisation de phénomènes biologiques *in vivo* (Figure 2). Depuis, un éventail de protéines fluorescentes a été développé qui couvre toute une gamme de longueurs d'ondes d'émission, donnant ainsi des protéines fluorescentes de différentes couleurs qui peuvent être utilisées en combinaisons (Chudakov et al. 2005).

Les gènes rapporteurs sont souvent placés sous le contrôle des séquences régulatrices du gène d'intérêt. Ils permettent ainsi de déterminer dans quel tissu et à quel

stade du développement le gène d'intérêt est exprimé. De plus, en variant la longueur des séquences d'ADN régulatrices utilisées, ce type de construction permet aussi d'identifier les éléments régulateurs en *cis* qui contrôlent l'expression spatio-temporelle des gènes.

4.1.c. Vecteurs pièges et identification de nouveaux gènes

Les vecteurs pièges sont constitués de gènes rapporteurs privés de séquences régulatrices ou sous le contrôle de séquences incomplètes, inactives en elles même (Gossler et al. 1989; Friedrich et Soriano 1991; Stanford et al. 2001). Leur intégration au hasard dans le génome hôte ne s'accompagne de leur expression que si elle a lieu à proximité d'une unité de transcription.

Les vecteurs pièges de régions codantes n'ont pas de promoteur mais un terminateur de transcription et un site donneur d'épissage (Gossler et al. 1989). Celui-ci permet au gène d'être exprimé uniquement s'il est intégré dans un exon ou un intron. La protéine issue de l'expression du vecteur piège est une protéine de fusion avec le début du gène dans lequel l'insertion s'est produite ("*exon trap*").

Les vecteurs pièges de promoteurs ("*promoter trap*") possèdent le gène rapporteur avec son propre codon ATG et son terminateur de transcription mais pas de promoteur (Friedrich et Soriano 1991). Ce gène ne s'exprime que s'il est intégré immédiatement en aval d'un promoteur en phase avec le cadre de lecture du gène piégé.

Finalement, les vecteurs pièges de région amplificatrices ("*enhancer trap*"), possèdent le gène rapporteur sous le contrôle d'une région promotrice minimale (Gossler et al. 1989). Le gène ne s'exprime que s'il est intégré en aval d'un élément régulateur amplificateur en *cis*.

Ces vecteurs sont principalement utilisés pour l'identification de nouveaux gènes : le gène rapporteur faisant office d'étiquette, les séquences flanquant celui-ci peuvent être facilement identifiées par séquençage et le gène correspondant peut ainsi être cloné (Mlodzik et al. 1990; Skarnes et al. 1995; Hicks et al. 1997; Cecconi et Meyer 2000). La technique permet à la fois d'identifier des nouvelles régions régulatrices et les tissus et les stades du développement auxquels le gène piégé s'exprime (Gossler et al. 1989; Mlodzik et al. 1990; Hope 1991). Basé sur ce principe, des cribles à grande échelle ont été entrepris pour identifier des gènes associées à un stade du développement ou à un tissu particulier (Hope 1991; Wurst et al. 1995; Steel et al. 1998). Ces méthodes qui ont permis de nombreuses avancées ont été rendues obsolètes par l'avènement des méthodes de séquençage automatiques.

4.1.d. La transgénèse dans l'ère génomique

En 1986, Applied Biosystems Incorporated annonça le premier séquenceur automatique, développé par L. Hood (Kaiser et al. 1989). Depuis, les techniques de séquençage automatique se sont améliorées à une vitesse remarquable et en 1995 ces efforts ont abouti au premier génome entièrement séquencé, celui de la bactérie *Haemophilus influenza Rd* (Fleischmann et al. 1995). Derrière ce projet, se profilait le défi du séquençage du génome humain dont la première version a été publiée en 2001 (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001). Entre temps, d'autres génomes d'organismes modèles ont aussi été séquencés, comme celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al. 1996), de la bactérie *E. coli* (Blattner et al. 1997), du nématode *C. elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), de la mouche du vinaigre *D. melanogaster* (Myers et al. 2000), de la souris *M. musculus* (Waterston et al. 2002) et du rat *R. norvegicus* (Gibbs et al. 2004).

Les séquençages massifs des génomes ont ouvert l'ère de la génomique. La génomique consiste à exploiter les informations sur les génomes à partir des séquences brutes en utilisant des outils informatiques. Ces études se consacrent au génome pris comme un tout, contrairement par exemple à l'analyse d'un ou de quelques gènes impliqués dans tel ou tel mécanisme biologique. La détermination dans le génome des séquences fonctionnelles, à savoir celles qui correspondent à des gènes transcrits ou à des séquences régulatrices, est le premier défi lors de l'analyse de nouveaux génomes.

On pourrait croire que la connaissance de la totalité des gènes contenus dans un génome permette de comprendre tous les mécanismes spécifiques d'un organisme. Mais le séquençage n'est que la première étape vers cet objectif. Premièrement, car les séquences en elles mêmes ne permettent pas de caractériser les gènes et leur attribuer une fonction. Deuxièmement, car les gènes et leurs produits forment de complexes réseaux d'interactions qui ne se traduisent qu'indirectement en phénomènes biologiques macroscopiques : connaître le fonctionnement d'un seul composant ne permet pas de comprendre le système entier. Pour avancer dans la compréhension des processus biologiques grâce à la génomique, il est tout d'abord nécessaire de développer des moyens fiables pour annoter les génomes et associer les gènes à leur fonctions.

La transgénèse joue un rôle essentiel dans ce processus. Tout d'abord, c'est en partie grâce aux résultats de la transgénèse obtenus avant la fin des séquençages que nous disposons de résultats biologiques pour décortiquer et analyser les génomes.

Prenant l'exemple du génome humain : en 2003, le nombre de gènes présents dans le génome humain était estimé à 30000, mais seulement une petite fraction (15 %) avait une activité biologique connue (Shashikant et Ruddle 2003). Les progrès réalisés grâce à la transgénèse aboutissant à la découverte de gènes et leurs fonctions chez la souris ont servi à annoter le génome humain. Cette approche comparative entre l'homme et la souris a permis d'identifier non seulement les régions codantes mais aussi les séquences régulatrices potentielles dans les régions non-codantes. De manière plus générale, les approches comparatives entre espèces permettent d'identifier les séquences codantes ou non-codantes avec un grand degré de conservation et de leur attribuer une fonction basée sur des résultats biologiques connus. Aujourd'hui, plus de 50 % des gènes du génome humain n'ont pas encore été caractérisés et leurs fonctions ne sont pas connues (Human Genome Project Information 2009). Pour compléter l'annotation du génome humain et des autres génomes entièrement séquencés, il est donc nécessaire d'accumuler des données sur l'expression et la fonction de nouveaux gènes, notamment à travers des expériences de transgénèse.

La transgénèse permet surtout d'étudier un gène dans son contexte pour connaître sa fonction. Elle est essentielle pour l'étude de l'expression des gènes *in vivo* durant le développement, l'organogenèse et le vieillissement. D'après l'analogie décrite par Louis-Marie Houdebine, la séquence d'un gène équivaut à une bande magnétique ; tous les deux contiennent des messages codés qui sont en eux-même inertes. Il faut avoir un magnétoscope pour pouvoir lire l'information contenue dans la bande, tout comme il faut un organisme pour comprendre l'information contenue dans une séquence d'ADN. La transgénèse est ainsi largement utilisée pour confirmer les prédictions de la bioinformatique sur la fonction des séquences et relier la biologie moléculaire et la physiologie. Par exemple, des études à grande échelle sont réalisées qui permettent d'étudier le profil d'expression spatiotemporel de gènes ou de promoteurs, préalablement prédits par la bioinformatique, chez le nématode (Dupuy et al. 2007; Hunt-Newbury et al. 2007) et chez la souris (Gong et al. 2003).

4.2. Recherche biomédicale

4.2.a. Modèles de maladies humaines

Une partie essentielle de la recherche médicale repose sur l'utilisation de modèles animaux de maladies humaines qui permettent d'étudier le déclenchement et la

progression de la maladie et d'évaluer des stratégies thérapeutiques. Le développement d'organismes transgéniques est essentiel à la création de ces modèles, les cas de modèles spontanés étant trop rares pour répondre à l'attente des chercheurs.

Les animaux transgéniques sont plus souvent utilisés pour l'étude des maladies monogéniques (causées par la mutation d'un seul gène), mais des progrès sont faits vers l'étude de maladies polygéniques (causées par la combinaison de mutations dans plusieurs gènes). La souris est l'animal le plus utilisé pour créer des modèles de maladies humaines. D'autres espèces sont sollicitées en raison de leur taille plus adaptées pour des interventions chirurgicales mais aussi pour leurs spécificités biologiques.

De manière générale, les modèles de maladies sont générés suite à l'identification d'un gène candidat muté chez des patients malades. Par des techniques de transgénèse, le gène muté est introduit dans un organisme modèle et les animaux ainsi obtenus sont étudiés. Une exemple de modèle murin de maladie humaine est le modèle de Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) (Ripps et al. 1995). La SLA est une maladie neurodégénérative progressive. Dix pour cent des cas de SLA sont héréditaires et associés à une mutation ponctuelle dans le gène codant pour l'enzyme superoxyde dismutase (SOD-1). Cette observation suggérant qu'une altération ou une réduction de l'activité de SOD-1 pouvait jouer un rôle dans le développement de la maladie, M. E. Ripps et collaborateurs générèrent des souris transgéniques portant le gène murin codant pour la SOD-1 mutée (Ripps et al. 1995). Pour cela ils introduisirent des copies du gène murin codant pour la SOD-1, préalablement muté *in vitro*, dans des souris portant des gènes *sod-1* sauvages et identifèrent des individus transgéniques ayant intégré de nombreuses copies du gène muté dans leur génome. Des souris avec un niveau important d'expression de la SOD-1 mutée dans le système nerveux, présentaient une perte progressive des fonctions motrices associée à la dégénérescence des motoneurons de la moelle épinière, du tronc cérébral et du néocortex, caractéristiques du développement de la SLA chez l'homme. Ainsi, ces résultats confirmaient l'implication de la SOD-1 dans la maladie et les auteurs proposèrent ces souris transgéniques pour l'étude et la caractérisation moléculaire de la SLA.

4.2.b. Xénogreffes

Le manque croissant d'organes d'origine humaine pour des greffes à des patients a fait envisager depuis longtemps l'utilisation d'organes ainsi que des cellules d'origine animale. Parce qu'il est relativement proche de l'homme sur un plan physiologique, le porc

a été retenu comme donneur potentiel d'organes. Cependant, un inconvénient majeur est que les organes de porc sont fortement rejetés par les receveurs humains. La transgénèse permet non seulement l'étude des mécanismes de rejets des greffes mais aussi d'envisager la création de porcs transgéniques porteurs de gènes ayant des effets anti-rejet ou dépourvus des gènes porcins responsables du déclenchement des mécanismes de rejet (Lai et al. 2002). Même si les projets sont ambitieux, ceci pourrait rendre possible un jour la greffe d'organes entre espèces différentes (xénogreffes).

4.3. Biotechnologie animale

4.3.a. Agronomie et industrie agroalimentaire

La transgénèse a aussi des applications commerciales (Houdebine 2005). Pour l'agronomie et l'industrie agroalimentaire, les applications sont significatives, notamment chez les végétaux. Il existe des végétaux résistants à certaines maladies, d'autres adaptés à des conditions de croissance extrêmes (sols salés ou alcalins, sécheresse) ou encore des végétaux enrichis en éléments essentiels pour l'alimentation humaine. Pour les animaux à valeur commerciale, la transgénèse est un moyen complémentaire à la sélection génétique classique pour engendrer des animaux ayant des caractères génétiques intéressants (prise de poids rapide, composition du lait, ponte des oeufs...). La transgénèse permet aussi d'améliorer leur production en les rendants résistants à des maladies ou en accélérant leur croissance, ou encore pour diminuer la pollution générée par l'élevage intensif. Quelques exemples sont des vaches qui devraient être insensibles à l'encéphalite bovine spongiforme (maladie de la vache folle) (Kuroiwa et al. 2004), des poissons à croissance rapide causée par plusieurs copies du gène de l'hormone de croissance (Muir 2004), et des porcs produisant 75 % de phosphate polluant en moins (Golovan et al. 2001).

4.3.b. Production pharmaceutique

Dans l'industrie pharmaceutique, des organismes transgéniques sont utilisés comme « bioréacteurs » pour produire des protéines recombinantes utilisées comme médicaments. Certaines protéines ont une structure trop complexe pour être produites à l'état biologiquement actif par des bactéries ou sont difficiles à purifier à partir de celles-ci. Les modifications post-transcriptionnelles requises par certaines protéines pharmaceutiques ne peuvent être apportées que par des cellules animales. La

transgénèse a rendu possible l'utilisation d'organismes entiers comme fermenteurs (Houdebine 2005). Ainsi, des protéines recombinantes très variées ont été produites dans le lait ; 100 protéines ont été produites à titre expérimental et plusieurs sont soumises à des test cliniques (Yeung 2000; Koles et al. 2004; Houdebine 2005). En juin 2006, l'Agence européenne du médicament (EMA) a approuvé la mise sur le marché de la première protéine thérapeutique produite par des animaux transgéniques, l'antithrombine III (protéine anticoagulante) produite dans le lait de chèvre (Yeung 2000; Houdebine 2006).

En conclusion, les applications de la transgénèse s'étendent aujourd'hui de la recherche fondamentale aux applications agroalimentaires et biomédicales. Ce large panel d'applications est rendu possible grâce à l'éventail de techniques du génie génétique qui ne cesse de grandir à travers le développement de nouvelles techniques et l'amélioration continue de techniques déjà existantes.

Partie II : Le nématode *Caenorhabditis elegans*, présentation de l'organisme modèle

1. Généralités sur *Caenorhabditis elegans*

C. elegans est une espèce de nématodes (vers ronds). Dans l'arbre phylogénétique, initialement les nématodes étaient placés à l'extérieur d'un groupe comprenant le reste des protostomiens (annélides, mollusques, arthropodes...) et les deutérostomiens (échinodermes, ascidies, vertébrés...), mais des études récentes par des méthodes moléculaires les placent près des arthropodes, avec qui ils partagent la croissance par mues (Figure 3).

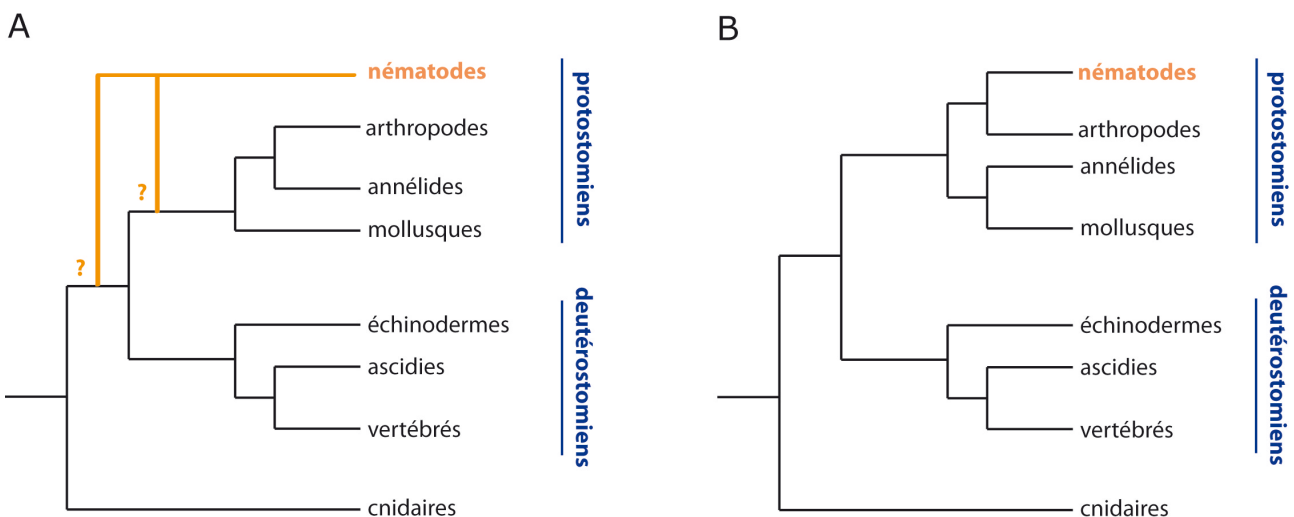


Figure 3 : Place des nématodes dans l'arbre phylogénétique. A Vue traditionnelle de la position des nématodes dans l'arbre phylogénétique. **B** Des études moléculaires placent les nématodes près des arthropodes avec qui ils partagent la croissance par mues. Adapté à partir du livre *Caenorhabditis elegans, un organisme modèle en biologie* (Felix et al. 2002).

C. elegans vit naturellement dans les fruits et feuilles mortes en décomposition, où il se nourrit de bactéries et d'autres micro-organismes. Il se reproduit avec un cycle de vie de trois jours et a une durée de vie de deux semaines dans des conditions optimales. Il est présent sous deux formes : une forme hermaphrodite, capable de produire des ovocytes et du sperme et de s'autoféconder, et une forme mâle beaucoup plus rare (surgit spontanément à une fréquence de 0,1 %), capable de féconder les hermaphrodites. Les deux formes atteignent ~1 mm de long et ~60 µm de diamètre au stade adulte mais diffèrent dans leur apparence (Figure 4).

Le génome de *C. elegans* comprend 100 mégabases et environ 20000 gènes sur 6 paires de chromosomes dont 5 autosomes et un chromosome sexuel X. Le sexe est déterminé par le ratio de chromosomes autosomes et sexuel. Les hermaphrodites sont diploïdes pour les 6 chromosomes (XX) alors que les mâles sont diploïdes uniquement pour les autosomes (XO).

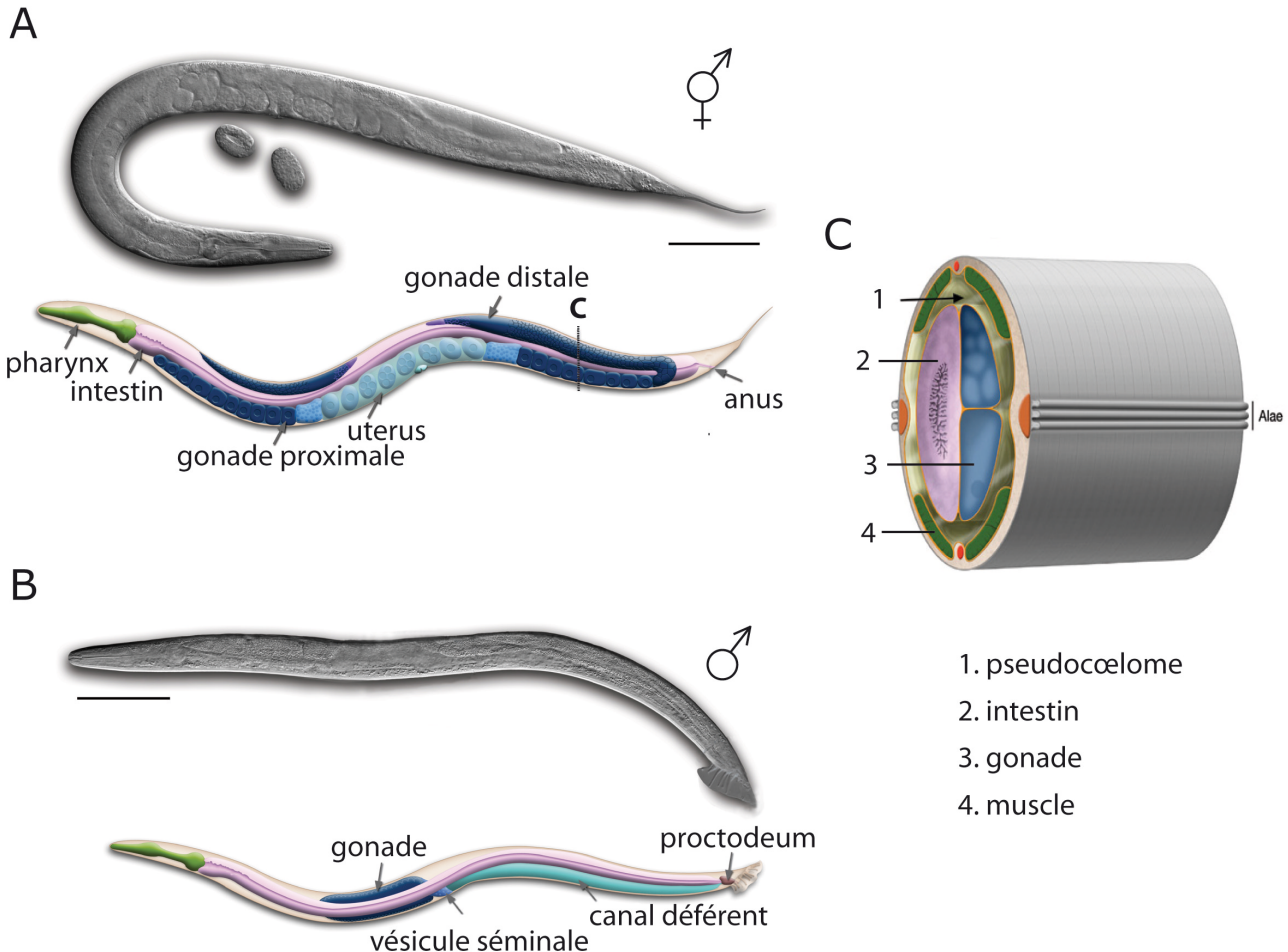


Figure 4 : Anatomie de *C. elegans*. **A** Image Nomarski et vue schématique d'un hermaphrodite adulte côté latéral gauche. **B** Image Nomarski et vue schématique d'un mâle adulte côté latéral gauche. **C** Vue schématique d'une coupe transversale côté postérieur d'un hermaphrodite adulte (voir **A**). Barre d'échelle 0,1 mm. Adapté à partir de WormAtlas (Altun et Hall 2008).

Comme pour les autres nématodes, le plan anatomique de *C. elegans* est simple (Figure 4). Le corps est formé de deux tubes concentriques séparés par un espace : le pseudocœlome. Le tube interne est l'intestin ; le tube externe est formé de cuticule, hypoderme, musculature et cellules nerveuses. Au stade adulte le pseudocœlome contient aussi les gonades. Une des caractéristiques majeures de *C. elegans* est l'invariance de son développement cellulaire. Chaque cellule a une histoire propre (différenciation, localisation) qui est identique dans chaque individu. La transparence du ver et la simplicité

de son anatomie ont permis de cartographier les 959 cellules somatiques de l'hermaphrodite adulte (1031 chez le mâle).

Un hermaphrodite qui s'autoféconde pond jusqu'à 300 oeufs durant sa vie reproductive. À 25°C, l'embryogenèse dure 14 heures et le développement post-embryonnaire 36 heures. Durant ce dernier, le ver passe par quatre stades larvaires (de L1 à L4) séparés par des mues, avant d'atteindre le stade adulte (Figure 5).

Une couvée nombreuse et un cycle de vie court caractérisent le mode de vie du ver qui consomme ainsi rapidement toutes les ressources disponibles dans son environnement. *C. elegans* dispose d'un mécanisme efficace de dispersion lorsque les ressources se font rares : le stade *Dauer* (Figure 5). Le stade *Dauer* («durée» en allemand) est un stade larvaire alternatif qui permet aux animaux de rentrer en diapause lors d'un stress (absence de ressources...) et de survivre pendant plusieurs mois sans se nourrir. Lorsque ces larves retrouvent de la nourriture elles sortent du stade *Dauer* et reprennent leur développement. Ainsi *C. elegans* est capable de migrer de manière efficace d'une région maigre en ressources à une autre plus riche pour assurer sa survie.

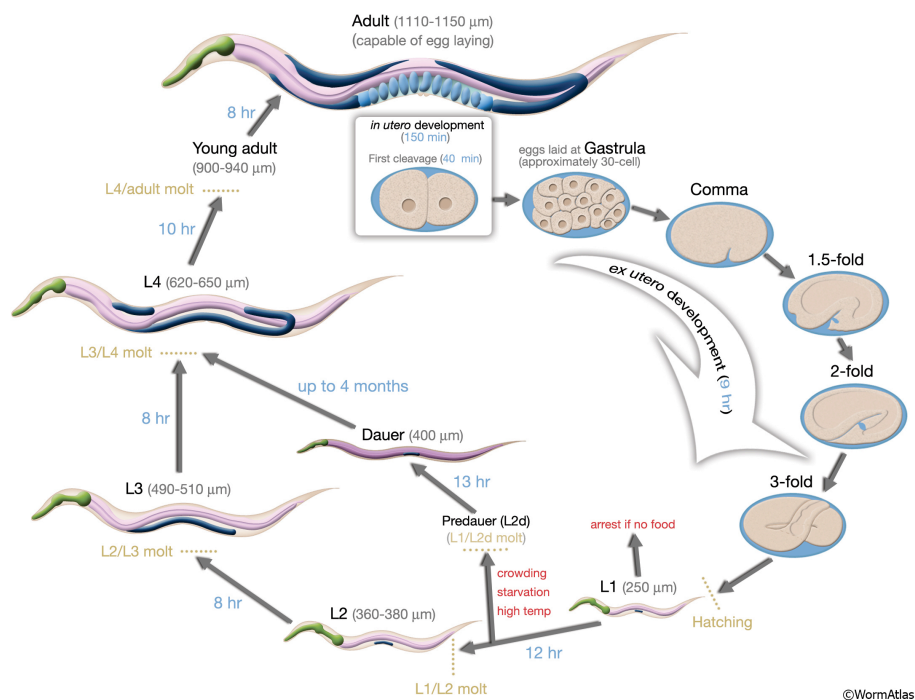


Figure 5 : Cycle de vie de *C. elegans* à 22°C. Le temps 0 minutes correspond à la fertilisation de l'oeuf. En bleu sont indiquées les durées de chaque stade. La longueur de l'animal à chaque stade est signalée en µm. Source : WormAtlas (Altun et Hall 2008).

2. *C. elegans* au laboratoire

Le nématode *C. elegans* possède des caractéristiques qui en font un modèle biologique multicellulaire facile d'emploi. Au laboratoire les vers sont cultivés dans des boîtes de Petri contenant du milieu de croissance pour nématodes gélifié et *E. coli* comme source de nourriture. Il est également possible de réaliser des cultures en milieu liquide en présence de bactéries. Grâce à leur couvée de 300 oeufs par hermaphrodite et leur cycle de vie court, il est extrêmement facile d'obtenir plusieurs milliers de vers dans une seule boîte de Petri. De plus, le mode de reproduction par autofécondation des hermaphrodites combiné à la possibilité de croiser des hermaphrodites avec des mâles et sa capacité de survivre à la congélation font de *C. elegans* le métazoaire le plus facile d'emploi pour la génétique.

3. *C. elegans* comme modèle biologique

“...with a few toothpicks, some petri dishes and a microscope, you can open the door to all of biology.”

Sydney Brenner, Novembre 1996

extrait de l'avant-propos du livre *C. elegans II* (Riddle et al. 1997)

Ce fut Sydney Brenner qui, dans les années 60', choisit *C. elegans* pour étudier les étapes clefs du développement cellulaire et le système nerveux. En tant que généticien et microbiologiste, il souhaitait travailler avec un organisme multicellulaire «le plus simple possible» qui puisse être soumis aux méthodes analytiques de la génétique microbienne.

Les travaux engagés par S. Brenner aboutirent à la publication de la première carte génétique de *C. elegans* (Brenner 1974), à la description complète du lignage cellulaire du ver sauvage depuis l'oeuf fertilisé jusqu'à l'adulte (Sulston et al. 1988) et à la cartographie du réseau neuronal reconstituée à partir de coupes de ver analysées par microscopie électronique (White et al. 1986; White et al. 1988). De cette manière S. Brenner donna le coup d'envoi de l'utilisation du nématode *C. elegans* comme modèle biologique.

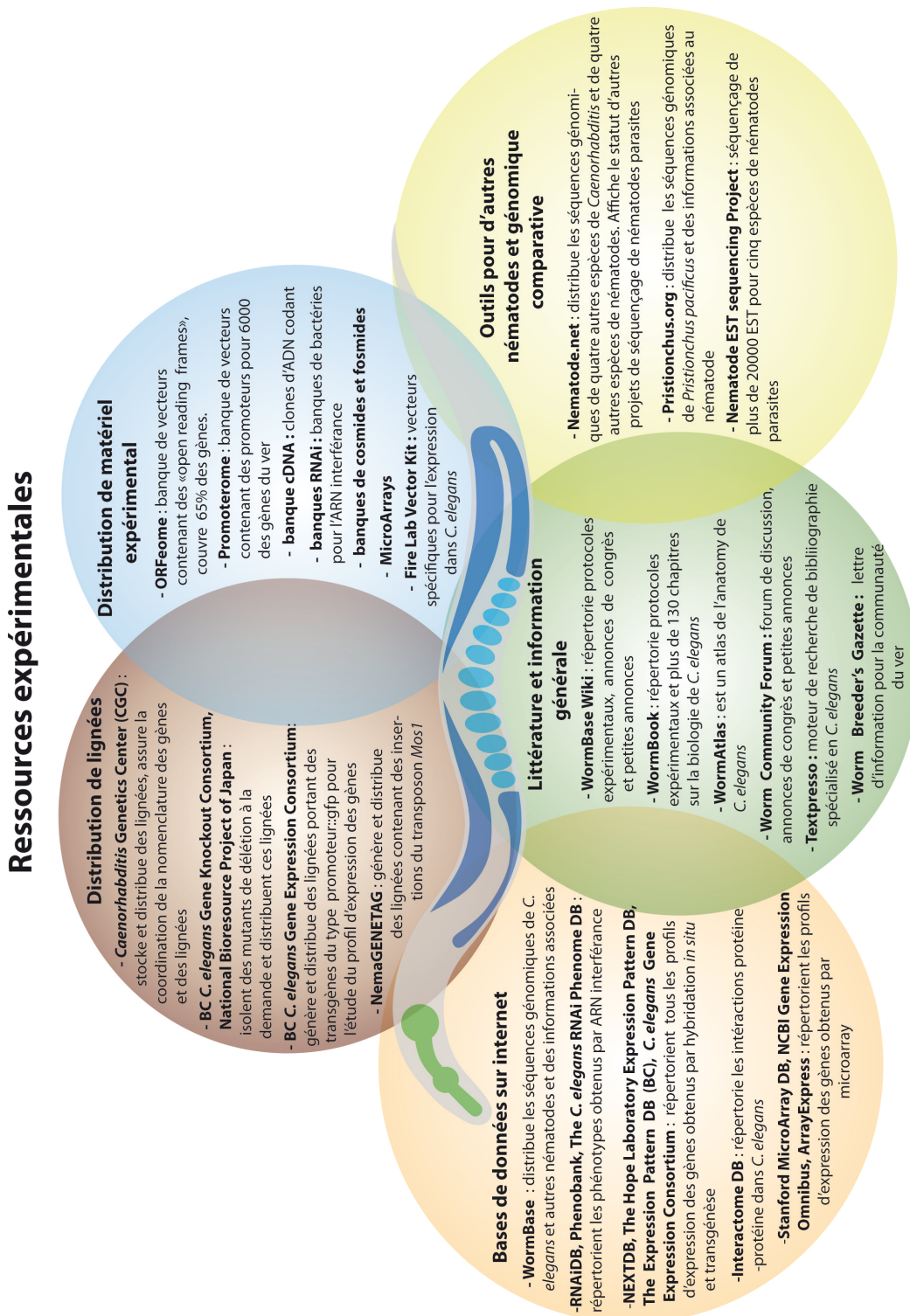
Très rapidement, l'application d'approches génétiques similaires à d'autres aspects de la biologie du ver permirent d'aborder d'autres domaines tels que le développement

embryonnaire, la détermination du sexe et le développement larvaire (Cassada et Russell 1975; Vanderslice et Hirsh 1976; Hodgkin et Brenner 1977). Les premières études de génétique moléculaire sur le ver se concentrèrent sur des gènes codant pour des produits facilement détectables plutôt que sur des molécules neuronales, comme le voulait le projet initial. Par exemple, un des premiers gènes à être étudié fut *unc-54*, le gène codant pour la chaîne lourde de myosine présente dans les cellules musculaires, car la protéine de 210 kD est l'une des protéines les plus abondantes du ver et elle est donc facilement analysable par des méthodes de SDS-PAGE (Epstein et al. 1974).

Depuis, *C. elegans* a gagné sa place en tant qu'organisme modèle au même titre que la drosophile ou la souris. Aujourd'hui il est couramment utilisé pour étudier la Génétique, la Biologie Cellulaire, le Développement, le Vieillissement, les Neurosciences, l'Immunologie, l'Évolution ou encore l'Écologie (Riddle et al. 1997) et on ne compte plus les apports que la recherche sur le ver a permis dans tous ces domaines. Son importante contribution à nos connaissances sur les mécanismes moléculaires comme l'apoptose, l'interférence ARN et le déterminisme moléculaire de la sénescence, ainsi que sur le développement de la GFP comme outil de marquage *in vivo*, a été récompensée par trois Prix Nobel (Prix Nobel de Physiologie et Médecine 2002 et 2006 et Prix Nobel de Chimie 2008), prouvant clairement la puissance du nématode comme organisme modèle.

4. La puissance du modèle *C. elegans*

L'utilisation de *C. elegans* comme modèle biologique se justifie parce qu'il est clair aujourd'hui que les molécules et les voies cellulaires sont conservées entre les nématodes et les mammifères. Il est apparu que près de 38 % des protéines humaines ont un orthologue chez *C. elegans* (Berglund et al. 2008), suggérant par la même occasion que de nombreuses fonctions de produits de gènes humains peuvent être analysées chez le ver. Il est clair que *C. elegans* ne permet pas d'étudier le déroulement clinique d'une maladie humaine ni le fonctionnement d'organes complexes comme le cerveau humain, mais il permet d'étudier la fonction d'une molécule au niveau cellulaire et dans le contexte d'un organisme multicellulaire simple et facile d'emploi. Ainsi il permet d'acquérir rapidement des connaissances sur les interactions moléculaires et les fonctions cellulaires d'un gène d'intérêt.



Ressources informationnelles et bases de données

Figure 6 : Principales ressources expérimentales et informationnelles relatives au nématode *C. elegans*. L'éventail de ressources mises à disposition des chercheurs travaillant sur *C. elegans* font du ver un organisme modèle extrêmement puissant. DB: data base. Plus d'information relative à ces ressources peut être obtenue dans la revue scientifique «The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research» (Antoshechkin et Sternberg 2007).

Les études sur *C. elegans* sont rendues possibles grâce à un arsenal de techniques et de ressources qui sont mises à disposition des chercheurs. Désormais, la force du modèle *C. elegans* réside dans l'esprit collaboratif des chercheurs travaillant sur le ver, réunis dans la «Communauté *C. elegans*», qui partagent gracieusement les ressources développées aux seins de leurs laboratoires. Même si le ver est un organisme modèle relativement récent, il est un des modèles biologiques avec le plus de ressources disponibles. Les paragraphes suivants présentent les principales ressources biologiques, informationnelles et techniques qui sont partagées entre les chercheurs et qui constituent la «boîte à outils» du ver.

4.1. Ressources biologiques, informationnelles et bases de données sur *C. elegans*

Depuis les premières études sur *C. elegans* dans les années 60, des grandes quantités de données en génétique, développement, neurobiologie, biologie cellulaire et moléculaire ont été générées. L'expansion la plus importante de la quantité de données vient probablement du séquençage complet du génome de *C. elegans* en 1998 (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998) et de la publication d'études à l'échelle génomique qui en ont découlées sur la fonction et l'expression des gènes et leurs interactions. À ces données viennent s'ajouter des ressources biologiques, telles que des lignées de mutants ou de vers transgéniques générées dans les laboratoires ou des consortiums, ou encore des banques de matériel génétique. Toutes ces ressources sont aujourd'hui partagées par la Communauté *C. elegans* principalement au travers d'interfaces sur internet et de centres de stockage et de distribution de matériel biologique (Antoshechkin et Sternberg 2007). La Figure 6 présente les principales ressources biologiques et banques de données qui font la force de *C. elegans* comme organisme modèle.

4.2. Méthodes génétiques

Les paragraphes suivants présentent de manière succincte les principales méthodes et techniques de la «boîte à outils» du ver.

4.2.a. Génétique classique

La génétique classique consiste à chercher les gènes qui sont impliqués dans un processus biologique donné (Brenner 1974; Jorgensen et Mango 2002). Dans cette démarche, les données du problème sont en général un phénotype déjà caractérisé et les inconnues sont les gènes impliqués dans ce phénotype. La génétique classique, qui va donc du phénotype au gène, se décompose en trois étapes : (i) Mutagénèse aléatoire du génome, (ii) Criblage permettant d'isoler le mutant avec le phénotype recherché et (iii) Identification du gène muté et de la mutation.

La mutagénèse aléatoire consiste à appliquer des agents mutagènes à des L4 ou jeunes adultes. Le mutagène chimique le plus utilisé est l'éthylméthanesulfonate (EMS) qui produit majoritairement des mutations ponctuelles. Le triméthylpsoralène combiné à des rayons ultraviolets (TMP-UV) permet d'obtenir des délétions de bases. Ce sont les gamètes des vers mutagénisés qui donnent naissance aux vers mutés. Après identification d'un mutant avec le phénotype recherché, le gène muté est identifié soit par des méthodes de cartographie génétique classique, soit en utilisant les techniques plus récentes de séquençage massif (Sarin et al. 2008).

4.2.b. Génétique inverse

Développée originellement chez la drosophile (Ballinger et Benzer 1989), la génétique inverse suit une démarche contraire à la génétique classique et va donc du gène au phénotype. Dans le cadre de ce type d'étude, l'expression du gène d'intérêt est inactivée (inactivation partielle ou totale). L'étude du phénotype ainsi obtenu (s'il y en a un) permet de caractériser la fonction du gène.

Il existe deux méthodes d'inactivation des gènes chez *C. elegans*. La première est une inactivation transitoire par ARN interférence (RNAi) (Fire et al. 1998). La deuxième consiste à inactiver de manière stable les gènes d'intérêt par mutagénèse chimique (Jansen et al. 1997) ou par insertion de transposons (Rushforth et al. 1993; Williams et al. 2005).

4.2.b.(i) ARN interférence (RNAi)

L'inactivation génique par RNAi découverte en 1998 (Fire et al. 1998) a élargi les outils de génétique inverse chez le ver. L'administration aux animaux d'ARN double brin (*double stranded RNA*, dsRNA) diminue l'expression des gènes à

travers un mécanisme endogène qui aurait comme rôle biologique la défense contre virus et transposons (Fischer 2010). Dans l'organisme, le dsRNA est découpé en molécules de 21-23 paires de bases, appelées petits ARN interférents (*small interfering RNAs*, siRNAs). Ces molécules reconnaissent l'ARNm cible par complémentarité de bases et entraînent leur destruction, altérant ainsi l'expression du gène.

L'administration des dsRNA à *C. elegans* peut se faire par quatre méthodes : (i) par injection d'une solution de dsRNA dans n'importe quel partie du ver (Fire et al. 1998), (ii) par immersion du ver dans une solution concentrée en dsRNA (Tabara et al. 1998), (iii) en nourrissant les vers avec des bactéries produisant le dsRNA (Timmons et Fire 1998) ou (iv) en transformant le ver avec un transgène codant pour les deux brins du dsRNA (Tavernarakis et al. 2000). Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients et les différences s'observent notamment en termes de pénétrance de l'effet interférence.

Il existe deux banques de bactéries produisant des dsRNA, dont la plus complète couvre plus de 87 % du génome du ver (Kamath et al. 2003). Ces banques non seulement donnent accès à des bactéries produisant les dsRNAs d'intérêt mais surtout permettent la réalisation de cribles à l'échelle génomique (Lehner et al. 2006).

Même si l'inactivation de gènes par RNAi est une méthode relativement facile à mettre en place et permet d'obtenir rapidement des informations sur la fonction d'un gène, il est cependant nécessaire dans certains cas d'utiliser des vers mutants où l'inactivation du gène d'intérêt est plus stable.

4.2.b.(ii) Inactivation stable de gènes par insertion de transposons et mutagenèse chimique

Adaptée d'une technique développée chez la drosophile, l'inactivation de gènes par insertion de transposons à été la première méthode de génétique inverse développée chez *C. elegans* (Rushforth et al. 1993). Cette méthode utilise une lignée mutée qui a une haute fréquence de transposition du transposon *Tc1*, naturellement présent chez le nématode. Cette lignée est donc hautement mutagène, puisque en se transposant *Tc1* peut s'insérer dans des régions intragéniques et altérer ainsi l'expression des gènes. Les propriétés de cette lignée combinées à la grande sensibilité de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

permettent d'isoler des vers portant une insertion dans le gène d'intérêt, dont la séquence est du moins partiellement connue. En effet, grâce à des amorces situées de part et d'autre en dehors du gène d'intérêt et d'autres situées à l'intérieur de la séquence du transposon, il était possible de cribler pour l'insertion du transposon à cet endroit précis du génome. Une variation de cette méthode est de cribler pour une délétion dans le gène d'intérêt ; en effet, la translocation de *Tc1* génère des coupures double brin de l'ADN qui, mal réparées, provoquent des délétions (Moerman et al. 1991).

La méthode robuste de détection par PCR d'événements uniques contenant la délétion d'intérêt a ensuite été adaptée à la mutagenèse chimique par EMS ou TMP-UV (Jansen et al. 1997). Dans ce cas, la délétion est criblée par PCR avec des amorces de part et d'autre du gène d'intérêt. Le produit d'amplification de l'allèle portant la délétion est en principe de taille inférieure à celle du produit d'amplification du gène intact. L'automatisation de cette technique a permis d'entreprendre la mutation systématique de chacun des 20000 gènes de *C. elegans* (Moerman et Barstead 2008). En 2008, on comptait 7000 délétions parmi 5500 gènes. Ces lignées sont accessibles aux chercheurs par deux consortiums, qui peuvent aussi obtenir des délétions à la demande (The *C. elegans* Gene Knockout Consortium et al. 2001-2005; National Bioresource Project - *C. elegans* 2009).

Si aujourd'hui le transposon *Tc1* n'est plus utilisé, la méthode a été reprise avec le transposon de la drosophile *Mos1* (Bessereau et al. 2001; Williams et al. 2005). Celui-ci est activé de manière contrôlée dans le nématode et il est ainsi possible d'isoler des lignées avec une seule copie du transposon. Le consortium européen NemaGENETAG (Bazopoulou et Tavernarakis 2009) a généré plus de 14000 insertions uniques de *Mos1* (intragéniques et intergéniques). Ces lignées sont toutes susceptibles d'être modifiées par remplacement du transposon *Mos1* par un allèle modifié en utilisant la méthode *Mos1* excision-induced transgene-instructed gene conversion (*MosTIC*) (Robert et Bessereau 2007). Cette méthode a récemment été adaptée pour générer des délétions de jusqu'à 25 kilobases (kb) près de l'insertion du transposon, *Mos1*-mediated deletion (*MosDEL*) (Frokjaer-Jensen et al. 2010), permettant ainsi d'obtenir des mutants de délétion pour presque tous les gènes du nématode.

4.2.c. La transgénèse

Depuis son développement dans les années 80 (Stinchcomb et al. 1985; Fire 1986) et la mise en place de techniques de routine (Mello et al. 1991; Praitis et al. 2001), la transgénèse est devenue un outil essentiel de la «boîte à outils» du ver.

Le grand succès de la transgénèse chez le ver est en partie dû au développement de la GFP et son expression chez *C. elegans* comme marqueur *in vivo* pour suivre l'expression spatiotemporelle des gènes (Chalfie et al. 1994). Le ver étant transparent et de petite taille (~60 µm de diamètre), la visualisation de l'expression de protéines fluorescentes est possible dans l'animal vivant.

La transgénèse de *C. elegans* et les techniques associées seront développées dans la Partie III.

Les caractéristiques intrinsèques de *C. elegans* auxquelles s'ajoutent toutes les ressources présentées dans les paragraphes précédents, font du ver un organisme modèle très complet qui est aujourd'hui utilisé dans de nombreux domaines de la biologie. Cinquante ans après les premières études sur le ver par S. Brenner, le pari est gagné.

Partie III : La transgénèse de *C. elegans*

1. Les applications de la transgénèse

1.1. Validation fonctionnelle d'un gène

Tout d'abord, la transgénèse est classiquement utilisée pour valider la fonction d'un gène en sauvant un phénotype mutant par l'ADN sauvage. Depuis que A. Fire et R. H. Waterston montrèrent pour la première fois qu'il était possible de sauver le phénotype «Uncoordinated» (Unc) (défaut de locomotion) des vers mutants *unc-54(e190)* en injectant le gène sauvage (Fire et Waterston 1989), la technique fut ensuite utilisée systématiquement pour cloner les gènes par complémentation (Goetinck et Waterston 1994; Clark et al. 1995; Aronoff et al. 2001; Yochem et al. 2004; Clary et Okkema 2010).

Il est aussi possible d'utiliser la transgénèse pour étudier la fonction d'un gène en exprimant le gène sauvage ou le gène muté de manière ectopique, en surexpression ou en mis-expression (Fire et Waterston 1989; Labrousse et al. 1999). En effet, la manipulation des gènes *in vitro* permet d'associer la région codante d'un gène d'intérêt à un promoteur hétérologue de manière à contrôler son expression spatiotemporelle. La surexpression d'un transgène est possible grâce à la formation lors de la transgénèse de concatémères extrachromosomiques répétitifs contenant des centaines de copies du transgène (Fire et Waterston 1989).

Elle permet aussi de construire des mosaïques génétiques (animaux dont seulement une partie des cellules contiennent le gène d'intérêt) qui permettent d'identifier les cellules dans lesquelles le gène est requis pour conférer un phénotype donné (Baum et Garriga 1997; Yochem et al. 1998; Sagasti et al. 2001). Par exemple, P.D. Baum et G. Garriga construisirent une lignée transgénique en transformant des mutants déficients pour le gène *ina-1* et *ncl-1* avec des cosmides portant les gènes *ina-1* et *ncl-1* sauvages (Baum et Garriga 1997). La mutation du gène *ncl-1* provoque une augmentation de la taille du nucléole, phénotype qui est sauvé par le gène *ncl-1* sauvage. Ceci permet de d'identifier visuellement les cellules portant le transgène (nucléole de taille normale) des cellules ayant perdu celui-ci (nucléole plus grand). En analysant des animaux

transgéniques ayant perdu le transgène uniquement dans les neurones étudiés, les auteurs ont pu déterminer que l'absence de *ina-1* sauvage entraîne des défauts de migration de ces neurones, montrant ainsi que le gène *ina-1* agit de manière autonome cellulaire.

1.2. Caractérisation du profil d'expression spatiotemporel

Une autre application qui s'est rapidement développée est l'étude du profil spatiotemporel de l'expression des gènes. Dans un premier temps le gène rapporteur utilisé était *lac-Z* codant pour la β -galactosidase d'*E. coli* (Way et Chalfie 1988; Fire et al. 1990; Stone et Shaw 1993; Maduro et Pilgrim 1995; Labrousse et al. 1999). Les animaux transgéniques portant *lac-Z* étaient fixés et traités avec du X-gal. En présence de ce substrat, la β -galactosidase produit une coloration bleue, ce qui permettait d'identifier les cellules exprimant le gène rapporteur (Figure 7). Mais après le clonage de la GFP en 1994, les gènes codant pour des protéines fluorescentes ont très vite remplacé les rapporteurs enzymatiques, car ils permettent la visualisation de l'expression des gènes *in vivo* et en direct chez des animaux vivants non fixés (Chalfie et al. 1994) (Figure 7). Pour cela, les régions régulatrices du gène d'intérêt, généralement la région intergénique 5' du site d'initiation de la traduction, sont fusionnées à la région codante du gène codant pour la protéine fluorescente. La présence d'une centaine de copies du transgène chez les animaux transgénique permet la visualisation de l'expression du gène rapporteur même dans le cas de promoteurs faibles.

Quelques exemples de cette application sont la localisation de l'expression de gènes codant pour des récepteurs chimiosensoriels (Troemel et al. 1995), des récepteurs nucléaires (Miyabayashi et al. 1999), des neuropeptides (Nathoo et al. 2001), des canaux ioniques (Salkoff et al. 2001), des protéines G (Jansen et al. 1999) ou encore des immunoglobulines (Aurelio et al. 2002). Plus récemment, cette technologie a été mise au profit d'études d'expression de gènes à l'échelle génomique (The Hope's Laboratory Expression Pattern Database ; Dupuy et al. 2007; Hunt-Newbury et al. 2007).

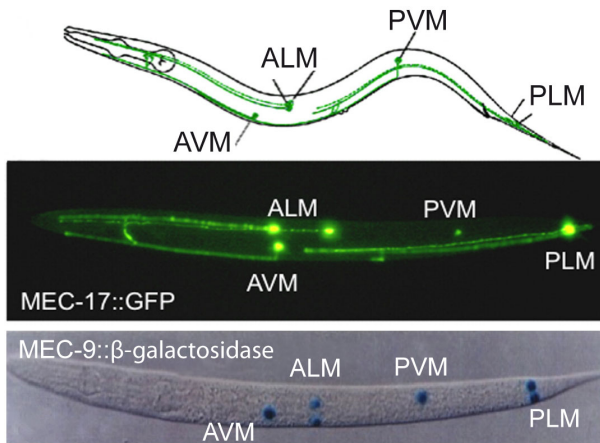


Figure 7 : Utilisation des gènes rapporteurs pour la visualisation de l'expression des gènes. Ici, *mec-17* et *mec-9* s'expriment dans les six neurones sensoriels du ver. En haut, schéma représentant la position des six neurones sensoriels dans le ver (partie antérieure à droite, partie ventrale en bas). Au milieu, image en fluorescence d'un ver exprimant le gène fusion *mec-17::gfp* dans les six neurones sensoriels. En bas, image de Nomarski d'un ver exprimant le gène fusion *mec-9::lac-Z* dans les corps cellulaires des six neurones. La présence du produit du gène contenant la β -galactosidase est détectée par une coloration bleue en présence du réactif X-gal. Adaptée de (Chalfie 2009).

1.3. Analyse fonctionnelle des séquences régulatrices

Les gènes rapporteurs permettent aussi d'analyser les régions régulatrices d'ADN et d'ARN. Un exemple est le piégeage de promoteurs développé par I. Hope en 1991 qui utilisait *lac-Z* comme rapporteur (Hope 1991). D'autres types d'études consistent à fusionner les régions d'intérêt au gène rapporteur et à subdiviser progressivement les régions régulatrices jusqu'à identifier les éléments minimaux nécessaires à l'expression ou à la régulation du gène (Harfe et Fire 1998; Wenick et Hobert 2004). Des gènes rapporteurs sont aussi utilisés pour étudier l'épissage alternatif (Kuroyanagi et al. 2006; Kuroyanagi et al. 2007). Dans ce type d'analyse les gènes rapporteurs sont inclus sous la forme d'exons parmi les différents exons du gène d'intérêt ; selon le type d'épissage, l'un ou l'autre gène rapporteur est exprimé (Figure 8).

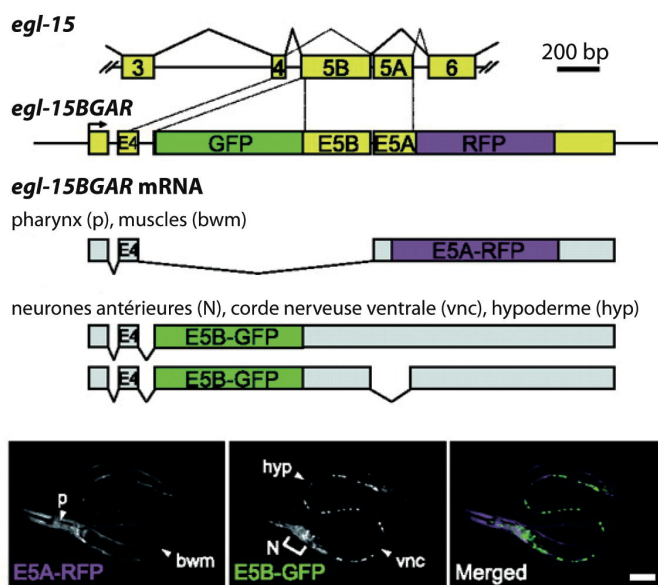


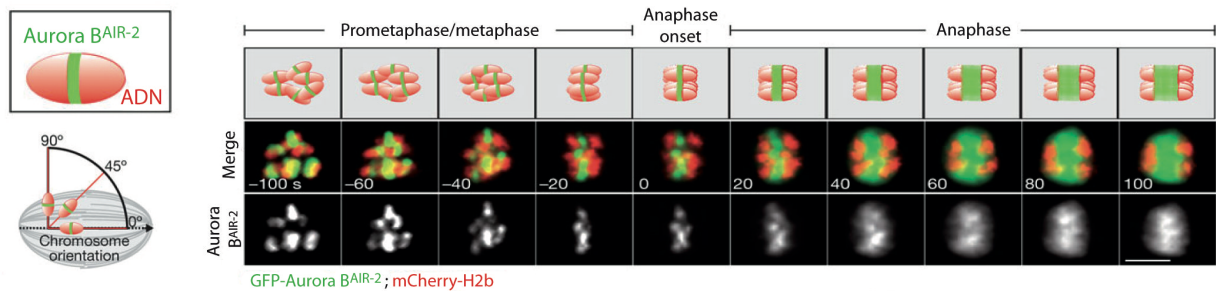
Figure 8 : Des systèmes rapporteurs sont utilisés pour étudier l'épissage alternatif du gène *egl-15* à l'échelle cellulaire *in vivo* (Kuroyanagi et al. 2007). Lors de l'épissage de ce gène, les exons 5A ou 5B sont épissés de façon mutuellement exclusive, donnant lieu à deux formes de la protéine EGL-15 avec des fonctions différentes. Le minigène rapporteur *egl-15BGAR* permet de visualiser la sélection de l'exon 5A ou 5B suivant la fluorescence. Lorsque l'exon 5A est inclus, c'est la protéine RFP qui s'exprime ; lorsque l'exon 5B est inclus, c'est la GFP qui s'exprime. Ainsi, les cellules contenant la forme 5A et la forme 5B de EGL-15 ont pu être identifiées. Ici, les rectangles représentent les exons et les lignes droites les introns. Dans les images de fluorescence du ver, le vert représente la GFP, le magenta la RFP. Barre d'échelle 50 μ m. Figure adaptée de (Kuroyanagi et al. 2007).

1.4. Utilisation de la transgénèse pour des études fonctionnelles

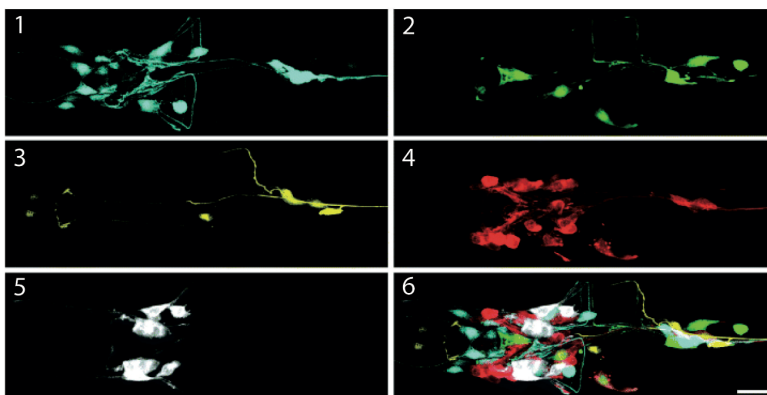
La transgénèse et les protéines fluorescentes sont aussi utilisées pour localiser des protéines à l'échelle cellulaire et subcellulaire en temps réel (Vogel et Hedgecock 2001; Chelur et al. 2002; Loria et al. 2003; Dumont et al. 2010) (Figure 9 A). Des fusions entre la protéine d'intérêt et la GFP ou d'autres types d'étiquettes sont aussi utilisées en biochimie pour les immunopurifications (Burbea et al. 2002; Rechtsteiner et al. 2010).

Finalement, il est possible grâce à ces techniques de visualiser au microscope les relations spatiales entre neurones marqués avec des protéines fluorescentes différentes (Hutter 2000; Hutter 2004) (Figure 9 B), étude uniquement réalisable auparavant par microscopie électronique (White et al. 1978). Ou encore, il est possible de visualiser les vagues calciques dans les neurones ou les cellules musculaires en utilisant des protéines «caméléon» (Kerr et al. 2000; Hilliard et al. 2005), ce qui n'était pas encore réalisable par les techniques d'injection intracellulaire de marqueurs calciques compte tenu la petite taille des neurones et des cellules musculaires (Dal Santo et al. 1999) (Figure 9 C).

A



B



C

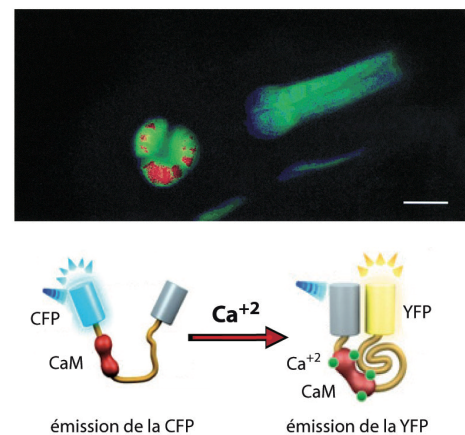


Figure 9 : Autres exemples d'application de la transgénèse de *C. elegans*. A Des fusions entre des protéines d'intérêt et des protéines fluorescentes permettent de visualiser des mécanismes cellulaires *in vivo* en temps réel. Ici, l'orientation des chromosomes et la séparation des chromatides durant la méiose sont visualisées *ex-utero* dans un ovocyte fécondé (Dumont et al. 2010). La protéine Aurora B - AIR-2,

nécessaire à l'alignement des chromosomes et à la séparation des chromatides, est fusionnée à la GFP (vert) et l'histone 2b est fusionnée à la mCherry (rouge). Le temps est indiqué en secondes et est relatif au début de l'anaphase. Figure adaptée de (Dumont et al. 2010). **B** Les relations spatiales entre neurones sont visualisées grâce à des protéines fluorescentes exprimées spécifiquement dans différents types de neurones (Hutter 2004). Ici, marquage de quatre types de neurones grâce à des fusions de protéines fluorescentes et marquage d'un cinquième type neuronal grâce au colorant lipophile DiD, capturé par les neurones sensoriels. 1. CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) exprimée dans des neurones sensoriels et interneurones. 2. GFP exprimée dans les neurones GABAergiques. 3. YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) exprimée dans les motoneurones excitateurs et quelques neurones sensoriels. 4. DsRed (rouge) exprimée dans les interneurones glutamatergiques. 5. Colorant DiD dans d'autres neurones sensoriels. 6. Superposition des images précédentes permettant l'analyse de l'anneau nerveux du ver et des positions relatives des neurones en temps réel. Barre d'échelle : 10 μm . Vue dorsale de la tête du ver, partie antérieure à gauche. Figure adaptée de (Hutter 2004). **C** Les vagues calciques dans les muscles du pharynx du ver sont visualisées grâce à des protéines caméléon (Kerr et al. 2000). La protéine caméléon est composée d'un domaine CFP lié à un domaine YFP par un domaine calmoduline (CaM). En absence de calcium (Ca^{+2}) la protéine caméléon est en conformation «ouverte» et émet de la fluorescence cyan. En présence de Ca^{+2} , celui-ci se fixe à la CaM provoquant un changement de conformation qui rapproche la CFP de la YFP (conformation «fermée») ; dans cette nouvelle conformation, l'excitation de la CFP transmet de l'énergie à la YFP qui émet dans le jaune. Le ratio entre l'intensité de l'émission de la YFP et celle de la CFP permet de suivre en temps réel les changements en concentration de Ca^{+2} . Dans cette image du pharynx (partie antérieure en haut à droite) la couleur rouge indique des ratios importants, donc une haute concentration en Ca^{+2} , et la couleur bleue indique des ratios faibles, donc une faible concentration en Ca^{+2} . Ici, l'image montre la contraction du pharynx. Barre d'échelle : 20 μm . Figure adaptée de (Kerr et al. 2000).

2. Méthodes de transformation

Deux méthodes sont communément utilisées pour la transformation de *C. elegans*. La première, développée dans les années 80, est la microinjection de l'ADN exogène dans les gonades du nématode ; la deuxième, développée il y a une dizaine d'années, consiste à bombarder des milliers de vers avec des billes recouvertes d'ADN, méthode dite de bombardement ou *biolistique*. Ces deux techniques sont décrites plus en détail dans les paragraphes suivants.

2.1. Transformation par microinjection

La lignée germinale de *C. elegans* est syncytiale, c'est à dire que les noyaux des cellules germinales coexistent dans un cytoplasme commun dans les gonades distales de l'hermaphrodite (Lints et Hall 2009). Lorsque ces noyaux progressent le long du bras de la gonade, ils sont individuellement encapsulés par une membrane cellulaire pour former des ovocytes immatures. Ceux-ci avancent dans la gonade en même temps que leur maturation a lieu, puis les ovocytes matures passent à travers la spermathèque où ils sont fécondés (Figure 10 A, B).

La transformation par microinjection consiste à injecter l'ADN exogène dans le syncytium des gonades distales (Stinchcomb et al. 1985; Mello et al. 1991). L'ADN exogène ainsi introduit dans le syncytium est encapsulé avec les noyaux des cellules germinales et se retrouve donc dans les ovocytes puis dans les oeufs (Figure 10 C).

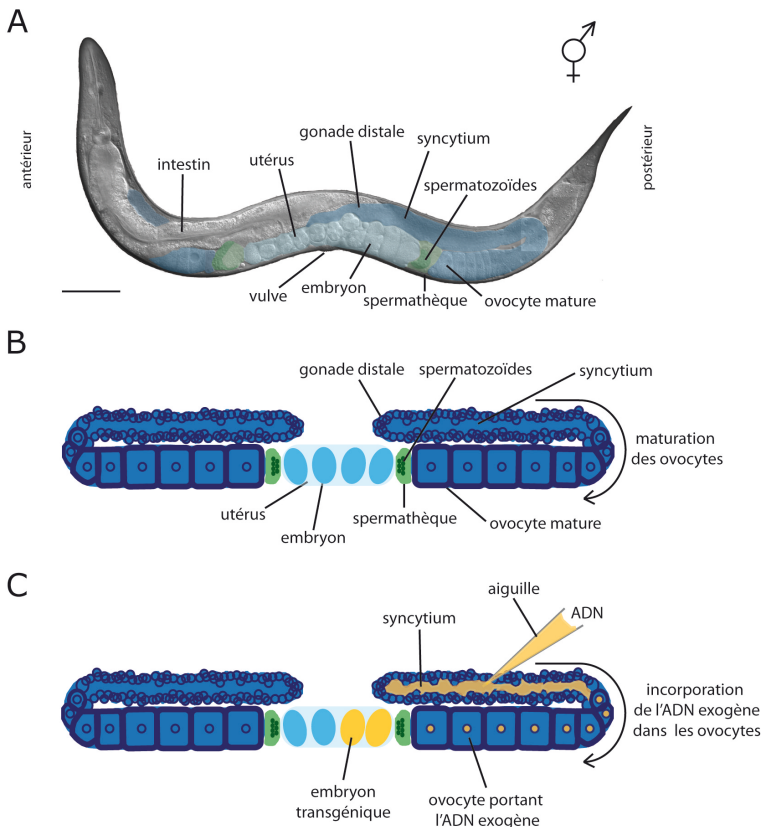


Figure 10 : Transgénèse de *C. elegans* par microinjection dans la gonade distale. **A** Image Nomarski d'un ver adulte hermaphrodite. L'appareil reproducteur de *C. elegans* comporte deux gonades symétriques qui ont comme axe de symétrie l'utérus et la vulve. Ici, la gonade antérieure passe derrière l'intestin. Les couleurs superposées à l'image démarquent les différentes parties des gonades et l'utérus. **B** Schéma simplifié des deux gonades symétriques et de l'utérus. **C** Schéma de la transgénèse par microinjection. L'ADN injecté dans le syncytium est encapsulé dans les ovocytes. Les ovocytes portant l'ADN exogène sont fécondés dans la spermathèque donnant lieu à des embryons transgéniques. Barre d'échelle : 50 μ m.

Le devenir de l'ADN une fois injecté dans les gonades syncytiales n'est pas à ce jour complètement élucidé. Le mécanisme proposé par Y. Jin est le suivant (Jin 1999) : l'ADN injecté dans les gonades du parent P_0 se retrouve dans seulement une partie des cellules des animaux de la première génération (F_1). Ce profil mosaïque résulte d'une répartition aléatoire de l'ADN exogène entre les cellules des embryons F_1 . Dans une fraction de cette progéniture, l'ADN injecté est réarrangé en tandem par un processus dit de concatémérisation, formant des molécules de haut poids moléculaire appelées concatémères extrachromosomiques. La formation de ces molécules résulte de réactions de coupure et de ligation qui feraient intervenir des mécanismes de recombinaison homologue entre les différents fragments d'ADN (Mello et al. 1991). Ces molécules sont donc formées d'un grand nombre de copies du transgène injecté, estimées entre 80 et 300 copies par D.T. Stinchcomb et collaborateurs (Stinchcomb et al. 1985) et entre 110 et 165 copies par C. Mello et collaborateurs (Mello et al. 1991). Les concatémères se comportent comme des chromosomes qui peuvent être répliqués et ségrégués durant les

divisions cellulaires ; en effet, les chromosomes de *C. elegans* sont holocentriques, c'est à dire qu'ils n'ont pas de centromère spécialisé et toute leur longueur semble pouvoir servir de point d'attachement au fuseau mitotique (Albertson et al. 1997). Les concatémères de taille supérieure à 700 kb peuvent donc être transmis efficacement à la descendance. Ainsi, lorsque un concatémère extrachromosomique de taille suffisante est formé dans la lignée germinale d'un F₁, il est transmis à sa descendance (F₂) et aux générations successives, donnant lieu ainsi à une lignée transgénique (Figure 11). Les concatémères extrachromosomiques se forment de manière indépendante entre les différents F₁, chaque F₁ donne lieu à une lignée unique. En effet, il a été montré que les concatémères extrachromosomiques de différentes lignées issues du même ver injecté ont des profils différents en Southern Blot (Mello et al. 1991).

La présence de séquences de *C. elegans* dans l'ADN injecté n'est pas nécessaire à la formation des concatémères extrachromosomiques. Ces molécules peuvent se former à partir de plasmides bactériens ne contenant aucune séquence propre au ver (Stinchcomb et al. 1985). De même, l'ADN injecté peut être circulaire ou linéaire (Mello et al. 1991). Il est possible d'injecter des plasmides (Stinchcomb et al. 1985; Mello et al. 1991), des fosmidés ou cosmides (Fire et Waterston 1989) et des produits PCR (Hobert 2002). Il est aussi possible d'injecter de l'ADN génomique du ver (Kelly et al. 1997). La seule condition pour qu'il y ait formation d'une molécule extrachromosomique stable semble être la concentration de la solution d'ADN injectée. Des concentrations inférieures à 100 µg/ml aboutissent plus rarement à la formation de molécules suffisamment grandes pour qu'elles soient stables (Mello et al. 1991).

Malgré la forte stabilité des concatémères extrachromosomiques qui donne lieu à des lignées transgéniques, ces chromosomes artificiels peuvent être perdus pendant les mitoses, donnant lieu à des animaux mosaïques et à une hérédité non mendélienne des transgènes (Mello et al. 1991). En effet, les taux de transmissions des ADN exogènes peuvent varier entre 10 et 90 %. D. Hirsh et collaborateurs calculèrent qu'il y aurait en moyenne 5 % de probabilité de perte du concatémère extrachromosomique par division cellulaire (Hirsh et al. 1985), mais cette probabilité varie certainement en fonction de la lignée.

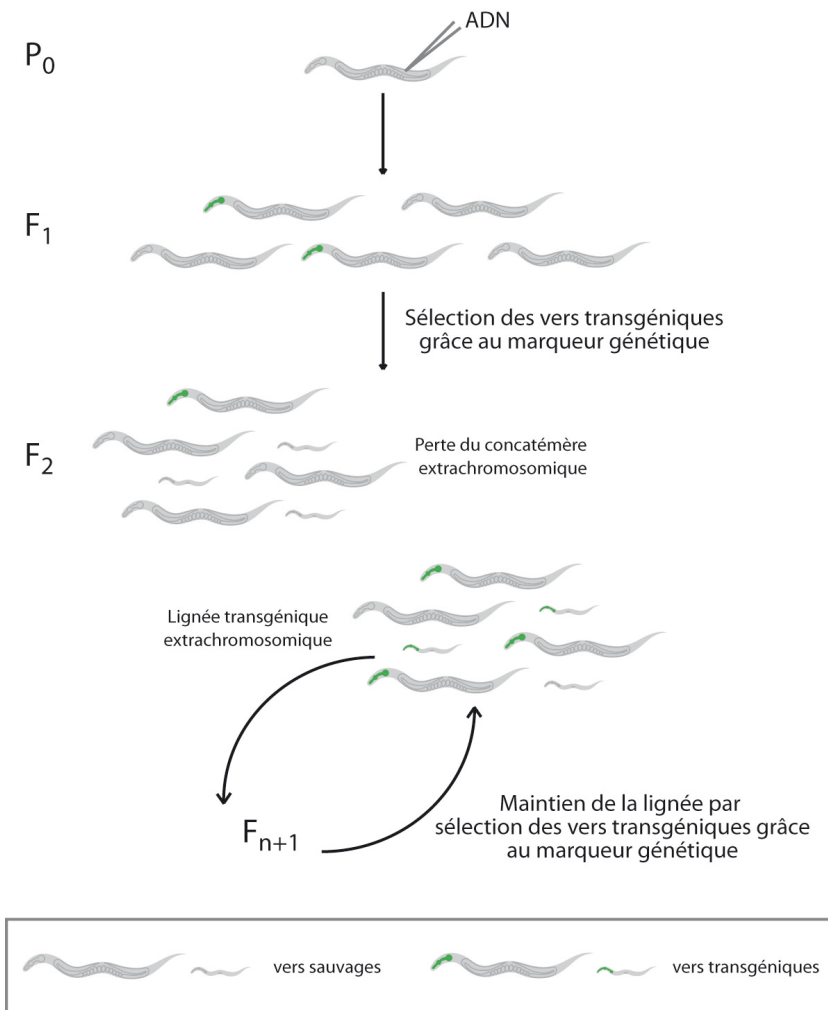


Figure 11 : Génération de lignées transgéniques extrachromosomiques par microinjection. Après injection des P₀, les F₁ transgéniques portant l'ADN exogène sont sélectionnés grâce au marqueur de transgénèse (ou marqueur génétique) et isolés dans des nouvelles boîtes. Leur descendance est criblée pour rechercher des F₂ exprimant le marqueur de transgénèse. Lorsque le concatémère extrachromosomique porté par le F₁ est de taille suffisante et se transmet à la F₂, il est transmis aux générations suivantes donnant lieu à une lignée transgénique extrachromosomique. Les marqueurs de transgénèse sont nécessaires à l'identification des vers transgéniques et au maintien des lignées.

Après microinjection dans le syncytium des gonades distales, l'intégration spontanée de l'ADN exogène dans les chromosomes est très rare ; C. Mello et collaborateurs reportèrent un événement d'intégration sur 400 lignées transgéniques obtenues (Mello et al. 1991). Cependant, il est possible d'obtenir des lignées intégrées en injectant l'ADN exogène directement dans le noyau des ovocytes déjà encapsulés (Fire 1986). Cette variante de la microinjection, combinée à l'injection de séquences toxiques pour le ver, entraîne la formation de concatémères extrachromosomiques de faible poids moléculaire (10 à 20 copies du transgène) et à l'intégration de quelques copies du transgène (1 à 10 copies) dans le génome. L'intégration se fait de manière aléatoire et ne semble pas suivre des mécanismes de recombinaison homologue. Malgré l'obtention de lignées intégrées, la méthode est techniquement difficile et les lignées sont obtenues à de très faibles fréquences. A. Fire rapporta l'obtention d'une lignée intégrée à partir de 50 à 100 vers injectés, en injectant 10 à 20 noyaux d'ovocyte par ver (Fire 1986). Compte tenu de cette difficulté, la méthode n'a pas connu un franc succès.

2.2. Transformation par bombardement

Une autre méthode pour l'obtention de *C. elegans* transgéniques est le bombardement ou *biolistique* (Wilm et al. 1999; Praitis et al. 2001), technique originellement développée pour la transformation de cellules végétales (Klein et al. 1987). Grâce à l'utilisation de canons à ADN (Figure 12 A), des populations de plus de 100000 vers jeunes adultes sont littéralement bombardées avec des microbilles de 1,5 à 3 µm de diamètre, en or ou en tungstène, enrobées d'ADN exogène.

Les premiers à développer la technique furent T. Wilm et P. Jackstadt et collaborateurs (Jackstadt et al. 1999; Wilm et al. 1999). Ces deux groupes utilisèrent des marqueurs visuels pour l'identification des F₁ transgéniques dans la génération suivant le bombardement, comme *rol-6(su1006)*, qui confère aux vers transgéniques un défaut locomoteur les faisant tourner autour de leur axe longitudinal dans le sens des aiguilles d'une montre (Wilm et al. 1999) et un marqueur fluorescent, *C.e p_{act-1}::gfp*, qui confère une forte expression de la GFP dans une grande partie des cellules du ver (Jackstadt et al. 1999). Or, l'identification visuelle des vers transgéniques parmi les milliers de F₁ issus des vers bombardés s'est avérée une étape compliquée en raison de la difficulté à manipuler un très grand nombre de vers. T. Wilm et collaborateurs montrèrent que, en effet, un marqueur de transgénèse sélectif tel le sauvetage de la mutation *pha-1(e2123ts)* létale à 25°C, par le gène sauvage *pha-1*, était plus adapté et plus efficace que les marqueurs visuels (Wilm et al. 1999). Plus tard, V. Praitis et collaborateurs développèrent un nouveau protocole de sélection des vers transgéniques après bombardement basé sur le sauvetage par le gène sauvage du phénotype causé par la mutation *unc-119(ed3)* (Praitis et al. 2001). Les animaux portant l'allèle *unc-119(ed3)* ont un défaut locomoteur (phénotype Unc) et ne sont pas capables de rentrer au stade *Dauer* dans des conditions de stress (Maduro et Pilgrim 1995). Ces caractéristiques font que dans des conditions de surpopulation et d'épuisement des sources de nourriture (bactéries), ces vers sont incapables de survivre. Ainsi, dans le contexte du bombardement, ce phénotype permet d'éliminer les F₁ non transformés et de sélectionner les vers transgéniques après épuisement des ressources alimentaires, en repérant les vers au stade *Dauer* ayant une locomotion de type sauvage. Ce dernier protocole est devenu le protocole de référence pour la transformation par bombardement de *C. elegans*.

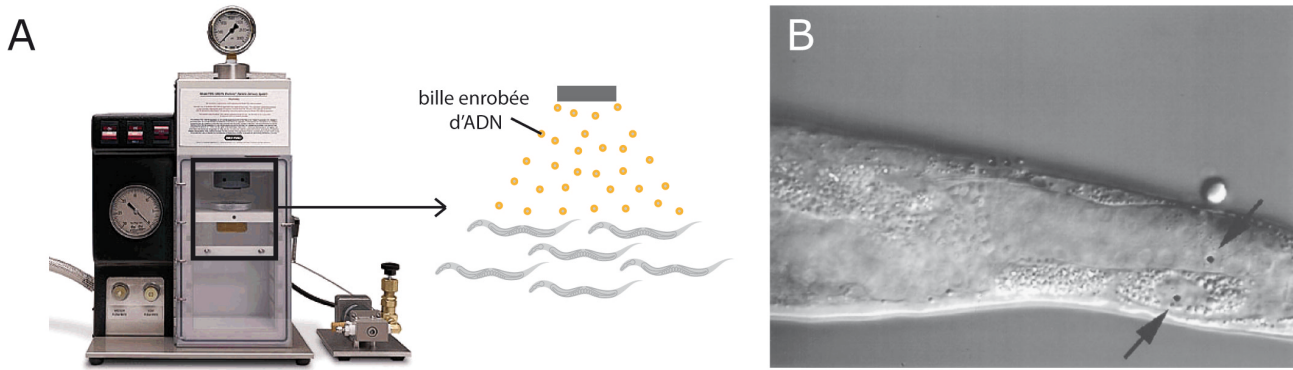


Figure 12 : Transgénèse de *C. elegans* par bombardement. **A** Canon à billes commercial (Bio-Rad) couramment utilisé pour le bombardement de nématodes. **B** Image Nomarski de la partie postérieure d'un ver hermaphrodite adulte bombardé. La flèche du haut indique une bille ayant pénétré la gonade postérieure. La flèche du bas indique une bille ayant pénétré l'intestin. Image adaptée de (Wilm et al. 1999).

Les lignées transgéniques obtenues par bombardement possèdent aussi des concatémères extrachromosomiques (Wilm et al. 1999; Praitis et al. 2001), cependant ces concatémères possèdent moins de copies du transgène que ceux obtenus par microinjection (Praitis et al. 2001). L'intégration d'un faible nombre de copies du transgène dans le génome est observée dans 1/3 à 1/8 des lignées obtenues (Praitis et al. 2001; Berezikov et al. 2004; Reece-Hoyes et al. 2007). Comme pour les intégrations obtenues par microinjection dans les noyaux des ovocytes, l'intégration est aléatoire et ne semble pas dépendre d'un mécanisme de recombinaison homologue (Praitis et al. 2001). L'intégration par recombinaison homologue a été reportée dans une seule étude réalisée par E. Berezikov et collègues (Berezikov et al. 2004). Dans leur étude, le vecteur bombardé contenait le gène sauvage *unc-119* flanqué de deux régions de ~ 2,2 kilos de paires de bases homologues aux régions génomiques de part et d'autre des parties 3' terminales des gènes *unc-54* ou *unc-22*. Ils ont observé que, parmi les 674 lignées obtenues après bombardement avec ces vecteurs (lignées extrachromosomiques et lignées intégrées confondues), quatre lignées présentaient un phénotype Unc, conséquence directe de la délétion de la partie 3' terminale des gènes *unc-54* ou *unc-22* par recombinaison homologue avec les vecteurs bombardés. Basés sur ces données, Berezikov et collègues affirmèrent que 0,7 à 7,5 % des lignées intégrées obtenues par bombardement serait donc des événements de recombinaison homologue (Berezikov et al. 2004). Ces chiffres prouvent que la fréquence d'obtention d'un événement d'intégration par recombinaison homologue chez *C. elegans* est très faible.

Le mécanisme par lequel les vers sont transformés lors du bombardement n'est pas connu à ce jour. L'ADN doit certainement atteindre les gonades distales ou les noyaux

des ovocytes lorsque les microbilles pénètrent l'animal à ces endroits (Figure 12 B). L'observation au microscope de billes dans les noyaux des ovocytes pourrait expliquer l'obtention de lignées intégrées, mais il est impossible de suivre individuellement les dizaines de milliers de vers bombardés pour corréler la position des billes observées et le résultat de la transformation sur sa descendance.

2.3. Transformation micromécanique

Il existe une autre méthode pour la transformation de nématodes qui utilise la micromécanique (Hashmi et al. 1995; Hashmi et Gaugler 1997). Il s'agit de déposer une population de nématodes sur des microplateformes de 5 x 8 mm, recouvertes de pointes en silicone de moins de 1 µm de diamètre enrobées de l'ADN exogène. Lorsque les nématodes se déplacent à la surface de ces microplateformes, les pointes en silicone transperceraient la cuticule des vers et l'ADN exogène serait ainsi introduit dans les gonades. S. Hashmi et collaborateurs utilisèrent ces structures pour transformer le nématode *Heterorhabditis bacteriophora* (Hashmi et al. 1995) et proposèrent ce mécanisme pour la transformation de *C. elegans* (Hashmi et Gaugler 1997). Ces auteurs affirmèrent que ce traitement ne causa aucun dommage aux vers adultes et que 8 % des F₁ obtenus étaient transgéniques.

Malgré l'originalité de la technique et la facilité supposée de sa mise en place, cette méthode n'a connu aucun succès et il n'y a pas à ce jour des références bibliographiques confirmant la possibilité de transformation de *C. elegans* par ces microplateformes.

3. Marqueurs de transgénèse

Quelle que soit la technique de transformation de *C. elegans*, il est nécessaire de gérer trois étapes lors de l'établissement et l'analyse de lignées transgéniques (Figure 11). La première est l'identification des vers transgéniques parmi la progéniture F₁ (obtention). La deuxième est la maintenance des lignées portant des concatémères extrachromosomiques ; le taux de transmission de ces lignées étant inférieur à 100 %, il est nécessaire de sélectionner les vers transgéniques à chaque génération (maintenance). Finalement, il est nécessaire pour certaines expériences d'obtenir un très grand nombre de vers transgéniques (enrichissement).

Pour répondre à ces besoins, les techniques de transgénèse utilisent des marqueurs génétiques, aussi appelés marqueurs de transgénèse, qui permettent d'identifier ou de sélectionner les vers transgéniques parmi une population de vers sauvages. Dans le cas de la microinjection, les marqueurs de transgénèse sont co-injectés avec l'ADN exogène d'intérêt. Les ADNs injectés contribuent à la formation du concatémère extrachromosomique dans des proportions relatives à leur concentration dans le mélange d'injection (Mello et al. 1991). Dans le cas de la transformation par bombardement, le transgène et le marqueur de transgénèse sont souvent portés par le même vecteur (Praitis et al. 2001). En effet, dans le cas du bombardement, la co-transformation avec deux vecteurs indépendants n'est pas efficace à 100 % (Wilm et al. 1999).

Les marqueurs génétiques pour la transgénèse de *C. elegans* peuvent être classés en trois catégories. La première est le sauvetage par complémentation génique d'un phénotype causé par une mutation non létale. La deuxième catégorie regroupe les marqueurs qui confèrent un phénotype dominant facilement repérable. Finalement, dans la troisième catégorie on trouve les gènes codant pour des protéines fluorescentes. Des exemples de marqueurs de ces trois catégories sont développés ci-dessous.

3.1. Sauvetage d'un phénotype par compensation génique

3.1.a. Suppresseur d'ambre *sup-7(st5)*

Le marqueur *sup-7(st5)* fut le premier marqueur génétique à avoir été développé pour la transgénèse de *C. elegans* (Fire 1986). Il contient une mutation supresseur d'ambre dans l'ARN de transfert (tRNA) *sup-7*, qui supprime le phénotype causé par la mutation ambre du gène *tra-3*. La lignée contenant l'allèle ambre *tra-3(e1107)* est partiellement masculinisée et lorsqu'elle est homozygote, elle est stérile à des températures supérieures à 20°C (Hodgkin et Brenner 1977). Ce phénotype peut être sauvé par un effet maternel, ce qui signifie que les vers homozygotes issus d'une mère hétérozygote *tra-3(e1107)/tra-3⁺* sont fertiles à 20°C. De la même manière, l'expression du supresseur d'ambre *sup-7(st5)* dans la mère peut sauver le phénotype de sa progéniture (Hodgkin 1985). Ainsi, dans le cadre de la transgénèse, des vers *tra-3(e1107)* homozygotes, fertiles à 20°C car sauvés par effet maternel, sont injectés avec *sup-7(st5)* ; les vers transgéniques des générations suivant l'injection sont sélectionnés à 20°C (Fire 1986).

Il a été montré qu'un grand nombre de copies du gène *sup-7(st5)* est toxique pour le ver (Waterston 1981). Lors de la transgénèse, cette toxicité entraînerait la sélection préférentielle de concatémères extrachromosomiques avec un faible nombre de copies du transgène (Fire 1986; Mello et al. 1991). De même, ce marqueur combiné à l'injection dans les noyaux des ovocytes développée par A. Fire, favoriserait l'intégration aléatoire d'un faible nombre de copies du transgène dans le génome (Fire 1986).

Le marqueur *sup-7(st5)* présente quelques limites. D'une part, il nécessite la production de vers *tra-3(e1107)* homozygotes sauvés par effet maternel. Pour cela il est nécessaire de maintenir une lignée *tra-3(e1107)/tra-3⁺* d'hermaphrodites fertiles qui produise les vers *tra-3(e1107)* homozygotes (Fire 1986). D'autre part, la sélection des vers transgéniques ne se fait que à partir de la génération F₃ suivant l'injection (Fire 1986). En effet, il n'est pas possible de différencier les F₁ transgéniques des F₁ sauvés par effet maternel suite à une expression partielle du transgène dans les gonades du P₀ injecté (tous les deux fertiles à 20°C). De la même manière, il n'est pas possible de différencier les F₂ transgéniques des F₂ sauvés par effet maternel à partir d'un F₁ ayant perdu le transgène (tous les deux fertiles à 20°C). La sélection des lignées transgéniques se fait donc seulement après plusieurs générations à 20°C. Finalement, le marqueur n'est pas adapté à la transformation par microinjection dans le syncytium des gonades distales (Fire 1986), probablement dû à sa toxicité lorsqu'il est présent en grand nombre de copies, ce qui empêcherait la formation de concatémères extrachromosomiques stables.

3.1.b. *dpy-5* et *dpy-20* : sauvetage du phénotype Dumpy

Les gènes *dpy-5* et *dpy-20* codent pour des protéines participant à la formation de la cuticule (Clark et al. 1995; Thacker et al. 2006). Les mutations dans l'un ou l'autre de ces deux gènes provoquent un changement dans la morphologie du ver qui les rend plus petits et courtauds (Figure 13 A). Ce phénotype est appelé Dumpy (Dpy) (*dumpy* signifie «trapu» en anglais).

La lignée *dpy-20(e1282ts)* a un phénotype Dpy à 22,5°C (Clark et al. 1995) qui peut être sauvé par le gène sauvage *dpy-20* (Han et Sternberg 1991). Les vers transgéniques ont une morphologie sauvage, mais certains peuvent être plus longs à cause de la surexpression du gène sauvage. De la même manière, le phénotype Dpy de la lignée *dpy-5(e907)* est sauvé par le gène sauvage *dpy-5* (Thacker et al. 2006).

Les gènes *dpy-5* et *dpy-20* sont donc utilisés comme des marqueurs de transgénèse. Ils permettent l'identification visuelle des vers transgéniques dès la

génération F₁. Cependant, certains rapports indiquent que ces marqueurs semblent pouvoir avoir des effets modificateurs sur l'expression de l'ADN co-injecté (Jin 1999).

3.1.c. *lin-15* : sauvetage du phénotype Multivulva

Le gène *lin-15* code pour deux protéines de l'hypoderme qui interviennent dans la formation de la vulve (Clark et al. 1994). Les vers mutants *lin-15(n765ts)* ont un phénotype sauvage à 15°C, mais à des températures supérieures à 22,5°C ils présentent un excès de différenciation vulvaire, appelé phénotype Multivulva (Muv) (Figure 13 B).

Dans le contexte de la transgénèse, les vers *lin-15(n765ts)* sont amplifiés à 15°C. Puis, après transformation avec le gène sauvage, les vers sont cultivés à des températures supérieures à 22,5°C. Comme les vers mutants sont malades à ces températures et leur population se développe plus lentement que les populations sauvages, les vers transgéniques sont ainsi partiellement sélectionnés. Les vers transgéniques ainsi obtenus peuvent aussi être identifiés visuellement par l'absence du phénotype Muv, et ceci à partir de la génération F₁.

Le marqueur *lin-15* n'est pas adapté à l'étude du système nerveux du ver puisqu'il a été constaté que sa surexpression entraîne des défauts dans le développement neuronal (Jin 1999).

3.1.d. *unc-119* : sauvetage du phénotype Uncoordinated et Dauer formation-defective

Le gène *unc-119* code pour une protéine qui intervient dans le développement du système nerveux de *C. elegans* (Maduro et Pilgrim 1995). Les vers mutants *unc-119(ed3)* présentent un défaut locomoteur (phénotype Unc) et ne survivent pas en conditions de privation alimentaire car ils ne sont pas capables d'entrer en stade *Dauer* dans des conditions de stress (phénotype Daf-d, pour *Dauer formation-defective*) (Maduro et Pilgrim 1995) (Figure 13 C). Ces mutants, transformés avec le gène *unc-119* retrouvent un phénotype locomoteur sauvage et sont capables de survivre en absence de nourriture en passant au stade *Dauer* (Maduro et Pilgrim 1995).

Le marqueur *unc-119* apporte donc un système de sélection adapté à la méthode de bombardement. Cependant, le processus est long puisqu'il nécessite l'amplification des populations de vers mutants qui se développent lentement et l'épuisement du tapis bactérien pour l'élimination des mutants non-transgéniques incapables de rentrer en phase *Dauer*. Une autre utilisation du marqueur est l'identification des vers transgéniques

de manière visuelle grâce à leur mode de locomotion sauvage qui les distingue des vers *Unc*. De cette manière, les vers transgéniques peuvent directement être identifiés dans la génération F₁ suivant la transformation.

Le sauvetage du phénotype *Unc* est principalement utilisé pour la sélection des vers transgéniques après bombardement (Praitis et al. 2001). En revanche, son utilisation pour la microinjection est plus limitée, puisque les vers *unc-119(ed3)* sont de plus petite taille que les vers sauvages et sont donc plus difficiles à injecter. Les vers *unc-119(ed3)* ont aussi l'inconvénient de se propager plus lentement que les vers sauvages.

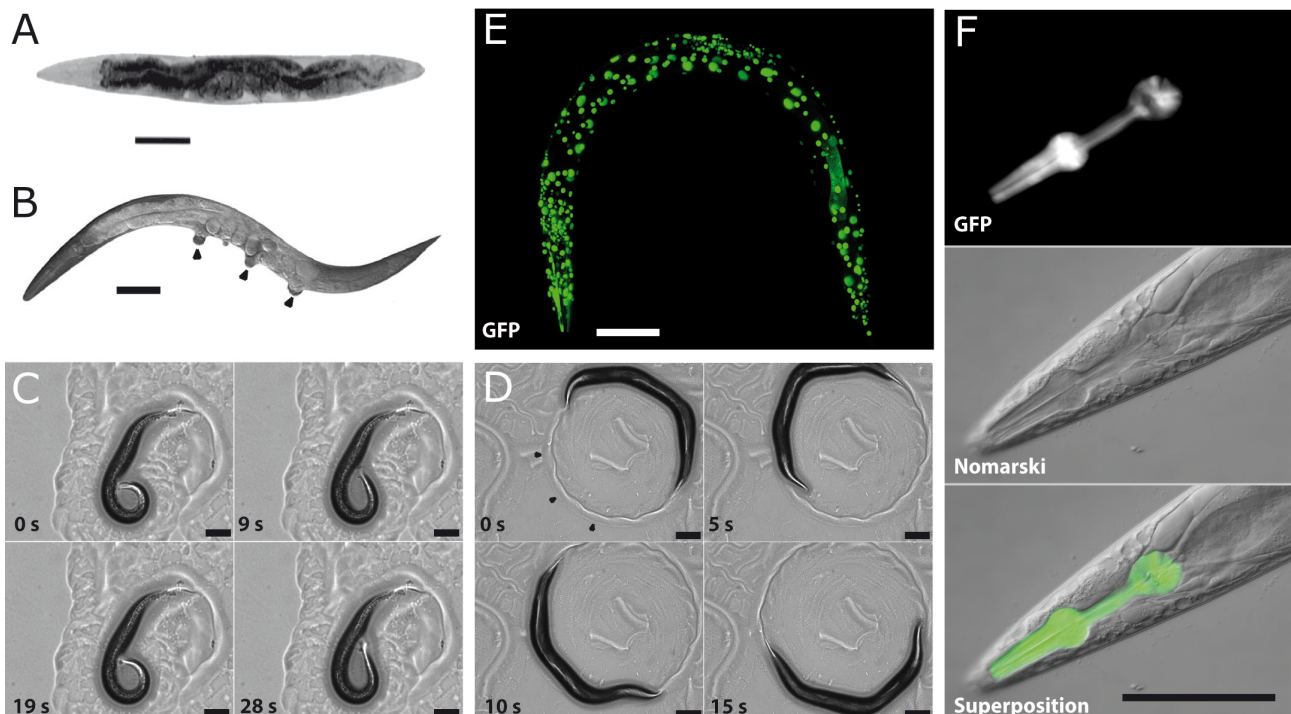


Figure 13 : Exemples de marqueurs génétiques pour la transgénèse de *C. elegans*. **A** Image en fond clair d'un ver mutant *Dumpy*. Adapté de (Flemming et al. 2000). **B** Image Nomarski d'un ver mutant *Multivulva*. Les flèches noires indiquent les excès de différenciation vulvaire. Adapté de (Cui et Han 2007). **C** Images en fond clair au cours du temps d'un ver mutant *Uncoordinated*. Le temps est indiqué en secondes. **D** Images en fond clair au cours du temps d'un ver transgénique *Roller*. Le temps est indiqué en secondes. Les flèches noires montrent la trace laissée par le ver sur le tapis de bactéries. Cette trace est caractéristique du déplacement des vers *Roller*. **E** Image en fluorescence d'un ver transgénique portant le transgène *sur::gfp*. La partie antérieure du ver est à gauche, la partie dorsale en haut. Ce ver exprime la GFP dans les noyaux cellulaires. Adapté de The Chin-Sang lab website (<http://130.15.90.245/>). **F** Images en fluorescence et en Nomarski de la tête d'un ver transgénique portant le transgène *myo-2::gfp*. Ce ver exprime la GFP dans les muscles du pharynx. Barre d'échelle: 100 µm.

3.1.e. *pha-1* : sauvetage du phénotype *Lethal*

Le gène *pha-1* code pour un facteur de transcription exprimé dans le pharynx du ver qui participe à la différenciation et à la morphogenèse de cet organe (Granato et al.

1994). Les vers mutants *pha-1(e2123ts)* se développent et se multiplient normalement à 15-20°C, mais à 25°C cette mutation est 100 % létale pour l'embryon (phénotype *Lethal*, *Let*).

Dans le cadre de la transgénèse, des vers *pha-1(e2123ts)* sont injectés avec le gène sauvage et les F₁ sont mis à 25°C (Granato et al. 1994). À cette température, seuls les vers transgéniques survivent et sont capables de se multiplier, permettant ainsi la sélection des animaux transgéniques dès les premières générations suivant l'injection. Les lignées transgéniques obtenues avec ce marqueur sont facilement maintenues à 25°C, puisque les vers ayant perdu le transgène sont éliminés au stade de l'embryon. Ce marqueur permet ainsi d'obtenir des grandes populations de vers transgéniques sans avoir besoin de sélectionner les vers manuellement. Cependant ceci n'est valable que pour les transgènes qui ne sont pas sensibles à cette température.

3.2. Marqueurs conférant des phénotypes dominants

3.2.a. L'ADN antisens de *unc-22* confère un phénotype Twitcher

Le gène *unc-22* code pour une protéine musculaire, appelée *twitchin*, qui participe à la contraction musculaire et à la maintenance d'une morphologie normale des cellules musculaires (Fire et al. 1991). Des vers sauvages transformés avec des vecteurs portant la séquence complémentaire de ce gène (ADN antisens) sous un promoteur spécifique des cellules musculaires, présentent un phénotype équivalent à la perte de fonction du gène (Fire et al. 1991). Ce phénotype se caractérise par des convulsions (phénotype Twitcher), une mobilité réduite (*Unc*) et un défaut de ponte (phénotype Egg-Lying Defective, *Egl*). Les convulsions peuvent être amplifiées en présence de 1 mM de nicotine. Le phénotype est visible dès les premiers stades larvaires et tout le long de la vie du ver.

Cependant ce marqueur a des nombreux inconvénients (Jin 1999). Tout d'abord, le phénotype peut être subtil, difficile à identifier et peut être annulé dans certains contextes génétiques. Deuxièmement, le marqueur ne peut pas être utilisé pour des études de comportement ou de locomotion à cause des phénotypes *Unc* et Twitcher. Troisièmement, les mâles portant ce marqueur ont une efficacité d'accouplement réduite due à la perte de mobilité. Finalement, les vers transgéniques ainsi obtenus sont relativement malades comparés aux vers ayant perdu le transgène, ce qui implique une sélection manuelle pour le maintien des lignées.

3.2.b. *rol-6(su1006)* confère un phénotype Roller

Le gène *rol-6* code pour une protéine collagène nécessaire à la formation de la cuticule du ver (Kramer et al. 1990). Chez les vers portant la mutation gain de fonction *rol-6(su1006)*, la cuticule est anormalement tournée en hélice et les vers tournent sur leur axe longitudinal, provoquant un déplacement circulaire (phénotype Roller, Rol) (Kramer et al. 1990) (Figure 13 D). Cette mutation gain de fonction est utilisée comme marqueur de transgénèse car les vers Rol sont très facilement identifiables (Mello et al. 1991). Cependant, le gène *rol-6* ne s'exprimant qu'à partir du stade L2, le phénotype Rol n'est identifié que chez les vers transgéniques ayant dépassé ce stade larvaire.

Le marqueur *rol-6(su1006)* présente aussi quelques inconvénients (Jin 1999). Premièrement, le phénotype Rol est supprimé dans certains contextes génétiques, comme par exemple des mutations causant des phénotypes Dpy ou Unc. Deuxièmement, dû à la morphologie en hélice du ver, il est plus difficile d'identifier les cellules et d'analyser de lignage cellulaire chez les larves. Troisièmement, le phénotype Rol n'est pas compatible avec des études de comportement et de locomotion. Quatrièmement, l'efficacité d'accouplement des mâles est également réduite. Finalement, les vers Rol se développent plus lentement que les vers avec un phénotype sauvage, ce qui implique la sélection manuelle des vers transgénique.

3.3. Gènes codant pour des protéines fluorescentes

Les fusions de gènes au profil d'expression connu avec des protéines fluorescentes sont aussi utilisées comme marqueur de transgénèse. De préférence, ce sont les gènes ayant une forte expression dans un grand nombre de cellules et tout au long de la vie du ver qui sont utilisés. Quelques exemples des marqueurs fluorescents les plus utilisés sont *sur-5::gfp*, qui s'exprime dans les noyaux de la plupart des cellules (Yochem et al. 1998) et *myo-2::gfp*, qui s'exprime dans le pharynx (Thatcher et al. 1999) (Figure 13 E, F).

L'utilisation de ces gènes comme marqueurs de transgénèse nécessite l'utilisation d'une loupe à épifluorescence pour l'identification des vers exprimant le marqueur. Ces marqueurs fluorescents ne confèrent aucun avantage sélectif aux vers transgéniques ; il est donc également nécessaire de sélectionner les vers manuellement pour maintenir les lignées. Finalement, ils ne sont pas adaptés pour l'étude de l'expression de gènes qui utilisent les mêmes protéines fluorescentes comme gène rapporteur.

Tous les marqueurs génétiques cités ci-dessus ont leurs propres avantages et inconvénients. Lors des expériences de transgénèse, le choix du marqueur se fait en général en fonction de l'étude dont les vers transgéniques font l'objet, de manière à ce que le contexte génétique de la lignée receveuse ou le phénotype conféré par le marqueur de transgénèse n'interfèrent pas avec celle-ci. La gamme de marqueurs génétiques disponibles offre un choix varié, ce qui permet l'application de la transgénèse à un large éventail d'études.

Cependant, la plupart de ces marqueurs ne confèrent pas d'avantage sélectif aux vers transgéniques. De ce fait, les lignées extrachromosomiques doivent être maintenues en repiquant des vers manuellement, pratique pouvant devenir lourde lorsque l'étude requiert un grand nombre de vers. Les marqueurs *pha-1* et *unc-119* donnent aux vers transgéniques un avantage sélectif ; cependant, la capacité de sélection de *pha-1* est limitée à une température spécifique et celle de *unc-119* n'a lieu que dans des conditions d'épuisement des ressources alimentaires. Ainsi, la plupart des lignées extrachromosomiques ne sont pas adaptées à des études nécessitant un grand nombre d'animaux, comme par exemple la purification de protéines (Polanowska et al. 2004). Les lignées extrachromosomiques ne sont pas non plus adaptées aux cribles de suppression du phénotype provoqué par le transgène, réalisées par mutagenèse. Pour ce type d'applications il est nécessaire de générer des lignées intégrées.

4. Génération de lignées transgéniques intégrées

L'obtention de lignées transgéniques intégrées non seulement prévient la perte du transgène mais permet aussi de pallier à d'autres inconvénients propres aux concatémères extrachromosomiques. Par exemple, l'intégration du transgène permet d'éviter le mosaïcisme (Mello et Fire 1995; Jin 1999).

Les lignées extrachromosomiques présentent aussi des inconvénients dus au caractère répétitif des concatémères. D'une part, le grand nombre de copies peut provoquer la surexpression du transgène dans les tissus somatiques, surexpression qui peut s'avérer toxique (Fire et Waterston 1989). A. Fire and R.H. Waterston observèrent que la lignée extrachromosomique portant un grand nombre de copies du gène *unc-54*, codant pour la protéine musculaire myosine, était malade et partiellement Unc dû à un

large excès de production de la protéine qui entraînait la déstructuration des filaments musculaires. En revanche, les lignées portant le transgène *unc-54* intégré dans le génome en faible nombre de copies, ne présentaient pas ce phénotype (Fire et Waterston 1989).

D'autre part, le caractère répétitif du concatémère entraîne la répression de l'expression du transgène dans la lignée germinale (Kelly et al. 1997; Kelly et Fire 1998). W. G. Kelly et collaborateurs montrèrent qu'une lignée portant un concatémère répétitif avec la fusion *let-858::gfp* n'exprimait pas la GFP dans la lignée germinale, alors que la protéine LET-858 était détectée par des anticorps anti-LET-858 dans les gonades des animaux sauvages (Kelly et al. 1997). Puis, ils construisirent des lignées portant des concatémères extrachromosomiques avec un faible nombre de copies du transgène, et ceci en injectant le transgène en très faible concentration mélangé à de l'ADN génomique digéré. Dans les lignées portant ces concatémères, appelés concatémères complexes (par opposition aux concatémères répétitifs), la répression de l'expression du transgène dans les gonades n'avait pas lieu. Ainsi, ils conclurent que la répression était due au grand nombre de copies du transgène dans les concatémères. Aujourd'hui, les concatémères complexes sont utilisés pour éviter la répression de l'expression du transgène dans la lignée germinale. Cependant, la création de ces concatémères ne résout qu'en partie le problème, puisque la répression dans les gonades peut s'établir même dans ces lignées au fur et à mesure des générations, jusqu'à la répression totale de l'expression du transgène (Kelly et al. 1997; Praitis et al. 2001). En revanche, l'intégration d'un faible nombre de copies du transgène dans le génome permet la création de lignées stables exprimant aussi le transgène dans la lignée germinale (Praitis et al. 2001).

L'intégration du transgène dans le génome permet donc de résoudre la plupart des inconvénients liés aux concatémères extrachromosomiques. Il est possible de créer des intégrations directement par microinjection (Fire 1986; Mello et al. 1991) et par bombardement (Praitis et al. 2001), ou encore, il est possible d'intégrer les concatémères extrachromosomiques dans le génome par mutagénèse (Mello et Fire 1995; Jin 1999). Ces techniques sont développées dans les paragraphes suivants.

4.1. Intégration du transgène par microinjection

Comme décrit dans le paragraphe «Méthodes de transformation, Transformation par microinjection», il est possible d'obtenir l'intégration du transgène en injectant celui-ci directement dans les ovocytes des vers (Fire 1986). Cette technique, combinée à

l'utilisation du marqueur *sup-7(st5)*, entraîne l'intégration d'un faible nombre de copies du transgène dans le génome. Malgré l'obtention de lignées transgéniques stables, cette méthode n'est pas couramment utilisée, certainement à cause des difficultés techniques qu'elle représente et son faible rendement.

C. Mello et collaborateurs développèrent une autre méthode d'intégration par microinjection (Mello et al. 1991). Cette méthode consiste à injecter dans le syncytium des gonades distales un mélange du transgène avec un excès d'oligonucléotides simple brin de 50 paires de bases. L'injection de ce mélange semble promouvoir l'intégration du transgène et ce indépendamment de la séquence de l'oligonucléotide. Comme pour les autres intégrations, celles-ci se font de manière aléatoire dans le génome. Les lignées transgéniques intégrées sont obtenues à une fréquence similaire à celle de l'intégration par injection dans les noyaux des ovocytes (Mello et al. 1991).

4.2. Intégration du transgène par bombardement

Actuellement, la méthode la plus populaire d'intégration du transgène dans le génome du ver est la transformation par bombardement. Comme décrit dans le paragraphe «Méthodes de transformation, Transformation par bombardement», cette méthode combinée à l'utilisation du marqueur génétique *unc-119* permet l'obtention de lignées intégrées portant un faible nombre de copies du transgène, pouvant aller jusqu'à une seule copie (Praitis et al. 2001). Cependant, dû au caractère aléatoire des intégrations, l'expression du transgène peut être affectée par des séquences génomiques situées près du site d'intégration ou encore un phénotype mutant peut être causé par l'intégration du transgène à un endroit particulier du génome.

4.3. Intégration du concatémère extrachromosomique dans le génome par mutagénèse

Il est aussi possible d'intégrer un concatémère extrachromosomique dans le génome du ver par mutagénèse (Mello et Fire 1995; Jin 1999). La méthode consiste à mutagéniser une lignée extrachromosomique avec des rayons X, des rayons γ , des rayons UV ou encore de l'EMS et à identifier ensuite les vers portant une intégration sur la base de la ségrégation des marqueurs génétiques. Le mécanisme d'intégration du concatémère n'est pas complètement connu. Il semblerait que le concatémère entier soit intégré de manière aléatoire dans le génome au niveau des cassures provoquées par les

agents mutagènes. Des points chauds d'insertion préférentielle ont été observés lors de l'intégration de certains transgènes (Jin 1999).

La plupart du temps, l'intégration des concatémères dans le génome permet de pallier au mosaïcisme et à la ségrégation non-mendélienne des concatémères extrachromosomiques. Cependant, comme le concatémère est apparemment intégré en entier, le nombre de copies du transgène reste élevé. De plus, l'intégration dans le génome peut provoquer des changements dans l'expression du transgène, pouvant aller jusqu'à la répression totale de son expression (Jin 1999). Il arrive aussi qu'un phénotype mutant soit associé à l'intégration du concatémère suite à l'intégration de celui-ci à un endroit particulier du génome, ou à des mutations causées par la mutagenèse elle-même à d'autres endroits du génome ; de ce fait, les lignées intégrées doivent être croisées plusieurs fois avec des animaux sauvages pour éliminer ces mutations. Finalement, des variations de l'expression de transgènes chez les lignées intégrées ont été observées après plusieurs passages suivant l'intégration (Jin 1999; Hammarlund et al. 2007).

Les techniques d'intégration du transgène présentées ci-dessus permettent de pallier à la plupart des inconvénients intrinsèques des concatémères extrachromosomiques. Cependant, ces méthodes ne permettent pas de contrôler l'endroit du génome où l'insertion a lieu, ni le nombre de copies du transgène intégrées. D'une part, le remplacement d'un gène par recombinaison homologue étant très rare chez *C. elegans* (Broverman et al. 1993; Berezikov et al. 2004), les intégrations par microinjection et par bombardement restent des intégrations aléatoires dont le mécanisme est méconnu. D'autre part, même s'il est possible d'intégrer une seule copie du transgène par bombardement (Praitis et al. 2001), les paramètres pouvant contrôler le nombre de copies intégrées n'ont pas été identifiés et l'intégration d'une seule copie du transgène semble avoir lieu à une fréquence relativement faible, estimée à une insertion d'une seule copie du transgène sur 22 lignées intégrées (Praitis et al. 2001).

Récemment, des nouvelles techniques d'ingénierie du génome du ver ont été développées qui permettent l'insertion d'une seule copie du transgène à un endroit précis du génome (Barrett et al. 2004; Robert et Bessereau 2007; Frokjaer-Jensen et al. 2008). Grâce à ces technologies il est désormais possible d'étudier l'expression des transgènes présents en une seule copie, à des niveaux d'expression physiologiques.

5. Insertion d'une copie unique du transgène dans le génome de *C. elegans*

L'insertion d'une seule copie du transgène dans le génome du ver a été récemment développée grâce à des techniques basées sur l'utilisation de transposons. Les transposons sont des séquences d'ADN capables de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans le génome.

5.1. Les transposons de la famille *Tc1/mariner* chez *C. elegans*

La famille des *Tc1/mariner* regroupe tous les transposons homologues au transposon *Tc1* endogène de *C. elegans* et au transposon *mariner* endogène de *D. mauritiana* (Plasterk et al. 1999). Ces transposons sont les plus répandus dans la nature ; ils se trouvent chez les champignons, les plantes, les ciliés et différents animaux parmi lesquels on trouve les nématodes. Ces transposons sont composés de 1300 à 2400 paires de bases ; ils contiennent des répétitions inverses situées à leurs extrémités qui encadrent une phase de lecture codant pour l'enzyme transposase, nécessaire et suffisante à l'excision et à la réinsertion du transposon dans le génome, ou transposition.

Les transposons de la famille *Tc1/mariner* se transposent par un mécanisme dit de «couper-coller», laissant derrière eux une cassure double brin de l'ADN (Plasterk et al. 1999). La transposase excise le transposon au niveau des répétitions inverses situées à ses extrémités et l'intègre ailleurs dans le génome au niveau d'un dinucléotide TA. Au point d'excision, la cassure double brin de l'ADN est réparée soit simplement en rejoignant les bouts cassés (*Non-homologous end-joining*), soit par recombinaison homologue (Haber 2000; Kass et Jasin 2010) par des mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN conservés chez tous les eucaryotes. La première étape de la réparation par recombinaison homologue est la dégradation des bouts d'ADN cassés par une exonucléase 5'-3' qui expose l'ADN simple brin en 3' à la recherche de séquences homologues. Dans certains cas, l'ADN simple brin envahit une séquence homologue appelée «donneur» qui joue le rôle d'amorce pour la synthèse du brin complémentaire. La séquence «donneur» peut être la chromatide-soeur, un chromosome homologue ou encore une séquence ectopique, comme par exemple un transgène. La synthèse à partir de la séquence homologue peut aboutir à un transfert non-réciproque de la séquence de

l'ADN «donneur» à l'allèle cassé «receveur», mécanisme connu sous le nom de conversion génique (Figure 14 A).

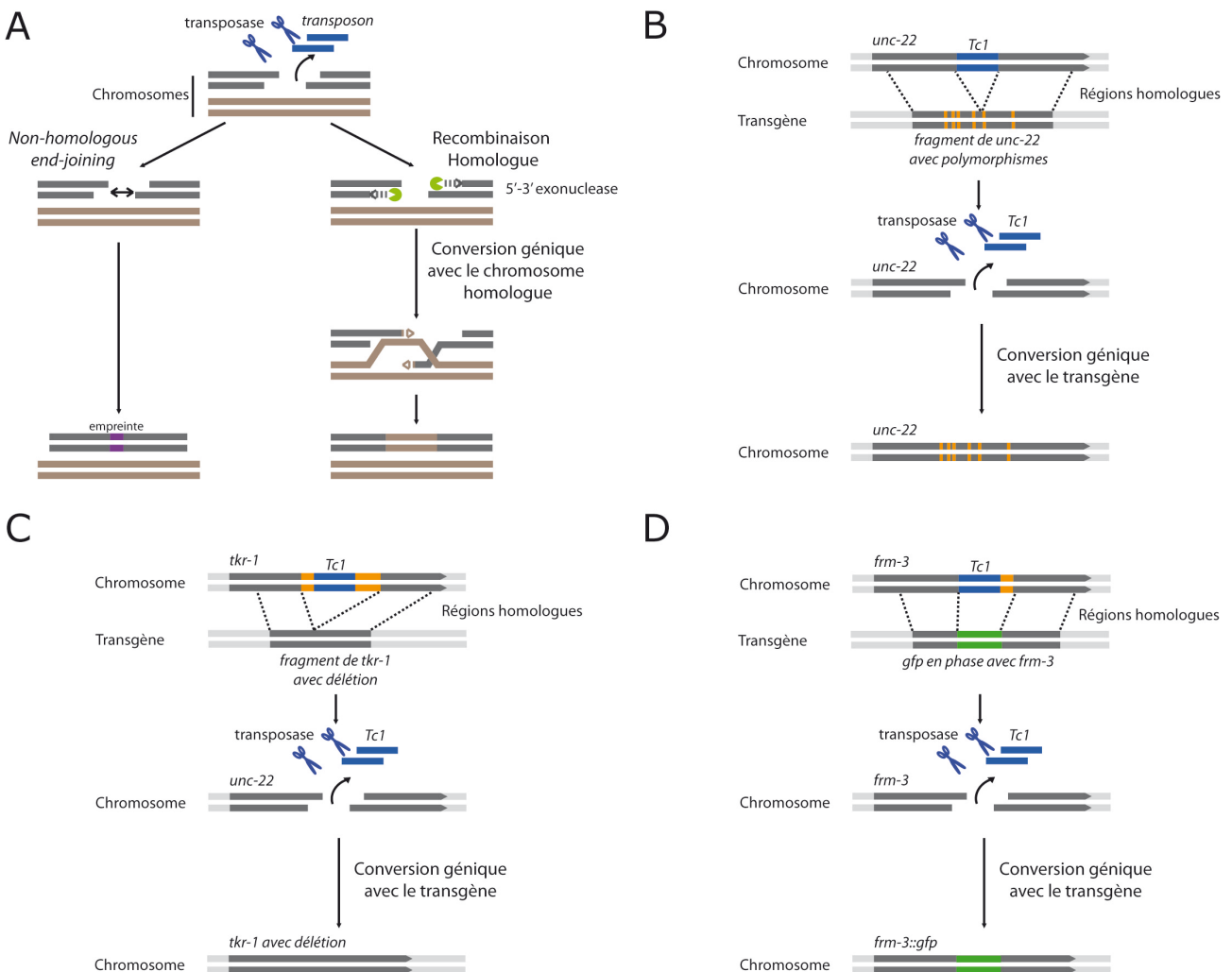


Figure 14 : Intégration d'altérations ciblées dans le génome de *C. elegans* par conversion génique suite à l'excision d'un transposon. **A** Mécanismes de réparation des coupures double brin de l'ADN. La réparation par recombinaison homologue peut aboutir à la conversion génique ou à la réparation par hybridation intrachromosomique (*single-strand annealing intrachromosomal repair*) non représentée ici. **B** Insertion de polymorphismes dans le gène *unc-22* par conversion génique à partir du transgène suite à l'excision de *Tc1* (Plasterk et Groenen 1992). **C** Délétion d'une région du gène *tkr-1* par conversion génique à partir du transgène suite à l'excision du transposon *Tc1* (Barrett et al. 2004). La partie de *tkr-1* délétée est représentée en orange. **D** Insertion de la GFP en phase avec *frm-3* et délétion d'une partie de ce gène par conversion génique avec le transgène suite à l'excision de *Tc1* (Barrett et al. 2004). Le gène *gfp* est représenté en vert, la partie délétée en orange.

Chez *C. elegans* on trouve au moins sept transposons endogènes actifs appartenant à la famille *Tc1/mariner*, tel le transposon *Tc1* qui est présent en 31 copies par génome haploïde dans la souche de référence N2 (Bessereau 2006). Dans cette souche, ces transposons sont naturellement transposés dans les cellules somatiques, mais dans la lignée germinale la transposition est réprimée. Ceci n'est pas le cas dans les lignées portant des mutations dans les gènes appelés «mutators» (*mut*) ; dans ce contexte

génétique, le transposon *Tc1* et autres transposons présents chez le ver sont aussi mobiles dans la lignée germinale. Ainsi, les lignées portant ces mutations sont des lignées hautement mutagènes, car la mobilisation des transposons dans la lignée germinale d'un ver P₀ donne lieu à des vers F₁ portant des nouvelles insertions du transposon à d'autres endroits du génome.

Le transposon *Mos1*, membre de la famille des *Tc1/mariner* et initialement identifié chez *D. mauritiana*, peut être introduit et mobilisé ectopiquement chez *C. elegans* (Bessereau et al. 2001). Comme pour les autres membres de la famille des *Tc1/mariner*, ce transposon de 1286 paires de bases contient une phase de lecture qui code pour une transposase, seule protéine nécessaire à sa transposition. Les travaux de J.L. Bessereau et collaborateurs en 2001 montrèrent que *Mos1* peut être introduit dans le génome de *C. elegans* à partir de transgènes portant d'une part la transposase sous le promoteur d'un gène endogène du ver et d'autre part des copies du transposon (Bessereau et al. 2001). La seule présence de la transposase et d'un transgène source de *Mos1* est suffisante pour catalyser la mobilisation du transposon du transgène vers les chromosomes, et ceci à la fois dans les cellules somatiques et dans la lignée germinale de *C. elegans*. La transposase permet aussi de mobiliser des éléments *Mos1* d'un endroit à un autre du génome du ver. La transposase de *Mos1* ne mobilise pas les transposons endogènes de *C. elegans* ; ainsi, la transposition est contrôlée et spécifique. De plus, les lignées portant des insertions de *Mos1* obtenues par mobilisation du transposon d'un concatémère extrachromosomique au génome ont en moyenne 2,5 copies du transposon, mais le nombre de copies peut aller de 1 à dix, ce qui signifie qu'il est possible d'isoler des lignées contenant une seule copie du transposon (Williams et al. 2005).

5.2. Introduction d'altérations ciblées dans le génome de *C. elegans* suite à l'excision du transposon endogène *Tc1*

Les techniques basées sur la conversion génique induite par l'excision d'un transposon ont tout d'abord été développées avec le transposon *Tc1* (Plasterk et Groenen 1992). Dans ces travaux, les auteurs montrèrent qu'il était possible d'utiliser le transgène *unc-22* marqué par différents polymorphismes et présent dans un concatémère extrachromosomique pour réparer la coupure double brin causée par l'excision du transposon *Tc1* dans le gène *unc-22* (Figure 14 B). Pour cela ils utilisèrent une lignée portant l'insertion de *Tc1* dans le gène *unc-22*, la mutation d'un gène «mutator» *mut-6* (*st702*), et un concatémère extrachromosomique contenant un fragment du gène *unc-22*

marqué par différents polymorphismes. Ce dernier couvrait 1500 paires de bases de part et d'autre du point d'insertion de *Tc1* dans le génome. Ils montrèrent qu'à partir de cette lignée il était possible d'identifier des animaux où l'allèle de *unc-22* contenant le transposon *Tc1* avait été remplacé par le transgène *unc-22* marqué par les polymorphismes. Dans ces animaux, le transposon présent dans le gène *unc-22* avait été mobilisé laissant derrière lui une coupure double brin de l'ADN. Lors de la réparation de cette cassure par la machinerie cellulaire, les mutations ponctuelles contenues dans le transgène avait été copiées dans le génome par un mécanisme de conversion génique. Ainsi, ils démontrèrent pour la première fois que des altérations spécifiques contenues dans un transgène pouvaient être introduites de manière spécifique dans le génome de *C. elegans*. Malheureusement, dans le contexte de la lignée *mut-6(st702)*, les événements de conversion génique à partir du transgène et induite par l'excision de *Tc1* restaient très rares ; en effet, R. Plasterk et J. Groenen identifièrent uniquement 11 vers portant la conversion génique recherchée parmi une progéniture de 450000 vers, soit une fréquence de 2×10^{-5} (Plasterk et Groenen 1992).

Une dizaine d'années plus tard, P. L. Barret et collaborateurs reprirent la même stratégie pour introduire cette fois-ci soit une délétion dans le gène *tkr-1*, soit la *gfp* en phase de lecture avec le gène *frm-3* (Barrett et al. 2004) (Figure 14 C et D). Dans les deux cas, le transgène servant de matrice «donneur» au mécanisme de conversion génique contenait des séquences homologues aux séquences de part et d'autre de l'insertion du transposon. Ils montrèrent alors qu'il était désormais possible de modifier le génome de *C. elegans* de manière ciblée, en créant des délétions ou en introduisant des gènes modifiés *in vitro*. À différence des travaux de R. Plasterk et J. Groenen, ils utilisèrent les lignées «mutators» *mut-2(r459)* et *mut-7(pk204)*. Avec ces lignées, ils trouvèrent une fréquence de conversion génique basée sur le transgène dix fois plus élevée que celle des travaux de R. Plasterk et J. Groenen, rendant la technique plus intéressante et prometteuse, et offrant ainsi une alternative au remplacement des gènes par recombinaison homologue, qui manque cruellement chez *C. elegans*. Cette technique, combinée à l'expansion des banques de lignées portant des insertions du transposon *Tc1* à différents endroits du génome (Williams 1995; Korswagen et al. 1996; Martin et al. 2002), permettait d'envisager à long terme la modification de n'importe quel gène du génome de *C. elegans*. De plus, l'existence d'insertions de *Tc1* intergéniques permettait désormais d'accéder à des séquences du génome inaccessibles jusque là par mutagénèse.

Cependant, l'utilisation du transposon *Tc1* pour la conversion génique présente quelques inconvénients. Tout d'abord, la transposition de *Tc1* n'est pas contrôlée par l'expérimentateur puisqu'elle a lieu spontanément dans les cellules somatiques et germinales des lignées «*mutators*». De plus, d'autres insertions de *Tc1*, ainsi que d'autres transposons endogènes, sont présentes dans le génome de la souche de référence N2 ; ceci, combiné au phénotype «*Mutator*», donne des contextes génomiques hautement mutagènes. Les lignées générées par les méthodes de conversion génique basée sur le transgène suite à l'excision de *Tc1* restent donc des lignées génétiquement instables qui accumulent les insertions de transposons et des mutations liées à la transposition de ceux-ci, ce qui rend la maintenance de ces lignées sur le long terme problématique.

5.3. Introduction d'altérations ciblées dans le génome de *C. elegans* suite à l'excision du transposon de *Drosophila Mos1*

Basé sur les stratégies d'ingénierie du génome du ver qui utilisent l'excision du transposon *Tc1*, une autre stratégie similaire a été développée qui utilise cette fois-ci le transposon hétérologue *Mos1* (Robert et Bessereau 2007; Robert et al. 2008). L'utilisation de *Mos1* permet de pallier aux inconvénients liés à l'utilisation du transposon *Tc1* et des lignées «*mutator*». Contrairement à la mobilisation des transposons *Tc1* dans ces lignées, la mobilisation du transposon de la drosophile *Mos1* dans *C. elegans* se fait de manière contrôlée et spécifique (Bessereau et al. 2001). La transposase de *Mos1* ne permet pas la mobilisation de transposons endogènes. De plus, il est possible de travailler avec des lignées contenant une insertion unique du transposon *Mos1* (Williams et al. 2005), contrairement au transposon endogène *Tc1*.

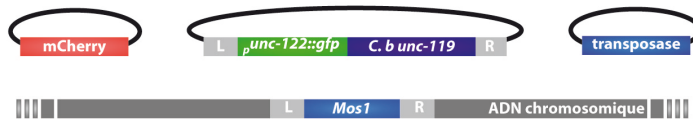
La technique de *MosTIC* pour «*Mos1 excision-induced transgene-instructed gene conversion*», c'est à dire la conversion génique basée sur le transgène suite à l'excision de *Mos1*, permet d'introduire des mutations ponctuelles, des gènes modifiés *in vitro* ou encore des délétions, dans le génome de *C. elegans*, à partir d'une lignée portant une insertion *Mos1* au site d'intérêt, un transgène «donneur» portant des séquences homologues aux séquences de part et d'autre de l'insertion du transposon dans le génome, et une source de transposase exogène nécessaire à la mobilisation du transposon (Robert et Bessereau 2007). Comme lors de la mobilisation de *Tc1*, l'excision de *Mos1* génère des coupures double brin de l'ADN qui peuvent ensuite être réparées par conversion génique basée sur le transgène (Robert et al. 2008). Les événements *MosTIC* ont une fréquence de 10^{-5} à 10^{-3} par génération F_1 après l'expression de la transposase

(Robert et Bessereau 2007; Robert et al. 2009), fréquence comparable à celle observée lors des travaux de P. L. Barret et collaborateurs sur la conversion génique suite à l'excision du transposon *Tc1* (Barrett et al. 2004).

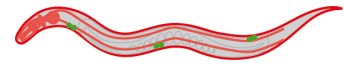
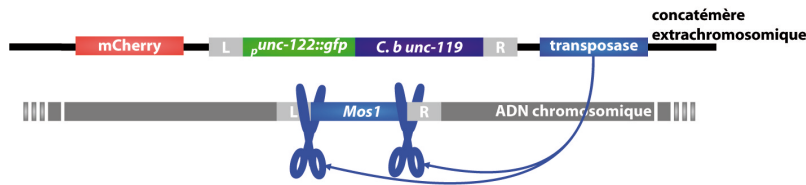
La technique du *MosTIC* comporte un intérêt particulier suite au développement de la banque d'insertions uniques de *Mos1* par le consortium européen NemaGENETAG (Bazopoulou et Tavernarakis 2009). Cette banque comporte plus de 14000 insertions intragéniques et intergéniques et l'objectif du consortium à long terme est de couvrir tout le génome du ver, de manière à disposer d'une insertion unique de *Mos1* pour chaque gène. Ceci, combiné au *MosTIC*, devrait permettre de modifier à volonté n'importe quel gène du génome de *C. elegans*.

5.4. Insertion d'une copie unique du transgène dans le génome du ver par *Mos1*-mediated Single-Copy Insertion (*MosSCI*)

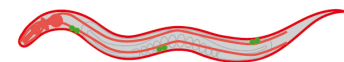
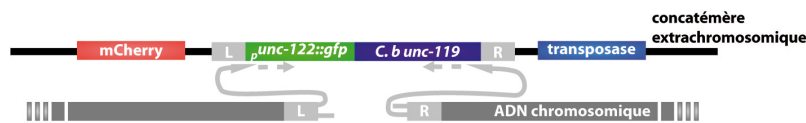
La technique d'ingénierie du génome du ver *MosTIC* a récemment été adaptée pour pouvoir intégrer une seule copie d'un transgène à la place d'une insertion *Mos1* (Frokjaer-Jensen et al. 2008). En 2008, C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs publièrent la technique appelée *MosSCI* pour «*Mos1-mediated single-copy insertion*», qui permet d'introduire une copie unique du gène d'intérêt par conversion génique suite à l'excision de *Mos1* dans une région intergénique cible (Frokjaer-Jensen et al. 2008).

1 Microinjection dans la lignée receveuse *Mos1 ; unc-119(ed3)*

Phénotype

2 Expression de la transposase et excision de *Mos1*

3 Réparation de la coupure double brin de l'ADN par conversion génique avec le transgène



4 Perte du concatémère extrachromosomique et identification de l'événement d'intégration



Figure 15 : Insertion d'une copie unique du transgène dans le génome de *C. elegans* par *MosSCI*. Exemple d'insertion réalisée lors des travaux de C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs (Frøkjær-Jensen et al. 2008). Ici, insertion du transgène $p_{unc-122}::gfp$, qui confère l'expression de la GFP dans les coelomocytes de *C. elegans*. Le marqueur de co-insertion utilisé est le gène *unc-119* de *C. briggsae* qui sauve le phénotype Unc des vers *unc-119(ed3)*. Les marqueurs négatifs utilisés sont $p_{myo-2}::mCherry$ (expression de la mCherry dans le pharynx), $p_{myo-3}::mCherry$ (expression de la mCherry dans les muscles) et $p_{rab-3}::mCherry$ (expression de la mCherry dans les neurones). À droite, schéma du profil d'expression des vers à chaque étape du protocole d'insertion.

La technique *MosSCI* utilise une lignée portant une insertion intergénique unique de *Mos1* (Figure 15). Cette lignée est tout d'abord injectée avec : (i) une source de transposase, qui permet la mobilisation de *Mos1*, (ii) un vecteur, qui fait office de matrice «donneur» pour le mécanisme de conversion génique et (iii) des marqueurs génétiques qui permettent d'identifier la lignée extrachromosomique ainsi formée. Le vecteur «donneur», appelé aussi vecteur matrice de réparation, est composé du transgène à intégrer et d'un marqueur de co-insertion flanqués par des régions homologues aux séquences de part et d'autre de l'insertion de *Mos1* dans le génome (séquence à gauche de l'insertion appelée «L», séquence à droite de l'insertion appelée «R»). Chez les vers portant ce concatémère extrachromosomique, l'expression de la transposase assure la mobilisation de *Mos1*. Dans les cas où la cassure double brin de l'ADN créée par l'excision du transposon est réparée par conversion génique, le vecteur matrice de réparation sert de séquence «donneur» grâce à la présence des régions homologues L et

R. Ainsi, le transgène d'intérêt et le marqueur de co-insertion sont synthétisés au niveau de la cassure de l'ADN et sont donc intégrés en une seule copie dans le génome du ver. La perte du concatémère due à son instabilité lors des méïoses et des mitoses permet l'obtention d'animaux portant uniquement une copie du transgène dans le génome. Les vers qui expriment le marqueur de co-insertion mais qui n'expriment pas les marqueurs génétiques caractéristiques du concatémère extrachromosomique, appelés marqueurs négatifs, sont considérés comme des insertions putatives. Des analyses par PCR et Southern blot permettent ensuite de confirmer l'intégration.

Lors des travaux de C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs, le marqueur de co-insertion utilisé était *unc-119* (Frokjaer-Jensen et al. 2008). Pour cela, la lignée contenant l'insertion intergénique de *Mos1* dans le génome avait été croisée avec le mutant *unc-119* (*ed3*). Ainsi, tous les vers portant le vecteur matrice de réparation dans le concatémère extrachromosomique ou portant l'insertion de *unc-119* dans le génome pouvaient être identifiés par leur phénotype de locomotion sauvage et leur capacité à entrer dans le stade *Dauer*.

Pour identifier les événements d'insertion, ils inclurent dans le mélange d'injection des marqueurs négatifs. Seuls les vers portant un concatémère extrachromosomique étaient susceptibles d'exprimer ces marqueurs. Ils utilisèrent comme marqueur négatif ρ *myo-2::mCherry* (entraîne l'expression de mCherry dans le pharynx), ρ *myo-3::mCherry* (entraîne l'expression de mCherry dans les muscles), ρ *rab-3::mCherry* (entraîne l'expression de mCherry dans les neurones) et ρ *myo-3::twk-18(cn110)*. *twk-18(cn110sd,ts)* est un allèle codant pour le canal de potassium TWK sensible à la température. Lorsque des vers transgéniques expriment cet allèle dans les muscles, ils sont paralysés à 25°C. Grâce à ces marqueurs, les événements d'insertions étaient identifiés comme les vers ayant un phénotype de locomotion sauvage à 25°C et n'exprimant pas la mCherry.

Les insertions du transgène par *MosSCI* peuvent être obtenues suivant deux protocoles différents qui diffèrent dans le contrôle de l'expression de la transposase (Frokjaer-Jensen et al. 2008). Dans un cas, la transposase de *Mos1* est exprimée sous le contrôle du promoteur endogène de la protéine de choc thermique *hsp-16-48*. Des vers P₀ de lignées extrachromosomiques doivent donc être soumis à un choc thermique pour activer l'expression de la transposase. Les événements d'insertion sont criblés dans la génération F₂ suivant le choc thermique. La fréquence d'obtention d'événements d'insertion pour ce protocole est d'une insertion putative pour 100 vers P₀ soumis au choc thermique). L'autre protocole consiste à exprimer la transposase directement dans la

lignée germinale grâce au promoteur endogène du gène *glh-2*. Dans ce cas, les événements d'insertion sont criblés dans la génération F₂ suivant l'injection. La fréquence d'obtention d'événements d'insertion est d'une insertion putative pour 6 vers P₀ injectés ayant donné des F₁ transgéniques extrachromosomiques. Dans ce dernier cas, l'identification de F₂ homozygotes pour l'insertion laisse penser que l'excision de *Mos1* et la réparation par conversion génique ont lieu dans les gonades des vers P₀ injectés.

Quel que soit le protocole utilisé, quelques erreurs de séquence peuvent être introduites dans le transgène lors de l'insertion de celui-ci dans le génome (Frokjaer-Jensen et al. 2008). En effet, 10 à 40 % des insertions obtenues portent des délétions ou des insertions d'autres séquences. Ces structures complexes peuvent être dues à des erreurs lors de la réparation de la cassure de l'ADN double brin par le mécanisme de recombinaison homologue ou à des structures complexes du transgène reconstituées lors de la formation du concatémère extrachromosomique. Dans ce dernier cas, le mécanisme de conversion génique copie avec fidélité les erreurs pré-existantes dans le concatémère.

Jusqu'à présent, deux lignées portant des insertions uniques de *Mos1* à des sites intergéniques ont été utilisées pour créer des insertions *MosSCI* (Frokjaer-Jensen et al. 2008). Mais en théorie, n'importe quelle lignée à insertion unique de la banque NemaGENETAG (Bazopoulou et Tavernarakis 2009) ou générée dans le laboratoire par mutagenèse avec *Mos1* (Williams et al. 2005) pourrait être utilisée comme lignée receveuse, à condition de construire le vecteur matrice de réparation avec les régions L et R adéquates. Suivant les protocoles développés par C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs, ces lignées devraient cependant être croisées avec le mutant *unc-119(ed3)*. Suivant la distance génomique entre le site d'insertion *Mos1* et le locus du gène *unc-119*, les croisements peuvent être difficiles voire impossibles.

Malgré ces quelques difficultés, la technique de *MosSCI* semble extrêmement efficace pour l'intégration d'une seule copie de transgène allant jusqu'à 9 kb (incluant le marqueur de co-insertion) à un endroit ciblé du génome. Les protocoles ne présentent pas d'étape techniquement difficile et les événements d'insertion peuvent être identifiés en moins de deux semaines. Grâce à l'intégration d'une seule copie d'un transgène, il est désormais possible d'étudier l'expression d'un gène d'intérêt à des niveaux physiologiques et de pallier aux inconvénients liés aux concatémères extrachromosomiques. La technique de *MosSCI* peut aussi être utilisée pour étudier les effets de la duplication d'un gène en intégrant une deuxième copie d'un gène endogène au site d'insertion intergénique (Tarailo-Graovac et al. 2010).

Partie IV : La transgénèse d'autres nématodes

En termes de nombre d'individus, les nématodes sont le type le plus abondant d'animaux sur terre. Près de 25000 espèces ont été classifiées jusqu'à présent et les estimations du nombre d'espèces varient entre cent mille et cent millions (Felix et al. 2002; Coghlan 2005). Cette abondance résulte certainement de leur capacité d'adaptation à différents milieux, grâce à leur petite taille, une cuticule résistante, un stade de diapause facultatif ou obligé (comme le stade *Dauer* de *C. elegans*) et une anatomie simple. Parmi les nématodes on trouve des espèces vivant librement dans les sols, l'eau douce ou encore l'eau de mer et des espèces parasites des animaux ou des plantes (Figure 16).

Les nématodes offrent d'excellents modèles pour les études d'évolution car ils combinent une morphologie et un plan anatomique simples avec de nombreuses variations entre les espèces (Fitch et Kelley Thomas 1997). En particulier, *C. elegans* associé à d'autres espèces cultivés en laboratoire, servent de modèle pour les études d'évolution. Les grandes quantités de connaissances accumulées en génétique et sur les mécanismes moléculaires déterminant les caractères morphologiques chez *C. elegans* permettent de tester des gènes candidats pour leur rôle dans l'évolution d'un caractère particulier. Quelques caractères étudiés chez les nématodes dans le cadre d'études d'évolution sont l'embryogenèse précoce (Brauchle et al. 2009; Schulze et Schierenberg 2009), le lignage cellulaire post-embryonnaire (Sommer et al. 1994), le développement de la vulve (Delattre et Felix 2001; Kolotuev et Podbilewicz 2008) ou encore la morphologie de la queue des mâles (Fitch et Emmons 1995).

Les études comparatives entre différentes espèces de nématodes ont lieu aussi dans le cadre de la génomique. La comparaison des génomes entièrement séquencés de différentes espèces de nématodes comme *Brugia malayi* (Ghedin et al. 2007), *Caenorhabditis briggsae* (Stein et al. 2003), *Caenorhabditis brenneri*, *Caenorhabditis japonica*, *Caenorhabditis remanei* ou encore *Pristionchus pacificus* (Dieterich et al. 2008), permet de mieux caractériser les parties codantes et régulatrices des gènes les plus conservés, identifiant ainsi les séquences potentiellement les plus importantes, et permet aussi d'étudier l'évolution des génomes (Coghlan 2005; Guiliano et Blaxter 2006; Hillier et al. 2007; Coghlan et al. 2008; Thomas 2008).

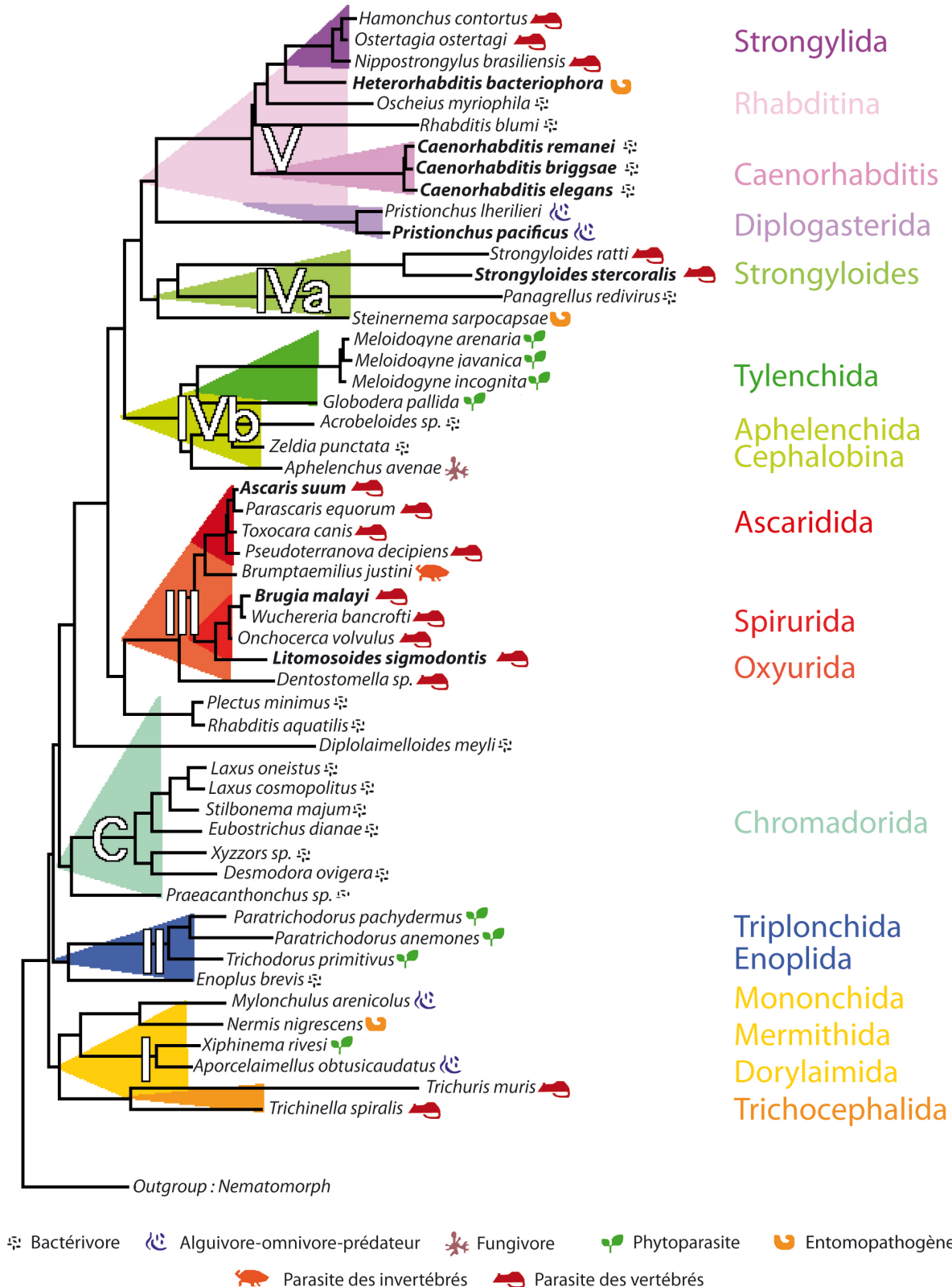


Figure 16 : Phylogénie moléculaire des nématodes. Classification phylogénétique des nématodes basée sur la comparaison des séquences des petites sous-unités ribosomales (Blaxter 1998). À droite de chaque espèce un icône représente l'écologie trophique. Les groupes taxonomiques les plus hauts regroupant chaque groupe d'espèces est signalé à droite. Les espèces pour lesquelles des techniques d'expression de transgènes ont été développées, sont marquées en gras. Adapté de (Blaxter 1998).

Les nématodes parasites des plantes et des animaux font aussi l'objet de nombreuses études (Blaxter et Bird 1997). D'une part, parce que les parasites des végétaux et des animaux ont un fort impact sur l'agriculture et l'élevage et représentent un enjeu économique important (Jasmer et al. 2003; Smiley et al. 2005; Ballweber 2006; Hodda et Cook 2009). D'autre part, parce que les parasites humains posent un grave problème de santé publique (en particulier dans les pays tropicaux). En effet, d'après la *World Health Organization* (<http://www.who.int>), plus de 120 millions de personnes sont infectés par les nématodes *Wuchereria bancrofti*, *B. malayi* ou *Brugia timori* responsables de la filarioses lymphatique, plus de 37 millions sont infectés par le nématode *Onchocerca volvulus* responsable de l'onchocercose, ou cécité des rivières, et plus de 1,221 milliards de personnes sont infectées par les nématodes parasites intestinaux *Ascaris lumbricoides* et *Trichuris trichiura*. Comprendre les cycles de vie et l'écologie des nématodes parasites et les interactions hôte-pathogène devrait permettre de mieux les contrôler et de prévenir les maladies associées.

Par le passé, des outils originellement développés pour *C. elegans*, tels que le RNAi, la mutagénèse chimique, l'ablation cellulaire par laser ou la transgénèse, ont été adaptés à d'autres nématodes (Pires Da Silva 2005; Baird et Chamberlin 2006; Kalinna et Brindley 2007; Felix 2008; Lok et Artis 2008). Le développement de techniques de transgénèse pour d'autres nématodes présente de nombreux intérêts, en particulier pour des études de génomique fonctionnelle après le séquençage des génomes.

Dans les paragraphes suivants sont présentés les espèces de nématodes pour lesquelles des techniques de transgénèse pour la transformation transitoire ou héréditaire ont été développées.

1. La transgénèse de nématodes libres de la famille Rhabditidae

1.1. La transgénèse de *C. briggsae*

C. briggsae est un nématode proche de *C. elegans* qui a été développé comme modèle biologique en parallèle avec ce dernier, principalement dans le cadre d'études d'évolution (Figure 16). *C. briggsae* est un ver hermaphrodite (la forme mâle existe aussi mais est rare), avec un cycle de vie et une morphologie presque identique à celle de *C.*

elegans et qui est facilement cultivé en laboratoire. Le génome de *C. briggsae* a été entièrement séquencé (Stein et al. 2003). Des analyses comparatives avec le génome de *C. elegans* ont montré que les génomes de ces deux nématodes ont une taille semblable, un nombre similaire de gènes et que 62 % des gènes codant pour des protéines chez *C. briggsae* ont des orthologues chez *C. elegans* (Gupta et al. 2007; Berglund et al. 2008).

Des lignées transgéniques de *C. briggsae* peuvent être obtenues par microinjection de l'ADN exogène dans les gonades distales (Streit et al. 1999) et par bombardement (Zhao et al. 2008; Zhao et al. 2010) suivant les méthodes décrites pour *C. elegans*. L'application de ces techniques à *C. briggsae* bénéficie de l'usage de marqueurs de transgénèse originellement conçus pour *C. elegans* qui fonctionnent chez cette espèce. Quelques marqueurs génétiques utilisés pour la transgénèse de *C. briggsae* sont le marqueur *C.e rol-6(su1006)* qui confère le phénotype Rol (Streit et al. 1999), *C.e pmyo-2::gfp* qui confère l'expression de la GFP dans le pharynx (Inoue et al. 2007), *C.e pmyo-3::gfp* qui confère l'expression de la GFP dans les muscles et *C.e p_{hsp-16-48}::gfp* et *C.e p_{sur-5}::gfp* qui confèrent l'expression de la GFP dans toutes les cellules (Baird et Chamberlin 2006). Récemment, le marqueur de sélection spécifique à *C. briggsae* *C.br unc-119* qui sauve le phénotype Unc et Daf-d conféré par l'allèle *unc-119(st20000)* a été développé, permettant ainsi la mise en place d'une sélection efficace des vers transgéniques obtenus par bombardement (Zhao et al. 2010).

Comme pour *C. elegans*, lors de la transgénèse l'ADN exogène forme des concatémères extrachromosomiques instables ou peut être intégré dans le génome lors de la transgénèse par bombardement (Zhao et al. 2010). Cependant, l'efficacité de la transformation de *C. briggsae* par microinjection est moins importante que pour *C. elegans* (Baird et Chamberlin 2006). Les vers transgéniques présentent souvent la répression de l'expression du transgène (même dans les cellules somatiques) et un fort taux de mosaïcisme. De manière générale, les mêmes mélanges d'injection donnent trois à dix fois moins de lignées stables chez *C. briggsae* que chez *C. elegans*.

1.2. La transgénèse d'autres espèces de *Caenorhabditis*

La transgénèse stable a aussi été rendue possible chez d'autres espèces de *Caenorhabditis*, tel *C. remanei* ou *C. brenneri* (espèce gonochoristique : les adultes se présentent avec une forme mâle et une forme femelle), en utilisant des marqueurs génétiques tel *C.e myo-2::mCherry* (communication personnelle de Marie-Anne Félix et

Marie Delattre) (Figure 16). Cependant, chez ces espèces, le têt d'obtention de lignées transgéniques est beaucoup plus faible que pour *C. elegans*.

1.3. Transmission transitoire du transgène chez *Oscheius tipulae*

O. tipulae est un nématode vivant librement dans les sols, de la même famille que *C. elegans* (Felix 2006). Il présente le même mode de reproduction hermaphrodite que ce dernier et est facilement cultivable dans le laboratoire. Ce nématode est utilisé pour des études d'évolution, notamment pour l'étude du développement de la vulve (Delattre et Felix 2001; Kolotuev et Podbilewicz 2008).

La transgénèse par microinjection de *O. tipulae* n'a pas encore été mise au point. Cependant, des plasmides injectés dans les gonades d'un hermaphrodite P₀ ont été détectés par PCR dans la progéniture F₁ (Felix 2006), suggérant ainsi qu'il serait possible de développer des techniques de transgénèse efficaces.

2. La transgénèse de *P. pacificus*, de la famille Diplogasteridae

P. pacificus est un nématode hermaphrodite avec apparition sporadique de mâles, de la famille Diplogasteridae (Figure 16) (Hong et Sommer 2006). Il est omnivore (peut se nourrir de bactéries, champignons et autres nématodes) et dans la nature il est trouvé en association avec des scarabées, suggérant qu'il passe au moins une partie de son cycle de vie dans cet insecte hôte. Dans le laboratoire, ce nématode est cultivé dans les mêmes conditions que *C. elegans*.

P. pacificus est aujourd'hui utilisé comme organisme modèle pour des études d'évolution, notamment pour des études de développement de la vulve (Schlager et al. 2006) et pour des études d'écologie comme l'étude de l'association entre espèces (Herrmann et al. 2007).

B. Schlager et collaborateurs ont montré qu'il est possible de générer des lignées transgéniques stables de *P. pacificus* portant des concatémères extrachromosomiques par microinjection de l'ADN exogène dans les gonades du ver (Schlager et al. 2009). À défaut d'un marqueur de transgénèse efficace (*C.e rol-6(su1006)* et *C.e gfp* ne fonctionnent pas chez *P. pacificus*), les auteurs développèrent un marqueur génétique analogue au

marqueur Rol de *C. elegans* à partir d'un crible génétique par mutagenèse à l'EMS. L'allèle *P.pa prl-1(tu92)* fut identifié pour conférer le phénotype Rol au nématode *P. pacificus*. Grâce à l'utilisation de cet allèle comme marqueur, les auteurs déterminèrent les conditions requises pour l'obtention de vers transgéniques de cette espèce : l'utilisation de séquences régulatrices en 3' et 5' et d'accepteurs d'épissage endogènes et l'injection d'un mélange du transgène avec l'ADN de *P. pacificus*, tous les deux digérés par la même enzyme de restriction, dans des proportions où l'ADN génomique est majoritaire (constructions de concatémères extrachromosomiques complexes). Ils construisirent aussi deux cassettes *P.pa gfp* et *P.pa Turbo-rfp* pour l'expression de la GFP et la RFP dans *P. pacificus*. Ces cassettes diffèrent de celles utilisées dans *C. elegans* par l'usage d'accepteurs d'épissage et d'introns endogènes de *P. pacificus*.

3. La transgénèse des nématodes parasites

3.1. La transgénèse d'*Heterorhabditis bacteriophora*, parasite d'insectes de la famille Heterorhabditidae

H. bacteriophora est un nématode parasite d'insectes de la famille Heterorhabditidae (Figure 16) (Blaxter et Bird 1997; Ciche 2007). Ce nématode utilise l'insecte hôte comme niche pour cultiver la bactérie symbiotique *Photorhabdus luminescens* dont il se nourrit. Le stade larvaire infectieux (fonctionnellement analogue au stade *Dauer* de *C. elegans*) se trouve souvent dans les sols à la recherche d'un organisme hôte. Ce stade contient une monoculture de la bactérie symbiotique dans l'intestin qu'il régurgite une fois à l'intérieur de l'insecte. À l'intérieur de l'hôte, en présence de nourriture, *H. bacteriophora* se développe en quatre stades larvaires jusqu'au stade adulte, hermaphrodite ou mâle. Le nématode se reproduit pendant deux à trois générations avant de quitter l'hôte au stade larvaire infectieux. *H. bacteriophora* peut être cultivé en laboratoire en présence *P. luminescens*.

Le développement de *P. luminescens* est la cause principale de la mortalité des insectes. Ainsi, *H. bacteriophora* est utilisé pour le contrôle biologique d'insectes dans les champs de culture (Toepfer et al. 2004). La majorité des études relatives à ce nématode se concentrent donc sur ce domaine, mais il est aussi utilisé pour l'étude des mécanismes de parasitisme (Hallem et al. 2007), de symbiose (Somvanshi et al. 2010) et avec le

séquençage du génome en cours, il émerge comme modèle pour les études d'évolution (Cicche 2007).

Il a été montré qu'il est possible d'obtenir des lignées transgéniques de *H. bacteriophora* par microinjection de l'ADN exogène dans les gonades des hermaphrodites en appliquant les méthodes développées pour *C. elegans* (Hashmi et al. 1995). S. Hashmi et collaborateurs injectèrent un mélange d'un plasmide contenant *C.e rol-6(su1006)* et un autre plasmide contenant *C.e p_{hsp-16-48}::lac-Z* dans les gonades de l'hermaphrodite et obtinrent des F₁ exprimant la β -galactosidase dans les muscles et l'hypoderme. L'expression de cette protéine était héréditaire et fut suivie pendant quatre à cinq générations. Cependant, la présence du transgène *C.e rol-6(su1006)* dans les populations de vers transgéniques, confirmée par Southern blot, ne conféra pas un phénotype Rol. La transformation de *H. bacteriophora* par microinjection n'a pas été répétée depuis cette étude initiale probablement en lien avec l'absence de marqueur génétique approprié.

3.2. La transgénèse transitoire de *Strongyloides stercoralis* et la transgénèse héréditaire de *Parastrongyloides trichosuri*, parasites intestinaux de la famille Strongyloididae

Les *Strongyloides* sont des nématodes parasites du système gastrointestinal des vertébrés. Ils infectent des mammifères, des oiseaux, des reptiles et des amphibiens (Figure 16) (Viney et Lok 2007). Ce sont des espèces gonochoristiques, qui alternent des générations parasitiques dans l'organisme hôte avec des générations sous la forme de nématodes libres. *S. stercoralis* présente une seule génération libre d'adultes dont la progéniture infecte l'organisme hôte sous la forme du stade larvaire infectieux L3i (hypothétiquement analogue au stade *Dauer* de *C. elegans*). L'espèce proche *P. trichosuri*, également gonochoristique, peut survivre en tant que nématode libre en dehors de l'hôte durant un nombre de générations illimité. En laboratoire, les générations parasites de *S. stercoralis* sont maintenues en infectant des chiens ou des gerbilles et celles de *P. trichosuri* sont maintenues en infectant des opossums ; les générations libres de ces deux parasites sont maintenues dans des conditions de culture similaires à celles de *C. elegans*. La présence d'un mode de vie en tant que nématodes libres fait de *S. stercoralis* et, plus particulièrement, *P. trichosuri* des bons modèles pour l'étude du parasitisme.

Des similarités morphologiques entre les gonades des femelles de *S. stercoralis* et *P. trichosuri* et celles de *C. elegans*, ont permis de développer des méthodes de transgénèse par microinjection basées sur les techniques de transgénèse de *C. elegans*

(Grant et al. 2006; Li et al. 2006). Dans le cas de *S. stercoralis*, l'ADN exogène est injecté dans les gonades de femelles libres, qui sont ensuite cultivées avec des mâles libres (Lok et Massey 2002; Li et al. 2006). La génération libre F₁ est criblée pour identifier les vers sous la forme L3i exprimant le transgène, qui sont ensuite utilisés pour infecter un organisme hôte (Li et al. 2006; Lok et Artis 2008). Suivant ce protocole, des transgènes ont pu être identifiés par PCR jusqu'à la génération F₅ après l'injection, mais l'expression des transgènes n'a été observée que jusqu'à la génération F₂ (Li et al. 2006).

L'expression de transgènes dans *S. stercoralis* requiert la présence d'éléments régulateurs endogènes en 3' et 5' (Li et al. 2006). En effet, les constructions *C.e* ρ *myo-2::gfp*, *C.e* ρ *mec-7::gfp* et *C.e* ρ *sur-5::gfp*, avec des promoteurs et des régions 3' non traduites (3' *Untranslated region* ou 3' UTR) de *C. elegans*, ne s'expriment pas dans *S. stercoralis*. De même, les constructions *S.s* ρ *act-2::gfp* et *S.s* ρ *era-1::gfp*, construites avec des promoteurs endogènes mais le 3' UTR du gène *unc-54* de *C. elegans*, n'aboutissent qu'à l'expression de la GFP dans des tissus des femelles injectées et des embryons précoces qui meurent avant d'éclore (Lok et Massey 2002). Cette expression artéfactuelle semble être due à une transcription et traduction dérégulées durant la mort cellulaire (Li et al. 2006). Finalement, des constructions portant un promoteur et une région 3' UTR endogènes, tel *S.s* ρ *era-1::gfp::3' UTR era-1*, aboutissent à l'expression stable de la GFP dans des animaux transgéniques viables, suggérant que des séquences de régulation endogènes en 3' sont indispensables à l'expression du transgène dans *S. stercoralis*. Les auteurs de ces travaux n'ont pas testé l'expression du gène *gfp* sous le contrôle d'un promoteur hétérogène et avec une région 3' UTR endogène.

Malgré la construction de gènes s'exprimant correctement dans *S. stercoralis*, des lignées stables n'ont pas encore pu être construites. En effet, l'expression des transgènes est réprimée à la génération F₂ après l'injection (Li et al. 2006). La transgénèse de *S. stercoralis* nécessite donc encore des étapes de mise au point.

Il est possible cependant de construire des lignées stables de *P. trichosuri* (Grant et al. 2006). W. N. Grant et collaborateurs construisirent des lignées transgéniques stables par microinjection dans les gonades des transgènes *P.t* ρ *hsp-1::gfp::lac-Z::C.e 3' UTR unc-54* et *C.e* ρ *let-858::gfp::lac-Z::C.e 3'UTR unc-54*. Ces vers exprimaient la β -galactosidase mais pas la GFP. Les lignées furent maintenues à l'état libre mais ils montrèrent qu'il était aussi possible d'infecter un organisme hôte avec le stade L3i et de récupérer des vers transgéniques après un passage dans l'hôte.

4. L'expression transitoire de gènes dans des nématodes parasites

4.1. Expression transitoire d'un transgène dans les embryons du parasite intestinal *Ascaris suum* de la famille Ascarididae

A. suum est un parasite intestinal du porc proche du parasite intestinal humain *A. lumbricoides* (Figure 16), responsable de l'infection de plus de 1,22 milliards de personnes. De ce fait, et parce que *A. suum* a lui-même un impact sur l'élevage porcin et peut être transmis à l'homme, ce nématode est largement étudiée (Crompton 2001; Villeneuve 2003). Ce nématode peut atteindre jusqu'à 40 cm de long et la durée de vie de l'adulte est d'environ 6 mois. Les oeufs contenus dans les matières fécales des porcs infectés sont très résistants et peuvent survivre pendant des années jusqu'à être avalés par un nouvel hôte.

Les premières études sur l'expression transitoire de transgènes dans des parasites ont été réalisées sur *A. suum* par R. E. Davis et collaborateurs (Davis et al. 1999). S'il n'y a pas encore de techniques pour l'obtention de lignées transgéniques stables, ces auteurs montrèrent cependant qu'il est possible d'exprimer un transgène de manière transitoire dans des embryons de cette espèce. Pour cela, ils bombardèrent des embryons dont la cuticule avait été affaiblie par un traitement à l'hypochlorite, avec le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur du 5S ARN ribosomal endogène et de la région 3' UTR du gène endogène codant pour une sous-unité de l'ATP synthétase. L'expression de la luciférase fut détectée sur des lysats d'embryons en moins d'une heure et jusqu'à 80 heures suivant le bombardement. L'expression de la luciférase fut aussi observée après bombardement des embryons avec de l'ARN. Ces méthodes présentent un intérêt particulier pour l'étude des séquences régulatrices en l'absence de méthodes de transgénèse stable.

4.2. Expression transitoire d'un transgène dans les parasites responsables de la filariose lymphatique *B. malayi* et *Litomosoides sigmodontis* de la famille Onchocercidae

B. malayi et *L. sigmodontis* sont des nématodes gonochoristiques de la famille Onchocercidae (Figure 16) responsables de la filariose lymphatique chez l'humain et chez les rongeurs respectivement (Blaxter et Bird 1997; Hubner et al. 2009). Ces espèces ont un cycle de vie qui requiert le passage par un vecteur intermédiaire, comme le moustique

Mansoni dans le cas de *B. malayi* et l'acarien *Ornithonyssus bacoti* dans le cas des rongeurs, ce qui permet de transmettre les larves d'un organisme hôte à un autre. Le nématode *B. malayi* est étudié en raison de son impact sur la santé des populations des pays tropicaux et *L. sigmodontis* est utilisé comme modèle pour l'étude de la filariose lymphatique et les interactions hôte pathogène (Hoffmann et al. 2000; Hubner et al. 2009).

Malgré l'absence de techniques pour l'obtention de lignées transgéniques stables de ces deux espèces de nématodes, il est cependant possible d'étudier l'expression de transgènes de manière transitoire (Jackstadt et al. 1999; Higazi et al. 2002). D'une part, P. Jackstadt et collègues utilisèrent la technique de bombardement pour introduire le transgène *C.e act-1::lac-Z* dans des mâles et femelles adultes de *L. sigmodontis*, cultivées pendant une dizaine de jours *in vitro* (Jackstadt et al. 1999). Ils observèrent l'expression de la β -galactosidase dans l'utérus de femelles et dans une région proche du cloaque des mâles deux à dix jours après le bombardement. Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits depuis. D'autre part, l'expression transitoire de transgènes dans le nématode *B. malayi* est reproductible et est utilisé dans le cadre de l'étude des séquences régulatrices des promoteurs et de l'épissage (Higazi et al. 2002; Shu et al. 2003; Higazi et Unnasch 2004; Higazi et al. 2005). T. B. Higazi et collègues utilisèrent les méthodes développées par R. E. Davis et collègues pour obtenir l'expression transitoire de transgènes dans *B. malayi* (Higazi et al. 2002). Ils montrèrent qu'il est possible d'exprimer un transgène dans des embryons, des larves et des femelles adultes bombardées, ou après injection du transgène dans l'utérus de femelles adultes. Ces auteurs utilisèrent comme transgène la luciférase sous le contrôle du promoteur endogène de la sous-unité 5S de l'ARN ribosomal et suivirent l'expression de la luciférase par des méthodes biochimiques dans des lysats d'embryons ou de vers. L'expression du transgène à lieu jusqu'à cinq jours après l'introduction du transgène dans l'organisme. Suivant les mêmes méthodes ils montrèrent aussi l'expression transitoire de la GFP sous le contrôle du promoteur endogène de la sous-unité 5S de l'ARN ribosomal.

Alors que la découverte de nouveaux gènes de nématodes libres et parasites s'est accélérée grâce au séquençage de nombreux génomes, les techniques pour l'analyse fonctionnelle des gènes, dont la transgénèse, n'ont été développées que pour un nombre réduit de nématodes. Au total, seulement sept espèces de nématodes peuvent être modifiées génétiquement de manière stable pendant au moins quelques générations et trois espèces peuvent exprimer des transgènes de manière transitoire. Ce manque de

techniques fiables de transgénèse s'explique d'une part par les difficultés techniques causées par les passages obligés de la plupart des espèces parasites dans l'organisme hôte et d'autre part par le manque de marqueurs de transgénèse pour les nématodes autres que *C. elegans* et *C. briggsae*.

Le développement de marqueurs génétiques spécifiques à chaque espèce basés sur des rapporteurs fluorescents ou des allèles mutants est en théorie possible, comme le montrent les travaux de B. Schlager et collègues sur le marqueur Rol pour *P. pacificus* et X. Li et collègues sur l'adaptation du gène *gfp* à *S. stercoralis* (Li et al. 2006; Schlager et al. 2009). Cependant, ces démarches sont longues et nécessitent des analyses génétiques poussées et donc des outils de génétique classique et inverse seulement disponibles pour un nombre d'espèces limitées. Le développement de marqueurs génétiques polyvalents qui puissent être utilisés dans différentes espèces de nématodes, pourrait aider à développer des techniques de transgénèse fiables pour une grande variété de nématodes utilisés pour des études d'évolution et de parasitisme.

Partie V : Les gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueurs génétiques

Les antibiotiques sont des drogues, pour la plupart naturelles, qui affectent des structures ou interfèrent avec des processus essentiels à la croissance des bactéries. La plupart des antibiotiques sont produits par un microorganisme (bactérie ou champignon) pour inhiber la croissance d'autres microbes compétiteurs. Ce sont des produits qui ont été découverts dans la nature, comme les pénicillines isolées du champignon *Penicillium* ou la streptomycine isolée de la bactérie *Streptomyces*. La production d'antibiotiques par des microbes implique l'existence de gènes de résistance qui protègent l'organisme émetteur des effets de ces drogues ; des gènes de résistance peuvent également être utilisés comme mécanisme de réponse du microbe cible (Davies 1994).

Les antibiotiques, combinés aux gènes de résistance associés, ont depuis le début du génie génétique été utilisés comme marqueurs de transformation pour sélectionner les bactéries portant l'ADN exogène d'intérêt (Cohen et al. 1973; Morrow et al. 1974). Dans les années 1970, les travaux de J. F. Morrow, S. N. Cohen et collègues établirent les bases de la sélection de bactéries recombinantes par la résistance aux antibiotiques, en montrant que lorsque l'ADN exogène était associé à un plasmide portant la résistance à la tétracycline ou à la kanamycine, il était possible de sélectionner les bactéries portant l'ADN d'intérêt en présence de ces antibiotiques. Ce moyen de sélection s'est rapidement montré très utile pour la manipulation de bactéries recombinantes dans le cadre des expériences de biologie moléculaire et il reste encore aujourd'hui le moyen le plus efficace pour sélectionner des bactéries portant un transgène d'intérêt (Berg et Mertz 2010).

1. Antibiotiques à spectre large : marqueurs de sélection de systèmes eucaryotes

Les gènes de résistance aux antibiotiques sont d'excellents marqueurs génétiques car ce sont des gènes compacts, sans introns, qui sont bien caractérisés et qui ne nécessitent aucun contexte génétique spécifique pour conférer la résistance. En présence des antibiotiques, ces gènes confèrent un avantage sélectif à la cellule ou l'organisme

hôte par rapport au sauvage, offrant ainsi un système de sélection rigoureux des cellules et des organismes recombinants.

Même si la plupart des gènes de résistance aux antibiotiques sont d'origine bactérienne, ils sont facilement adaptés aux systèmes eucaryotes grâce à l'utilisation d'éléments régulateurs non traduits en 5' et 3' propres au système de destination (Colbere-Garapin et al. 1981; Hirth et al. 1982; Herrera-Estrella et al. 1983). Aujourd'hui, les marqueurs génétiques à base d'antibiotiques sont utilisés pour la transformation des levures, des cellules mammifères et d'insectes, des cellules végétales, des champignons, d'amibes et d'autres parasites protozoaires. Le Tableau 3 présente les antibiotiques à large spectre les plus utilisés, avec leurs modes d'action, leurs gènes de résistance et leurs applications comme marqueurs génétiques.

Tableau 3 : Antibiotiques à large spectre et leurs applications comme marqueurs génétiques

Antibiotique	Blasticidine	G-418	Hygromycine	Puromycine	Phléomicine
Mode d'action	Inhibent la synthèse des protéines				Inhibe la synthèse de l'ADN
Gène de résistance	<i>bsr, bsd</i>	<i>neo</i>	<i>hph</i>	<i>puro</i>	<i>ble Sh</i>
Système					
champignons		✓	✓		✓
levures	✓	✓	✓		✓
protozoaires	✓	✓	✓	✓	✓
cellules mammifères	✓	✓	✓	✓	✓
cellules d'insectes	✓	✓	✓	✓	✓
cellules végétales	✓	✓	✓		✓
Références	1 - 5, 28	6 - 12	1, 13 -18	1, 19 - 20	22 -28

bsr : blasticidine S acetyltransferase ; *bsd* : blasticidine S deaminase ; *neo* : aminoglycoside phosphotransferase 3' (I) ou (II) ; *hph* : hygromycine phosphotransferase ; *puro* : puromycine N-acetyltransferase ; *ble Sh* : gène de résistance à la phleomycine de *Stroptoalloteichsu hindustanus*

¹(Vazquez 1974), ²(Lopez et al. 2010), ³(Kimura et al. 1994)a, ⁴(Kimura et al. 1994)b, ⁵(Goyard et Beverley 2000; Suarez et Mcelwain 2009), ⁶(Bar-Nun et al. 1983), ⁷(Maisonhaute et Echalié 1986; Okano et al. 1992), ⁸(Colbere-Garapin et al. 1981), ⁹(Davies et Jimenez 1980), ¹⁰(Lee et Van Der Ploeg 1990), ¹¹(Gastmann et al. 2007), ¹²(Herrera-Estrella et al. 1983), ¹³(Blochlinger et Diggelmann 1984), ¹⁴(Giordano et Mcallister 1990), ¹⁵(Gritz et Davies 1983), ¹⁶(Lee et Van Der Ploeg 1991), ¹⁷(Cullen et al. 1987), ¹⁸(Waldron et al. 1985), ¹⁹(Iwaki et al. 2003), ²⁰(De La Luna et al. 1988), ²¹(Freedman et Beverley 1993), ²²(Tanaka et al. 1963), ²³(Pfeifer et al. 1997), ²⁴(Bennett et al. 1998), ²⁵(Gatignol et al. 1987), ²⁶(Freedman et Beverley 1993), ²⁷(Perez et al. 1989), ²⁸(Kamakura et al. 1990)

2. G-418 et le gène de résistance *neo* : marqueur de sélection d'insectes transgéniques

G-418 est un aminoglycoside à large spectre qui bloque l'étape de l'élongation lors de la synthèse des protéines chez les eucaryotes en se fixant aux ribosomes au niveau des sites de reconnaissance des codons (Vazquez 1974; Fan-Minogue et Bedwell 2008). La résistance à cet antibiotique est conférée par les transposons bactériens *Tn5* et *Tn601* codant respectivement pour les gènes 3'-O-aminoglycoside phosphotransferase type I et type II (*neo*), qui inactivent l'antibiotique par phosphorylation (Kotra et al. 2000). Ces gènes procaryotes confèrent la résistance à G-418 aux cellules mammifères, d'insectes et végétales, aux champignons, aux levures et aux protozoaires (voir Tableau 3).

2.1. *p_{hsp-70}::neo* marqueur de sélection pour la transgénèse de *D. melanogaster*

En 1985 H. Steller et V. Pirrotta utilisèrent l'antibiotique G-418 et le gène *neo* pour sélectionner des drosophiles transgéniques, montrant ainsi que les systèmes de sélection rigoureux couramment utilisés pour la sélection de cellules et d'organismes unicellulaires recombinants pouvait être adapté aux métazoaires (Steller et Pirrotta 1985). Un tel système présentait en théorie de nombreux avantages face aux marqueurs génétiques déjà existants pour la transgénèse des insectes. D'une part, le gène *neo* ne nécessite aucun contexte génétique pour conférer la résistance, ce qui permettait de travailler avec des lignées sauvages, contrairement aux marqueurs génétiques basés sur la couleur des yeux ou la résistance à l'éthanol, qui requièrent l'utilisation de lignées mutantes (Goldberg et al. 1983; Rubin et Spradling 1983; Klemenz et al. 1987). D'autre part, un tel système devait permettre d'éliminer les animaux sauvages, incapables de pousser en présence de l'antibiotique, diminuant ainsi le nombre d'animaux à manipuler et en conséquence le temps de travail de l'expérimentateur (lors de la transgénèse de la drosophile, une larve injectée G₀ donne naissance à 150 - 200 G₁ et il peut être nécessaire d'analyser une centaine de larves et leur descendance pour établir des lignées transgéniques (Atkinson et al. 2001)).

Pour développer le marqueur de sélection *neo* pour la transgénèse de *D. melanogaster*, H. Steller et V. Pirrotta commencèrent par établir la concentration de G-418 nécessaire pour bloquer la croissance des larves sauvages lorsque l'antibiotique G-418

était administré dans la nourriture (Steller et Pirrotta 1985). Ils observèrent que les larves de drosophile sont plus sensibles au G-418 que les adultes, et à une concentration donnée (concentration critique), les larves sont incapables de se développer alors que les adultes ne commencent à être affectés que 6 à 10 jours après la mise en présence de l'antibiotique. Ces conditions sont idéales pour la sélection des drosophiles transgéniques, car elles permettent aux adultes de pondre des oeufs dans un milieu toxique pour les larves.

Le protocole de sélection développé par ces auteurs consiste à injecter des larves G_0 avec le vecteur de transformation P (nécessaire à l'insertion du transgène dans le génome de la drosophile) associé au gène *neo* sous le contrôle du promoteur du gène endogène *hsp70*, codant pour une protéine de réponse au choc thermique. Le gène *hsp70* étant ubiquitaire, il assure la protection de tous les tissus de l'organisme à tous les stades du développement. Pour sélectionner les larves à la génération G_1 , les individus injectés G_0 au stade adulte sont accouplés et mis en présence de nourriture contenant l'antibiotique à la concentration critique. Ainsi, les larves G_1 sont directement en contact avec la drogue dès leur ponte et seuls les individus G_1 ayant intégré le transgène dans leur génome sont capables de pousser et de se développer. Pour assurer l'expression du transgène *p_{hsp-70}::neo* inductible, les larves G_1 sont soumises à des chocs thermiques tous les trois jours jusqu'au stade adulte. Dans ces conditions, les larves transgéniques se développent aussi rapidement que les larves sauvages en absence d'antibiotique (contrôle) alors que les larves sauvages meurent au premier stade larvaire.

Ce protocole comporte cependant quelques limites (Steller et Pirrotta 1985; Ashburner 1989; French-Constant et Benedict 2000; O'connor et Chia 2002). D'une part, il peut être difficile de déterminer la concentration de travail létale pour les larves sauvages et non toxique pour les individus transgéniques. Lors de la transgénèse de la drosophile, l'élément P contenant le transgène s'intègre dans le génome grâce à l'action d'une transposase exprimée par un plasmide co-injecté. Suivant le site d'intégration dans le génome, les séquences environnantes peuvent avoir un effet sur le niveau d'expression du transgène, qui peut être plus ou moins fort. Ainsi, suivant le site d'intégration du transgène *p_{hsp-70}::neo* dans le génome, l'expression peut être insuffisante pour conférer la résistance aux larves transgéniques, et si la concentration d'antibiotique est trop élevée, ces événements d'intégrations risquent d'être perdus (O'connor et Chia 2002). La fenêtre de concentrations permettant aux différents types de transgéniques de survivre mais limitant l'apparition de faux positifs est donc très étroite. D'autre part, plusieurs auteurs

remarquèrent l'apparition croissante de faux positifs au fur et à mesure des générations (French-Constant et Benedict 2000). Si le système *neo* permettait de sélectionner les transgéniques à la première génération, pour une raison inconnue, un nouveau mécanisme de résistance au G-418 semblait se mettre en place au fil des générations. Certains auteurs attribuèrent l'apparition de faux positifs à la présence de levures résistantes au G-418 comme source de nourriture dans le milieu de croissance (Ashburner 1989).

2.2. Utilisation du marqueur *neo* pour la transgénèse d'autres insectes

Peu de temps après le développement du protocole de sélection pour *D. melanogaster*, le système *neo* et un marqueur similaire utilisant le gène de résistance à l'hygromycine furent utilisés pour la transgénèse de trois espèces de moustiques différentes *Anopheles gambiae*, *Aedes triseriatus* et *Aedes aegypti* (Mcgrane et al. 1988; Morris et al. 1989; Sakai et Miller 1992; Higgs et Lewis 2000).

Même si le système de sélection par le gène *D.m p_{hsp-70}::neo* a permis de d'obtenir des événements de transgénèse chez ces trois espèces de moustique, il ne s'est pas montré pour autant complètement satisfaisant. D'une part, lors de la transgénèse de *A. aegypti*, les auteurs constatèrent une très forte mortalité en présence de l'antibiotique, même pour les individus transgéniques (96 % des individus transgéniques mourraient au huitième jour) (Morris et al. 1989). Il semblait donc difficile de trouver une concentration suffisamment toxique pour éliminer les individus sauvages mais permissive pour la croissance des individus transgéniques. D'autre part, lors de la transgénèse de *A. gambiae* et *A. triseriatus*, les auteurs constatèrent au contraire la présence d'un grand nombre de faux positifs (des individus sauvages non transgéniques mais résistants au G-418) (Miller et al. 1987; Mcgrane et al. 1988). En effet, uniquement 13 individus parmi 36 G₁ résistants d' *A. gambiae* et 8 individus parmi 132 G₂ résistants d'*A. triseriatus* portaient le transgène *p_{hsp-70}::neo*. Par la suite, des expériences ont été réalisées sur une lignée de *A. gambiae* afin de trouver les conditions optimales pour accroître la rigueur de la sélection et réduire ainsi le nombre de faux positifs (Sakai et Miller 1992). Malgré des résultats plutôt satisfaisants obtenus en augmentant le nombre et la fréquence des chocs thermiques, l'arrivée de nouveaux marqueurs génétiques visuels a supplanté l'utilisation du système *neo* pour la transgénèse de ces insectes (Jasinskiene et al. 1998; Berghammer et al. 1999; Higgs et Lewis 2000).

Le système *neo* fut aussi utilisé pour montrer l'expression transitoire du transgène dans la mouche méditerranéenne *Ceratitis capitata* et dans la sauterelle *Locust migratoria* (Mcinnis et al. 1990; Walker 1990). Lors de ces travaux, les auteurs furent aussi confrontés à l'apparition croissante de faux positifs sans que le transgène ait été intégré dans le génome. Certains auteurs affirment que l'apparition de faux positifs lors de ces expériences pourrait être due à la présence de bactéries résistantes au G-418 dans le système digestif des insectes, ce qui les protégerait de la drogue (O'brochta et Handler 2008).

Il faut remarquer que lors des expériences décrites ci-dessus, le vecteur de transformation utilisé était le vecteur de transformation P et le gène *neo* sous le contrôle d'éléments régulateurs de la drosophile, vecteur qui ne fonctionne pas chez ces espèces d'insectes. L'obtention de lignées transgéniques de moustiques s'explique certainement par l'intégration aléatoire ou la recombinaison homologue du transgène dans le génome (Handler 2000).

Malgré ses quelques limites, le système *neo* a montré son utilité en tant que marqueur génétique pour la transgénèse des insectes, notamment en ce qui concerne la diminution de la quantité d'insectes à analyser. Pour bénéficier de cet avantage, certains auteurs proposèrent l'utilisation du système *neo* couplé à un autre marqueur visuel, ce qui devait permettre de différencier les individus transgéniques des faux positifs (Xu et Rubin 1993; Handler 2001). Finalement, l'adaptation du système de sélection basé sur l'utilisation d'antibiotiques à différents insectes montra la possibilité d'utiliser ces systèmes pour la transgénèse des métazoaires.

Objectif des travaux de thèse

Développement d'un nouveau marqueur de transgénèse pour nématodes

Comme décrit dans la Partie III, la transgénèse est un outil clef pour la recherche chez *C. elegans*. Cependant, même si cette technique est utilisée avec succès dans le cadre d'un grand éventail d'études, les marqueurs génétiques utilisés présentent tous des inconvénients. Il serait donc utile pour la Communauté *C. elegans* de disposer de nouveaux marqueurs de transgénèse qui contournent les limites des marqueurs génétiques déjà existants.

Un bon marqueur génétique candidat pour la transgénèse des nématodes devrait remplir les critères suivants : (i) être facilement détectable avec un équipement simple, indépendamment du nombre de copies du gène et à tous les stades du développement, (ii) conférer un avantage sélectif aux individus transgéniques, de manière à diminuer le temps de manipulation de l'expérimentateur lors de la maintenance des lignées, (iii) être compatible avec tout contexte génétique, et, finalement (iv) être compatible avec différentes espèces de nématodes. Ce dernier point est essentiel dans le cadre du développement de techniques de transgénèse pour des nématodes autres que *C. elegans* et *C. briggsae*, comme décrit dans la Partie IV. Basé sur l'exemple du système *neo* et son utilisation pour la transgénèse des insectes présenté dans la Partie V, les critères listés ci-dessus semblent être remplis par les gènes de résistance aux antibiotiques.

En 2003, lors du 14th *C. elegans* International Meeting, J. D. Slone et H. M. Chamberlin proposèrent l'utilisation du gène *neo* comme marqueur de sélection pour la transformation du ver (communication personnelle de J. D. Slone et H. M. Chamberlin). Malgré des résultats encourageants, ce marqueur ne fut jamais complètement développé.

Mes travaux de thèse ont consisté à mener à bien le développement d'un nouveau marqueur génétique pour la transgénèse de *C. elegans* et d'autres nématodes basé sur la résistance à l'antibiotique G-418.

Matériel et Méthodes

1. Nématodes et méthodes associées

Culture des nématodes. *C. elegans* N2, *Rhabditella axei* DF5006, *Rhabditoides regina* DF5012 et *P. pacificus* PS312 ont été obtenus à travers le Caenorhabditis Genetics Center (University of Minnesota, USA). *C. briggsae* AF16 a été offert par I. Hope (University of Leeds, UK). *C. elegans* EN5271 et EN5273 ont été offerts par V. Robert et J. L. Bessereau (École Normale Supérieure, France). Toutes ces espèces et lignées sont maintenues sur du milieu de croissance pour nématodes (Nematode Growth Medium, NGM), inoculé avec la bactérie *E. coli* OP50 comme source de nourriture, suivant les recommandations de S. Brenner et J.E. Sulston et J. Hodgkin (Brenner 1974; Sulston et Hodgkin 1988). Les espèces sont cultivées à 20°C ou à température ambiante (22-23°C) pour leur amplification et à 15°C pour leur maintenance. Pour le stockage à long terme, *C. elegans* N2, EN5271 et EN5273, ainsi que *C. briggsae* AF16 ont été congelés à - 80°C dans une solution de congélation pour nématodes (Sulston et Hodgkin 1988) et *R. axei* DF5006, *R. regina* DF5012 et *P. pacificus* PS312 sont maintenus indéfiniment à 15°C.

Microscopie. Les photos de vers en fluorescence et en Nomarski sont prises avec le microscope droit Axio Imager Z1, Zeiss. Pour cela, les vers sont déposés sur des lames recouvertes d'un tapis d'agarose à 5 %, dans une goutte d'azoture de sodium à 10 mM (anesthésique), le tout recouvert par une lamelle.

Traitement des nématodes à l'hypochlorite de sodium. Pour décontaminer les nématodes de microorganismes non désirables, des populations contenant principalement des adultes sont rincées dans du tampon M9 (Sulston et Hodgkin 1988), puis incubées à température ambiante sous agitation au vortex dans un mélange de soude (0,5 M) et d'hypochlorite de sodium (5 %). Ce traitement tue les adultes et dégrade leur cuticule en libérant les oeufs dans la solution, alors que les oeufs ne sont pas sensibles au traitement. Lorsque 50 % des vers adultes sont dégradés, la solution est centrifugée pendant 3 minutes à 5000 g pour récupérer les oeufs qui se trouvent dans le culot. Puis, les oeufs sont rincés dans du M9 trois fois afin d'éliminer toute trace d'hypochlorite de sodium qui puisse affecter leur croissance. Les oeufs ainsi obtenus sont déposés sur du milieu NGM. Ce même traitement est aussi utilisé pour l'obtention d'oeufs nécessaires pour différentes

expériences. Pour évaluer la quantité d'oeufs présents dans la suspension finale, les oeufs sont comptabilisés sur trois échantillons de 5 μ l indépendants.

Analyse des populations au COPAS Biosort. Afin de connaître le pourcentage d'individus exprimant la GFP au sein d'une population de vers, les populations d'intérêt sont analysées aux COPAS Biosort (Union Biometrica) (Figure 17). Pour cela, la population d'une boîte est resuspendue dans de l'eau et la suspension est versée entièrement dans le récipient du COPAS Biosort prévu pour l'analyse des échantillons. Lors de l'analyse, la totalité de l'échantillon passe devant un faisceau laser (Figure 17 A) et un capteur fournit le profil de fluorescence de chaque ver dans le rouge, le vert et le jaune, ainsi que sa densité optique et la durée de passage du ver devant le capteur (appelé temps de vol, il est représentatif de la taille du ver) (Figure 17 B). Un logiciel informatique convertit ces informations en graphiques où chaque point correspond à un ver et ses coordonnées correspondent au temps de vol (abscisse) et à l'intensité de fluorescence maximale dans le vert (ordonnée). L'analyse d'une population d'animaux sauvages permet de délimiter la région du graphique correspondant à la population non fluorescente (Figure 17 C). Puis, lors de l'analyse des populations d'intérêt, le logiciel permet d'obtenir le nombre de vers qui se trouvent à l'intérieur et à l'extérieur de cette zone. Ainsi, il est possible d'obtenir le nombre et le pourcentage d'animaux sauvages et transgéniques pour chaque population analysée.

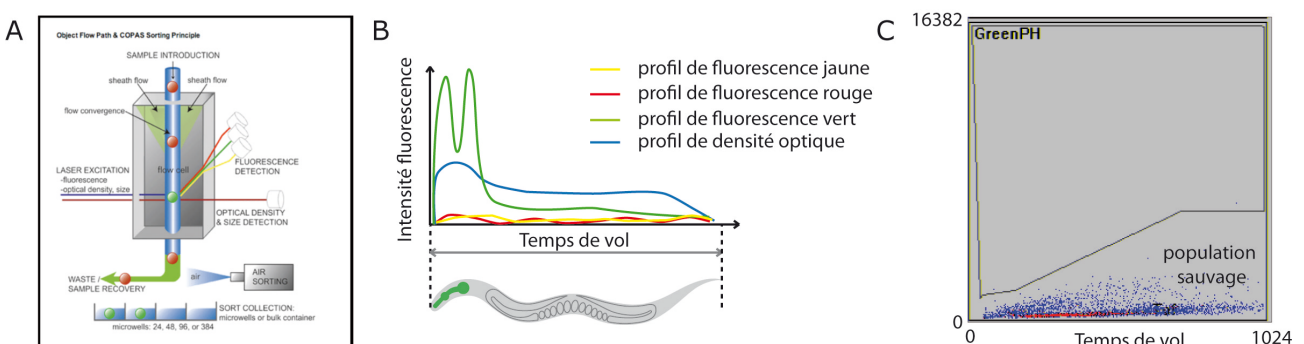


Figure 17 : Analyse des populations de vers au COPAS Biosort. **A** Schéma représentant le passage de l'échantillon devant le faisceau laser du COPAS Biosort. **B** Schéma représentant les profils de fluorescence et de densité optique d'un ver exprimant la GFP dans le pharynx. **C** Analyse d'une population de *C. elegans* N2 (sauvages). La région délimitée en noir exclue tous les animaux sauvages. GreenPH: intensité maximale de fluorescence dans le vert. Chaque point représente un individu analysé.

2. Préparation de boîtes NGM/G-418

De manière générale, les boîtes contenant du milieu NGM avec l'antibiotique G-418 sont préparées en mélangeant la quantité adéquate d'une solution de 50 mg/ml de G-418 (GIBCO, Invitrogen), préparée dans de l'eau stérile, à du milieu NGM à la température de 50-55°C. Puis, les milieux sont coulés dans des boîtes de pétri et séchés pendant un jour à température ambiante (22-23°C). Les milieux sont ensuite inoculés avec une suspension d'*E. coli* OP50 concentrée. Il est nécessaire d'utiliser une suspension bactérienne concentrée, car *E. coli* étant sensible au G-418 le tapis bactérien ne se forme pas normalement en présence de l'antibiotique. La suspension est préparée en centrifugeant pendant 15 minutes à 4000 g une culture de bactéries de 16 heures, inoculée à partir d'une colonie isolée. Le culot est ensuite suspendu dans un cinquième du volume initial, donnant lieu à une suspension 5 fois concentrée. Pour inoculer les boîtes avec cette suspension, les boîtes sont séchées (sans couvercle) sous la hôte stérile pendant 20 minutes, puis, après inoculation, les boîtes sont encore laissées sous la hôte une vingtaine de minutes jusqu'au séchage complet du tapis bactérien. Les boîtes de 4 cm, 6 cm, 9 cm et 14 cm de diamètre sont inoculées avec 50 µl, 300 µl, 1 ml et 2 ml de suspension bactérienne respectivement. Les boîtes ainsi préparées sont stockées avant utilisation jusqu'à 3 semaines à 15°C.

Gammes de concentration G-418 pour tester la toxicité de l'antibiotique. Pour tester la sensibilité des différentes espèces au G-418, des gammes de milieux NGM avec différentes concentrations de G-418 (0,01 à 2 mg/ml), coulés dans des boîtes de 6 cm de diamètre, ont été préparées comme suit. La quantité adéquate d'une solution de 50 mg/ml de G-418 est ajoutée à un volume de 30 ml de NGM à la température de 50-55°C. Puis, les boîtes sont inoculées comme décrit ci-dessus. Les expériences de toxicité ont été effectuées à température ambiante (22-23°C).

Gammes de concentration G-418 pour évaluer l'enrichissement des lignées transgéniques. Pour évaluer le pourcentage de vers transgéniques dans des populations cultivées à différentes concentrations de G-418, des gammes de milieux NGM avec différentes concentrations de G-418 (0,1 à 0,4 mg/ml), coulés dans des boîtes de 6 cm de diamètre, ont été préparées comme suit. La quantité adéquate d'une solution de 50

mg/ml de G-418 est ajoutée à un volume de 100 à 150 ml de NGM à la température de 50-55°C. Une fois la solution d'antibiotique ajoutée, le milieu est mélangé quelques minutes à l'aide d'un agitateur magnétique afin d'assurer la répartition homogène de l'antibiotique dans le milieu et minimiser la variabilité entre les boîtes. Les boîtes sont ensuite coulées et inoculées comme décrit ci-dessus.

Milieu sélectif pour sélection et maintenance des lignées. Les boîtes contenant du milieu NGM avec du G-418 à 0,4 mg/ml (milieu sélectif), sont préparées à partir de volumes de 1 à 2,5 L de milieu NGM à 50-55°C. Une fois la solution d'antibiotique ajoutée, le milieu est mélangé quelques minutes à l'aide d'un agitateur magnétique afin d'assurer la répartition homogène de l'antibiotique dans le milieu et minimiser la variabilité entre les boîtes. Les boîtes sont ensuite coulées et inoculées comme décrit ci-dessus.

Boîtes pour sélection post-bombardement. Les boîtes de 14 cm de diamètre contenant du G-418 à 1 mg/ml, utilisées pour la sélection suite au bombardement, sont préparées en ajoutant de l'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml, pour éviter des contaminations bactériennes dues à la technique du bombardement.

Milieu sélectif inoculé avec des bactéries résistantes au G-418. Des bactéries *E. coli* OP50 résistantes au G-418, transformées avec le plasmide *pETMCN-EK* (dérivé du plasmide *pET-28b:Ori colE1* (Kan^R), fourni par S. Fribourg, IECB, France) furent aussi utilisées pour inoculer les milieux NGM-G-418. Ces bactéries sont cultivées en présence de G-418. Une culture de 16 heures à partir d'une colonie isolée est utilisée pour inoculer les boîtes suivant les recommandations pour la préparation du milieu NGM classique (Sulston et Hodgkin 1988).

3. Méthodes de transgénèse

Transgénèse par microinjection. La transgénèse des nématodes par microinjection est réalisée suivant le protocole décrit par C. Mello et collaborateurs (Mello et al. 1991). Une liste complète des lignées receveuses ainsi que des lignées obtenues durant les travaux de thèse est présentée en Annexe 1. Tous les plasmides utilisés pour la transformation

des vers par microinjection sont préparés en utilisant le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) suivi d'une purification avec le kit Qiaquick PCR Purification Kit (QIAGEN) ou en purifiant les plasmides directement avec le kit Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Pour la construction des lignées de *C. elegans* portant des concatémères extrachromosomiques répétitifs avec le transgène $p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}$, des jeunes adultes N2 ont été injectés avec le plasmide $p_{DD04neo p_{myo-2::gfp}}$ à 100 ng/μl (DUD0001 à DUD0004), ou avec un mélange de $p_{DD04neo p_{mec-7::gfp}}$ et p_{RF4} (50:50) à la concentration finale de 100 ng/μl (DUD0007 à DUD0011). Les lignées de *C. elegans* portant des concatémères extrachromosomiques complexes avec le transgène $p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}$ ont été construites en injectant un mélange de 0,4 ng/μl du plasmide $p_{DD04neo p_{myo-2::gfp}}$ et de 30 ng/μl d'ADN génomique de *C. elegans* N2, tous les deux digérés avec l'enzyme de restriction SmaI, avec 40 ng/μl du plasmide p_{Ceh361} (0,5:42,5:57) dans la lignée CB907 (injections réalisées par D.Tu, Simon Fraser University, Canada) (BC8949 à BC8951).

Pour la construction des lignées de *C. briggsae* portant le transgène $p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}$, des jeunes adultes ont été injectés avec un mélange de 0,8 ng/μl du plasmide $p_{DD04neo p_{myo-2::gfp}}$ et de 60 ng/μl d'ADN génomique de *C. briggsae* AF16, tous les deux digérés avec l'enzyme de restriction SmaI (DUD0005, DUD0006).

Les lignées extrachromosomiques pour l'obtention d'insertions suivant le protocole de MosSCI par choc thermique ont été obtenues après injection dans la lignée receveuse EN5271 (ou EN5273) de 33 ng/μl de p_{CB101} , 33 ng/μl de p_{JL44} et 33 ng/μl de $p_{RG5271 p_{myo-2::gfp}}$ (ou $p_{RG5273 p_{myo-2::gfp}}$) (DUD0015 à DUD0023).

La lignée *C. elegans* portant le transgène $p_{rps-27::neo::gfp::3'UTR unc-54}$, a été créée en injectant des jeunes adultes avec un mélange de 2 ng/μl du plasmide p_{RG01} , 0,5 ng/μl du plasmide $p_{destDD04neo}$ et 100 ng/μl du plasmide p_{RF4} (DUD0060).

Les lignées destinées à la culture cellulaire des interneurones AIY et des neurones AFD ont été créées en injectant des jeunes adultes *C. elegans* N2 avec des mélanges complexes contenant le plasmide d'intérêt ($p_{AK062puro}$ ou $p_{SAS318puro}$) à 5 ng/μl, de l'ADN génomique de *C. elegans* N2 à 90 ng/μl et le plasmide $p_{destDD04neo}$ à 1 ng/μl, tous les trois digérés avec l'enzyme de restriction ApaI (DUD0033 à DUD0054).

Sauf si indiqué autrement, toutes les lignées ont été sélectionnées sur du milieu NGM contenant 0,4 mg/ml de G-418 (milieu sélectif) sur la base de la résistance à

l'antibiotique et maintenues en repiquant des individus isolés ou en transférant un morceau d'agar contenant des vers d'une boîte avec milieu sélectif à une autre.

Transgénèse par bombardement. La transgénèse des nématodes par bombardement a été réalisée en utilisant le canon à billes commercial Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad), équipé de l'Hepta Adaptor et en suivant le protocole décrit par V. Praitis et collaborateurs (Praitis et al. 2001), sauf pour les modifications suivantes. 60 mg de billes de tungstène (Bio-Rad) sont lavées dans 1 ml d'éthanol à 70 % en agitant fortement pendant 3 à 5 minutes. Les billes sont récupérées par centrifugation rapide et suspendues dans 1 ml d'éthanol à 70 %, puis agitées à 100 rpm pendant 15 minutes. Les billes sont ensuite lavées trois fois dans 1 ml d'eau stérile et suspendues dans 500 µl d'une solution de 50 % de glycérol (à ce stade, les billes peuvent être stockées à -20°C). Pour enrober les billes avec l'ADN d'intérêt, 60 µl de billes ainsi préparées sont mélangées à 50 µl d'ADN à 200 ng/µl, 100 µl de CaCl₂ à 2,5 M et 40 µl de spermidine à 0,1 M, sous forte agitation pendant 3 minutes. Puis, les billes sont lavées dans 300 µl d'éthanol à 70 %, puis dans 500 µl d'éthanol à 100 % et finalement suspendues dans 170 µl d'éthanol à 100 %. Cette préparation est répartie sur sept disques porteurs (Bio-Rad) pour un heptabombardement, en raison de 20 µl par disque. Pour cela, les disques sont d'abord imbibés d'isopropanol et séchés sous la hôte aspirante afin de faciliter l'adsorption des billes. L'assemblage de l'Hepta Adaptor et le bombardement se fait suivant les instructions du manuel du canon à billes (Bio-Rad).

Pour la constructions de lignées portant le transgène *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54*, l'ADN utilisé fut préparé en liant le plasmide *pdestDD03* (Dupuy et al. 2004) et le plasmide *pdestDD04neo*, tous les deux digérés avec les enzymes de restriction HindIII et Sall, avec la T4 DNA Ligase. Cet ADN fut utilisé pour bombarder des vers *C. elegans* DP38. Pour cela, 20 boîtes de 9 cm de diamètre contenant des vers jeunes adultes, amplifiés suivant le protocole décrit par T. C Evans (Evans 2006), furent resuspendus dans du tampon M9 et sédimentés en les incubant dans la glace. Pour un heptabombardement, le culot contenant les jeunes adultes fut reparti en sept populations sur la même boîte, suivant la disposition des disques porteurs dans l'Hepta Adaptor. Après le bombardement, la population entière fut suspendue dans du M9 et distribuée sur cinq à sept boîtes NGM de 9 cm de diamètre. Deux à trois semaines après le bombardement, les boîtes furent criblées à la recherche de vers ayant un phénotype sauvage. Un seul ver transgénique

par boîte a été considéré comme provenant d'une lignée indépendante (DUD0012 à DUD0014).

Pour les essais de bombardement de *C. elegans* N2 et *C. briggsae* AF16 avec le vecteur *pDD04neo pmyo-2::gfp*, des populations contenant principalement des larves L1 sont transférées sur des boîtes NGM de 14 cm de diamètre et cultivées jusqu'au stade de jeunes adultes. Les populations d'une à trois boîtes sont ensuite suspendues dans du tampon M9 et sédimentées en les incubant dans la glace. Trois échantillons de 5 µl de culot, sont comptés afin d'estimer la quantité de vers contenus dans la suspension. Pour le bombardement, les vers sont repartis en différentes populations sur une même boîte en suivant la disposition des disques porteurs dans l'Hapta Adaptor et ceci sur la glace, afin de minimiser le déplacement des vers. Après le bombardement, les populations sont suspendues dans du milieu M9 et distribuées sur des boîtes NGM de 14 cm de diamètre contenant 1 mg/ml de G-418 et 100 µg/ml d'ampicilline pour éviter les contaminations. Les populations sont incubées à température ambiante et soumises à un choc thermique par jour, pendant les trois premiers jours post-bombardement. Pour cela, les boîtes sont mises dans un incubateur de bactériologie à 37°C, pendant une heure. Les boîtes sont ensuite criblées régulièrement pendant un mois à la recherche de vers exprimant la GFP dans le pharynx.

4. Insertions par *MosSCI*

PCR diagnostique pour confirmer la présence du transposon *Mos1*. Avant d'utiliser les lignées EN5271 et EN5273 pour des expériences de *MosSCI*, la présence du transposon *Mos1* au bon locus a été confirmée par PCR. Pour cela, la PCR fut réalisée sur des vers EN5271 (ou EN5273) avec les amorces oJL115 (s'hybride à l'intérieur du transposon *Mos1*) et oVR261 (ou oVR266) (s'hybride sur l'ADN génomique à l'extérieur du transposon) (Figure 18). Le couple d'amorces org109 et org110, donnant lieu à l'amplification de l'ADN ribosomale 18S (Fitch et al. 1995) fut inclus dans le mix à PCR et utilisé comme contrôle interne de la PCR (amplification de 1,7 kb).

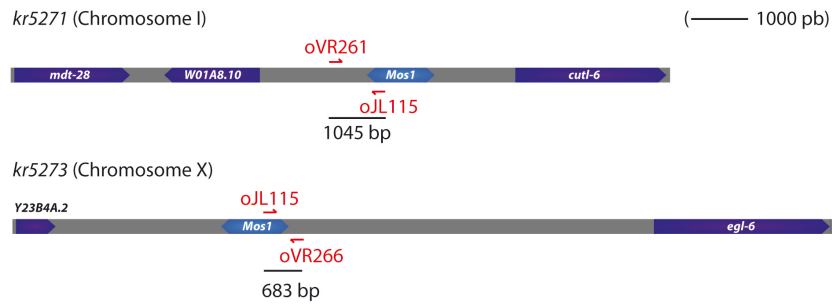


Figure 18 : Position des insertions *Mos1* dans les lignées EN5271 et EN5273. En haut, allèle *kr5271* de la lignée EN5271. En bas, allèle *kr5273* de la lignée EN5273.

Insertions *MosSCI* suivant le protocole de choc thermique. Des populations contenant principalement des jeunes adultes des lignées DUD0021 à DUD0023, pour les insertions à partir de l'allèle *kr5271*, et des lignées DUD0015 à DUD0020, pour les insertions à partir de l'allèle *kr5273*, ont été soumises à un choc thermique de 1 heure à 33°C, 1 heure à 15°C et 1 heure à 33°C, directement sur boîte sélective (Robert et al. 2009). Pour cela, les boîtes sont sellées avec du parafilm et submergées dans un bain marie à 33°C pendant une heure. L'opération est répétée après une heure de récupération à 15°C. Puis, après une nuit à 15°C, les vers adultes sont transférés sur des nouvelles boîtes sélectives en raison de 20 vers par boîte. Les populations sont ensuite amplifiées à température ambiante (22-23°C) jusqu'à l'identification des événements d'insertion, basé sur l'expression de la GFP dans le pharynx et l'absence d'expression de DsRed2 dans le système nerveux. Des événements d'insertion indépendants, provenant de boîtes distinctes inoculées de 20 vers soumis au choc thermiques, ont été isolés sur du milieu sélectif pour confirmer leur résistance au G-418. Les populations homozygotes sont maintenues sur milieu NGM (DUD0024 à DUD0030).

Insertions suivant le protocole direct. Pour l'obtention d'insertions suivant le protocole de *MosSCI* direct, des jeunes adultes de la lignée EN5273 ont été injectés avec le mélange suivant : 33 ng/μl de *pCB101*, 33 ng/μl de *pJL43* et 33 ng/μl de *pRG5273* *pmyo-2::gfp*. Un deuxième essai a été effectué en ajoutant à ce mélange 10 ng/μl du plasmide *pRF4*. Les jeunes adultes injectés ont été isolés sur des boîtes contenant du milieu sélectif. Les populations ont été amplifiées jusqu'à l'identification des événements d'insertion basée sur l'expression de la GFP dans le pharynx et l'absence d'expression de DsRed2 dans le système nerveux. Des événements d'insertion indépendants, provenant d'individus injectés différents, ont été isolés sur du milieu sélectif pour confirmer leur

résistance au G-418. Les populations homozygotes sont maintenues sur milieu NGM (DUD0055 à DUD0059).

PCR diagnostique des insertions. Les événements d'insertion putatifs ont été vérifiés par PCR sur ver. Les insertions à partir de la lignée EN5271 sont criblées avec les amorces org115 (s'hybride sur la région 3'UTR du transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}*) et org146 (s'hybride sur la région génomique à droite du locus *kr5273*), qui entraînent l'amplification d'un fragment de 1,4 kb. Un autre couple d'amorces, M13F (s'hybride sur le vecteur *pBlueScript*) et org99 (s'hybride sur la région génomique à gauche du locus *kr5273*, présente sur le vecteur matrice de réparation), entraîne l'amplification d'un fragment de 1,5 kb si le concatémère extrachromosomique est encore présent (Figure 36 A Résultats Partie III). Les insertions à partir de la lignée EN5273 sont criblées avec les amorces org115 (s'hybride sur la région 3'UTR du transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}*) et org145 (s'hybride sur la région génomique à droite du locus *kr5273*), qui entraînent l'amplification d'un fragment de 1,7 kb. Une autre couple d'amorces, M13F (s'hybride sur le vecteur *pBlueScript*) et org103 (s'hybride sur la région génomique à gauche du locus *kr5273*, présente sur le vecteur matrice de réparation), entraîne l'amplification d'un fragment de 1,5 kb si le concatémère extrachromosomique est encore présent (Figure 36 B Résultats Partie III).

PCR quantitative (qPCR). Pour confirmer la présence des transgènes *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* et *p_{myo-2::gfp}* en une seule copie, et exclure ainsi la présence d'événements d'insertion complexes ayant abouti à l'insertion de plusieurs copies, l'ADN génomique de chaque événement d'insertion putatif a été analysé par qPCR. Pour cela, cinq paires d'amorces ont été dessinées, destinées à amplifier des séquences de ~70 pb à partir de la région codante du transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR (neo)}*, du transgène *p_{myo-2::gfp (gfp)}* et du gène *unc-119 (unc-119)* et de la région génomique à gauche du locus *kr5271 (71L)* et de la région génomique à droite du locus *kr5273 (73R)* (Figure 19, et Annexe 3). Des échantillons d'ADN génomique sont analysés avec le système de détection à fluorescence DNA Engine Opticon2 (MJ Research/Bio-Rad), avec chaque paire d'amorces spécifiques. Le kit DyNAmo SYBR Green qPCR (Finnzymes) est utilisé pour l'amplification, suivant les instructions du fabricant. Le programme de PCR utilisé est le suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes, puis, 40 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, et l'hybridation-extension à

61°C pendant 35 secondes. Les courbes de dissociation de chaque échantillon sont vérifiées afin de confirmer qu'un seul produit est amplifié. Pour chaque ADN génomique analysé, le nombre de cycles correspondant à un seuil d'amplification prédéfini (*cycle threshold*, C(t)) pour chaque couple d'amorces est normalisé par rapport au C(t) de *unc-119* (C(t)_{*unc-119*}). Les variations entre le C(t) d'intérêt et le C(t)_{*unc-119*} contrôle sont ensuite exprimées en termes de facteur de variation (*Fold change*, Fc) d'après la formule $Fc = 2^{-(C(t) - C(t)_{unc-119})}$. Un facteur de variation proche de 1 signifie que le nombre de copies du gène d'intérêt dans l'échantillon analysé est équivalent au nombre de copies du gène *unc-119*.

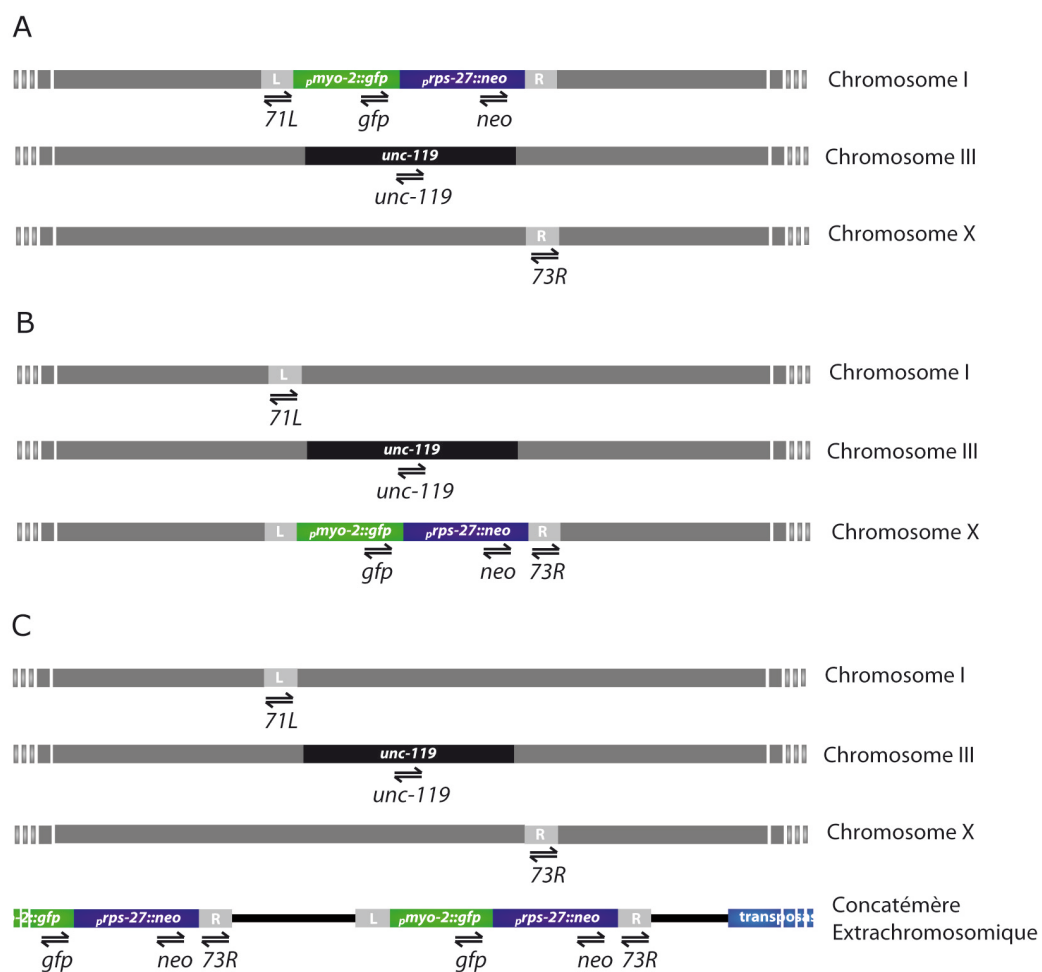


Figure 19 : Position des amorces pour la PCR quantitative. **A** Schéma représentatif de l'hybridation des couples d'amorces 71L, *gfp*, *neo*, *unc-119* et 73R sur l'ADN génomique d'un événement d'insertion à la place de l'allèle *kr5271*. **B** Schéma représentatif de l'hybridation des couples d'amorces 71L, *gfp*, *neo*, *unc-119* et 73R sur l'ADN génomique d'un événement d'insertion à la place de l'allèle *kr5273*. **C** Schéma représentatif de l'hybridation des couples d'amorces 71L, *gfp*, *neo*, *unc-119* et 73R sur l'ADN génomique d'une lignée extrachromosomique portant le vecteur matrice de réparation pour les insertions au locus *kr5273*.

Southern Blot. Les événements d'insertion putatifs ont aussi été analysés par Southern Blot. Pour cela, l'ADN génomique de chaque lignée est tout d'abord digéré avec les

enzymes de restriction d'intérêt (Figure 37 et 38, Résultats, Partie III). 2,5 µg d'ADN génomique sont digérés avec 12,5 unités de l'enzyme de restriction, dans le tampon approprié, durant 12 à 16 heures. Puis, les ADN digérés sont chauffés 3 minutes à 56°C et 1 µg de chaque ADN est chargé dans un gel 0,7 % agarose dans 50 % de tampon TAE, de 10 cm de long. Les fragments sont séparés par électrophorèse pendant 7 heures à 30 V. Le gel est alors rincé dans de l'eau, puis incubé 15 minutes dans du tampon de transfert alcalin (NaOH 0,4 N, NaCl 1M), suivi d'une deuxième incubation de 20 minutes dans le même tampon (agitation douce de 50 rpm à température ambiante). Le transfert des fragments d'ADN du gel à la membrane (SensiBlot™ Plus Nylon Membrane, Fermentas) est effectué pendant 16 à 18 heures, dans du tampon de transfert alcalin, suivant les recommandations de J. F. Sambrook et I. Russell (Sambrook et Russell 2001). La membrane est ensuite rincée dans du tampon 0,5 M Tris-Cl pH 7,2, 1 M NaCl, pendant 15 minutes à température ambiante, sous agitation (50 rpm), puis séchée à l'air libre sur du papier Whatman. L'ADN est fixé sur la membrane grâce à l'incubation à 80°C pendant 30 minutes, suivi de 2 minutes d'exposition aux rayons UV. Pour l'hybridation de la membrane avec la sonde *gfp* ou *neo*, la membrane est d'abord trempée dans du 6 X SSC (*Saline-sodium citrate*, SSC : 0,15 M NaCl, 1,5 mM citrate de sodium), puis hybridée avec la sonde correspondante suivant les recommandations du kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas). La détection des sondes est effectuée grâce au kit Biotin Chromogenic Detection (Fermentas), suivant les recommandations du fabricant et en incubant la membrane avec le substrat BCIP-T pendant 16 à 18 heures. Ce système de détection est basé sur l'utilisation de sondes biotinilées qui sont reconnues par la streptavidine couplée à une phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline clive le substrat BCIP-T, donnant lieu à la formation d'un précipité bleu insoluble. Les sondes *neo* et *gfp* ont été réalisées avec le kit Biotin DecaLabel™ DNA Labeling (Fermentas) et suivant les recommandations du fabricant. L'amplification des sondes *neo* et *gfp* est réalisée par PCR avec les amorces org96 et org97 et iz51 et iz52, respectivement. Les membranes sont d'abord hybridées avec la sonde *neo*. Pour réutiliser les membranes et les hybrider une deuxième fois avec la sonde *gfp*, elles sont incubées sous agitation (50 rpm) dans 0,1 % SDS chauffé à 100°C, jusqu'au refroidissement à température ambiante de la solution. Ce traitement permet de re-hybrider la membrane mais ne permet pas pour autant d'éliminer le précipité bleu apparu lors de la première hybridation.

5. Biologie Moléculaire

5.1. Constructions de plasmides

Une liste complète des plasmides utilisés et construits dans le cadre des travaux de thèse est présentée en Annexe 2. Les amorces utilisées sont présentées en Annexe 3. Toutes les PCR pour l'amplification d'inserts dans le cadre de constructions de plasmides furent réalisées avec l'enzyme Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes), suivant les recommandations du fabricant. Les enzymes de restrictions et la T4 DNA Ligase proviennent de New England BioLabs et ont été utilisées suivant les recommandations du fabricant.

Construction du plasmide *pdestDD04neo*. (construction réalisée par D. Dupuy) La cassette *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* (2274 pb) a été construite par PCR fusion en amplifiant le promoteur du gène *C.e rps-27* avec les amorces Prs-27 fwd et Prs-27 rev à partir de l'ADN génomique de *C. elegans*, le gène *neo* avec les amorces Neo fwd et Neo rev à partir du plasmide *pCDNA-dest53* (Gateway®, Invitrogen) et le *3'UTR unc-54* avec les amorces utr fwd et UTRrev2 à partir du plasmide *pdestMB14* (Dupuy et al. 2004). Cette cassette a ensuite été clonée dans le vecteur *pBlueScript (SK-)* grâce aux enzymes de restriction Apal et XhoI. La cassette *attR4::ccdB::Cm::attL1::gfp::3'UTR unc-54::attR2*, a été réalisée en utilisant la technologie Gateway® (Invitrogen), puis amplifiée par PCR avec les amorces PdestDD fwd et PdestDD rev-2 contenant des sites de restriction Apal et introduite en amont de la cassette *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* grâce à l'enzyme Apal. Le vecteur a été vérifié par séquençage. La carte du plasmide est présentée dans la Figure 20 A.

Construction des plasmides *pDD04neo p_{myo-2::gfp}* et *pDD04neo p_{mec-7::gfp}*. (constructions réalisées par D. Dupuy) Les promoteurs *C.e p_{myo-2}* et *C.e p_{mec-7}* sont introduits dans le vecteur *pdestDD04neo* en utilisant la technologie Gateway® (Invitrogen) (Dupuy et al. 2004).

Construction du plasmide *pRG01*. Pour construire la cassette *p_{rps-27::neo::gfp::3'UTR unc-54}*, les amorces org177 et org178 ont été utilisées pour amplifier l'insert *p_{rps-27::neo}*

à partir de *pdestDD04neo*. Puis, l'insert a été cloné dans *pAK062* à la place du fragment coupé par les enzymes HindIII et KpnI (Figure 20 B). Le vecteur a été vérifié par séquençage avec les amorces org174 et org225.

Construction des plasmides *pRG5271neo* et *pdestRG5271neo*. Les amorces org98 et org99 ont été utilisées pour amplifier un fragment de 1,5 kb du côté gauche de l'insertion du transposon *Mos1* au locus *kr5271*, à partir de l'ADN génomique de *C. elegans*. Ce fragment a ensuite été utilisé pour remplacer le fragment KpnI et Apal dans le plasmide *pdestDD04neo*, pour donner le plasmide *p71L*. Les amorces org113 et org114 ont été utilisées pour amplifier un fragment de 1,3 kb du côté droit de l'insertion du transposon *Mos1* au locus *kr5271*, à partir de l'ADN génomique de *C. elegans*. Ce fragment a été cloné dans le vecteur *p71L* grâce aux enzymes SmaI et NotI, donnant lieu au plasmide *pRG5271neo* (Figure 20 C). Le séquence de ce vecteur a été confirmée par séquençage avec les amorces M13 F, M13 R, org89 et org115. Puis, les amorces org119 et org120 ont été utilisées pour amplifier la cassette *attR4::ccdB::Cm::attL1::gfp::3'UTR unc-54::attR2* à partir du vecteur *pdestDD04neo*. Cette cassette a ensuite été clonée dans le vecteur *pRG5271neo* grâce à l'enzyme Apal, donnant lieu au vecteur *pdestRG5271neo* (Figure 20 D). L'orientation de cette cassette par rapport à *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54* a été déterminée par restriction avec les enzymes XhoI et NotI.

Construction des plasmides *pRG5273neo* et *pdestRG5273neo*. Les amorces org102 et org103 ont été utilisées pour amplifier un fragment de 1,4 kb du côté gauche de l'insertion du transposon *Mos1* au locus *kr5273*, à partir de l'ADN génomique de *C. elegans*. Ce fragment a ensuite été utilisé pour remplacer le fragment KpnI et Apal dans le plasmide *pdestDD04neo*, pour donner le plasmide *p73L*. Les amorces org111 et org112 ont été utilisées pour amplifier un fragment de 1,6 kb du côté droit de l'insertion du transposon *Mos1* au locus *kr5273*, à partir de l'ADN génomique de *C. elegans*. Ce fragment a été cloné dans le vecteur *p73L* grâce aux enzymes SmaI et NotI, donnant lieu au plasmide *pRG5273neo* (Figure 20 F). La séquence de ce vecteur a été confirmée par séquençage avec les amorces M13 F, M13 R, org89 et org115. Puis, les amorces org119 et org120 ont été utilisées pour amplifier la cassette *attR4::ccdB::Cm::attL1::gfp::3'UTR unc-54::attR2* à partir du vecteur *pdestDD04neo*. Cette cassette a ensuite été clonée dans le vecteur *pRG5273neo* grâce à l'enzyme Apal, donnant lieu au vecteur *pdestRG5273neo*

(Figure 20 G). L'orientation de cette cassette par rapport à $p_{rps-27}::neo::3'UTR\ unc-54$ a été déterminée par restriction avec les enzymes XhoI et NotI.

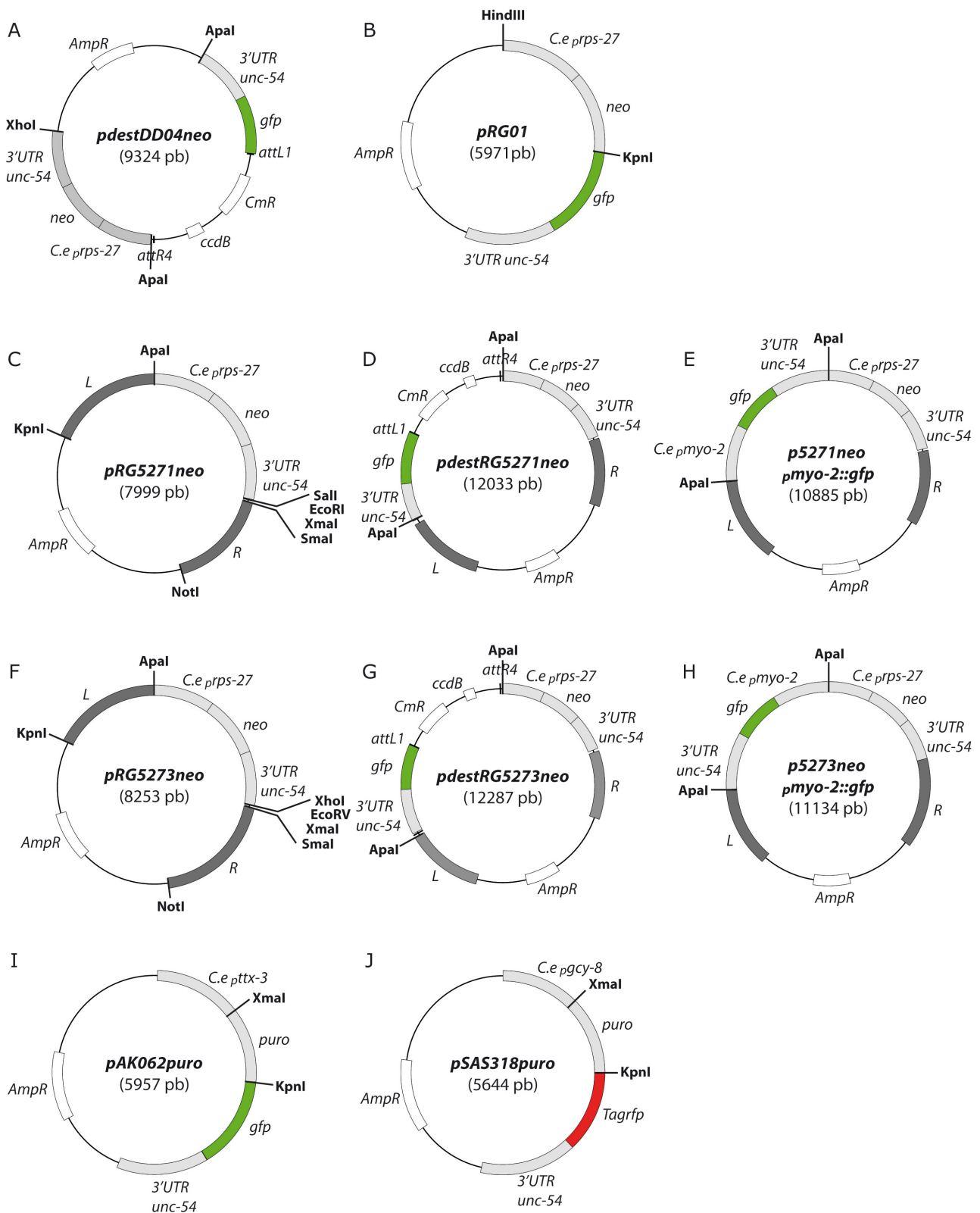


Figure 20 : Cartes des plasmides. Les sites de restriction utilisés pour la construction de chaque plasmide sont signalés en gras.

Construction des plasmides *pRG5271neo* *pmyo-2::gfp* et *pRG5273neo* *pmyo-2::gfp*.

L'insert *pmyo-2::gfp* a été coupé du plasmide *pDD04neo* *pmyo-2::gfp* grâce à l'enzyme de restriction Apal, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose, puis cloné dans les plasmides *pRG5271neo* et *pRG5273neo* (Figure 20 E et H). L'orientation de la cassette par rapport à *pmps-27::neo::3'UTR unc-54* a été déterminée par restriction avec les enzymes SmaI et NotI.

Construction des plasmides *pAK062puro* ou *pSAS318puro*. La région codante du gène *puro* avec introns, a été amplifiée avec les amorces org172 et org173 à partir du plasmide *pBCN22-R4-R3* (Semple et al. 2010). Ce fragment a été cloné dans les vecteurs *pAK062* et *pSAS318* (fournis par I. Mori, Nagoya University, Japan), grâce aux enzymes XmaI et KpnI, donnant lieu aux vecteurs *pAK062puro* et *pSAS318puro* (Figure 20 I et J). Les vecteurs ont été vérifiés par séquençage avec les amorces org174 et org175 respectivement.

5.2. Divers

Extraction d'ADN génomique. L'extraction d'ADN génomique des différentes espèces et lignées a été réalisée en utilisant le kit commercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), avec les modifications suivantes. Les populations contenant principalement des vers adultes (deux à trois boîtes de 9 cm de diamètre) sont rincées deux fois dans du M9 ou de l'eau stériles, en les laissant sédimenter à chaque fois dans la glace. Le culot est ensuite suspendu dans 500 µl du tampon de pré-lyse T1 et congelé à -80°C pendant au moins une heure. Après l'ajout de 50 µl de protéinase K, l'échantillon est incubé pendant la nuit (16 heures) à 56°C. Puis, l'ADN est extrait en suivant les recommandations du fabricant.

Purification de l'ADN à l'éthanol. Pour la purification de l'ADN génomique suite à des restrictions enzymatiques, les échantillons sont incubés minimum 1 heure à -20°C, avec 1/10 du volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol à 100 % froid (-20°C). Puis, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 4°C, à la vitesse maximale. Le surnageant est prélevé une première fois, puis le reste est prélevé suite à une deuxième centrifugation. Le culot (parfois invisible) est lavé avec 200 µl d'éthanol à 70 % froid (-20°C), puis l'échantillon est centrifugé à nouveau pendant 5 minutes à vitesse

maximale à 4°C. Le surnageant est éliminé et les restes d'éthanol sont évaporés en laissant le tube ouvert à 37°C. Le culot est resuspendu dans de l'eau.

PCR sur ver. Les PCR de diagnostic ont été réalisées sur des individus uniques. Les vers sont repiqués individuellement à partir de populations homozygotes pour le gène d'intérêt. Le ver à analyser est déposé dans 5 µl de tampon de lyse (tampon de PCR contenant 1 mg/ml de protéinase K), dans le bouchon d'un tube à PCR. Une centrifugation rapide permet de ramener le ver dans le tampon de lyse au culot du tube. Le tube est ensuite incubé à -80°C pour une heure minimum (endommagement de la cuticule du ver), puis il est soumis à une incubation de 1h30 à 60°C (lyse des cellules) et 15 minutes à 95°C (inactivation de la protéinase K), le tout dans un thermocycleur. À ce stade, l'échantillon peut-être stocké à -20°C. Pour la PCR, 25 µl d'un mix de PCR avec les amorces d'intérêt est ajouté aux 5 µl de lysat de ver. L'enzyme utilisée est la *Taq* DNA Polymerase with Thermo Pol Buffer (New England BioLabs), suivant les instructions du fabricant.

Résultats

Partie I : Le gène *neo*, marqueur de transgénèse pour la microinjection de *C. elegans* et *C. briggsae*

1. *C. elegans* et quatre autres espèces de nématodes sont sensibles à l'antibiotique G-418

1.1. Détermination de la concentration critique en G-418 pour *C. elegans*

Pour évaluer la sensibilité de *C. elegans* à l'antibiotique G-418, des vers *C. elegans* N2, au stade L1 ou adulte, furent placés sur du milieu NGM solide contenant l'antibiotique, en présence de *E. coli* OP50 concentrée comme source de nourriture. Pour chaque concentration de G-418 allant de 0 mg/ml (contrôle) à 1 mg/ml, dix jeunes adultes ou dix L1 furent mis en présence de l'antibiotique et leurs croissance et reproduction furent observées durant deux à quatre semaines.

La croissance des larves L1 est affectée par l'antibiotique G-418 (Figure 21 A et B). Lorsque les larves sont mises en présence de G-418 à 0,1 mg/ml, leur croissance est ralentie et elles n'atteignent le stade adulte qu'au bout de 72 heures au lieu de 48 heures en absence de la drogue. À des concentrations supérieures à 0,2 mg/ml, plus de 50 % des larves L1 ne se développent pas (Figure 21 A) ; leur croissance s'arrête aux premiers stades larvaires (L1 ou L2) et les larves meurent après quelques jours (Figure 21 B). Les larves survivantes atteignent le stade adulte après 72 heures de culture. À des concentrations supérieures à 0,4 mg/ml, plus de 80 % des larves L1 n'atteignent pas le stade adulte. Les vers qui atteignent le stade adulte dans ces conditions présentent des défauts locomoteurs et ont une taille inférieure aux contrôles non exposés à la drogue. Ils meurent avant le sixième jour de croissance sans donner de progéniture viable.

Les vers adultes sont moins sensibles au G-418 que les larves L1 (Figure 21 C). À des concentrations de G-418 inférieures à 0,3 mg/ml, les vers adultes sont tous viables, présentent un phénotype sauvage et sont capables de pondre des oeufs en présence de l'antibiotique (Figure 21 C). À des concentrations de G-418 entre 0,3 mg/ml et 0,5 mg/ml, une fraction inférieure à 20 % des vers est affectée et meurt au troisième jour. Les vers survivants présentent cependant un phénotype sauvage, ne semblent pas être affectés par la drogue et sont capables de pondre des oeufs. Au-delà de cette concentration, la

fraction de vers adultes morts après trois jours de culture augmente. En présence de G-418 à 1 mg/ml, plus de 50 % des adultes meurent avant le troisième jour.

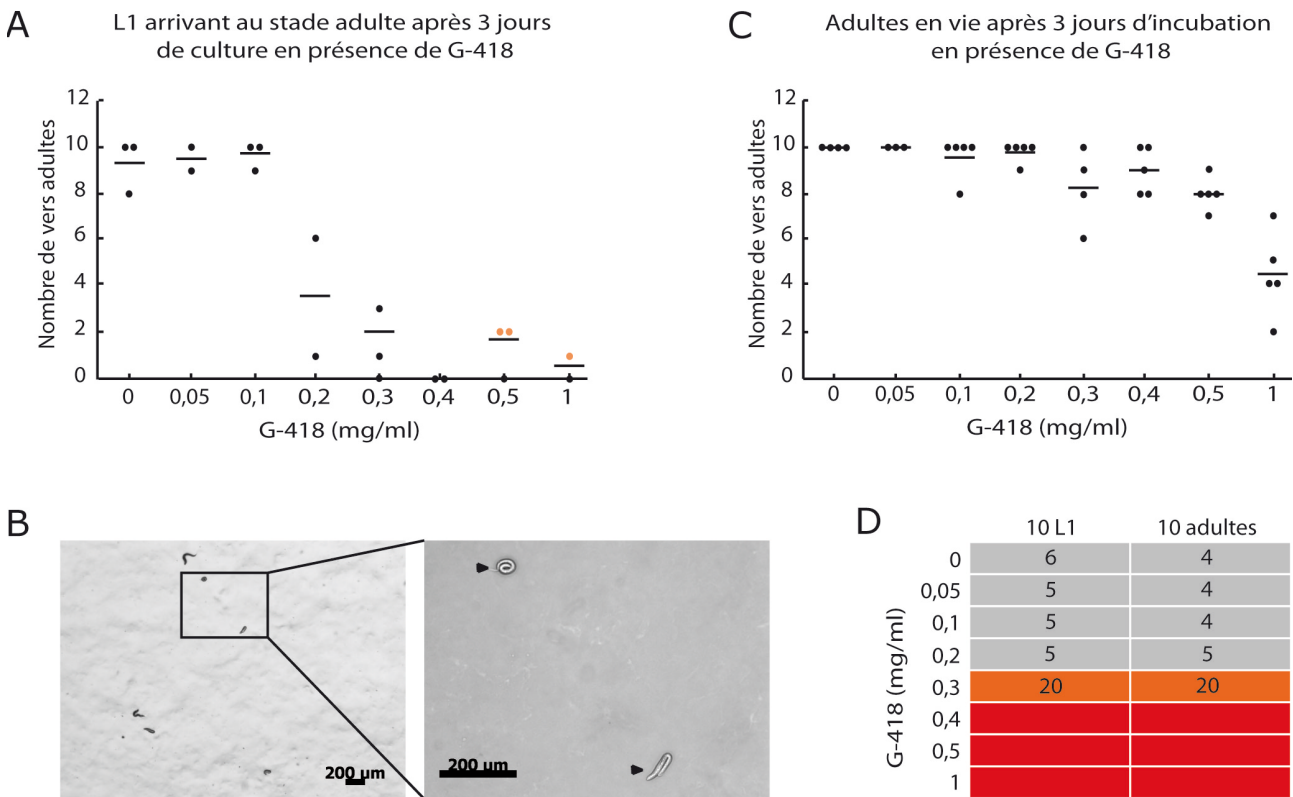


Figure 21 : L'antibiotique G-418 affecte la croissance de *C. elegans*. **A** Dix larves L1 sont mises en culture dans des boîtes NGM en présence de la drogue. Le nombre de vers adultes par boîte est comptabilisé après trois jours de culture. Chaque point représente le nombre d'adultes dans une boîte contenant la concentration d'antibiotique indiquée en abscisse, pour une expérience indépendante. Les points oranges représentent des adultes n'ayant pas donné de progéniture viable et mourant avant le sixième jour de culture. **B** Larves de *C. elegans* arrêtées aux premiers stades larvaires. Image en fond clair de larves cultivées en présence de G-418 après six jours de culture. **C** Dix jeunes adultes sont mis en culture dans des boîtes NGM en présence de la drogue. Le nombre de vers adultes vivants par boîte est comptabilisé après trois jours de culture. Chaque point représente le nombre d'adultes dans une boîte contenant la concentration d'antibiotique indiquée en abscisse, pour une expérience indépendante. **D** Tableau représentant le nombre de jours avant l'épuisement total de la source de nourriture, après introduction de dix L1 ou dix adultes en présence de G-418 (moyenne pour trois à cinq expériences indépendantes). Les concentrations de G-418 n'affectant pas le développement de la population sont indiquées en gris. La concentration retardant la croissance de la population est indiquée en orange. Pour des concentrations supérieures à 0,4 mg/ml les vers ne se développent pas, la source de nourriture n'est jamais épuisée.

Lorsque des vers sauvages adultes sont mis en présence de G-418 à des concentrations inférieures à 0,2 mg/ml, leur progéniture est capable de se développer et de procréer. Les populations se développent au même rythme que les populations sur les boîtes contrôles et épuisent la source de nourriture entre le cinquième et septième jour (Figure 21 D). À 0,3 mg/ml, la croissance de la population est plus lente et la source de nourriture n'est épuisée qu'après le 20^{ème} jour. Finalement, à des concentrations

supérieures à 0,4 mg/ml, la progéniture ne se développe pas. La croissance des larves F₁ s'arrête aux premiers stades larvaires (L1 ou L2) et les larves meurent après quelques jours.

Dans le cadre de la transgénèse du ver, pour utiliser l'antibiotique G-418 comme agent de sélection, il est nécessaire de déterminer une concentration de travail qui soit permissive pour les adultes P₀ et toxique pour les larves F₁. Cette concentration de travail est appelée concentration critique et correspond à la concentration à laquelle les adultes ne sont pas affectés par la drogue et peuvent pondre des oeufs alors que les larves ne peuvent pas se développer. La concentration critique en G-418 retenue pour *C. elegans* est 0,4 mg/ml (Figure 22).

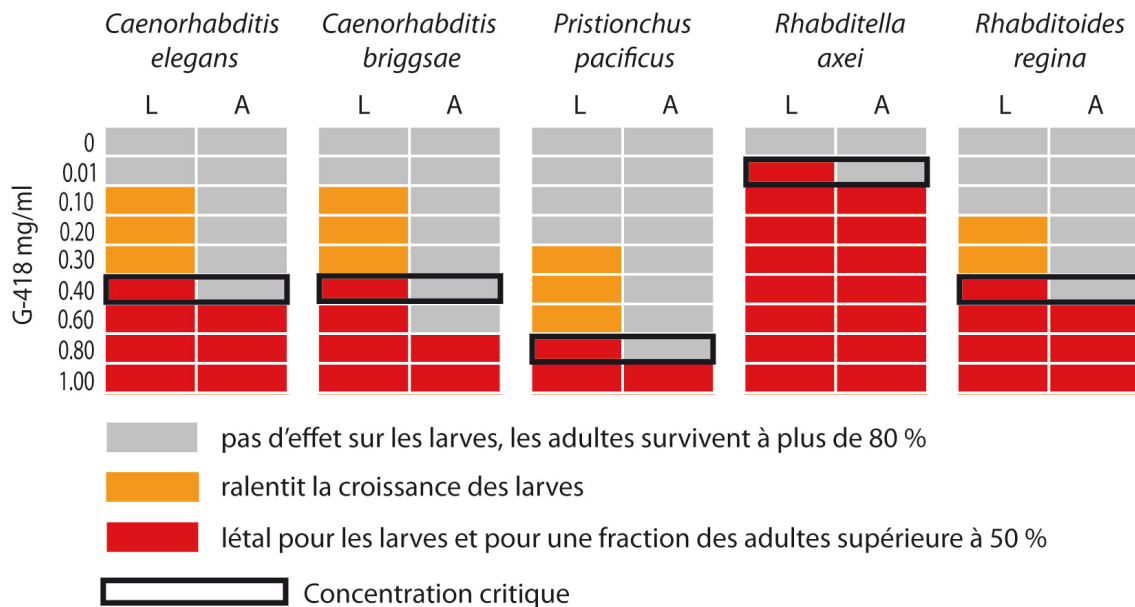


Figure 22 : Effet de l'antibiotique G-418 sur cinq espèces de nématodes et leurs concentrations critiques correspondantes. L : larves ; A : adultes.

1.2. Détermination de la concentration critique en G-418 pour d'autres espèces de nématodes

La toxicité du G-418 a été évaluée pour quatre autres espèces de nématodes sauvages : *C. briggsae* AF16, *P. pacificus* PS312, *R. axei* DF5006 et *R. regina* DF5012. Suivant le même protocole que pour *C. elegans*, dix larves (premiers stades larvaires) ou dix adultes furent mis en culture sur du milieu NGM contenant du G-418 à différentes concentrations. Dans le cas des espèces gonochoristiques, *R. axei* et *R. regina*, des femelles adultes contenant des oeufs furent utilisées pour tester leur sensibilité à la drogue.

Les différentes espèces de nématodes testées sont toutes sensibles à l'antibiotique G-418 à différents degrés. Alors que *C. briggsae* et *R. regina* répondent à la drogue d'une manière semblable à *C. elegans*, *P. pacificus* n'est affecté que par des concentrations supérieures à 0,3 mg/ml et *R. axei*, au contraire, est sensible à des concentrations aussi faibles que 0,01 mg/ml (Figure 22). Les concentrations critiques pour ces quatre espèces, définies suivant les mêmes critères que pour *C. elegans*, sont de 0,4 mg/ml pour *C. briggsae* et *R. regina*, 0,8 mg/ml pour *P. pacificus* et 0,01 mg/ml pour *R. axei*.

2. Le gène de résistance *neo* confère la résistance à l'antibiotique G-418 à *C. elegans* et *C. briggsae*

2.1. Le transgène $p_{rps-27::neo::3'UTR\ unc-54}$ confère la résistance à l'antibiotique G-418 à *C. elegans*

La cassette $p_{rps-27::neo::3'UTR\ unc-54}$ a été spécialement conçue pour assurer l'expression ubiquitaire du gène *neo* dans le ver. Le plasmide $p_{destDD04neo}$ porte le gène de résistance au G-418 (*neo*) sous le contrôle du promoteur du gène *C.e rps-27*, qui code pour une protéine ribosomale exprimée de manière ubiquitaire et de la région 3' UTR du gène *C.e unc-54*, permissive pour l'expression des gènes dans tous les tissus de l'organisme (Hunt-Newbury et al. 2007).

Deux types de lignées transgéniques de *C. elegans* ont été construites par microinjection, portant la cassette $p_{rps-27::neo::3'UTR\ unc-54}$. D'une part *C. elegans* N2 fut injecté avec le plasmide $p_{DD04neo}$ portant le gène $p_{myo-2::gfp}$ qui confère l'expression de la GFP dans le pharynx (Figure 23 A). D'autre part, *C. elegans* N2 fut injecté avec un mélange d'injection (50:50) contenant le plasmide $p_{DD04neo}$ portant le gène $p_{mec-7::gfp}$, qui confère l'expression de la GFP dans les six neurones sensoriels du toucher, et le plasmide p_{RF4} portant le gène *rol-6(su1006)* (Figure 23 B). Dans le premier cas, les lignées transgéniques furent établies sur la base de l'expression du gène $p_{myo-2::gfp}$; dans le deuxième cas elle furent établies sur la base du phénotype Rol conféré par le gène *rol-6(su1006)*.

Des individus adultes F₂ ou F₃ de quatre lignées portant le transgène $p_{DD04neo}$ $p_{myo-2::gfp}$ (DUD0001, DUD0002, DUD0003 et DUD0004) et quatre lignées portant le transgène $p_{DD04neo}$ $p_{mec-7::gfp}$; p_{RF4} (DUD0007, DUD0008, DUD0010, DUD0011)

furent mis en culture sur du milieu NGM contenant l'antibiotique G-418 à la concentration critique 0,4 mg/ml. Dans ces conditions, une partie de leur progéniture fut capable de se développer et d'atteindre le stade adulte sans présenter de phénotype différent de celui des vers des mêmes lignées cultivés sur du milieu NGM. Ces vers adultes, résistants au G-418, exprimaient tous la GFP, prouvant qu'il s'agissait de vers transgéniques.

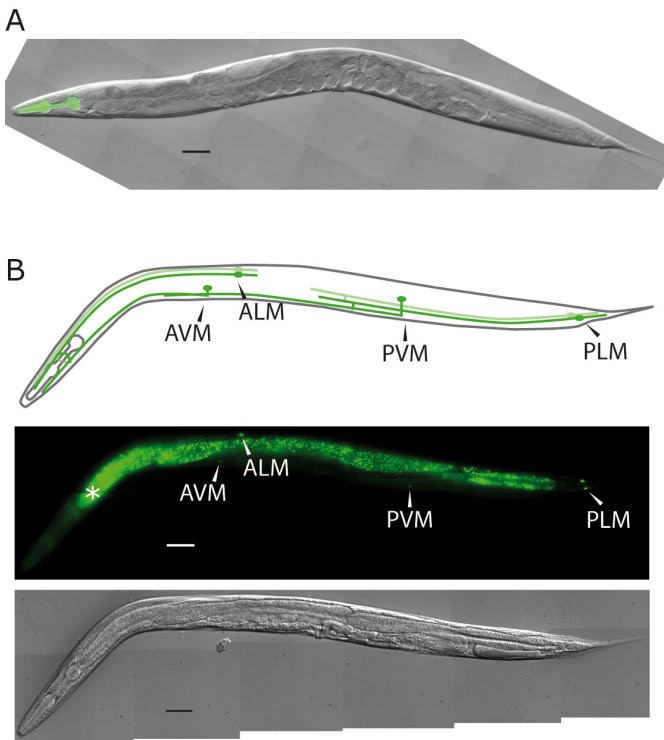


Figure 23 : Lignées transgéniques Neo. **A** Image d'un ver de la lignée DUD0001, exprime le GFP dans le pharynx. Superposition de l'image de fluorescence (vert) et l'image Nomarski. **B** Images d'un ver de la lignée DUD0011, exprime la GFP dans six neurones sensoriels du toucher. En haut, schéma représentant la position des six neurones. Au milieu, image de fluorescence. Les flèches indiquent la position des neurones. L'astérisque montre l'autofluorescence des cellules de l'intestin. Les axones et dendrites des neurones ne sont pas visibles. En bas, image en Nomarski du même ver. Barre d'échelle : 50 μ m.

Des lignées transgéniques contenant le transgène *pDD04neo* *pmyo-2::gfp* furent aussi créées par bombardement. Pour cela, des populations de jeunes adultes *C. elegans unc-119(ed3)* furent bombardés avec le produit de ligation du plasmide *pdestDD03*, portant le gène *C.e unc-119* (Dupuy et al. 2004), et le plasmide *pDD04neo* *pmyo-2::gfp*. Les vers transgéniques furent identifiés sur la base du sauvetage du phénotype Unc par le gène *unc-119*. De quatre lignées obtenues, trois exprimaient la GFP dans le pharynx (DUD0012, DUD0013, DUD0014). La lignée DUD0013 fut écartée de l'étude car elle semblait malade et présentait un phénotype anormal (les vers jeunes adultes présentaient un fort taux de mortalité). Les deux autres lignées furent testées pour leur résistance au G-418. Comme pour les lignées obtenues par microinjection, une partie de la progéniture des vers adultes mis en présence de l'antibiotique fut capable de se développer et d'atteindre le stade adulte. À nouveau, tous les vers résistants exprimaient la GFP dans le pharynx et présentaient un phénotype de locomotion sauvage.

Ainsi, nous avons conclu que les lignées extrachromosomiques de *C. elegans* portant le transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}*, obtenues par microinjection ou par bombardement, sont capables de se développer et de se multiplier en présence de l'antibiotique G-418 à la concentration critique. La cassette *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* confère donc la résistance au G-418 à *C. elegans*. Le phénotype de résistance au G-418 est appelé Neo.

2.2. Le transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* confère la résistance à *C. elegans* dès la première génération après la microinjection

Basé sur les observations précédentes, nous avons testé si les F₁ transgéniques Neo pouvaient directement être cultivés en présence de G-418 à la concentration critique. À cette concentration, les adultes sauvages ne sont pas affectés et sont capables de pondre des oeufs. Ainsi, des *C. elegans* P₀ injectés avec le transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* furent directement mis en culture sur du milieu NGM avec l'antibiotique à la concentration critique.

Des adultes *C. elegans* furent injectés avec *p_{DD04neo p_{myo-2::gfp}}* (20 P₀) ou *p_{DD04neo p_{mec-7::gfp}}* ; *p_{RF4}* (11 P₀) et isolés dans des boîtes indépendantes contenant l'antibiotique. Après quatre jours de culture, des individus exprimant la GFP furent identifiés dans deux boîtes. D'une part, cinq vers adultes et trois L1 exprimaient la GFP dans le pharynx ; d'une autre part 24 vers adultes Rol exprimaient la GFP dans les neurones sensoriels. Ces boîtes ne présentaient pas d'autres adultes non transgéniques à part les P₀. Les vers adultes correspondaient donc à des F₁ transgéniques résistants à l'antibiotique. Nous en avons conclu que le transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* confère la résistance aux individus F₁ et permet ainsi la sélection immédiate des individus transgéniques de la première génération après la microinjection.

Tous les F₁ adultes furent ensuite isolés sur des nouvelles boîtes contenant l'antibiotique à la concentration critique. Des cinq adultes exprimant la GFP dans le pharynx, aucun n'eût une progéniture résistante et aucun des vers F₂ arrêtés aux premiers stades larvaires n'exprimait la GFP (les F₁ n'ont pas transmis le concatémère extrachromosomique). Des 24 adultes Rol, un seul eut une progéniture viable en présence de l'antibiotique. Cette progéniture s'est avérée transgénique par l'expression de la GFP dans les neurones sensoriels et le phénotype Rol. Il s'agissait donc d'une lignée transgénique (DUD0009).

Le nombre de F₁ adultes obtenus par P₀ injecté suite à la sélection en présence de G-418 était du même ordre de grandeur que celui des F₁ adultes identifiés sur la base de marqueurs visuels (GFP ou Rol) sur du milieu NGM lors des expériences précédentes. Parmi les F₁ identifiés exprimant la GFP dans le pharynx, certains étaient mosaïques (seulement quelques cellules du pharynx exprimaient la GFP), suggérant que les individus mosaïques pouvaient résister à l'antibiotique. Cependant, trois larves L1 exprimant la GFP dans le pharynx ne se sont pas développées. Ceci peut être dû à : (i) la forte toxicité du transgène *pmyo-2::gfp*, aussi observée lors de la culture de F₁ en absence de l'antibiotique, (ii) un fort degré de mosaïcisme qui ne permet pas la protection de l'individu par le transgène *prps-27::neo::3'UTR unc-54*, ou encore (iii) au transgène *neo* lui même, qui pourrait être toxique à forte dose.

2.3. Le transgène *prps-27::neo::3'UTR unc-54* confère la résistance à *C. briggsae* dès la première génération après la microinjection

Suite aux expériences réalisées avec *C. elegans*, nous avons testé le transgène *prps-27::neo::3'UTR unc-54* sur *C. briggsae*. Des expériences préliminaires avaient montré que l'injection d'un mélange répétitif (mélange uniquement composé du plasmide *pDD04neo pmyo-2::gfp*) à *C. briggsae* conférait la résistance au G-418 aux F₁ transgéniques, mais ne permettait pas d'obtenir des F₂ résistants, probablement à cause de l'instabilité des concatémères extrachromosomiques ou de la répression de l'expression du transgène (Baird et Chamberlin 2006). Par conséquent, la transgénèse de cette espèce fut ensuite réalisée avec un mélange d'injection contenant *pDD04neo pmyo-2::gfp* et de l'ADN génomique de *C. briggsae* (1:60), tous les deux digérés avec l'enzyme de restriction *Sma*I (Schlager et al. 2009). Ce type de mélange d'injection entraîne la formation de concatémères extrachromosomiques complexes qui sont plus rarement soumis aux mécanismes de répression (Kelly et al. 1997).

Soixante-deux P₀ *C. briggsae* furent injectés et mis en culture directement en présence de l'antibiotique à la concentration critique. Dix adultes F₁ furent identifiés trois à six jours après la microinjection, qui exprimaient la GFP dans le pharynx. Isolés dans des nouvelles boîtes contenant l'antibiotique, deux d'entre eux donnèrent lieu à une progéniture résistante, elle aussi exprimant la GFP (lignées DUD0005, DUD0006). Ainsi, nous avons conclu que le gène *neo* sous le contrôle des séquences régulatrices de *C. elegans* confère la résistance au G-418 à *C. briggsae*.

Lors de cette expérience, douze autres F₁ adultes furent identifiés qui exprimaient très faiblement la GFP dans le pharynx (ces vers étaient tous issus de P₀ ayant donné des transgéniques). Aucun de ces F₁ isolés sur nouvelles boîtes en présence de l'antibiotique ne donna une progéniture résistante. Ces observations suggèrent donc que soit le concatémère obtenu n'était pas de taille suffisante pour être efficacement transmis, soit (dans le cas où le transgène a été transmis) l'expression transitoire du transgène a conféré la résistance aux F₁, mais sa répression au stade adulte et dans la génération F₂ a empêché leur protection vis à vis du G-418.

Nous avons aussi remarqué la présence de 32 F₁ exprimant fortement la GFP dans le pharynx, arrêtés aux premiers stades larvaires et qui ne se sont pas développés jusqu'au stade adulte. Comme pour *C. elegans*, ceci peut être dû soit à une forte toxicité de la GFP ou du transgène *neo* lui même, soit à une expression mosaïque du transgène *neo*, non suffisante pour conférer la résistance au G-418.

Ces expériences nous ont permis de conclure que le gène *neo* sous le contrôle de séquences régulatrices de *C. elegans* permet la sélection des vers transgéniques en présence de l'antibiotique G-418, dès la première génération après la microinjection de *C. elegans* et *C. briggsae*.

Les expériences sur *C. briggsae* ont permis aussi de conclure que la présence de la cassette *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54* en faible nombre de copies (dans le cadre d'un concatémère extrachromosomique complexe) est suffisante pour conférer la résistance au G-418 à des nématodes sauvages.

Des essais de transgénèse infructueux sur les espèces *P. pacificus*, *R. axei* et *R. regina* ne nous ont pas permis de conclure sur la fonctionnalité de la cassette *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54* chez ces autres espèces.

3. Caractérisation des lignées Neo *C. elegans* et *C. briggsae*

3.1. Phénotype adverse des lignées Neo: morphologie anormale des gonades

Certains individus des lignées *C. elegans* générées par l'injection d'un mélange répétitif contenant le transgène *pDD04neo p_{myo-2}::gfp* ou *pDD04neo p_{mec-7}::gfp*

présentaient des gonades avec une morphologie défectueuse (Figure 24). Le défaut de morphologie apparaissait plus ou moins sévère suivant les individus, allant de gonades déformées produisant des ovocytes et des oeufs (Figure 24 A, B et D) à des gonades complètement atrophiées ne produisant pas d'oeufs (Figure 24 E). Des analyses préliminaires sur le pourcentage d'individus présentant ce défaut ont montré que le nombre d'individus affectés était relativement élevé (Tableau 4). Paradoxalement, ce phénotype adverse, qui doit affecter la reproduction des individus concernés, n'empêcha pas la propagation des lignées sur de nombreuses générations.

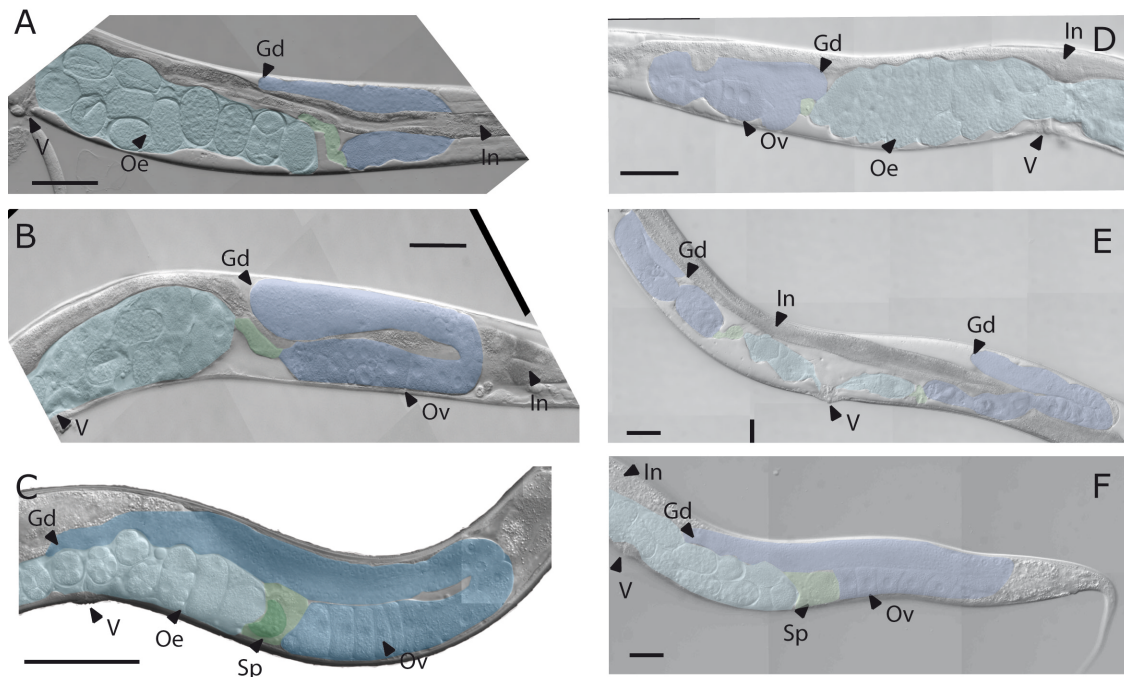


Figure 24 : Défaut de développement des gonades des lignées extrachromosomiques Neo. Images Nomarski de gonades de vers. La partie antérieure du ver est à droite de l'image, la partie dorsale en haut. **A, B, D et E** Gonades défectueuses des vers de la lignée DUD0003, portant le transgène $\rho rps-27::neo::3'UTR\ unc-54$ dans un concatémère extrachromosomique répétitif. **C** Gonade normale d'un ver sauvage. **F** Gonade normale d'un ver de la lignée DUD0033 portant le transgène $\rho rps-27::neo::3'UTR\ unc-54$ dans un concatémère extrachromosomique complexe. Barre d'échelle 50 μ m. Gd : gonade distale ; Ov : ovocytes ; Sp : spermathèque ; Oe : oeufs ; V : vulve ; In : intestin.

Nous avons évoqué plusieurs hypothèses sur la cause de ce phénotype. Premièrement, ce défaut de morphologie pourrait être dû à l'expression du produit du gène *neo* lui-même dans les gonades. Cette hypothèse paraît peu probable puisque le transgène se trouvant contenu dans un concatémère extrachromosomique répétitif, son expression est vraisemblablement réprimée dans les gonades du ver (Kelly et al. 1997).

Deuxièmement, le phénotype pourrait être dû à l'effet du G-418 sur les cellules de la lignée germinale. En effet, il est possible que la répression de l'expression du gène *neo* dans ces cellules les rende vulnérables à l'action de l'antibiotique, provoquant ainsi un

défaut de développement des gonades. Pour tester cette hypothèse nous avons observé les gonades de vers transgéniques cultivés pendant plus de deux générations en absence de l'antibiotique. Dans ces conditions, le pourcentage de vers ayant des gonades défectueuses est semblable, voire plus élevé, que celui des vers cultivés en présence de G-418 (Tableau 4). Ces observations nous ont permis de conclure que ce phénotype n'est pas causé par un défaut de protection des cellules de la lignée germinale.

Troisièmement, il est possible d'évoquer l'hypothèse de la co-suppression ou de la titration de facteurs de transcription dues à la présence du transgène en grand nombre de copies (Dernburg et al. 2000; Toms et al. 2001). D'une part, la répression dans les gonades du ver d'un gène présent dans un concatémère extrachromosomique répétitif, entraîne parfois la répression de l'expression du gène endogène par un mécanisme connu sous le nom de co-suppression (Dernburg et al. 2000). La co-suppression entraîne les mêmes phénotypes que ceux générés par une perte de fonction du gène. C'est la présence de l'ADN codant du gène dans le concatémère, et non pas de son promoteur, qui entraîne la répression de l'expression du transgène par un mécanisme proche de celui du RNAi (Dernburg et al. 2000). Ainsi, la présence du transgène *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54* en grand nombre de copies pourrait provoquer la répression d'autres gènes endogènes nécessaires au bon développement des gonades. La région codante de ce transgène (*neo*) n'est pas endogène de *C. elegans*, mais ceci n'exclut pas la possibilité qu'il puisse y avoir des similarités avec des gènes endogènes, suffisantes pour que ceux-ci soient co-supprimés. D'autre part, la présence d'un grand nombre de copies du transgène peut aussi entraîner la titration de facteurs de transcription et diminuer ainsi l'expression d'autres gènes, provoquant parfois des phénotypes anormaux (Toms et al. 2001). N. Toms et collègues montrèrent que la titration de facteurs de transcription par le promoteur du gène *mec-3*, présent dans un concatémère extrachromosomique répétitif, entraînait des défauts de développement de certains neurones sensoriels. De la même manière, la présence du promoteur *p_{rps-27}* endogène en un grand nombre de copies pourrait titrer les facteurs nécessaires à la transcription de gènes impliqués dans le développement des gonades.

Tableau 4 : Pourcentage de vers Neo avec des gonades défectueuses.

Température	Lignée	Milieu NGM sans antibiotique		G-418 à 0,4 mg/ml
		20 °C	25 °C	20 °C
<i>C. elegans</i>				
<i>pDD04neo</i> <i>pmyo-2::gfp</i>	DUD0003	64 % (n=17)		36 % (n=11)
	DUD0004	44 % (n=9)		
	DUD0014	4 % (n=128)	0 % (n=29)	
	BC8949			0 % (n=21)
	BC8950			0 % (n=17)
	BC8951			0 % (n=16)
<i>pDD04neo</i> <i>p mec-7::gfp</i>	DUD0007	75 % (n=8)		77 % (n=13)
	DUD0008	62 % (n=8)		7 % (n=14)
	DUD0009	95 % (n=20)	33,3 % (n=18)	9 % (n=22)
	DUD0010			48 % (n=54)
<i>C. briggsae</i>				
<i>pDD04neo</i> <i>pmyo-2::gfp</i>	DUD0005	3 % (n=29)	0 % (n=32)	0 % (n=16)

Noir : lignées obtenues après microinjection d'un mélange répétitif. Bleu : lignée obtenue par bombardement. Vert : Lignées obtenues après microinjection d'un mélange complexe.

L'hypothèse d'un défaut de développement des gonades provoqué par la présence d'un grand nombre de copies du transgène *p rps-27::neo::3'UTR unc-54* est supportée par le fait que les lignées de *C. briggsae* portant des concatémères extrachromosomiques complexes et les lignées de *C. elegans* obtenues par bombardement, donc portant un plus faible nombre de copies du transgène, ne présentent pas ce phénotype ou seulement dans un nombre très faible d'individus (Tableau 4). Pour tester cette hypothèse, de nouvelles lignées *C. elegans* ont été construites par microinjection, portant cette fois-ci des concatémères extrachromosomiques complexes (BC8949, BC8950, BC9851). Ces lignées sont aussi résistantes au G-418 à la concentration critique et présentent donc le phénotype Neo. L'absence d'individus avec des gonades défectueuses parmi ces lignées (Tableau 4), nous a permis de conclure que c'est la présence du transgène *p rps-27::neo::3'UTR unc-54* en grand nombre de copies qui provoque un défaut de développement des gonades. Ainsi, les autres lignées Neo construites lors des travaux de thèse ont été

obtenues par l'injection de mélanges contenant le transgène *neo* à des concentrations inférieures à 0,8 ng/μl (Figure 24 F).

3.2. Les lignées Neo extrachromosomiques stables de *C. elegans* et *C. briggsae* ont une croissance normale en présence de l'antibiotique G-418

Durant plus d'un an, les deux lignées Neo de *C. briggsae* et quinze lignées Neo de *C. elegans*, obtenues dans la première partie des travaux de thèse, furent maintenues en présence de l'antibiotique à la concentration critique 0,4 mg/ml, en repiquant des vers sur la base du phénotype Neo ou en transférant un morceau d'agar contenant des vers d'une boîte à une autre. Ces lignées furent cultivées à différentes températures (15 °C, 20°C et à température ambiante, 22-25 °C) sans présenter de sensibilité particulière à aucune de ces températures. Comparées aux lignées sauvages, certaines des lignées Neo, notamment celles portant le transgène *rol-6(su1006)*, présentent un rythme de croissance plus lent. Cependant, cette propriété a déjà été attribuée dans la littérature à certaines lignées transgéniques et en particulier à celles générées avec le marqueur *rol-6(su1006)* (Jin 1999). Les lignées Neo présentent toutes une locomotion sauvage (à l'exception des lignées Rol) et sont aussi capables de rentrer dans le stade *Dauer* lors de l'épuisement de la source de nourriture et une forte concentration de population. Toutes ces observations prises ensemble suggèrent que les lignées Neo ne présentent aucun phénotype adverse visible autre que le défaut des gonades décrit dans le paragraphe précédent. Les lignées portant des concatémères extrachromosomiques complexes présentent quand à elles un phénotype sauvage. Cependant, ces éléments ne permettent pas d'affirmer que le produit du gène *neo* n'affecte pas certains mécanismes moléculaires ou cellulaires qui n'ont pas de répercussions visibles sur le phénotype du ver.

3.3. Étude du niveau de résistance des lignées extrachromosomiques Neo de *C. elegans*

Pour évaluer le niveau de résistance à l'antibiotique G-418 des lignées extrachromosomiques Neo, des adultes transgéniques ou un mélange d'oeufs transgéniques et sauvages, furent mis en culture sur du milieu NGM contenant l'antibiotique à des concentrations allant jusqu'à 2 mg/ml.

3.3.a. Survie et reproduction

Pour chaque concentration de G-418, deux adultes de la lignée DUD0011, portant les transgènes *pDD04neo* *p_{mec-7}::gfp* ; *pRF4*, et deux adultes N2 furent mis dans des boîtes de pétri indépendantes et le nombre de vers adultes dans les boîtes fut comptabilisé cinq jours plus tard. Le nombre de vers adultes à ce jour regroupe les adultes de la première et deuxième génération ayant été capables de se développer en présence de G-418, et reflète donc la capacité de la lignée à se reproduire en présence de la drogue. À la différence des vers N2, pour lesquels les concentrations testées se sont toutes avérées toxiques, les vers DUD0011 furent capables de se reproduire normalement en présence de G-418 à des concentrations allant jusqu'à 2 mg/ml (Figure 25). Tous les vers DUD0011 adultes présents après cinq jours de culture présentaient le phénotype Rol, prouvant que seuls les vers transgéniques furent capables de résister au traitement.

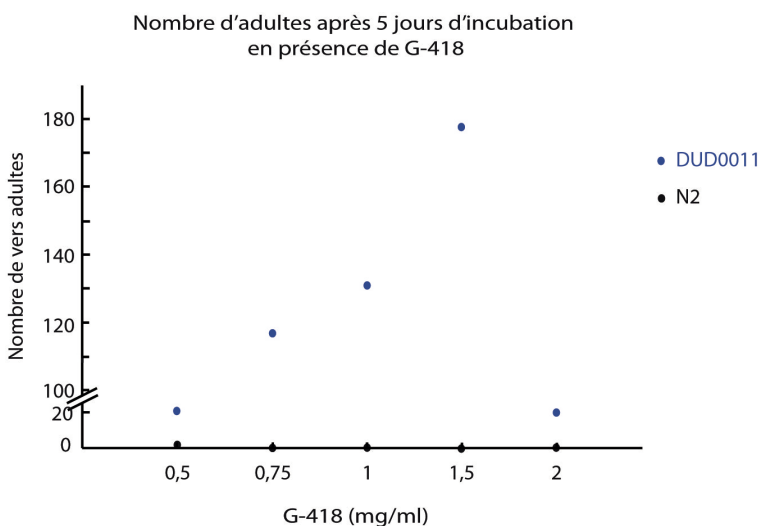


Figure 25 : Résistance des vers DUD0011 à des concentrations croissantes de G-418. Les vers adultes sont comptabilisés cinq jours après la mise en culture de deux vers adultes DUD0011 ou N2 dans des boîtes contenant l'antibiotique. Tous les vers adultes de la lignée DUD0011, présents dans les boîtes G-418, présentaient le phénotype Rol.

3.3.b. Développement

Des expériences précédentes avaient montré que les oeufs de lignées Neo étaient capables d'éclore et de se développer sur du milieu NGM avec du G-418 à la concentration critique, même après décontamination des lignées Neo par le protocole à l'hypochlorite de sodium classique (Sulston et Hodgkin 1988). Ainsi, afin de tester la résistance des larves Neo à différentes concentrations de G-418, des oeufs extraits d'adultes transgéniques par un traitement à l'hypochlorite de sodium furent mis en culture sur du milieu NGM avec du G-418 à différentes concentrations. Les oeufs ainsi obtenus constituent un mélange d'oeufs transgéniques et d'oeufs sauvages ayant perdu le concatémère extrachromosomique. 150 oeufs de N2 ou des lignées DUD0010 et DUD0011, portant les transgènes *pDD04neo* *p_{mec-7}::gfp* ; *pRF4*, furent mis en culture

dans du NGM contenant l'antibiotique et les vers au stade adulte furent comptabilisés au troisième jour (Figure 26 A). La même expérience fut réalisée ensuite avec la lignée DUD0008, portant les transgènes *pDD04neo p_{mec-7}::gfp ; pRF4*, en utilisant 1000 oeufs au lieu de 150 (Figure 26 B).

Le nombre d'individus adultes à 0 mg/ml représente le nombre total d'oeufs transgéniques et sauvages ayant survécu au traitement à l'hypochlorite de sodium, donc le nombre absolu d'individus testés. Malgré le faible rendement du traitement (moins d'un tiers des oeufs survécurent jusqu'à l'éclosion, Figure 26), l'expérience permet de conclure que les oeufs Neo sont capables d'éclore et de se développer jusqu'au stade adulte en présence de G-418 jusqu'à la concentration de 2 mg/ml. Le nombre de vers résistants ne semble pas dépendre de la concentration croissante de G-418.

Cette expérience permet aussi de conclure qu'il est possible de sélectionner des individus transgéniques parmi une population sauvage suite à un traitement à l'hypochlorite de sodium.

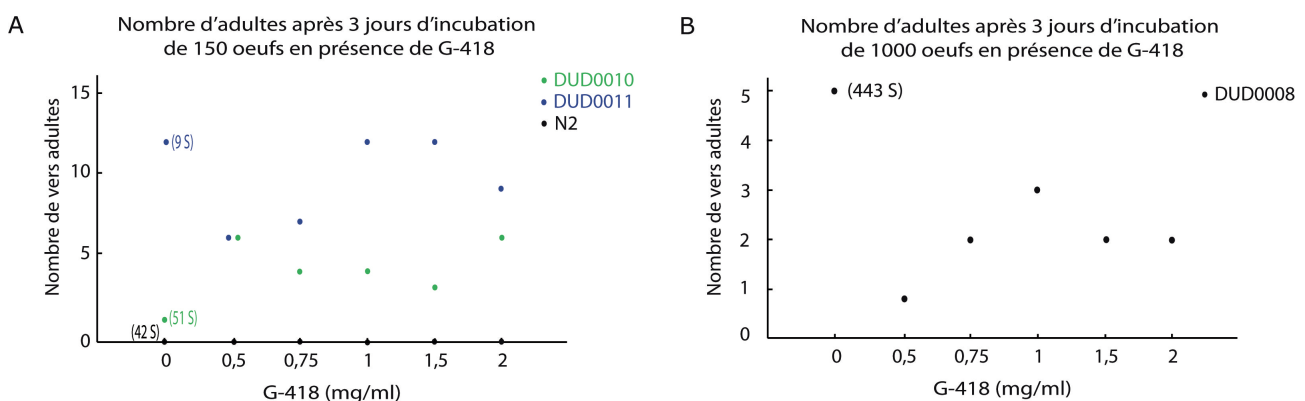


Figure 26 : Résistance des oeufs Neo à des concentrations croissantes de G-418. Les vers adultes Rol sont comptabilisés trois jours après la mise en culture de 150 oeufs (A) ou 1000 oeufs (B) dans des boîtes contenant l'antibiotique. Le nombre de vers sauvages (S) présents dans les boîtes est indiqué entre parenthèses. Tous les vers adultes des lignées DUD0010, DUD0011 et DUD0008 présents dans les boîtes G-418, présentaient le phénotype Rol.

En conclusion, les lignées extrachromosomiques Neo résistent à des concentrations de G-418 jusqu'à 2 mg/ml (des concentrations supérieures de G-418 n'ont pas été testées). Ces expériences n'ont pas été réalisées avec des lignées Neo portant des concatémères extrachromosomiques complexes. Il se pourrait que ces lignées, ayant un nombre plus faible de copies du transgène *neo*, soient moins résistantes que les lignées testées.

4. Enrichissement de populations transgéniques Neo de *C. elegans* et *C. briggsae* en présence de G-418

Lorsque les lignées Neo sont mises en culture sur du milieu NGM avec l'antibiotique G-418 à la concentration critique, les vers transgéniques ont un avantage sélectif vis à vis des vers ayant perdu le concatémère extrachromosomique et donc la résistance à l'antibiotique. Ainsi, les vers résistants sont sélectionnés en présence de la drogue et la population transgénique est enrichie (Figure 27). Le milieu NGM contenant l'antibiotique à la concentration critique est ainsi appelé milieu sélectif. Afin d'évaluer le degré d'enrichissement des populations transgéniques en présence de l'antibiotique G-418, les populations cultivées sur du milieu sélectif furent analysées au COPAS Biosort (voir Matériel et Méthodes).

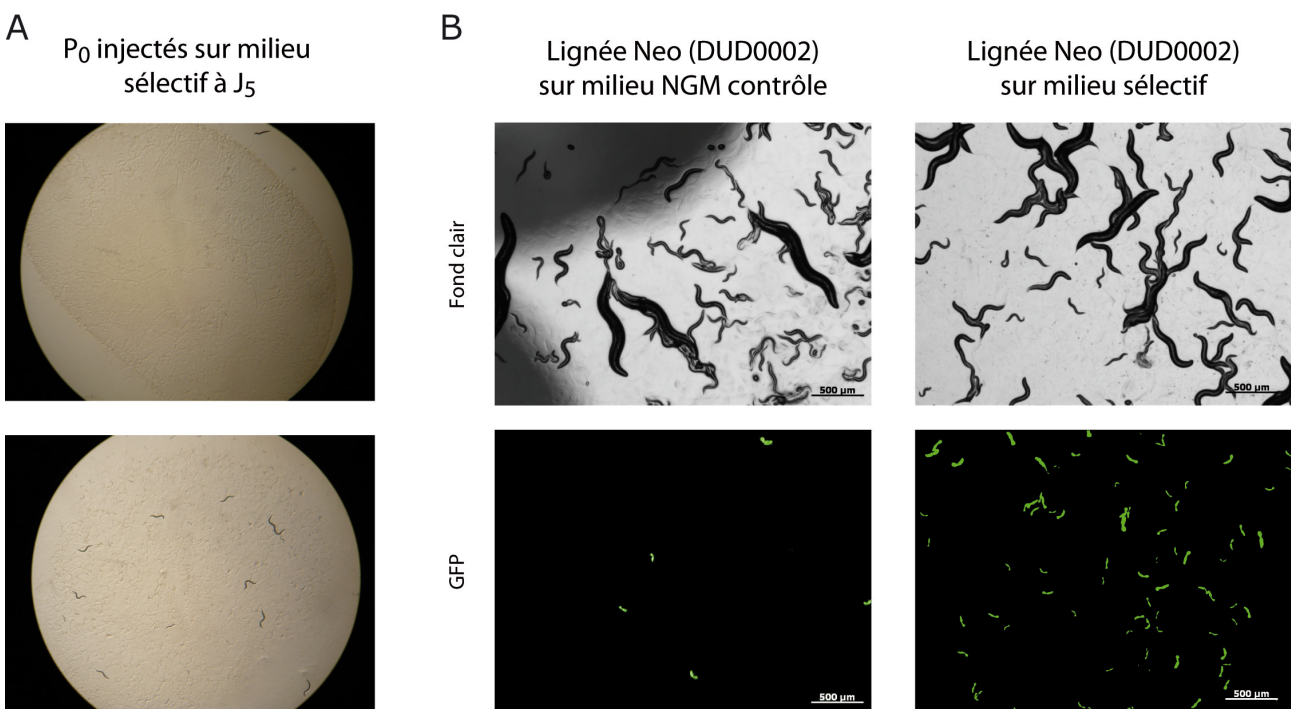


Figure 27 : Sélection des vers Neo sur du milieu G-418 à la concentration critique (milieu sélectif). **A** Sélection des *F*₁ transgéniques Neo sur milieu sélectif. Photos des boîtes cinq jours après l'injection. En haut, photo d'une boîte contenant uniquement le P₀ injecté, n'ayant pas donné de transgéniques. En bas, photo d'une boîte contenant de nombreux *F*₁ transgéniques capables de pousser sur milieu sélectif. Les P₀ injectés ayant donné des transgéniques peuvent ainsi être facilement identifiés. **B** Populations de la lignée *C. elegans* DUD0002 (Neo, exprime la GFP dans le pharynx) après six jours de culture, établies à partir d'un seul individu transgénique mis sur du milieu contrôle (gauche) ou sur du milieu sélectif (droite). À gauche, les vers transgéniques sont dilués parmi une population de vers sauvages, dû à l'instabilité du concatémère extrachromosomique. À droite, l'élimination des individus sauvages par l'action du G-418 permet l'enrichissement de la population transgénique.

4.1. Analyse des populations transgéniques au COPAS Biosort

Les populations transgéniques des lignées extrachromosomiques *C. elegans* et *C. briggsae* furent analysées au COPAS Biosort, basé sur l'expression de la GFP dans les neurones sensoriels ou dans le pharynx (Figure 23). En effet, cet appareil mesure la taille et le profil de fluorescence de chaque individu contenu dans l'échantillon et il est ainsi possible de classer les individus par intensité de fluorescence et en fonction de leur taille. Les individus exprimant la GFP sont en principe facilement identifiés grâce à leur profil de fluorescence ou à l'intensité maximale de la fluorescence exprimée, qui les distingue des individus sauvages (Figure 28). Il est donc possible de distinguer les deux types de ver et d'obtenir le pourcentage d'individus transgéniques dans la population totale.

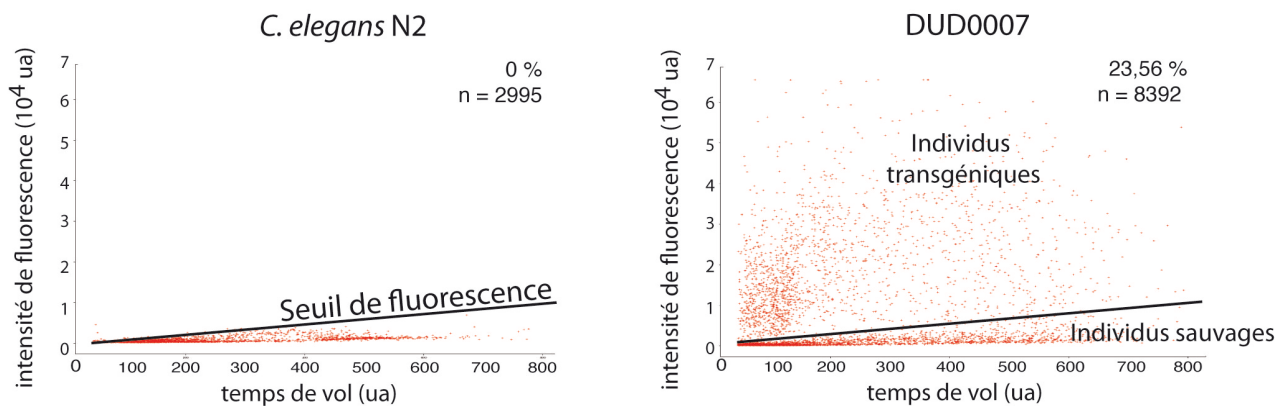


Figure 28 : Analyse des populations Neo au COPAS Biosort. Dans ces graphiques, chaque point représente un ver analysé. Les vers sont représentés par l'intensité de fluorescence observée en fonction de leur taille (temps de vol). À gauche, l'analyse d'une population de vers sauvages *C. elegans* N2 permet de déterminer le seuil de fluorescence. Les vers situés au dessus de ce seuil sont considérés comme fluorescents et donc comme des vers transgéniques. À droite, une population de la lignée DUD0007 (exprime la GFP dans les neurones sensoriels). Le pourcentage d'individus au dessus du seuil de fluorescence est marqué en haut à droite. n : nombre d'individus analysés. ua : unité arbitraire.

Pour évaluer le degré d'enrichissement des populations Neo en présence de G-418, des populations obtenues lors de la mise en culture d'un seul individu transgénique au jour J_0 , sur du milieu NGM (contrôle) ou sur du milieu sélectif, furent analysées au COPAS Biosort. Dans un premier temps, des populations des lignées de *C. elegans* portant le transgène *pDD04neo p_{mec-7}::gfp ; pRF4* furent analysées à J_6 ou J_7 avant l'épuisement total de la source de nourriture dans l'un des milieux. Les résultats de ces analyses ont permis de confirmer que les populations transgéniques étaient enrichies en présence de l'antibiotique (Annexe 4). Le pourcentage de vers transgéniques sur milieu sélectif, toutes les lignées confondues, était en moyenne de $30,9 \pm 10,0$ %, contre $5,2 \pm 4,0$ % sur milieu contrôle, soit un enrichissement de six fois. Cependant, les analyses au

COPAS des vers exprimant la GFP dans les neurones sensoriels montraient un grand nombre d'individus adultes sauvages sur les boîtes sélectives (Annexe 4), alors que, au microscope, ces populations contenaient principalement des adultes Rol. Il est possible que la sensibilité du COPAS ne permette pas de distinguer les individus exprimant faiblement la GFP dans les neurones sensoriels. Dans ce cas, ce type d'individu est comptabilisé comme un ver sauvage, affectant ainsi le calcul d'enrichissement. De ce fait, les analyses quantitatives d'enrichissement présentées par la suite ont été réalisées sur les lignées portant le transgène *pDD04neo pmyo-2::gfp*. *pmyo-2* étant un promoteur fort, le niveau de fluorescence des individus transgéniques est élevé, ce qui permet une discrimination plus nette de ces individus par rapport aux individus sauvages (des exemples d'analyses de populations portant le transgène *pmyo-2::gfp* sont présentées en Annexe 5, Annexe 6 et Annexe 7).

Ces analyses préliminaires ont aussi permis de constater que lorsque les boîtes contrôles et les boîtes sélectives sont analysées le même jour, le nombre d'individus dans les boîtes contrôles est plus élevé que dans les boîtes sélectives (voir Annexe 4). Ceci s'explique simplement par le fait que dans les boîtes sélectives la partie de la population ayant perdu le concatémère extrachromosomique, et donc la résistance au G-418, est éliminée, diminuant ainsi le nombre de vers ayant une progéniture viable à chaque génération. Pour traiter des échantillons avec un nombre de vers comparable lors des analyses suivantes, les boîtes contrôles et sélectives sont analysées au moment où celles-ci arrivent à l'épuisement de la source de nourriture.

Dans un deuxième temps, les lignées extrachromosomiques Neo *C. elegans* et *C. briggsae* portant le transgène *pDD04neo pmyo-2::gfp* furent analysées sur la base de la fluorescence du pharynx. Sur du milieu sélectif, la proportion d'animaux transgéniques atteint $39,3 \pm 23,9$ % en moyenne (toutes lignées confondues), contre seulement $5,7 \pm 8,3$ % sur du milieu contrôle, soit un enrichissement d'environ 7 fois (Figure 30 A). Cependant ceci représente une sous estimation de l'efficacité réelle de la sélection, car en effet l'analyse au COPAS Biosort ne permet pas de discriminer entre les larves sauvages viables et les larves sauvages arrêtées aux premiers stades larvaires ou mortes, qui s'accumulent sur le milieu sélectif. Les L1 sont discriminés en fonction de leur taille, qui produit un temps de vol inférieur à 150 (Figure 29). Les pourcentages d'individus transgéniques calculés en excluant les L1 reflètent de manière fiable la sélection par l'antibiotique G-418, qui n'a lieu qu'à partir du stade L2. On obtient de cette façon $93,1 \pm$

4,4 % de transgéniques en milieu sélectif contre $6,0 \pm 2,9$ % en milieu contrôle, soit un enrichissement de 15,5 fois.

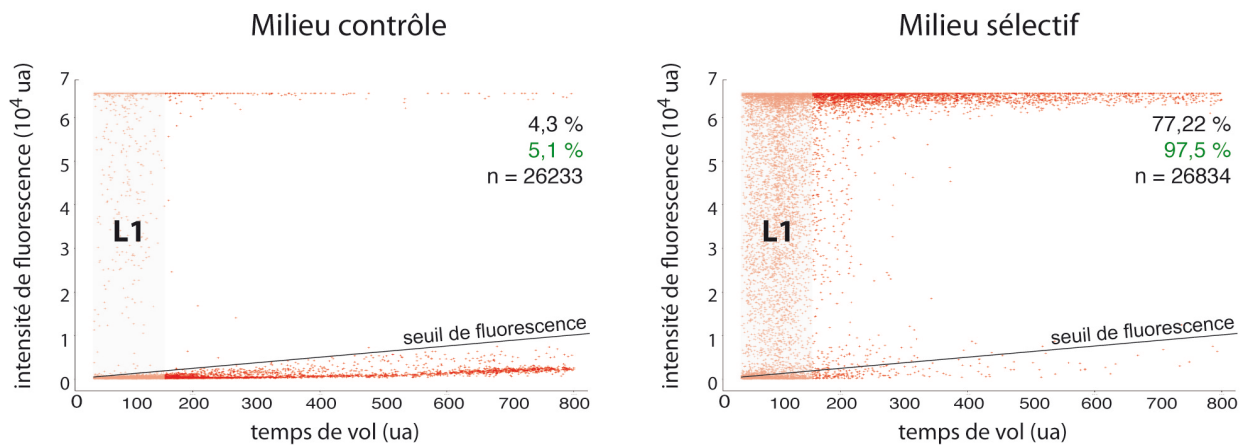


Figure 29 : Méthode de calcul de l'enrichissement des populations transgéniques. Analyse de populations de la lignée DUD0003 (exprime la GFP dans le pharynx), cultivées sur du milieu NGM contrôle (à gauche) ou sur du milieu sélectif (à droite). Le pourcentage d'individus transgéniques dans la population totale est marqué en haut à droite en noir. Le pourcentage d'individus transgéniques L2 à adultes (avec un temps de vol supérieur à 150) est marqué en vert. n : nombre d'individus analysés.

4.2. Enrichissement des populations Neo sur milieux sélectif

La proportion d'animaux transgéniques sur milieu sélectif des lignées portant le transgène *pDD04neo* *pmyo-2::gfp* varie entre 79 et 100 %, avec une moyenne de 93,1 %, toutes les lignées confondues (Figure 30 B). Les populations sont analysées avant l'épuisement total de la source de nourriture, entre six à dix jours après la mise en culture d'un individu transgénique au jour J_0 . Ainsi, ces taux d'enrichissement sont obtenus après accumulation de plusieurs générations sur la même boîte, traduisant la puissance de la sélection par l'antibiotique G-418.

Les analyses des populations permettent de conclure dans un premier temps que le taux de transmission des lignées ne semble pas affecter le taux d'enrichissement en présence de l'antibiotique. Le taux de transmission de chaque lignée est traduit par l'enrichissement dans les boîtes contrôles. Plus le taux de transmission d'une lignée est fort, plus l'enrichissement en absence de sélection est élevé. Par exemple, la lignée DUD0002 a un taux de transmission supérieur à celui des lignées DUD0001, DUD0003 et DUD0004 (Figure 30). Pourtant, les taux d'enrichissement sur du milieu sélectif de ces trois lignées sont similaires. Le taux de transmission se traduit cependant par la taille de la population, c'est à dire le nombre d'individus à un jour précis. En effet, sur du milieu sélectif, plus le taux de transmission est faible, moins il y a d'individus viables par

génération et plus le rythme de croissance de la population est lent. Inversement, plus une lignée a un taux de transmission important, plus la population grandit rapidement.

Dans un deuxième temps, ces analyses permettent de conclure que la nature du concatémère extrachromosomique, répétitif ou complexe, n'affecte pas l'enrichissement en présence de l'antibiotique (Figure 30). En effet, les taux d'enrichissement obtenus pour des lignées portant des concatémères répétitifs et celles portant des concatémères complexes sont similaires. Le nombre de copies du transgène *neo* n'affecte donc pas l'enrichissement des lignées. De plus, les lignées *C. briggsae* sont enrichies aux mêmes niveaux que les lignées *C. elegans*.

Finalement, les lignées présentant des gonades défectueuses peuvent aussi être enrichies sur du milieu sélectif. Lors de la réalisation des analyses d'enrichissement présentées dans ce paragraphe, ce phénotype adverse n'avait pas encore été identifié. Ainsi, certains des individus transgéniques mis en culture des lignés DUD0001 à DUD0004 présentaient certainement des gonades défectueuses. Ceci explique certainement les différences observées dans la vitesse de développement des différentes populations pour une même lignée (non montrées), puisque un ver avec les gonades défectueuses est certainement moins fertile qu'un ver avec des gonades sauvages. Toutefois, ces expériences ont montré que ce phénotype adverse n'affecte pas la sélection des individus transgéniques en présence de l'antibiotique.

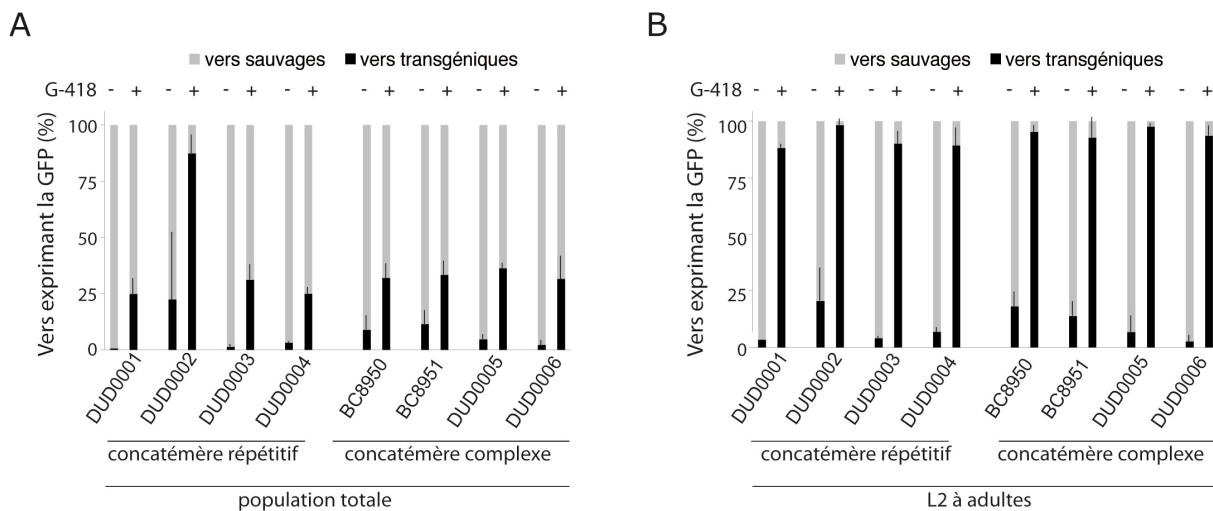


Figure 30 : Enrichissement des populations transgéniques en présence de G-418. Pourcentage d'enrichissement calculé en tenant compte de la population totale ($n = \sim 5000$) (A) ou des individus au stade L2 au stade adulte (B). DUD0001 à DUD0004 sont des lignées *C. elegans* portant des concatémères extrachromosomiques répétitifs. BC8950 et BC8951 sont des lignées *C. elegans* portant des concatémères extrachromosomiques complexes. DUD0005 et DUD0006 sont des lignées *C. briggsae*. Les analyses furent réalisées avec un minimum de trois préparations de milieu sélectif indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

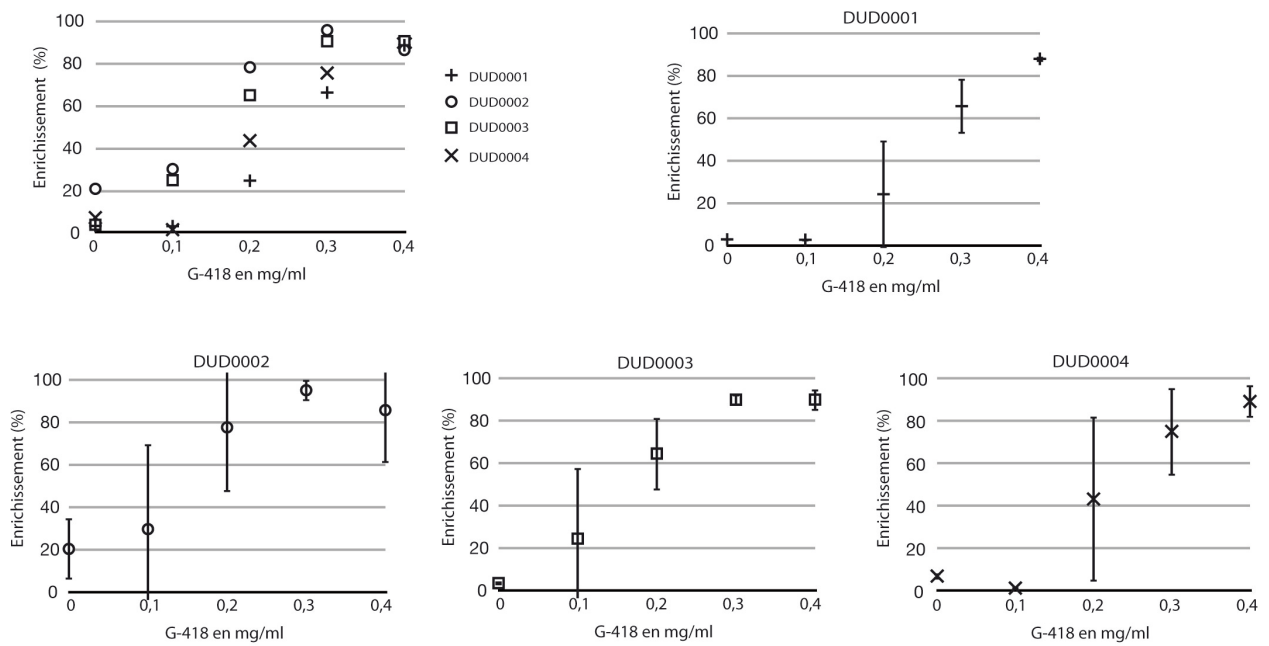
4.3. Enrichissement des populations Neo en fonction de la concentration de G-418

Afin d'étudier l'influence de la concentration de G-418 sur l'enrichissement des populations sur du milieu sélectif, les analyses décrites ci-dessus ont été réalisées avec des milieux contenant l'antibiotique à différentes concentrations, entre 0 mg/ml (contrôle) et 0,4 mg/ml.

Pour toutes les lignées *C. elegans* analysées, le pourcentage d'individus transgéniques augmente avec la concentration de G-418 dans le milieu (Figures 31). L'enrichissement maximal est obtenu à 0,4 mg/ml G-418, mais à 0,3 mg/ml la proportion d'animaux transgéniques est déjà supérieure à 60 %. Ceci signifie que la maintenance des lignées transgéniques peut être effectuée à des concentrations inférieures à la concentration critique, l'avantage sélectif des vers Neo étant suffisant pour devancer la croissance ralentie des vers sauvages capables de pousser à des faibles concentrations de l'antibiotique (Figure 21 D).

Dans le cadre de cette analyse, les lignées portant un concatémère extrachromosomique répétitif (présentant des gonades défectueuses) (Figures 31 A) se distinguent des lignées avec un concatémère complexe (sans phénotype adverse) (Figures 31 B). Les pourcentages d'enrichissement obtenus pour les lignées défectueuses sont très variables pour des concentrations de G-418 inférieures à 0,4 mg/ml, alors que ceux obtenus pour les lignées sans phénotype adverse semblent reproductibles. Ceci est certainement dû au phénotype défectueux des premières lignées. En effet, en présence de G-418 à des concentrations non létales, la présence de vers sauvages aboutit au développement d'une population non transgénique, ayant certainement un rythme de croissance supérieur à celui des individus transgéniques avec une fertilité diminuée. Le bénéfice apporté par le transgène *neo* est contrebalancé par une fertilité diminuée lorsque la pression de sélection appliquée n'est pas assez forte. Les variations entre les analyses pour une même lignée proviennent certainement de la quantité de vers défectueux dans les boîtes. Il a été constaté que la répartition des vers défectueux n'est pas constante entre les différentes populations analysées. Ainsi, des populations contenant une majorité de vers sans phénotypes adverse se comportent comme les populations des lignées portant des concatémères complexes. Les lignées sans phénotype adverse peuvent être enrichies à des taux supérieurs à 90 %, en présence de G-418 à 0,2 mg/ml (Figure 31 B).

A



B

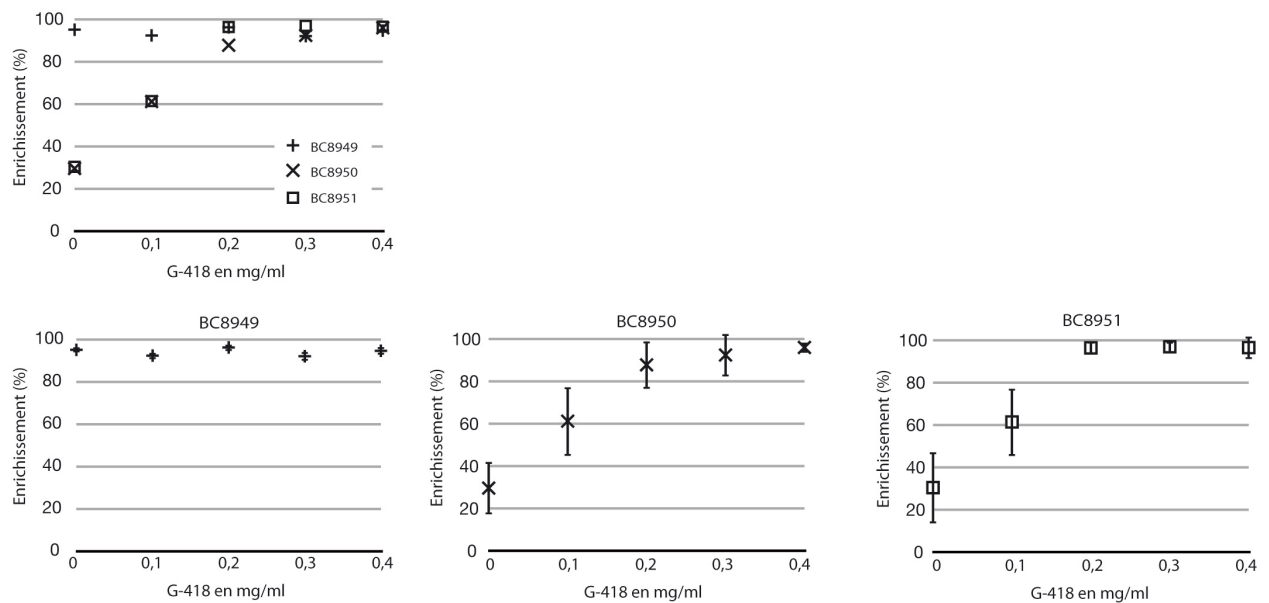


Figure 31 : Enrichissement en fonction de la concentration de G-418. Pourcentages de vers transgéniques obtenus pour les lignées *C. elegans* portant des concatémères extrachromosomiques répétitifs (A) ou des lignées portant des concatémères extrachromosomiques complexes (B), à différentes concentrations de G-418. Dans chaque cas, le graphique en haut à gauche représente la superposition des différentes lignées concernées ; puis, chaque lignée est représentée dans un graphique indépendant pour mieux visualiser les écart-types (barres d'erreur). Les pourcentages de vers transgéniques sont calculés en tenant compte des individus du stade L2 au stade adulte. Les analyses furent réalisées avec un minimum de trois préparations de milieu sélectif indépendantes.

Les analyses d'enrichissement n'ont pas été réalisées pour des concentrations supérieures à 0,4 mg/ml. Dans le cadre de l'utilisation du système de sélection pour la maintenance des lignées transgéniques, les enrichissements obtenus à la concentration

critique sont suffisants. Cependant, il pourrait être utile de chercher à éliminer les vers sauvages parmi les populations transgéniques en augmentant la concentration d'antibiotique, sachant que les lignées Neo portant des concatémères extrachromosomiques répétitifs résistent à des concentrations jusqu'à 2 mg/ml.

4.4. Présence d'individus échappant à la sélection en présence de G-418

Lors des expériences d'enrichissement, les populations cultivées sur milieu sélectif présentent un faible pourcentage de vers non transgéniques (faux positifs) (Figure 30). Ces vers ne correspondent pas à des individus ayant acquis la résistance à l'antibiotique de manière spontanée, puisque lorsqu'ils sont isolés sur des nouvelles boîtes sélectives, ils ne transmettent pas la résistance à leur progéniture (expérience répétée à plusieurs reprises sur des populations indépendantes et pour différentes lignées). Cette constatation laisse supposer que la sélection par l'antibiotique dans une boîte portant des milliers de vers n'est pas aussi efficace que dans des boîtes «vierges». Pour que l'antibiotique G-418 ait un effet sur les vers, il doit rentrer dans leurs cellules pour atteindre sa cible, les ribosomes. Il est plausible que pour une même concentration d'antibiotique, la concentration réellement incorporée par un individu soit supérieure lorsque celui-ci se trouve seul dans la boîte que lorsque des milliers de vers incorporent l'antibiotique sur la même boîte. Ainsi, lorsque une boîte contient des milliers de vers, la concentration effective incorporée par un individu risque de ne pas être suffisante pour arrêter son développement. Ainsi, des oeufs pondus sur du milieu sélectif après trois générations de croissance dans la même boîte peuvent se trouver face à une concentration de G-418 non létale. Cette hypothèse pourrait expliquer l'apparition de faux positifs sur du milieu sélectif. Pour la valider, il serait intéressant de répéter les analyses d'enrichissement à des concentrations de G-418 supérieures à la concentration critique. Toutefois, la présence de faux positifs parmi les populations de vers transgéniques sur du milieu sélectif reste très minoritaire et n'affecte pas la maintenance des lignées extrachromosomiques sur la base du phénotype Neo.

4.5. Présence d'individus échappant à la sélection en présence de contaminations bactériennes

Au cours de cette étude il a été constaté que la contamination du milieu sélectif par des bactéries résistantes (non identifiées) favorise l'apparition de faux positifs. Des

expériences préliminaires ont montré que des individus *C. elegans* N2 mis en culture sur du milieu sélectif inoculé uniquement avec la contamination bactérienne ne sont pas affectés par l'antibiotique. En d'autres mots, les bactéries résistantes protègent les vers de la drogue, probablement en consommant celle-ci. Ainsi, toutes les boîtes contaminées par des bactéries résistantes ont été systématiquement éliminées de l'étude.

Cependant, des résultats préliminaires ont montré que les bactéries *E. coli* OP50 recombinantes portant le gène *neo* et donc résistantes à l'antibiotique, ne semblent pas protéger les vers sauvages du G-418. En effet, la culture de populations transgéniques en présence de cette bactérie semble aboutir aux mêmes pourcentages d'individus transgéniques que lors de l'utilisation de bactéries OP50 concentrées. La bactérie OP50 est auxotrophe à l'uracile et a été choisie comme source de nourriture pour *C. elegans* car le milieu NGM étant pauvre en uracile, sa croissance est limitée ; ainsi, le tapis bactérien d'OP50 reste fin et permet la visualisation des vers (Brenner 1974). Il est donc probable que la faible croissance d'*E. coli* OP50 résistante ne soit pas suffisante pour protéger les vers sauvages du G-418. Cependant, à différence de celle-ci, la croissance de la contamination bactérienne ne semble pas être limitée, ce qui provoque l'élimination rapide de l'antibiotique.

L'utilisation d'*E. coli* OP50 résistante au G-418 comme source de nourriture sur du milieu sélectif diminuerait considérablement le temps de préparation des boîtes sélectives (voir Matériel et Méthodes). Il serait donc intéressant de déterminer les conditions de sélection des vers Neo en présence de cette bactérie afin d'améliorer la technique de sélection en présence de G-418.

5. Application du système *neo* comme marqueur de sélection et caractérisation de la sélection

L'ensemble des résultats présentés dans de cette Partie I permettent de conclure que l'antibiotique G-418 combiné au gène de résistance *neo* peut être utilisé comme marqueur génétique pour la sélection de vers transgéniques *C. elegans* et *C. briggsae* lors de la transgénèse par microinjection. Ce système permet la sélection directe des transgéniques dès la première génération après l'injection (Figure 27 A) ainsi que

l'enrichissement des vers transgéniques sur du milieu sélectif (Figure 27 B), facilitant ainsi la maintenance des lignées extrachromosomiques.

Afin de mieux caractériser le système de sélection de *C. elegans* transgéniques avec le gène *neo*, le système fut utilisé comme marqueur génétique à plusieurs reprises durant mes travaux de thèse. Dans un premier temps, il fut utilisé pour établir des lignées extrachromosomiques stables de *C. elegans* pour des expériences de *MosSCI* par choc thermique (voir Résultats Partie III). Puis, il fut utilisé pour établir des lignées portant le gène d'intérêt *p_{ttx-3}::puro::gfp::3'UTR unc-54* dans les interneurones AIY ou le gène *p_{gcy-8}::puro::Tagrfp::3'UTR unc-54* dans les neurones AFD (voir Discussion Application à la culture *in vitro* de cellules de *C. elegans*). Finalement, il fut utilisé pour l'injection de fosmides dans le cadre d'autres expériences du laboratoire. Ces applications ont nécessité un grand nombre d'injections et ont donc permis de prendre du recul par rapport au système *neo* et son utilisation. Ce système de sélection s'est montré très efficace et a permis avant tout l'identification rapide des vers F₁ transgéniques et la maintenance des lignées sur du milieu sélectif (Figure 27).

5.1. Différents degrés de résistance observés parmi les F₁

Lors de la sélection des F₁ sur milieu sélectif, certains individus atteignent le stade adulte et présentent un phénotype sauvage, alors que d'autres se développent avec un rythme de croissance ralenti et présentent un phénotype anormal (adultes de taille réduite, défaut de locomotion, défaut de ponte et accumulation d'oeufs dans l'utérus, durée de vie réduite). Ce phénotype anormal n'est pas dû au transgène *neo* lui même, puisqu'il n'a jamais été observé chez les individus F₁ portant le transgène et cultivés sur du milieu NGM contrôle. Ce phénotype semble donc résulter d'un défaut de protection de l'individu par le transgène. Ainsi, les F₁ sélectionnés en présence de G-418 semblent avoir des degrés de résistance différents.

La proportion de F₁ présentant un phénotype anormal semble varier entre les différentes expériences et même entre chaque P₀ injecté. Par exemple, lors de la création de lignées stables de *C. elegans* pour les expériences de *MosSCI* (voir Résultats Partie III), un premier mélange d'injection aboutit à 30 individus avec un phénotype anormal sur 83 F₁ adultes identifiés (soit 36,1 % d'individus anormaux) et un deuxième mélange d'injection aboutit à 95 individus avec un phénotype anormal sur 150 F₁ adultes identifiés (soit 63,3 % d'individus anormaux) (Expériences 1 et 2 Tableau 5). Lors de ces

expériences, certains P₀ injectés donnèrent 0 % de F₁ avec un phénotype anormal, alors que d'autres donnèrent plus de 90 %.

La caractérisation et le suivi de 233 F₁ sélectionnés sur du milieu sélectif lors de ces expériences a permis de conclure que les individus faiblement résistants avec un phénotype anormal peuvent aussi transmettre le transgène à la génération F₂. Cependant, sur huit F₁ avec un phénotype anormal ayant transmis le transgène, seulement un transmet le phénotype Neo et donna lieu à une lignée extrachromosomique stable sans phénotype adverse. Pour les autres sept F₁, la transmission du transgène fut confirmée par la présence de larves F₂ fluorescentes (le mélange d'injection contenait aussi le transgène *pmyo-2::gfp* dans le même vecteur que le gène *neo*). Cependant, dans quatre cas les larves F₂ ne se développèrent pas, et dans les trois cas restants les F₂ présentèrent le même phénotype anormal que les parents F₁. Ces derniers cas représentaient donc certainement des lignées transgéniques avec un niveau de résistance trop faible pour pouvoir se développer sur du milieu sélectif.

5.2. Différents degrés de résistance observés parmi les lignées

Il a aussi été constaté lors de ces expériences que certaines lignées se développent plus difficilement que d'autres sur du milieu sélectif. Alors que certaines lignées ne présentent pas de phénotype adverse, pour d'autres, la majorité des individus présentent le phénotype anormal décrit ci-dessus (Tableau 5). Ces lignées ont toutes un taux de croissance très faible sur du milieu sélectif, caractéristique d'un faible taux de transmission. Elles ne sont donc pas des lignées utiles pour l'expérimentation et ont été écartées pour la suite des expériences. Le pourcentage de lignées sans phénotype adverse obtenues (par rapport au nombre de F₁ total) est entre 7 et 35 % (Tableau 5), pourcentage généralement obtenu lors des expériences de transgénèse par microinjection (entre 10 et 50 % d'après (Jin 1999)).

Tableau 5 : Quantification des F₁ et des lignées sélectionnés sur milieu sélectif

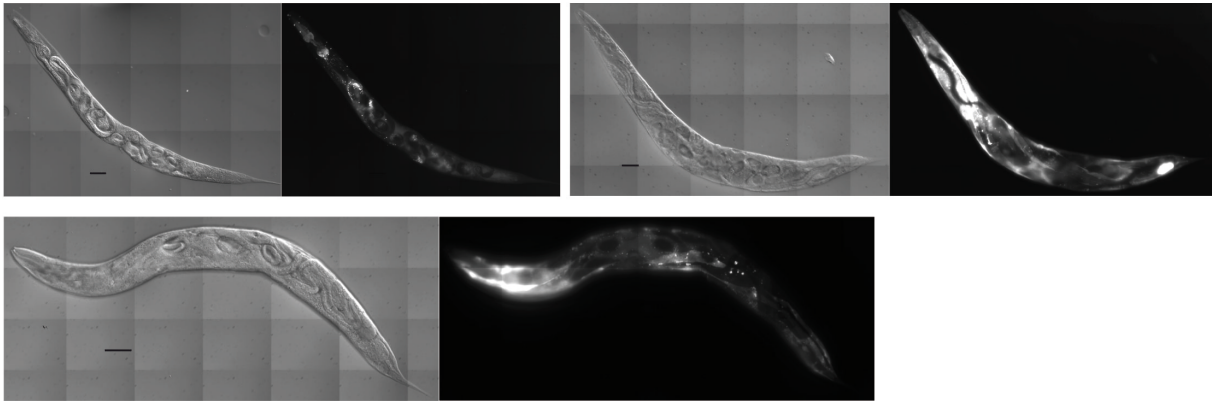
	F ₁		Lignées		Pourcentage de F ₁ donnant des lignées sans phénotype adverse
	Total F ₁	F ₁ avec phénotype adverse	Total lignées	Lignées avec phénotype adverse	
Expérience 1	83	30	7	1	7,22 %
Expérience 2	150	95	20	5	10 %
Expérience 3	26	non déterminé	13	4	34,6 %
Expérience 4	36	non déterminé	9	2	19,4 %

5.3. Caractérisation du profil d'expression du transgène $\rho_{rps-27::neo::3'UTR}$ *unc-54* nécessaire pour conférer la résistance au G-418

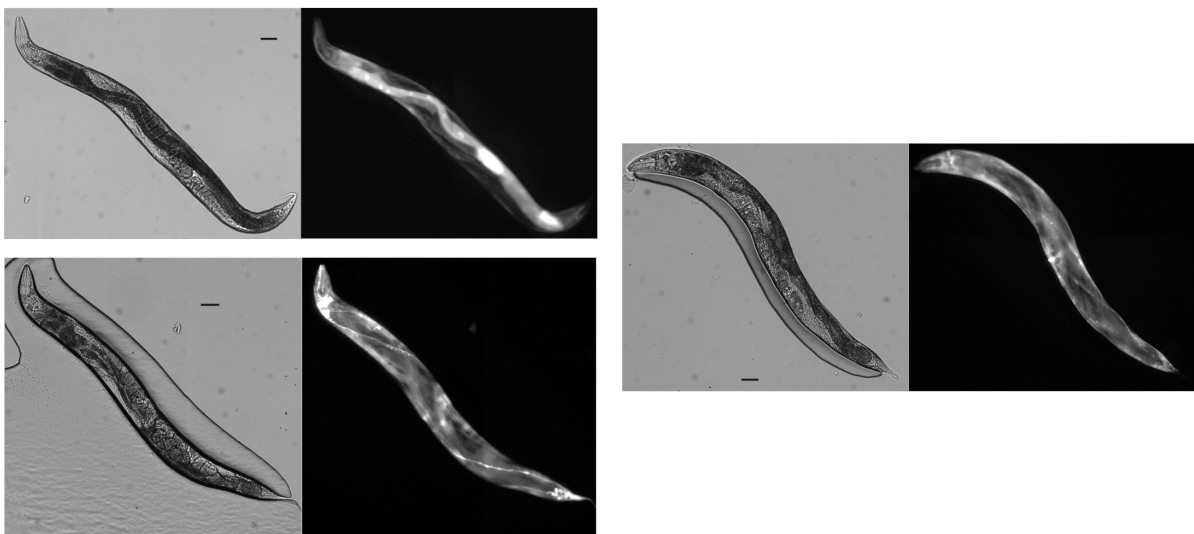
Les observations décrites ci-dessus suggèrent que les différents degrés de résistance au G-418 pourraient avoir un rapport avec le degré de mosaïcisme des individus. En effet, lors de la transgénèse, les F₁ expriment le transgène de manière mosaïque (Mello et Fire 1995; Jin 1999). De plus, la faible résistance de certaines lignées coïncide avec un faible taux de transmission. Or, le faible taux de transmission s'expliquerait par la présence d'un concatémère extrachromosomique hautement instable, facilement perdu lors des divisions cellulaires, qui aurait aussi comme conséquence un fort taux de mosaïcisme (Mello et al. 1991). Ainsi, il est plausible que la faible résistance au G-418 s'explique par un fort taux de mosaïcisme, ce qui signifie que le degré de résistance de chaque individu dépend des tissus dans lesquels le transgène $\rho_{rps-27::neo::3'UTR}$ *unc-54* est exprimé.

Pour tester cette hypothèse, le degré de mosaïcisme des différents types d'individus résistants (avec et sans phénotype adverse) a été évalué. Des expériences de transgénèse ont été réalisées avec le transgène $\rho_{rps-27::neo::gfp::3'UTR}$ *unc-54*. L'expression du gène *rps-27* étant ubiquitaire, ce transgène entraîne l'expression de la GFP dans toutes les cellules où le concatémère extrachromosomique est présent, permettant ainsi d'évaluer le degré de mosaïcisme de l'individu. Des expériences préliminaires ont montré que la fusion *neo::gfp* utilisée ne confère pas la résistance au G-418. *C. elegans* N2 a donc été injecté avec un mélange de $\rho_{rps-27::neo::gfp::3'UTR}$ *unc-54* avec le plasmide *pDD04neo* et le plasmide *pRF4* comme marqueur génétique supplémentaire.

A



B



C

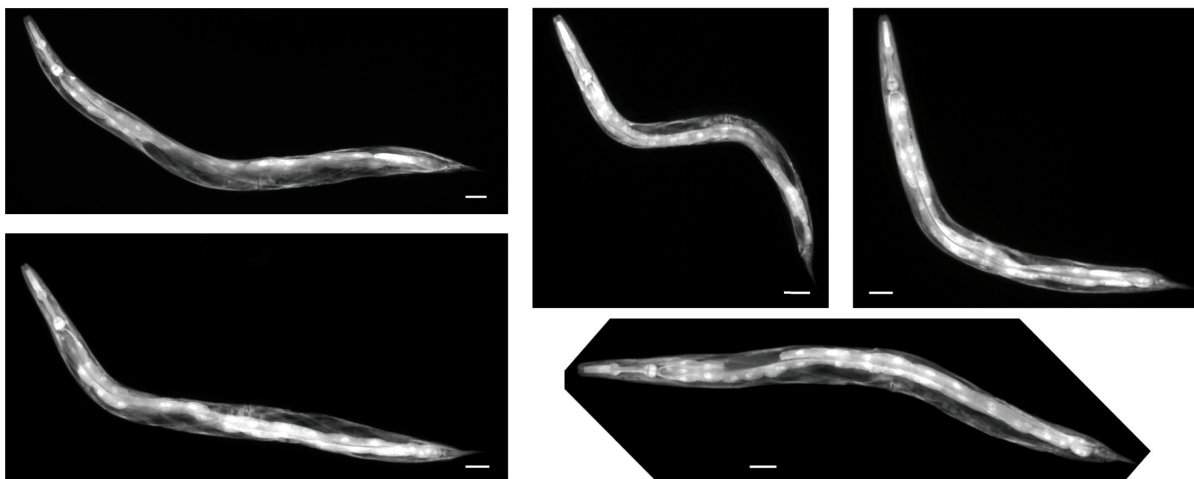


Figure 32 : Profil d'expression du transgène $\rho_{rps-27}::neo::gfp::3'UTR_{unc-54}$ chez des individus avec différents degrés de résistance au G-418. A Images de Nomarski (gauche) et de fluorescence (droite) de F₁ avec phénotype adverse. **B** Images sur fond clair (gauche) et de fluorescence (droite) de F₁ sans phénotype adverse. **C** Images de fluorescence d'individus d'une lignée extrachromosomique stable sans phénotype adverse. La tête des vers est à gauche. Barre d'échelle : 50 μ m.

Après injection de 10 P₀, 184 F₁ furent identifiés sur la base de l'expression de la GFP. Cependant, seulement 35 individus se développèrent jusqu'au stade adulte, parmi lesquels 18 présentaient un phénotype adverse. Après comparaison du profil d'expression de la GFP entre les deux types de F₁ adultes, il a été constaté que les F₁ avec un phénotype adverse présentaient tous un profil d'expression mosaïque, avec uniquement certains tissus exprimant la GFP (Figure 32 A), alors que les F₁ avec un phénotype sauvage avaient un mosaïcisme moins marqué et exprimaient la GFP dans la plupart des tissus (Figure 32 B). Cette expérience préliminaire avec un nombre réduit de F₁ n'a pas permis d'identifier le ou les tissus devant exprimer le transgène pour conférer la résistance au G-418.

Une seule lignée transgénique fut obtenue à partir de cette expérience. Cette lignée ne présente pas de phénotype adverse et exprime la GFP de manière ubiquitaire (Figure 32 C). L'expression de la GFP est systématiquement identifiée dans les muscles du corps, du pharynx et de la vulve, dans les cellules de l'hypoderme, dans les neurones de la tête et de la queue, dans la cellule et le canal excrétoire, dans l'intestin et dans d'autres cellules de la queue non identifiées (48 individus observés). L'expression de la GFP étant très forte, il semble difficile de distinguer les tissus qui n'exprimeraient pas le transgène.

Malheureusement, l'obtention d'une seule lignée transgénique ne permet pas de conclure sur le profil d'expression du transgène *neo* nécessaire pour conférer la résistance. Mais il semblerait que l'expression ubiquitaire est bien nécessaire pour protéger les individus de l'antibiotique. Si cette hypothèse est vraie, le système *neo* sélectionnerait les individus transgéniques avec des profil d'expression faiblement mosaïque et donc des individus avec des concatémères extrachromosomiques stables.

Partie II : Adaptation du système *neo* à la transgénèse par bombardement

Le gène *neo*, combiné à l'antibiotique G-418, s'est montré être un système efficace de sélection des nématodes transgéniques lors de la transgénèse par microinjection. Dans le cadre des travaux de thèse, de nombreuses expériences ont été réalisées dans le but d'adapter ce marqueur génétique à la transgénèse des nématodes par bombardement. Les conditions de la transgénèse par bombardement sont très différentes de celles de la microinjection, notamment en termes de nombre de vers manipulés. Alors que lors de la microinjection les vers sont traités individuellement, lors du bombardement il est nécessaire de travailler avec des dizaines de milliers de vers, ce qui représente une difficulté particulière pour l'élimination des individus sauvages et la sélection des quelques individus transgéniques.

1. Optimisation des conditions de sélection

1.1. La concentration critique de G-418 n'est pas adaptée aux conditions de bombardement

Différentes expériences ont montré que la mise en culture d'un grand nombre de *C. elegans* (plus de 500 individus) sur du milieu sélectif à la concentration critique de G-418 (0,4 mg/ml) n'aboutit pas à l'élimination des individus sauvages et ceci quelle que soit la taille de la boîte de pétri utilisée (4 cm, 9 cm ou 14 cm de diamètre). Dans ces conditions, la population de vers épuise les ressources de nourriture avant même d'être affectée par la drogue et lorsque les larves sont transférées par milliers sur un morceau d'agar sur des nouvelles boîtes sélectives, elles sont capables de se développer jusqu'au stade adulte. En d'autres mots, lorsque les vers sont mis en culture par milliers sur du milieu sélectif, ils sont insensibles à la drogue, suggérant que la quantité d'antibiotique adsorbée par chaque individu n'est pas suffisante pour affecter leur croissance et leur reproduction.

Par la suite, d'autres concentrations d'antibiotique ont été testées sur des boîtes de 14 cm de diamètre, afin d'augmenter la quantité de drogue administrée aux vers ainsi que la taille du tapis bactérien et donc la quantité de nourriture. La détermination de conditions optimales s'est avérée infructueuse, puisque même lors de la mise en culture de 500

individus sur du milieu à 1 mg/ml de G-418, il ne fut pas possible d'arrêter la croissance de la totalité des larves pondues, ni le développement de la population sauvage.

Face à ces résultats il serait envisageable d'augmenter la concentration d'antibiotique ou de diminuer encore le nombre de vers mis en culture sur la même boîte afin d'augmenter la dose d'antibiotique administrée à chaque individu. Cependant, ces solutions ne semblent pas adaptées à la transgénèse par bombardement. D'une part, augmenter la concentration en G-418 aurait des répercussions sur le coût de l'expérience. D'autre part, diminuer le nombre de vers traités par boîte d'antibiotique obligerait l'expérimentateur à manipuler un très grand nombre de boîtes (une expérience de bombardement optimale peut utiliser jusqu'à 100000 individus P_0).

1.2. Enrichissement d'une population transgénique à partir d'un seul individu parmi des milliers de vers sauvages

Pour déterminer des conditions de sélection adaptées au bombardement, des expériences d'enrichissement ont été réalisées afin de mimer les conditions retrouvées après une expérience de bombardement. Ces expériences ont consisté à enrichir une population transgénique Neo à partir d'un seul individu Neo mis en culture en présence de G-418, parmi des centaines ou des milliers de vers sauvages. Compte tenu des résultats obtenus précédemment, l'objectif de ces expériences n'était pas d'éliminer la totalité de la population sauvage, mais d'obtenir des conditions d'enrichissement de la population Neo suffisantes pour faciliter l'identification visuelle des individus transgéniques parmi les faux positifs (vers sauvages capables de se développer en présence de G-418), grâce à des marqueurs visuels tel Rol ou l'expression de la GFP dans le pharynx.

Dans un premier temps, des mélanges d'un seul adulte de la lignée Neo *C. elegans* DUD0007 (exprimant la GFP dans les neurones sensoriels du toucher et avec le phénotype Rol) et de 1000 ou 3000 vers sauvages, furent mis en culture sur des boîtes de 10 cm de diamètre avec 1 mg/ml de G-418. La source de nourriture ayant été épuisée après deux jours de culture, la totalité des vers fut transférée par morceaux d'agar sur des nouvelles boîtes avec 1 mg/ml G-418. Après deux jours de culture sur du nouveau milieu, il a été possible d'identifier des individus Rol parmi de nombreux faux positifs. Pour la dilution initiale d'un ver transgénique parmi 1000 vers sauvages (dilution 1:1000), 20 adultes Rol furent identifiés parmi 270 adultes, soit un enrichissement de 69 fois par rapport à la dilution initiale. Pour la dilution 1:3000, 9 adultes Rol furent identifiés parmi 107 adultes, soit un enrichissement de 232 fois par rapport à la dilution initiale. Ces

résultats montrèrent que si l'élimination totale des vers sauvages n'est pas réussie, il est cependant possible d'enrichir significativement la population de transgéniques.

1.3. Enrichissement sur G-418 après choc thermique

Lors de la détermination de la concentration critique de G-418 pour *C. elegans* dans le cadre de la microinjection, il a été observé que les larves sont plus sensibles à la drogue que les adultes. Cette différence de sensibilité a aussi été observée chez la drosophile (Steller et Pirrotta 1985) et pourrait s'expliquer en partie par le besoin des larves de produire des protéines pour assurer leur développement. Alors que le blocage de la production de protéines par le G-418 chez les individus adultes pourrait ne pas avoir des conséquences majeures, il aurait des conséquences fatales pour les larves en développement. Si cette hypothèse est correcte, il devrait être possible d'augmenter la toxicité du G-418 pour les vers adultes en les soumettant à des conditions de stress qui nécessitent la production de nouvelles protéines pour la résistance au stress.

Basé sur cette hypothèse, des expériences d'enrichissement à partir d'une dilution initiale de 1:500 à 1:2000 furent réalisées avec des adultes *C. elegans* ou *C. briggsae*, avec l'administration de chocs thermiques (1h à 37°C). Des expériences préliminaires avaient montré que les adultes et les larves de *C. elegans* ou *C. briggsae* sauvages sur du milieu NGM, ainsi que les adultes et les larves transgéniques des lignées Neo *C. elegans* DUD0001 et *C. briggsae* DUD0005 sur du milieu sélectif, résistaient à ces chocs thermiques (croissance et reproduction comparable à celles de vers contrôles non soumis au choc thermique).

Des adultes *C. elegans* N2 et un adulte Neo DUD0003 (exprimant la GFP dans le pharynx) furent mis en culture à des ratios de 1:500, 1:1000 et 1:2000, sur des boîtes de 14 cm de diamètre avec du G-418 à 1 mg/ml. Après un jour de culture et pendant deux jours successifs, les boîtes furent incubées à 37°C durant une heure. La croissance et la reproduction des vers furent observées durant les jours suivants. Quatorze jours après la mise en culture, alors que les populations contrôles (non soumises aux chocs thermiques) avaient proliféré jusqu'à épuisement des ressources de nourriture, les boîtes soumises aux chocs thermiques contenaient encore des bactéries et les populations étaient composées principalement d'adultes sauvages et de transgéniques à tous les stades du développement. Ainsi, dans ces conditions, les populations transgéniques amplifiées étaient facilement identifiables parmi les faux positifs. Les pourcentages d'individus

transgéniques les plus élevés furent obtenus pour la dilution initiale de 1:500 ; dans ces conditions, le pourcentage de vers exprimant la GFP dans le pharynx fut estimé entre 20 et 50 % (estimation après comptage d'un échantillon de la population, pour trois expériences indépendantes). Cette expérience a permis de confirmer que l'application de chocs thermiques à des populations sauvages en présence de G-418 permet l'enrichissement des populations Neo à partir d'individus largement minoritaires.

La même expérience fut réalisée avec des adultes *C. briggsae* AF16 et un adulte Neo DUD0005 (exprime la GFP dans le pharynx) à un ratio de 1:500. Quatorze jours après le traitement de chocs thermiques, le pourcentage d'individus transgéniques fut estimé à 50 %, prouvant que le traitement fonctionne également sur *C. briggsae*.

2. Transgénèse par bombardement et sélection sur G-418 après choc thermique

Des expériences de bombardement avec le transgène *pDD04neo_ρmyo-2::gfp* ont été réalisées sur des *C. elegans* N2 et des *C. briggsae* AF16. Les vers bombardés P₀ furent mis en culture sur des boîtes de 1 mg/ml G-418, à raison de 500 P₀ par boîte. Afin d'augmenter la sélection, les populations furent soumises au traitement décrit ci-dessus, avec un choc thermique supplémentaire au troisième jour après le bombardement, soit un total de trois chocs thermiques consécutifs. Cependant, malgré les résultats encourageants décrits précédemment, l'arrêt de l'amplification de la population sauvage s'est avéré peu reproductible (Tableau 6). En effet, lors d'un des bombardements de *C. elegans*, 7 boîtes sur 17 présentaient des populations sauvages amplifiées et la nourriture était épuisée après dix jours de culture (Bombardement 2 de *C. elegans*, Tableau 6). Ce fut aussi le cas lors d'un bombardement de *C. briggsae* (Bombardement 2 de *C. briggsae*, Tableau 6) où 12 boîtes sur 17 présentaient des populations sauvages amplifiées.

Des individus transgéniques ne furent obtenus que lors d'une seule expérience de bombardement de *C. elegans* (Tableau 6), où seulement deux individus adultes furent identifiés sept jours après le bombardement, sur la base de l'expression de la GFP dans le pharynx. Ces vers présentaient un phénotype adverse (adultes de petite taille avec défaut de locomotion) et aucune population transgénique ne fut amplifiée dans ces boîtes. Il est possible que ces vers transgéniques avec un phénotype adverse, faiblement résistants,

n'aient pas eu d'avantage sélectif dans les conditions de choc thermique et se soient comportés comme des individus sauvages.

Le faible succès de ces expériences de bombardement peut être dû au faible nombre de vers bombardés. Lors des expériences de bombardement, les protocoles de routine utilisent 100000 à 200000 individus (Evans 2006) alors que nous n'en avons utilisé que ~10000.

Les expériences de bombardement et de sélection sur du milieu G-418 réalisées durant mes travaux de thèse n'ont pas permis d'optimiser les conditions de sélection après bombardement sur la base du phénotype Neo. Cependant, ces expériences préliminaires restent encourageantes et permettent d'envisager des expériences de bombardement avec un nombre d'individus plus important.

Tableau 6 : Essais de bombardement et sélection sur G-418 de *C. elegans* et *C. briggsae*.
Données recueillies dix jours après le bombardement.

Nombre de boîtes à 1mg/ml G-418 contenant :

	une population sauvage amplifiée	une population sauvage inférieure à 500 vers	aucun ver vivant	Total	Population totale bombardée (nombre de vers)
<i>C. elegans</i>					
Bombardement 1	-	3	14	17	8500
Bombardement 2	7	10	-	17	8500
Bombardement 3*	3	5	7	15	7500
<i>C. briggsae</i>					
Bombardement 1	-	4	13	17	8500
Bombardement 2	12	5	-	17	8500
Bombardement 3	-	8	-	8	4000

* Des vers exprimant la GFP dans le pharynx furent identifiés 7 jours après le bombardement.

Il est aussi envisageable d'effectuer la sélection dans du milieu liquide où, contrairement à la sélection sur du milieu solide, différentes doses d'antibiotiques peuvent être ajoutées au cours du temps pour assurer la sélection dans la durée. Des essais

préliminaires d'enrichissement en milieux liquide ont été réalisés. Cependant, des conditions de sélection en milieu liquide n'ont pas pu être mises aux point, principalement à cause de contaminations bactériennes résistantes au G-418 et à d'autres antibiotiques.

Partie III : Le système *neo*, marqueur de co-insertion pour l'intégration par *MosSCI*

Afin de tester la compatibilité du système de sélection *neo* avec la méthode *MosSCI*, deux lignées portant des insertions intergéniques du transposon *Mos1* ont été sélectionnées. Les lignées EN5271 et EN5273 portent des insertions du transposon dans le chromosome I (allèle *kr5271*) et X (allèle *kr5273*) respectivement. Pour chaque lignée, un vecteur matrice de réparation a été construit, portant les gènes ρ *myo-2::gfp* et ρ *rps-27::neo::3'UTR unc-54* flanqués par des régions de ~1,4 kb, homologues aux séquences de part et d'autres de l'insertion *Mos1* correspondante (Figure 34). Le gène ρ *rgef-1::DsRed2* qui confère l'expression de la DsRed2 dans le système nerveux, fut utilisé comme marqueur négatif, c'est à dire comme le marqueur présent uniquement dans le concatémère extrachromosomique (Figure 33). Finalement, deux sources de transposase différentes ont été utilisées, associées à deux protocoles différents. D'une part, le gène ρ *hsp-16.48::transposase* exprime la transposase suite à un choc thermique et fut utilisé lors du protocole dit protocole de choc thermique. D'autre part, le gène ρ *glh-2::transposase* exprime la transposase dans la lignée germinale et fut utilisé lors du protocole direct. Dans les deux cas, les événements d'insertion putatifs furent distingués des vers portant des concatémères extrachromosomiques, tous les deux ayant un phénotype Neo, par l'expression de la GFP dans le pharynx et l'absence d'expression de DsRed2 dans le système nerveux.

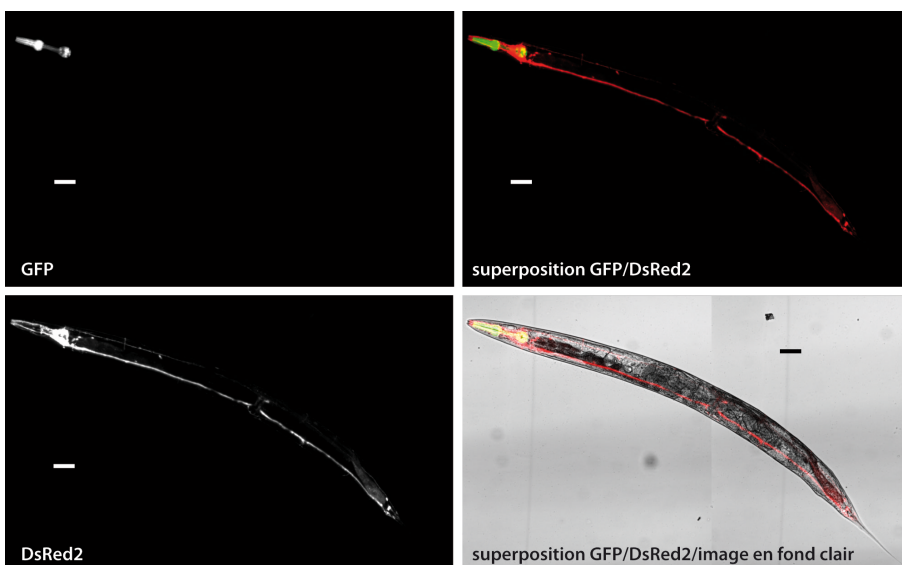
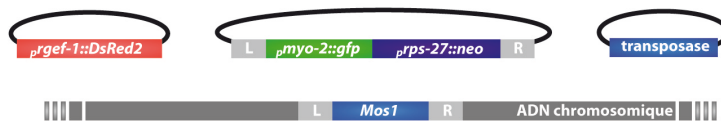


Figure 33 : Image d'un ver portant un concatémère extrachromosomique avec le vecteur matrice de réparation, contenant le transgène ρ *myo-2::gfp*, le marqueur négatif ρ *rgef-1::DsRed2*, et une source de transposase. En haut à gauche, image de fluorescence montrant l'expression de la GFP dans le pharynx. En bas à gauche, image de fluorescence montrant l'expression de la DsRed2 dans le système nerveux. Barre d'échelle : 50 μ m.

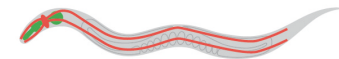
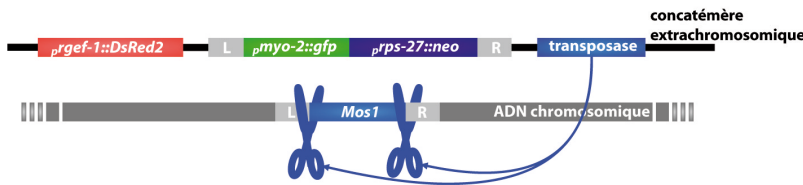
1 Microinjection dans la lignée receveuse *Mos1/Mos1*



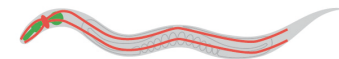
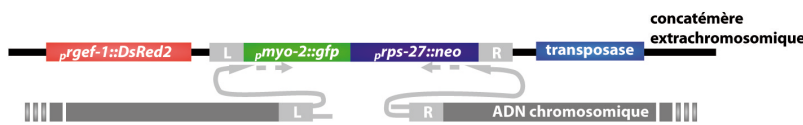
Phénotype



2 Expression de la transposase et excision de *Mos1*



3 Réparation de la coupure double brin de l'ADN par conversion génique



4 Perte du concatémère extrachromosomique et identification de l'événement d'intégration



Figure 34 : Stratégie d'insertion d'une copie unique de gène *neo* par *MosSCI*. 1-4 Étapes de l'insertion des transgènes *p_{myo-2}::gfp* et *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54* dans le génome de *C. elegans* par *MosSCI*. À droite, phénotype des vers à chaque étape. Les événements d'insertion putatifs sont identifiés sur la base de l'expression de la GFP dans le pharynx et l'absence d'expression de la DsRed2 dans le système nerveux. À chaque étape (2-4) les vers expriment le gène de résistance au G-418.

1. Insertion suivant le protocole de choc thermique

1.1. Adaptation du protocole à la sélection sur la base du phénotype Neo

Chaque étape du protocole de *MosSCI* par choc thermique fut adaptée à la sélection grâce au marqueur génétique *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54*. Dans un premier temps, des adultes *C. elegans* EN5271 et EN5273 furent injectés avec *p_{hsp-16.48}::transposase* comme source de transposase, *p_{rgef-1}::DsRed2* comme marqueur négatif et *p_{RG5271Neo} p_{myo-2}::gfp* et *p_{RG5273Neo} p_{myo-2}::gfp* respectivement, comme vecteur matrice de réparation. Des lignées extrachromosomiques stables furent sélectionnées sur la base du phénotype Neo. Comme prévu, les lignées ainsi obtenues exprimaient toutes la GFP dans le pharynx et la DsRed2 dans le système nerveux. Trois lignées extrachromosomiques EN5271 (DUD0021, DUD0022, DUD0023) et six lignées extrachromosomiques EN5273 (DUD0015 à DUD0020) furent retenues pour la

suite des expériences. Pendant la durée de celles-ci, les lignées furent maintenues sur milieu sélectif.

Par la suite, des populations contenant principalement des adultes furent soumises à un choc thermique pour activer l'expression de la transposase. Puis, les vers adultes P₀ furent transférés sur des nouvelles boîtes sélectives, en raison de 20 adultes par boîte de 9 cm de diamètre. À ce stade, les populations furent amplifiées pour augmenter la taille de la population d'individus portant l'insertion du transgène dans le génome et permettre la perte du concatémère extrachromosomique à chaque génération. Ainsi, les populations de P₀ furent amplifiées jusqu'à l'épuisement total de la source de nourriture (sept à 10 jours après le choc thermique), puis, les populations entières furent transférées sur des nouvelles boîtes sélectives (à raison d'un quart de boîte par nouvelle boîte sélective). Sept à dix jours après ce transfert, un échantillon de chaque population fut analysé sous le microscope à fluorescence à la recherche d'événements d'insertion putatifs.

Les événements d'insertion putatifs furent identifiés grâce à l'expression de la GFP dans le pharynx et l'absence d'expression de la DsRed2 dans le système nerveux. Les événements identifiés furent considérés comme indépendants uniquement s'il provenaient de populations issues de boîtes indépendantes (contenant 20 P₀ au départ). Deux insertions putatives furent obtenues dans le chromosome I (DUD0029 et DUD0030) et cinq insertions dans le chromosome X (DUD0024 à DUD0028). Des individus uniques issus de chaque population furent isolés sur du milieu sélectif et le phénotype Neo fut confirmé pour tous les candidats. Tous les événements d'insertion putatifs identifiés avaient une expression de la GFP dans le pharynx plus faible en intensité que celle des lignées extrachromosomiques originales (Figure 35 A et C). Cette observation est en accord avec la différence dans le nombre de copies du transgène *ρmyo-2::gfp* entre les lignées extrachromosomique portant une centaine de copies et les lignées portant l'insertion, qui auraient une seule copie intégrée dans le génome.

Les populations criblées contenaient aussi des individus n'exprimant ni la GFP ni la DsRed. Des individus uniques présentant cette caractéristique et issus de chaque population furent isolés sur milieu sélectif, mais aucun d'eux ne transmet le phénotype Neo (aucune progéniture ne fut capable de se développer), suggérant qu'il s'agissait de faux positifs. La présence de faux positifs n'est pas étonnante à ce stade de l'expérience, puisqu'après l'amplification de milliers de vers sur la même boîte la dose de G-418 présente dans le milieu n'est pas suffisante pour assurer l'élimination de la totalité des

animaux sauvages (voir Résultats Partie I). Toutefois, la proportion des faux positifs dans les populations criblées resta très minoritaire.

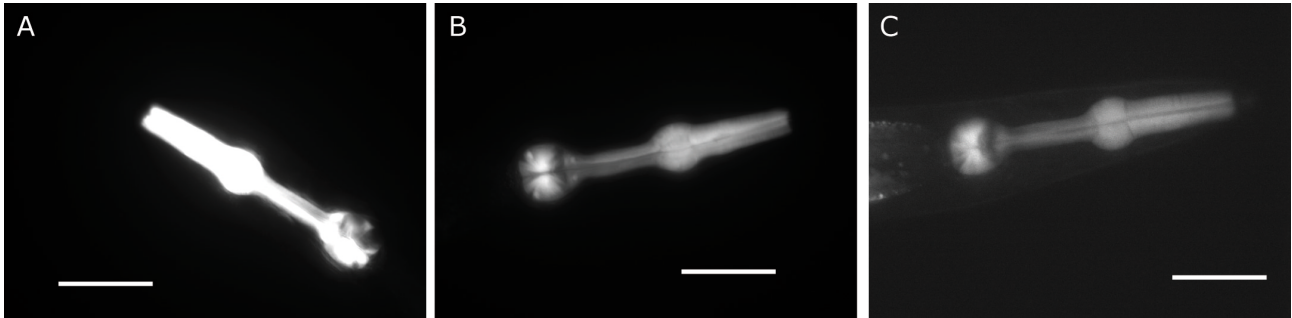


Figure 35 : Images en fluorescence de pharynx exprimant la GFP. Toutes les images ont été prises avec le même temps d'exposition (23 ms) **A** Image du pharynx d'un individu portant le transgène $\rho_{myo-2}::gfp$ dans un concatémère extrachromosomique. La partie antérieure du ver est à gauche, la partie dorsale en haut. **B** Image du pharynx d'un individu de la lignée DUD0056, portant un nombre réduit de copies du transgène $\rho_{myo-2}::gfp$. La partie antérieure du ver est à droite, la partie dorsale en haut. **C** Image du pharynx d'un individu portant une seule copie du transgène $\rho_{myo-2}::gfp$ intégrée dans le génome. La partie antérieure du ver est à droite, la partie dorsale en haut. Barre d'échelle : 50 μ m.

1.2. Caractérisation des insertions putatives

Tous les événements d'insertion putatifs furent soumis à différentes analyses afin de confirmer l'insertion par des techniques moléculaires. Dans un premier temps, tous les événements d'insertions furent confirmés comme tels grâce à des PCR en duplex (Figure 36). Pour les insertions à partir de la lignée EN5271, un des couples d'amorces utilisés donne un amplicon de taille 1,4 kb uniquement si le transgène $\rho_{rps-27}::neo::3'UTR\ unc-54$ est inséré au bon locus, alors que l'autre couple, spécifique aux vecteur matrice de réparation $\rho_{RG5271}Neo\ \rho_{myo-2}::gfp$, donne un amplicon de taille 1,5 kb uniquement si le concatémère extrachromosomique est présent (Figure 36 A). Suivant le même schéma, pour les insertions à partir de la lignée EN5273, un des couples d'amorces utilisés donne un amplicon de taille 1,7 kb uniquement si le transgène $\rho_{rps-27}::neo::3'UTR\ unc-54$ est inséré au bon locus, alors que l'autre couple, spécifique aux vecteur matrice de réparation $\rho_{RG5273}Neo\ \rho_{myo-2}::gfp$, donne un amplicon de taille 1,5 kb uniquement si le concatémère extrachromosomique est présent (Figure 36 B). D'après les résultats de ces PCR, toutes les insertions obtenues lors des ces expériences eurent lieu au bon locus et l'absence d'expression de la DsRed2 dans le système nerveux correspondait bien à la perte du concatémère extrachromosomique.

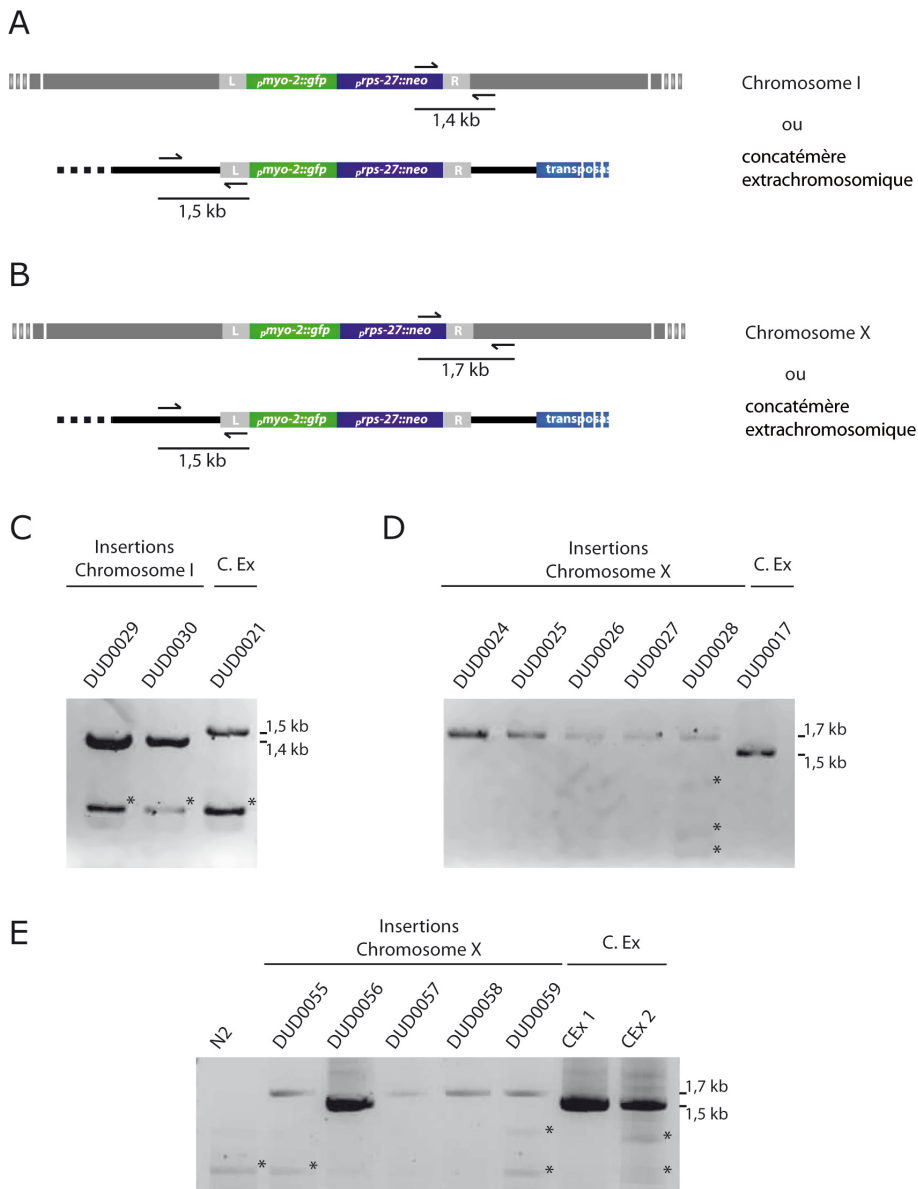


Figure 36 : Caractérisation des événements d'insertion putatifs par PCR. A-B Schéma représentant le positionnement des couples d'amorces et les possibles amplifications pour les insertions à la place de l'allèle *kr5271* (chromosome I) (**A**) ou de l'allèle *kr5273* (chromosome X) (**B**). **C-D** Caractérisation par PCR des événements d'insertion à la place de l'allèle *kr5271* (**C**) et *kr5273* (**D**) obtenus suivant le protocole de choc thermique. **E** Caractérisation par PCR des événements d'insertion à la place de l'allèle *kr5273*, obtenus suivant le protocole direct. C. Ex : Lignée portant un concatémère extrachromosomique. * : amplifications non spécifiques.

Dans un deuxième temps, les insertions furent analysées par des expériences de Southern Blot (Figures 37 et 38). Lors des expériences de *MosSCI* réalisées par C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs, 10 à 40 % des insertions obtenues portaient des délétions ou des insertions d'autres séquences, et les auteurs montrèrent qu'il était possible d'obtenir l'insertion de deux copies du même transgène (Frokjaer-Jensen et al. 2008). Dans le cadre des travaux de thèse, les expériences de Southern Blot permirent donc de caractériser la nature de chaque insertion obtenue. Aucune des insertions obtenues par le protocole de choc thermique ne présentait d'erreur de délétion ou d'insertion d'autres séquences qui puissent être repérées par Southern Blot.

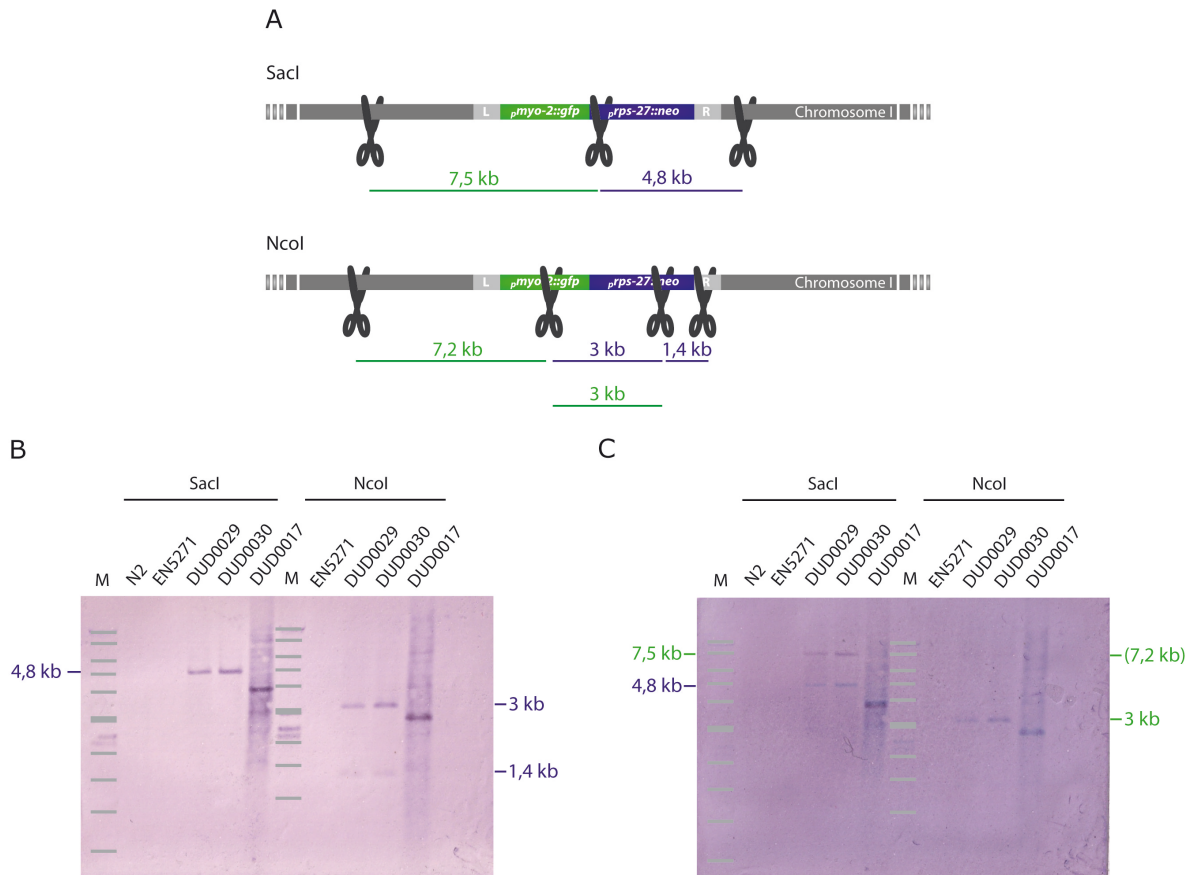


Figure 37 : Caractérisation par Southern Blot des insertions dans le chromosome I, à partir de la lignée EN5271. **A** Carte de restrictions de l'ADN génomique autour de l'insertion par les enzymes SacI et NcoI. Les tailles attendues des fragments hybridés par la sonde complémentaire au gène *gfp* sont indiquées en vert. Les tailles attendues des fragments hybridés par la sonde complémentaire au gène *neo* sont indiquées en violet. **B** Hybridation par la sonde complémentaire au gène *neo*. **C** Hybridation par la sonde complémentaire au gène *gfp*. Le fragment issu de la restriction par NcoI, à 7,2 kb est très faiblement visible, probablement dû à la faible sensibilité de la détection sur la membrane re-hybridée (voir Matériel et Méthodes). La bande à 4,8 kb issue de l'hybridation par la sonde complémentaire au gène *neo* est encore visible. DUD0029 et DUD0030 sont des événements d'insertion. DUD0017 est une lignée extrachromosomique. M : marqueur de taille

Finalement, la technique de PCR quantitative (qPCR) fut utilisée comme méthode complémentaire pour confirmer le nombre de copie insérées des transgènes *ρmyo-2::gfp* et *ρrps-27::neo::3'UTR unc-54*. Pour cela, cinq couples d'amorces furent utilisés de manière à amplifier spécifiquement des séquences de la région codante du transgène *gfp* et du transgène *neo*, ainsi que du gène *unc-119* et des régions homologues à gauche de l'allèle *kr5271* (71L) et à droite de l'allèle *kr5273* (73R) (voir Figure 19 du Matériel et Méthodes). Le gène *unc-119*, présent en une seule copie dans le génome de *C. elegans*, fut utilisé comme référence. Les différences en *Fold change* entre différentes séquences analysées relativement à *unc-119* donnent une estimation du nombre de copies de chaque séquence.

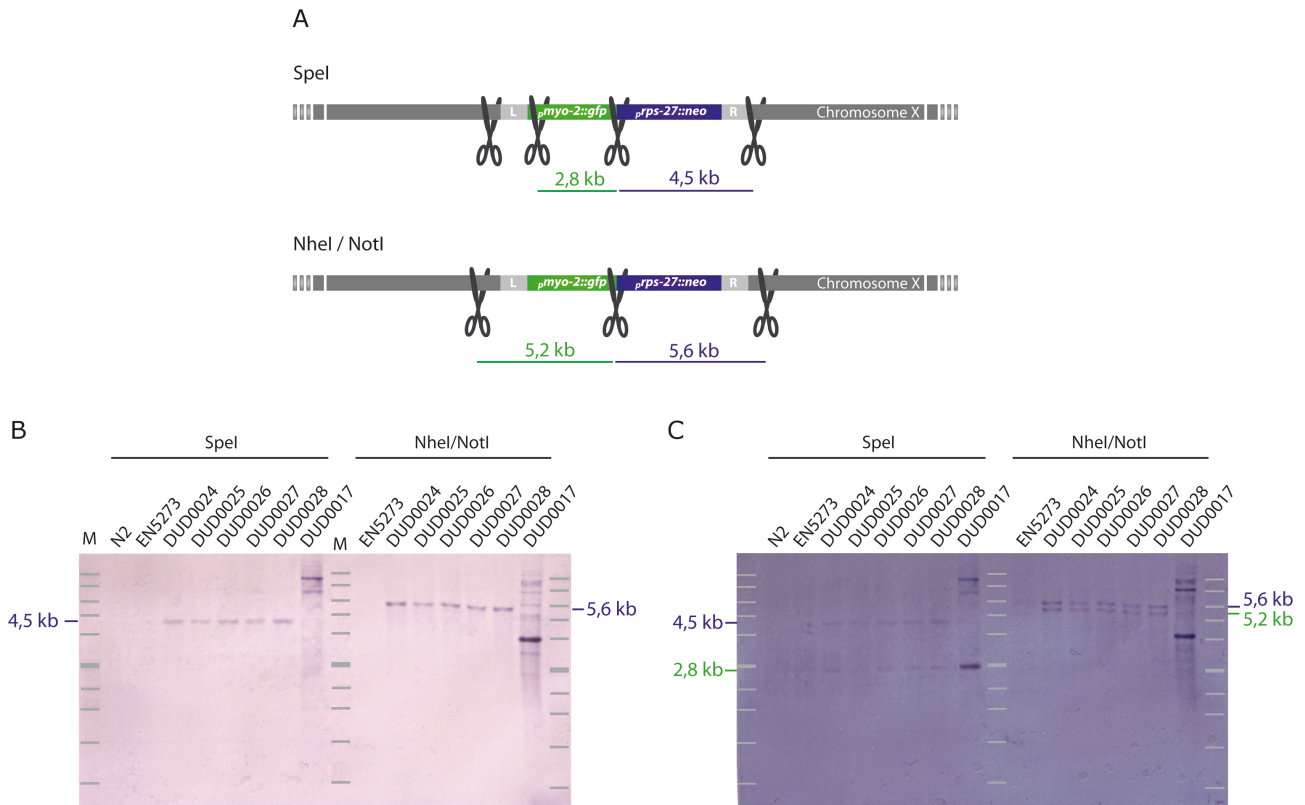


Figure 38 : Caractérisation par Southern Blot des insertions dans le chromosome X, à partir de la lignée EN5273 **A** Carte de restrictions de l'ADN génomique autour de l'insertion par les enzymes SpeI et NheI/NotI. Les tailles attendues des fragments hybridés par la sonde complémentaire au gène *gfp* sont indiquées en vert. Les tailles attendues des fragments hybridés par la sonde complémentaire au gène *neo* sont indiquées en violet. **B** Hybridation par la sonde complémentaire au gène *neo*. **C** Hybridation par la sonde complémentaire au gène *gfp*. Les bandes à 4,5 kb et à 5,6 kb, issues de l'hybridation par la sonde complémentaire au gène *neo*, sont encore visibles. DUD0024 et DUD0028 sont des événements d'insertion. DUD0017 est une lignée extrachromosomique. M : marqueur de taille.

Comme prévu, les amorces *gfp* et *neo* ne donnèrent aucune amplification à partir de l'ADN génomique des lignées EN5271 et EN5273 portant les insertions de *Mos1* (Figure 39). Cependant, des amplifications à partir de ces amorces furent obtenues pour tous les événements d'intégration dans le chromosome I et le chromosome X. Ces amplifications furent obtenues à des niveaux comparables à ceux des séquences *71L* et *73R*, présentes en une seule copie dans le génome du ver, indiquant que les gènes *pmyo-2::gfp* et *pmps-27::neo::3'UTR unc-54* sont présents à des niveaux endogènes. Finalement, des *Fold change* 40 à 50 fois supérieurs au niveau endogène furent obtenus pour les lignées extrachromosomiques. Ces résultats s'expliquent par le caractère répétitif des concatémères qui présentent des multiples copies des transgènes. Les résultats de qPCR permettent donc de confirmer les insertions en simple copie des transgènes.

En conclusion, ces expériences confirmèrent que tous les événements d'insertion putatifs isolés en utilisant le système *neo* comme marqueur de co-insertion étaient des insertions au locus attendu et qu'aucun de ses événements ne comportait d'erreurs introduites lors de la conversion génique, qui puissent être repérées par les méthodes utilisées.

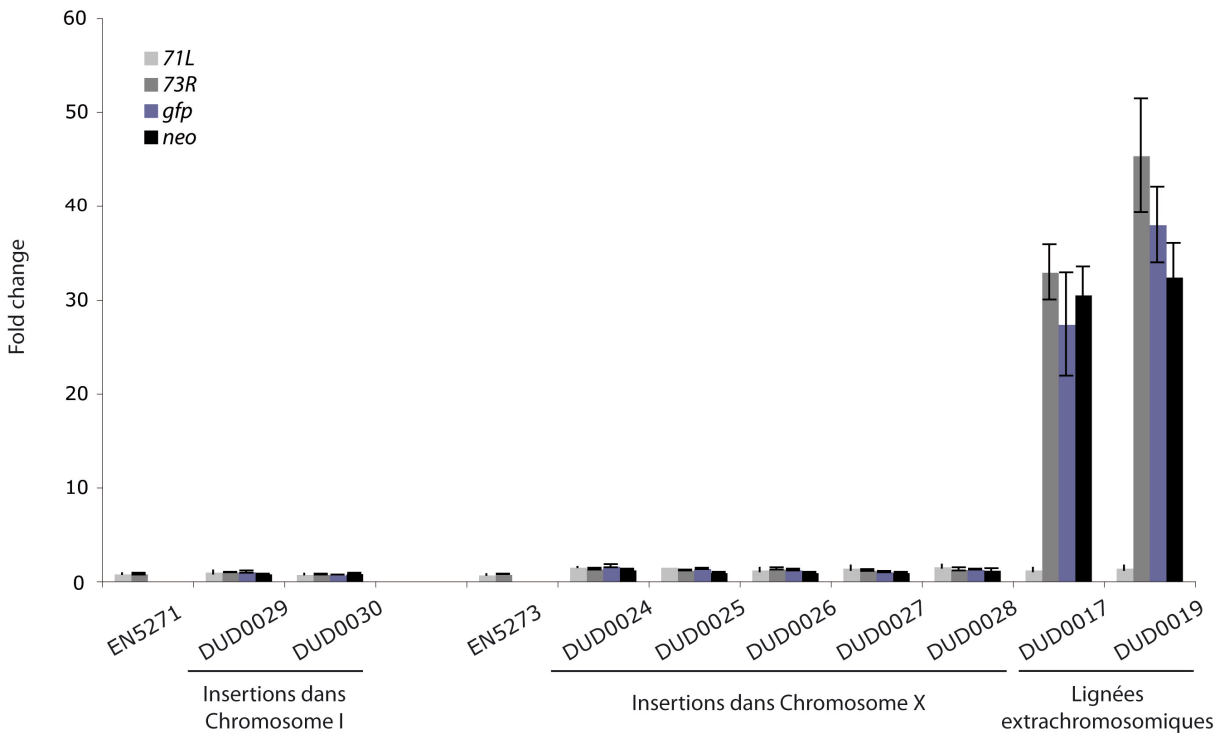


Figure 39 : Caractérisation des événements d'insertion par qPCR. Le *Fold change* est relatif à l'amplification du gène *unc-119*, présent en une seule copie dans le génome de *C. elegans*. Pour toutes les insertions, les gènes $p_{myo-2}::gfp$ et $p_{rps-27}::neo::3'UTR\ unc-54$ sont présents à des niveaux endogènes, comparables à ceux des séquences 71L et 73R.

1.3. Bilan du protocole d'insertion par choc thermique

L'obtention d'insertions de copies uniques du transgène $p_{rps-27}::neo::3'UTR\ unc-54$ par *MosSCI* sur du milieu sélectif montre qu'une seule copie de ce gène est suffisante pour conférer la résistance au G-418 à la concentration critique. Toutes les lignées obtenues par cette méthode présentent le phénotype Neo et aucune d'entre elles n'a de phénotype adverse, suggérant que l'expression ubiquitaire d'une seule copie du gène *neo* protège correctement le ver de l'antibiotique.

Lors du crible des populations amplifiées à partir des vers P_0 soumis au choc thermique, il a été remarqué que les boîtes contenant les événements d'insertion contenaient une large proportion de ces individus, ce qui a facilité l'identification des

populations intégrées. Il est plausible que les vers intégrés aient un avantage sélectif en présence de G-418 par rapport aux vers portant le concatémère extrachromosomique. En effet, un ver hétérozygote pour l'insertion du transgène *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54*, transmet le phénotype Neo à 75 % de sa progéniture. Dans le cas où la lignée extrachromosomique a un taux de transmission inférieur à ce pourcentage, la population intégrée prend facilement le devant sur la population extrachromosomique.

Tableau 7 : Nombre d'insertions obtenues par P₀ soumis au choc thermique.

Insertions au locus <i>kr5271</i>				Insertions au locus <i>kr5273</i>			
Lignée		Nombre de P ₀	Nombre d'insertion	Lignée		Nombre de P ₀	Nombre d'insertion
DUD0021	Expérience 1	20	0	DUD0015	Expérience 1	20	1
	Expérience 2	95	0		Expérience 2	120	0
	Expérience 3	140	0	DUD0016	Expérience 1	20	0
	Expérience 4	220	1		Expérience 2	178	0
DUD0022	Expérience 1	15	0	DUD0017	Expérience 1	24	0
	Expérience 2	20	0		Expérience 2	20	0
	Expérience 3	156	0		Expérience 3	106	2
	Expérience 4	158	1	DUD0018	Expérience 1	43	0
	Expérience 5	600	0		Expérience 2	190	0
DUD0023	Expérience 1	20	0	DUD0019	Expérience 1	20	0
	Expérience 2	40	0		Expérience 2	173	2
	Expérience 3	113	0				
	Expérience 4	250	0				

La fréquence d'obtention des événements d'insertion obtenue lors de ces expériences est très variable (Tableau 7). Pour les insertions dans le chromosome I, à la place de l'allèle *kr5271*, une insertion a été obtenue à partir de 220 P₀ de la lignée DUD0021 et une autre insertion a été obtenue à partir de 158 P₀ de la lignée DUD0022. Pour les insertions au chromosome X, à la place de l'allèle *kr5273*, une insertion a été obtenue à partir de 20 P₀ de la lignée DUD0015, deux insertions ont été obtenues à partir de 106 P₀ de la lignée DUD0017 et deux autres insertions ont été obtenues à partir de 173

P₀ de la lignée DUD0019. Cependant, d'autres P₀ soumis au choc thermique n'ont pas donné d'événement d'insertion (Tableau 7).

2. Insertions suivant le protocole direct

2.1. Adaptation du protocole à la sélection sur la base du phénotype Neo

Pour tester la compatibilité du marqueur génétique *neo* avec le protocole d'insertion *MosSCI* direct, des adultes P₀ de la lignée EN5273 furent injectés avec un mélange contenant le vecteur matrice de réparation *pRG5273Neo pmyo-2::gfp*, le transgène *p_{rgef-1}::DsRed2* comme marqueur négatif et *p_{glh-2}::transposase* comme source de transposase. Dans le cadre de ce protocole, la transposase étant exprimée dans la lignée germinale, l'excision du transposon *Mos1* et la réparation par conversion génique peuvent avoir lieu soit directement dans les gonades du P₀ injecté, soit dans les gonades des F₁ dans le cas où les transgènes sont transmis (Frokjaer-Jensen et al. 2008). Ainsi, il est possible d'identifier des événements d'intégration seulement quelques générations après l'étape d'injection.

Lors d'un premier essai de *MosSCI* suivant le protocole direct, les adultes P₀ injectés furent isolés sur du milieu sélectif dans des boîtes de 6 cm de diamètre. Sept jours après l'injection, toutes les populations amplifiées issues des P₀ ayant donné des transgéniques avaient épuisé la source de nourriture. Comme prévu, toutes les populations contenaient des individus exprimant la GFP dans le pharynx et la DsRed2 dans le système nerveux. Cependant, à ce stade, aucun événement d'insertion ne fut identifié. Il était plausible que des événements d'insertion aient eu lieu mais que le concatémère extrachromosomique n'ait pas encore été perdu. Ainsi, toutes les populations furent transférées sur des nouvelles boîtes sélectives dans le but de les amplifier et de permettre la perte du concatémère extrachromosomique. Cette première expérience fut perturbée par la contamination des milieux sélectif par un microorganisme résistant au G-418 qui semblait affecter la croissance des vers. Malgré cela, un mois après l'injection, deux intégrations putatives furent identifiées parmi des populations affectées par le microbe contaminant (DUD0055, DUD0056).

Lors de ce premier essai, d'autres individus transgéniques furent identifiés qui exprimaient la GFP dans le pharynx et qui n'exprimaient pas la DsRed2 dans le système nerveux. L'expression de la GFP dans le pharynx de ces individus était mosaïque et très intense, suggérant qu'il ne s'agissait pas d'une intégration du transgène dans le génome mais certainement de la formation d'un concatémère extrachromosomique n'ayant pas inclus le transgène *prgef-1::DsRed2*. Ainsi, ces individus ne furent pas pris en compte pour la suite de l'expérience.

Un deuxième essai de *MosSCI* suivant le protocole direct a donc été effectué en incluant cette fois ci *rol-6(su1006)* comme marqueur extrachromosomique complémentaire. Pour amplifier les populations issues des P₀ injectés pendant plusieurs générations, les P₀ furent isolés sur des boîtes sélectives de 9 cm de diamètre, contenant une quantité plus importante de bactéries que les boîtes utilisées lors du premier essai. Quatorze jours après l'étape d'injection trois types de boîtes furent identifiées parmi les P₀ ayant donné des transgéniques. Le premier type de boîtes contenait des populations de seulement une vingtaine d'individus ou moins, tous exprimant la GFP et la DsRed2 comme prévu, s'agissant probablement de F₁ transgéniques n'ayant pas transmis le concatémère extrachromosomique (9 boîtes sur 24). Le deuxième type de boîte contenait une population de taille plus importante avec des individus transgéniques à tous les stades, tous exprimant la GFP et la DsRed2 comme prévu, n'ayant pas encore épuisé la source de nourriture (7 boîtes sur 24). Ces populations contenaient certainement une ou plusieurs lignées stables portant des concatémères extrachromosomiques avec des faibles taux de transmission. Finalement, le troisième type de boîte contenait des populations de taille encore plus importante, ayant épuisé la source de nourriture (8 boîtes sur 24). Parmi celles-ci, deux boîtes contenaient uniquement des populations transgéniques exprimant la GFP et la DsRed2, s'agissant donc certainement de lignées extrachromosomiques stables ayant un fort taux de transmission. Trois autres boîtes contenaient majoritairement des animaux exprimants uniquement la GFP dans le pharynx, correspondant à des événements d'insertion putatifs (DUD0057, DUD0058, DUD0059). Dans ce cas, les individus intégrés avaient certainement un avantage sélectif face aux populations extrachromosomiques, ce qui leur permit de prendre le dessus. Le phénotype Neo de ces vers fut confirmé en les transférant sur du nouveau milieu sélectif. Finalement, trois autres boîtes contenaient des individus au stade *Dauer* n'exprimant aucun marqueur fluorescent, parmi une population majoritairement composée de vers transgéniques exprimant la GFP et la DsRed2. Même si la présence des vers n'exprimant aucune

fluorescence était minoritaire, ils furent transférés sur du milieu sélectif. Ne donnant pas de progéniture viable, ils furent considérés comme étant des faux positifs.

L'utilisation de *rol-6(su1006)* comme marqueur négatif supplémentaire ne s'est pas montrée concluante. En effet, uniquement certains vers transgéniques avaient un phénotype *Rol*, suggérant que la concentration de ce marqueur dans le mélange d'injection n'était pas suffisante pour assurer une pénétrance satisfaisante de ce phénotype.

2.2. Caractérisation des insertions putatives

Les événements d'insertions DUD0055 à DUD0059 furent tout d'abord vérifiés par PCR (Figure 36 B et E). Lors de cette expérience, quatre événements d'insertion putatifs furent confirmés comme étant des insertions du transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* au bon locus. L'insertion putative DUD0056 ne donna pas d'amplification pour le couple d'amorces associé à l'insertion, suggérant que l'insertion du transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* n'avait pas eu lieu, alors qu'une amplification fut obtenue à partir du couple d'amorces associé au plasmide matrice de réparation, suggérant cette fois-ci que ce plasmide était présent dans l'ADN génomique de la lignée. Lors de cette PCR en duplex, la forte amplification de la bande à 1,5 kb, à partir du vecteur matrice de réparation, aurait pu cacher l'amplification à 1,7 kb, à partir du transgène intégré. Cependant, l'absence d'insertion du transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* au bon locus fut confirmée lors d'une PCR simple, contenant uniquement le couple d'amorces associé à l'insertion (Figure 40 A). Par la suite, une PCR permettant de vérifier la présence du transposon *Mos1* à l'allèle *kr5273* a permis de conclure que le transposon n'avait pas été mobilisé dans la lignée DUD0056 (Figure 40 B).

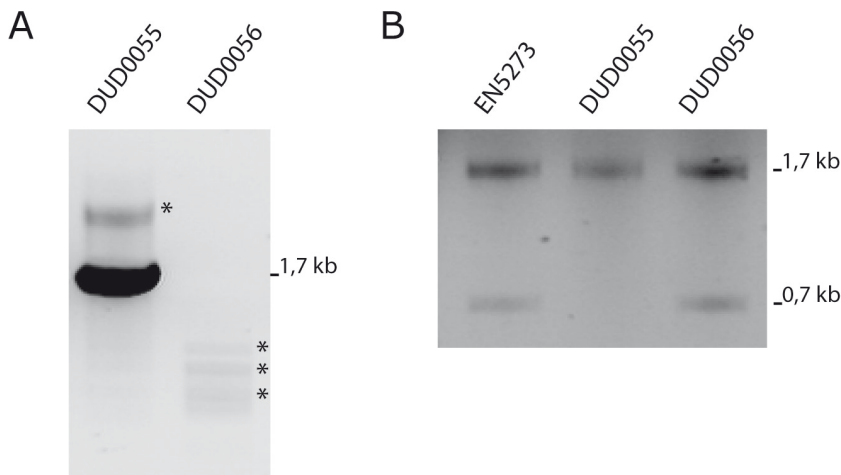


Figure 40 : Caractérisation de l'insertion putative DUD0056.

A PCR avec le couple d'amorces correspondant à l'insertion. Alors que la lignée DUD0055 montre l'insertion du transgène *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* au bon locus, la lignée DUD0056 ne donne aucune amplification. **B** PCR en duplex avec un couple d'amorces amplifiant la sous-unité ribosomale 18S (Fitch et al. 1995) comme contrôle interne à la PCR (bande à 1,7 kb) et un deuxième couple d'amorces correspondant à la présence du transposon *Mos1* à l'allèle *kr5273* (bande à 0,7 kb). Alors que le transposon est absent à

ce locus pour la lignée DUD0055, il est présent pour la lignée DUD0056. * : bandes non spécifiques.

Par la suite, des expériences de qPCR montrèrent que les transgènes *p_{myo-2::gfp}* et *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* étaient présents à des niveaux endogènes pour quatre événements d'insertion (Figure 41). Cependant, pour la lignée DUD0056, le *Fold change* des transgènes est six à sept fois supérieur de celui obtenu pour la séquence 71L, suggérant que cette lignée porte plusieurs copies des transgènes.

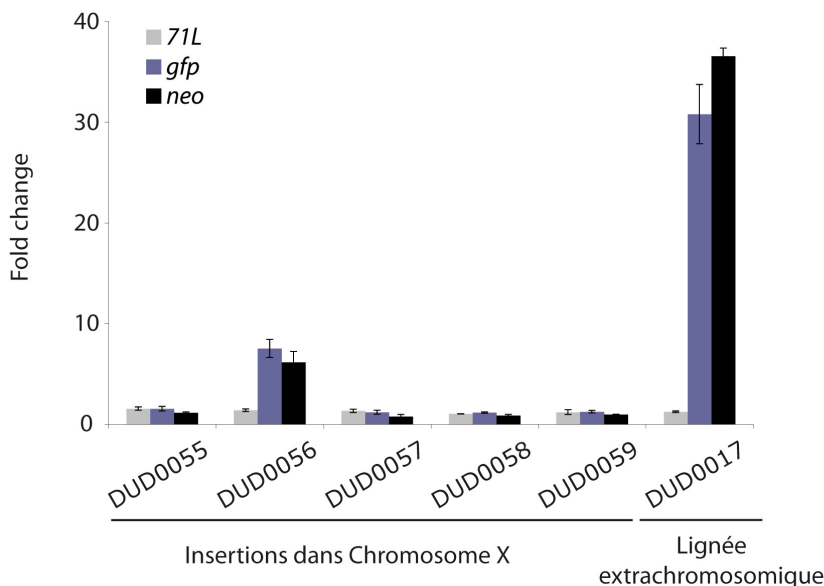


Figure 41 : Caractérisation des événements d'insertion obtenus par *MosSCI* direct par qPCR.

Le *Fold change* est relatif à l'amplification du gène *unc-119*, présent en une seule copie dans le génome de *C. elegans*. Pour les insertions DUD0055 et DUD0057 à DUD0059, les gènes *p_{myo-2::gfp}* et *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}* sont présents à des niveaux endogènes, comparables à ceux de la séquence 71L.

L'ensemble de ces expériences a permis de conclure que quatre des cinq événements d'insertion putatifs étaient des insertions au bon locus et que les transgènes étaient présents en une seule copie. De plus, elles ont montré que l'événement d'insertion putatif DUD0056 portait plusieurs copies des transgènes *p_{myo-2::gfp}* et *p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}*, probablement intégrées aléatoirement dans le génome. Cette observation

est supportée par l'intensité de la fluorescence de la GFP dans le pharynx des vers DUD0056 qui est plus intense que celle des autres lignées intégrées portant une simple copie du transgène *p_{myo-2}::gfp* (Figure 35 B et C).

2.3. Bilan du protocole direct

Ces expériences ont montré que le gène *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54* peut être utilisé comme marqueur de co-insertion et remplacer ainsi le marqueur *unc-119*, dans le cadre du protocole de *MosSCI* direct. Dans ces conditions, la fréquence d'obtention d'insertion d'un transgène en simple copie fut d'un événement d'insertion à partir de 22 P₀ injectés ayant donné des transgéniques, à un événement d'insertion pour 8 P₀ injectés ayant donné des transgéniques. Cette fréquence est du même ordre de grandeur que celle obtenue par C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs (Frokjaer-Jensen et al. 2008).

Même si le système *neo* fut utilisé avec succès dans le cadre du protocole direct, quelques améliorations peuvent être apportées. Il serait souhaitable d'inclure un ou plusieurs autres marqueurs négatifs dans le mélange d'injection pour favoriser l'inclusion d'au moins un de ces marqueurs lors de la formation des concatémères extrachromosomiques ou de l'intégration aléatoire de l'ADN exogène dans le génome. Ceci pourrait limiter l'apparition d'individus exprimant uniquement le transgène d'intérêt et le marqueur de co-insertion mais n'ayant pas intégré le transgène au bon locus, individus qui pourraient être confondus avec des événement d'insertion. La lignée DUD0056, ayant intégré le vecteur matrice de réparation mais pas le marqueur négatif *p_{rgef-1}::DsRed2*, est un exemple. C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs utilisent trois marqueurs négatifs indépendants et font également référence à l'apparition de ces faux positifs lorsqu'un seul marqueur négatif est utilisé (Frokjaer-Jensen et al. 2008; Jorgensen Lab C. *Elegans* Mos1 Techniques 2009).

La présence d'individus n'exprimant aucun marqueur fluorescent (ni celui du gène d'intérêt, ni celui des marqueurs négatifs) doit aussi être traitée avec précaution. Aucun de ces vers isolés sur du nouveau milieu sélectif ne donna de progéniture viable, prouvant qu'il s'agissait de faux positifs et certainement de vers ayant échappé à la sélection sur des boîtes contenant des milliers d'individus transgéniques. Cependant, la présence de ce type d'individus ne doit pas être ignorée pour autant, car suivant l'expérience, le gène d'intérêt peut ne pas être un marqueur fluorescent ou peut s'agir d'un marqueur fluorescent sous un promoteur spécifique à la lignée germinale. Dans ce dernier cas, la

répression du transgène dans la lignée germinale due à la présence de plusieurs copies dans le concatémère extrachromosomique peut durer quelques générations après la perte du concatémère extrachromosomique (Vastenhouw et al. 2006; Alcazar et al. 2008; Frokjaer-Jensen et al. 2008). Ainsi, une fois le gène intégré par *MosSCI*, sa visualisation risque d'être réprimée durant quelques générations, donnant lieu à des individus n'exprimant aucune fluorescence. Ainsi, suivant le gène d'intérêt à intégrer, il peut-être impératif de tester le phénotype Neo des individus n'exprimant aucune fluorescence. Il serait intéressant de répéter les expériences de *MosSCI* combiné au système *neo* en remplaçant le transgène *pmyo-2::gfp* par un transgène sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la lignée germinale.

3. *MosSCI*-biotic : une nouvelle approche de l'insertion par *MosSCI*

Les expériences de *MosSCI* décrites ci-dessus ont montré que le marqueur génétique *neo* est compatible avec la technique de *MosSCI* et remplace efficacement le marqueur de co-insertion *unc-119* dans le protocole long et le protocole direct. L'utilisation du système *neo* comme marqueur de co-insertion s'est avérée particulièrement intéressante, puisqu'elle présente plusieurs avantages par rapport aux protocoles développés sur la base du marqueur *unc-119*.

D'une part, l'utilisation du système *neo* comme marqueur de co-insertion signifie que toute lignée de la banque NemaGENETAG portant une insertion intergénique unique du transposon *Mos1* (Bazopoulou et Tavernarakis 2009), peut être utilisée pour des expériences de *MosSCI* sans avoir besoin d'introduire l'allèle *unc-119(ed3)* dans le génome. Le croisement entre une lignée *Mos1* et une lignée *unc-119(ed3)* peut s'avérer difficile à cause du phénotype Unc. De plus, la présence du transposon doit être suivie par PCR. Dans le cas où l'insertion *Mos1* est trop proche du locus du gène *unc-119*, le croisement peut ne pas être possible. En d'autres mots, cette étape peut s'avérer longue et contraignante.

D'autre part, l'utilisation de lignées receveuses *Mos1* ayant un phénotype sauvage facilite l'amplification de celles-ci et facilite aussi l'étape d'injection. En effet, les vers portant l'allèle *unc-119(ed3)* sont paralysés, ce qui oblige la distribution manuelle de larves

L1-L2 sur le tapis bactérien afin d'assurer la croissance des vers en présence de nourriture, sans qu'ils rentrent en compétition avec des vers proches (Frokjaer-Jensen et al. 2008; Jorgensen Lab *C. Elegans Mos1 Techniques* 2009). La croissance à 15°C et en présence des bactéries *E. coli* HB101 est aussi conseillée, mais cela implique un rythme de croissance plus lent. Finalement, les gonades des vers *Unc* sont plus petites et donc plus difficiles à injecter.

Finalement, toutes les étapes du protocole de choc thermique semblent être facilitées par l'utilisation du marqueur génétique *neo* à la place de *unc-119* (Figure 42). Premièrement, la sélection et la maintenance des lignées extrachromosomiques stables a lieu sur du milieu sélectif et bénéficient donc de tous les avantages du marqueur génétique *neo*. Deuxièmement, les populations transgéniques sont automatiquement enrichies sur du milieu sélectif et peuvent être directement soumises au choc thermique en assurant le traitement d'un grand nombre de vers. Troisièmement, l'identification des événements d'insertion se fait parmi une population présentant uniquement des vers portant un concatémère extrachromosomique et en l'absence d'individus sauvages. Dans ces conditions, les événements d'insertion semblent prendre rapidement le dessus sur les populations extrachromosomiques. Finalement, l'identification des événements d'insertion portant le transgène *neo* ne nécessite pas l'utilisation du marqueur négatif *pmyo-3::twk-18 (cn110)*, utilisé lors du protocole de choc thermique (Frokjaer-Jensen et al. 2008). Ce marqueur est utilisé pour assurer l'identification des événements d'insertion à 25°C, car les vers portant ce transgène sont paralysés et ne pondent pas d'oeufs à cette température, alors que les vers ayant intégré le marqueur de co-insertion *unc-119* et ayant perdu le concatémère extrachromosomique ont un phénotype de locomotion sauvage. Ainsi, à 25°C les événements d'insertion ont un avantage sélectif par rapport aux vers portant le transgène *pmyo-3::twk-18(cn110)* qui ont une croissance limitée. Mais l'utilisation de ce marqueur négatif est plutôt contraignante, car elle implique la sélection des lignées extrachromosomiques utilisées pour le choc thermique en fonction de leur degré de paralysie à 25°C (certaines lignées mosaïques présentent pas ce phénotype) (Frokjaer-Jensen et al. 2008). De plus, ces lignées impliquent l'utilisation de bactéries RNAi contre le transgène *pmyo-3::twk-18(cn110)* afin d'assurer leur amplification rapide à température ambiante. En contrepartie, le marqueur de co-insertion *neo* donne un avantage sélectif au vers portant l'insertion sans que les lignées extrachromosomiques nécessitent de traitement particulier.

Une nouvelle approche de l'insertion par *MosSCI* est proposée, basée sur l'utilisation du système *neo* comme marqueur de co-insertion. Cette approche est appelée *MosSCI*-biotic (Figure 42).

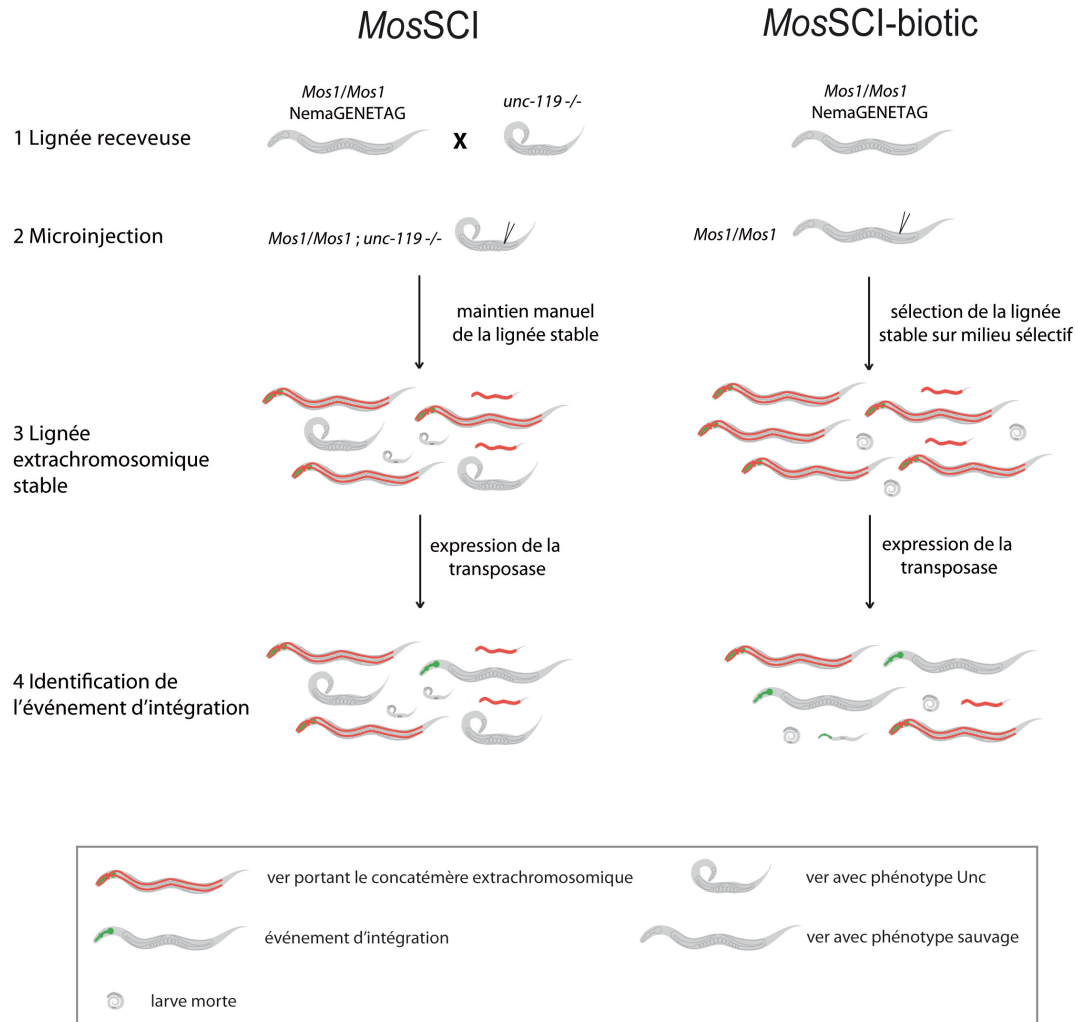


Figure 42 : Comparaison du protocole *MosSCI* au protocole *MosSCI*-biotic. (1-4) Les principales étapes des deux protocoles sont schématisées. À gauche, le protocole *MosSCI* utilise *unc-119* comme marqueur de co-insertion. À droite, le protocole *MosSCI*-biotic utilise le système *neo* comme marqueur de co-insertion.

Discussion

1. Le système *neo*, un nouveau marqueur génétique

Les résultats obtenus lors des travaux de thèse ont permis de développer et de valider l'utilisation du gène *ρrps-27::neo::3'UTR unc-54* comme marqueur génétique pour la transgénèse des nématodes. Ce marqueur remplit presque la totalité des critères que nous avons définis pour un bon marqueur de transgénèse. Premièrement, l'identification des individus transgéniques se fait facilement à la loupe et ne nécessite pas l'utilisation de loupe à fluorescence. L'identification se fait par rapport à la taille des individus sur du milieu sélectif, à partir du stade larvaire L2-L3, et à la capacité des individus à procréer sur ce milieu. Deuxièmement, le gène fonctionne en tant que marqueur indépendamment du nombre de copies. Il confère le phénotype Neo à partir de centaines de copies contenues dans un concatémère extrachromosomique répétitif, à partir d'un faible nombre de copies contenues dans un concatémère extrachromosomique complexe et également à partir d'une seule copie du gène intégrée dans le génome. Troisièmement, les lignées correctement protégées par le transgène ne présentent pas de phénotype adverse et contrairement à d'autres marqueurs visuels, le phénotype Neo ne confère pas de phénotype de locomotion anormal. Quatrièmement, ce gène confère un avantage sélectif aux vers transgéniques par rapport aux vers sauvages, en présence de G-418 et à toutes les températures permissives. Ceci signifie qu'il permet de diminuer le temps de manipulation de l'expérimentateur en limitant la maintenance manuelle des lignées extrachromosomiques. De plus, la sélection sur du milieu sélectif permet d'obtenir des populations contenant en moyenne plus de 93 % d'individus transgéniques du stade L2 au stade adulte, ce qui permet aussi d'obtenir des grandes quantités de vers transgéniques sans avoir besoin d'enrichir les populations manuellement. En d'autres mots, les lignées extrachromosomiques Neo présentent tous les avantages des lignées intégrées, mais sont obtenues facilement et peu de temps après l'injection. De plus, le gène *ρrps-27::neo::3'UTR unc-54* ne nécessite aucun contexte génétique particulier pour conférer la résistance à l'antibiotique. Il est ainsi compatible avec des lignées mutantes ou des lignées transgéniques ayant été construites avec d'autres marqueurs génétiques. Finalement, le gène *ρrps-27::neo::3'UTR unc-54* a été utilisé comme marqueur génétique pour la transgénèse de *C. briggsae*, suggérant qu'il pourrait être adapté à d'autres nématodes de la famille *Caenorhabditis*. En conclusion, le système *neo* s'est montré être

un marqueur génétique efficace présentant de nombreux avantages par rapport aux marqueurs génétiques déjà existants.

Certains aspects du système *neo* peuvent cependant être considérés comme des inconvénients. Premièrement, il n'est pas possible de différencier les L1 transgéniques des L1 sauvages, sauf après quelques jours de culture et l'observation de leur croissance. Le système *neo* n'est donc pas adapté aux études portées sur les larves L1. Deuxièmement, l'utilisation de l'antibiotique G-418 dans le milieu pourrait interférer avec la réalisation de certaines expériences, même si des individus préalablement sélectionnés sur milieu sélectif peuvent être transférés sur du milieu sans antibiotique le temps de l'expérience. Troisièmement, le système *neo* pourrait ne pas être compatible avec des lignées insensibles au G-418. En effet, il se pourrait qu'une mutation particulière rende le ver insensible à cette drogue, mais il s'agirait là d'un cas bien particulier. Finalement, l'utilisation de l'antibiotique G-418 représente un coût supplémentaire pour la fabrication des milieux de culture. Toutefois, les inconvénients liés à l'utilisation dans le cadre d'expériences particulières restent ponctuels et sont largement contrebalancés par les nombreux avantages décrit ci-dessus.

2. Autres marqueurs génétiques basés sur la résistance aux antibiotiques

En même temps que mes travaux de thèse, J. Semple et B. Lehner développèrent un marqueur génétique de transgénèse pour nématodes basé sur la résistance à l'antibiotique puromycine (Semple et al. 2010). Ils montrèrent tout d'abord que *C. elegans* et *C. briggsae* sont sensibles à cette drogue, puis, ils construisirent une cassette pour l'expression chez les nématodes du gène de résistance *puro*, *p_{rpl-28}::puro::3'UTR let-858*. Comme pour le système *neo*, cette cassette est constituée par le gène *puro* sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, le promoteur du gène ribosomal *rpl-28*, et d'une région 3'UTR permissive dans tous les tissus de l'organisme du ver. Ils montrèrent finalement que des vers *C. elegans* et *C. briggsae* portant ce transgène sont capables de survivre à des concentrations de puromycine létales pour les vers sauvages. Le système *puro* fonctionne aussi bien en une copie qu'en multiples copies, et présente tous les avantages du système *neo* présentés dans le paragraphe précédent. De plus, ces auteurs

développèrent des méthodes de sélection des individus dans du milieu liquide, méthodes facilement transférables à la sélection par le système *neo* et qui augmentent les possibilités d'applications des marqueurs de sélection aux antibiotiques.

Il est important de signaler que la méthodologie utilisée pour le développement du système *puro* est très proche de celle utilisée dans le cadre des travaux de thèse pour le développement du système *neo*. Elle consiste à : (i) tester la sensibilité des vers sauvages à la drogue, (ii) construire une cassette d'expression pour nématodes qui assure l'expression du gène de résistance de manière ubiquitaire et (iii) construire des lignées transgéniques pour établir un protocole de sélection. De manière générale cette méthodologie pourrait être appliquée au développement d'autres systèmes de sélection basés sur la résistance à des drogues (Chamberlin 2010). En effet, suivant ce schéma, une autre cassette de résistance a été construite, *p_{rpl-28}::zeocin::3'UTR let-858*, qui conférerait la résistance à la phléomycine aux nématodes sauvages (communication personnelle de J. Semple et B. Lehner).

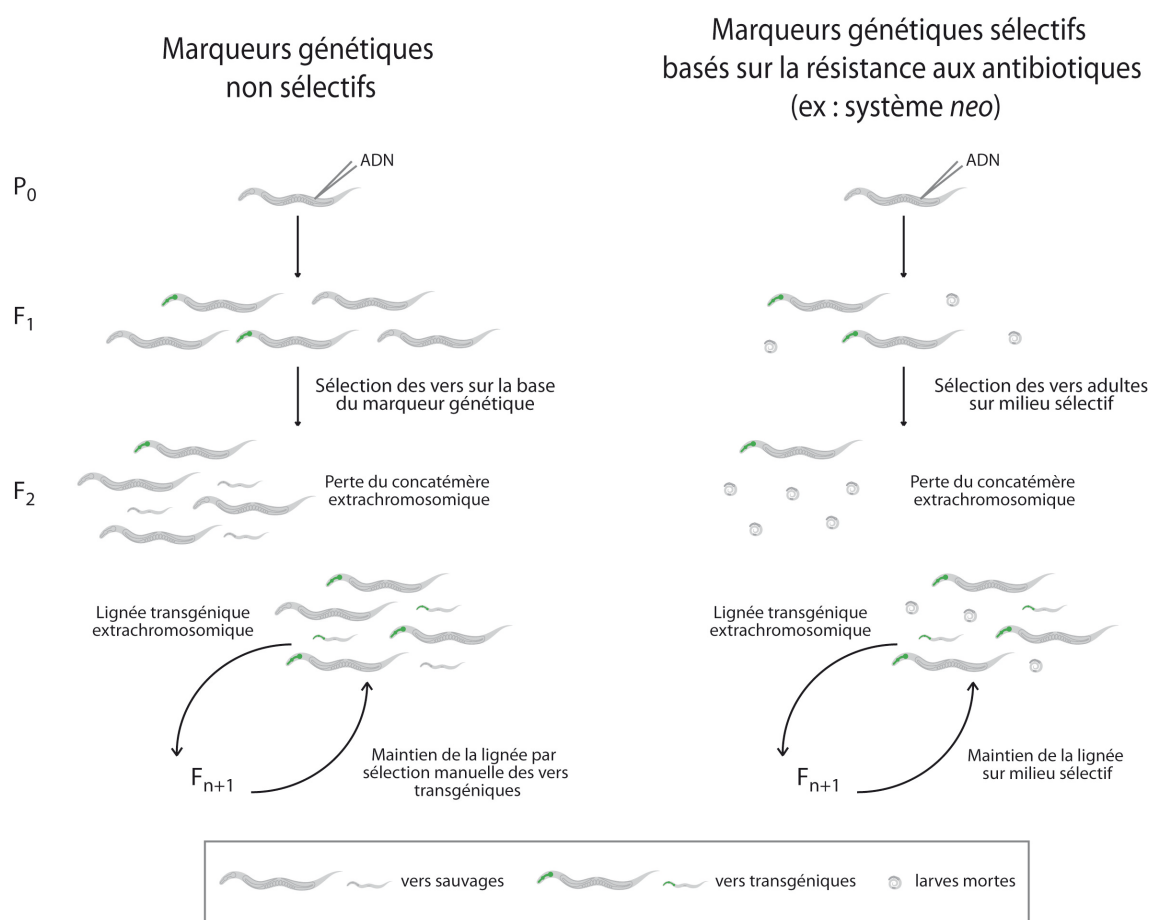


Figure 43 : Marqueurs génétiques non sélectifs vs. marqueurs génétiques sélectifs basés sur la résistance aux antibiotiques. Schéma de la sélection et la maintenance des vers transgéniques sur la base d'un marqueur génétique non sélectif (à gauche) et sur la base du système *neo* (à droite).

Les systèmes de sélection basés sur la résistance à des antibiotiques constituent une nouvelle catégorie de marqueurs génétiques pour la transgénèse de nématodes qui vient compléter la boîte à outils du ver (Figure 43). Ils constituent ainsi une alternative aux marqueurs génétiques déjà existants. De plus, la possibilité de combiner ces différents marqueurs entre eux ouvre des nouvelles perspectives pour la manipulation des lignées transgéniques, comme la sélection de vers avec une double résistance suite à un croisement entre un hermaphrodite Neo et un mâle Puro, par exemple.

3. Application à la transgénèse d'autres nématodes

Les systèmes *neo* et *puro* présentent un intérêt particulier dans le cadre de la transgénèse d'autres nématodes pour lesquels les outils de transgénèse sont rares. Ces systèmes ne nécessitent pas de contexte génétique particulier et pourraient donc être utilisés chez différentes espèces de nématodes pour lesquelles des marqueurs génétiques efficaces n'ont pas encore été développés (voir Introduction Partie IV). Ceci serait possible à condition que les nématodes sauvages soient sensibles aux antibiotiques à spectre large et que les séquences régulatrices de *C. elegans* utilisées pour l'expression des gènes de résistances soient reconnues et correctement traitées par l'organisme hôte.

Comme le système *neo*, le système *puro* fonctionne aussi comme marqueur génétique pour la transgénèse de *C. briggsae* (Semple et al. 2010), ce qui suggère que les séquences régulatrices endogènes de *C. elegans* utilisées pour l'expression de ces gènes de résistance fonctionnent aussi chez cette espèce. Il est donc probable que ces gènes s'expriment aussi chez des espèces de *Caenorhabditis* phylogénétiquement moins distantes comme *C. remanei* ou *C. brenneri* (Kiontke et Fitch 2005). Il devrait donc être possible d'utiliser ces marqueurs de sélection chez ces espèces de nématodes.

Pourtant, rien n'est certain en ce qui concerne l'expression des gènes de résistance chez des nématodes ayant divergé plus tôt de *C. elegans* que *C. briggsae*. Toutefois, les gènes de résistance sont sous le contrôle de promoteurs de gènes codant pour des protéines ribosomales, hautement conservées entre les espèces de nématodes et même entre les nématodes et les vertébrés (les analyses de comparaison de séquences entre la protéine RPS-27 de *C. elegans* et ses orthologues chez d'autres espèces de nématodes et *Homo sapiens* donnent des homologies de séquence supérieures à 98,8 % ; source

WormBase). Si une forte conservation de la séquence de ces protéines ne garantit pas pour autant une forte conservation des séquences régulatrices associées, il a déjà été montré que des promoteurs de *C. elegans* de protéines hautement conservées s'expriment chez des nématodes aussi éloignés de *C. elegans* que *H. bacteriophora* (promoteur du gène *hsp-16*), *P. trichosuri* (promoteur du gène *let-858*) ou encore *L. sigmodontis* (promoteur du gène *act-1*) (Hashmi et al. 1995; Jackstadt et al. 1999; Grant et al. 2006). De la même manière, des promoteurs de gènes clonés à partir d'espèces de nématodes tel *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* ou encore *Globodera rostochiensis* ont été utilisés avec succès pour exprimer la GFP dans *C. elegans* (Qin et al. 1998; Britton et al. 1999) (voir Figure 16, Partie IV, Introduction pour visualiser ces familles de nématodes dans l'arbre phylogénétique). Les résultats de ces études suggèrent qu'il serait possible que les promoteurs des gènes *C.e rps-27* et *C.e rpl-28* puissent fonctionner chez des espèces de nématodes plus éloignées. De même, *C.e 3'UTR unc-54* a déjà été utilisée chez *L. sigmodontis* et *P. trichosuri*, suggérant par la même occasion que cette région régulatrice pourrait être utilisée chez d'autres espèces. Finalement, les gènes de résistance *neo* et *puro* n'ont pas besoin d'introns pour s'exprimer correctement chez *C. elegans* et *C. briggsae* (Semple et al. 2010).

Il serait donc fortement intéressant de tester l'expression des gènes de résistance $p_{rps-27}::neo::3'UTR\ unc-54$ et $p_{rpl-28}::puro::3'UTR\ let-858$ dans d'autres espèces de nématodes afin de pouvoir envisager leur utilisation en tant que marqueurs de transgénèse. Dans le cas où les séquences régulatrices ne fonctionneraient pas, les cassettes d'expression des gènes de résistance pourraient être facilement adaptées en utilisant des séquences régulatrices endogènes de l'espèce (à déterminer si elles ne sont pas disponibles), ce qui assurerait l'expression correcte du gène de résistance (Li et al. 2006; Schlager et al. 2009). À nouveau, l'utilisation de séquences régulatrices de gènes hautement conservés pourraient permettre d'étendre l'usage de ces nouvelles cassettes de résistance à d'autres espèces proches de la même famille.

Finalement, la méthodologie utilisée pour le développement des systèmes *neo* et *puro* pourrait être utilisée pour développer des systèmes de sélection propres à d'autres nématodes (voire d'autres organismes), avec éventuellement d'autres types de drogues pour lesquelles des gènes de résistance associés ont été identifiés.

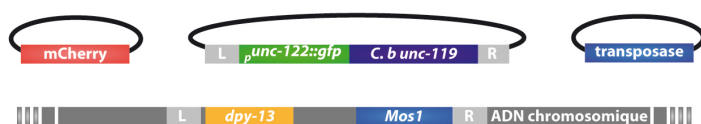
4. Application à la transgénèse par bombardement

L'adaptation du système *neo* à la transgénèse par bombardement semble être compromise par la difficulté à éliminer des dizaines de milliers de vers sauvages par l'action du G-418. Dans l'absolu, il devrait être possible d'éliminer n'importe quelle quantité de vers en augmentant les doses d'antibiotique administrées, mais dans le cas du bombardement cela augmenterait considérablement le coût de l'expérience. Face au marqueur *unc-119*, très efficace et qui ne représente aucun coût supplémentaire, le système *neo* ne représente pas d'avantages significatifs qui justifieraient son utilisation pour la transgénèse par bombardement de *C. elegans* ou *C. briggsae*. Cependant, un protocole de bombardement basé sur la sélection des vers résistants à l'antibiotique présente un intérêt particulier pour les espèces de nématodes pour lesquelles un marqueur du type *unc-119* n'a pas encore été développé.

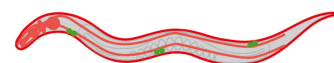
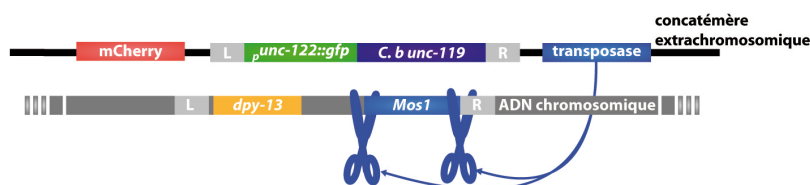
J. Semple et B. Lehner développèrent un nouveau protocole de bombardement basé sur la double sélection en présence de G-418 et puromycine (communication personnelle de J. Semple et B. Lehner). Le vecteur de bombardement contient les cassettes de résistance *prpl-28::neo::3'UTR let-858* et *prpl-28::puro::3'UTR let-858* et la sélection post-bombardement a lieu dans du milieu liquide en présence de G-418 et puromycine. Le milieu de sélection contient aussi du détergent Triton X-100 pour augmenter la sensibilité des nématodes aux antibiotiques (Semple et al. 2010). Ce protocole ne semble pas pouvoir éliminer la totalité des vers sauvages, mais malgré la présence de faux positifs, les populations transgéniques enrichies sont identifiées grâce à l'utilisation d'un marqueur génétique fluorescent supplémentaire. Suivant ce protocole, J. Semple et B. Lehner accomplirent la transgénèse par bombardement de *C. elegans*, *C. briggsae* et *C. remanei* en utilisant la sélection par antibiotique. Ces résultats sont prometteurs et permettent d'envisager le développement de protocoles de bombardement pour d'autres espèces de nématodes plus éloignées.

5. Application du système *neo* aux techniques basées sur l'excision du transposon *Mos1*

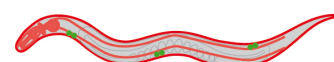
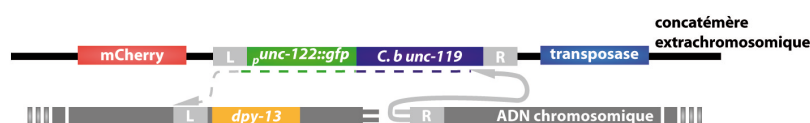
L'utilisation du système *neo* comme marqueur de co-insertion dans le cadre de *MosSCI* a mis en évidence les avantages que ce système présente par rapport au marqueur de co-insertion *unc-119* (présentés dans la Partie III, Résultats). Mais ces avantages deviennent encore plus intéressants dans le contexte de la technique de délétion de régions génomiques par *MosDEL* (Frøkjær-Jensen et al. 2010). Très brièvement, cette technique consiste à créer une délétion autour d'une insertion *Mos1* dans le génome, en se servant d'un vecteur matrice de réparation qui contient des régions homologues L et R flanquant cette fois-ci la région à supprimer (Figure 44). Dans le vecteur matrice de réparation, les régions L et R encadrent un marqueur d'insertion qui permet de sélectionner les individus ayant remplacé la région génomique à supprimer. C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs utilisèrent encore une fois le marqueur *unc-119* comme marqueur d'insertion. Mais celui-ci présente des limites particulières dans le cadre de la technique *MosDEL*. D'une part, l'utilisation du marqueur *unc-119* nécessite l'introduction de l'allèle *unc-119(ed3)* dans le génome. Dans le cas où l'insertion *Mos1* d'intérêt est trop proche du locus du gène *unc-119*, les croisements peuvent être difficiles, voire impossibles. D'autre part, il peut arriver que la délétion d'un gène particulier ait comme résultat un phénotype *Unc*. Dans ce cas, la distinction entre les individus de la lignée receveuse *Unc* et les individus *Unc* résultants de la délétion par *MosDEL* peut être difficile. L'utilisation du système *neo* comme marqueur d'insertion permettrait dans ces cas d'utiliser directement la lignée receveuse portant l'insertion *Mos1* et faciliterait la visualisation des individus portant la délétion sur la base du phénotype généré. Des expériences de *MosDEL* avec le transgène *p_{rps-27}::neo::3'UTR unc-54* comme marqueur d'insertion sont en cours de réalisation par C. Frøkjær-Jensen (communication personnelle de C. Frøkjær-Jensen). Le système *neo* se présente donc comme un marqueur de co-insertion aussi puissant que *unc-119*, qui pourrait le remplacer dans de nombreuses situations où ce dernier ne serait pas adapté.

1 Microinjection dans la lignée receveuse *Mos1* ; *unc-119(ed3)*

Phénotype

2 Expression de la transposase et excision de *Mos1*

3 Réparation de la coupure double brin de l'ADN par conversion génique avec le transgène



4 Perte du concatémère extrachromosomique et identification de l'événement de délétion



Figure 44 : Délétion du gène *dpy-13* par *MosDEL*. Exemple de délétion réalisée lors des travaux de C. Frøkjær-Jensen et collaborateurs (Frøkjær-Jensen et al. 2010). Ici, délétion du gène *dpy-13* qui confère le phénotype Dpy. Le vecteur matrice de réparation contient une région R, homologue à la région à droite de l'insertion de *Mos1* dans le génome, et une région L homologue à la région à gauche de la région à supprimer. Le marqueur d'insertion utilisé est le gène *unc-119* de *C. briggsae* qui sauve le phénotype Unc des vers *unc-119(ed3)*. Le transgène $p_{unc-122}::gfp$ permet de suivre la délétion, mais il n'est pas indispensable à l'expérience. Les marqueurs négatifs utilisés sont $p_{myo-2}::mCherry$ (expression de la mCherry dans le pharynx), $p_{myo-3}::mCherry$ (expression de la mCherry dans les muscles) et $p_{rab-3}::mCherry$ (expression de la mCherry dans les neurones). À droite, schéma du profil d'expression des vers à chaque étape du protocole d'insertion. La délétion du gène *dpy-13* confère le phénotype Dpy.

Finalement, il a été montré que le système *puro* fonctionne aussi en simple copie (Semple et al. 2010). Le marqueur *puro* n'a pas encore été utilisé comme marqueur de co-insertion, mais il devrait apporter les mêmes avantages que le système *neo* aux techniques de *MosSCI* et *MosDEL*. La disponibilité de différents marqueurs de co-insertions devrait accroître encore les possibilités d'expériences à partir des vers portant des insertions ou des délétions.

6. Application à la culture *in vitro* de cellules de *C. elegans*

Malgré les nombreux avantages que présente *C. elegans* comme modèle biologique, certaines caractéristiques du ver, comme la petite taille des cellules

somatiques ou la présence d'une cuticule qui maintient sous pression les organes du ver, représentent des difficultés pour les expériences qui nécessitent l'accès direct aux cellules étudiées. Dans ce contexte, des techniques de culture cellulaire à partir de cellules embryonnaires de *C. elegans* ont été développées (Buechner et al. 1999; Christensen et al. 2002).

Les cultures de cellules de nématodes sont réalisées à partir d'oeufs isolés d'adultes par un traitement à l'hypochlorite de sodium. Les oeufs sont traités avec de la chitinase, une enzyme capable de digérer leur cuticule résistante, puis les cellules des embryons sont dissociées et cultivées sur un substrat adhérent. Les cellules embryonnaires en culture se différencient jusqu'au niveau de différenciation équivalent à celui du stade larvaire L1 (Christensen et al. 2002). Ainsi, les cultures cellulaires présentent des cellules musculaires, des neurones et cellules de type gliale, des cellules épithéliales de l'intestin et du canal sécrétoire (Buechner et al. 1999; Christensen et al. 2002; Bacaj et al. 2008).

Deux des principales applications des cultures cellulaires de *C. elegans* sont l'étude des canaux ioniques par des analyses pharmacologiques, électrophysiologiques et d'imagerie calcique de neurones et cellules musculaires en culture (difficilement accessibles sous la cuticule pressurisée de l'animal vivant) (Suzuki et al. 2003; Bianchi et al. 2004; Park et al. 2005; Frokjaer-Jensen et al. 2006) et l'étude du profil d'expression des gènes (transcriptome) d'un type cellulaire particulier (Fox et al. 2005; Fox et al. 2007; Bacaj et al. 2008). Cette deuxième application nécessite l'obtention de quantités importantes de cellules du type cellulaire d'intérêt. S'il n'est pas encore possible de cultiver un type cellulaire unique suivant des techniques de culture cellulaire classiques, il est cependant possible d'enrichir une population cellulaire en utilisant le système de *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) (Christensen et al. 2002). Pour cela, la culture cellulaire est établie à partir d'une lignée transgénique de *C. elegans* qui exprime une protéine fluorescente sous le contrôle d'un promoteur spécifique du type cellulaire d'intérêt. Ainsi, les cultures cellulaires peuvent être triées par le FACS qui sélectionne spécifiquement les cellules d'intérêt sur la base de leur profil d'expression de fluorescence.

Dans ce contexte, il serait intéressant de tester la sélection d'un type cellulaire unique sur la base de la résistance à un antibiotique. Les systèmes de résistance aux antibiotiques sont utilisés en routine pour la sélection de cellules eucaryotes recombinantes portant le transgène d'intérêt (voir Partie V, Introduction). Ici, ce système

permettrait de sélectionner un type cellulaire d'intérêt portant le gène de résistance parmi une population de cellules sauvages. Si une telle sélection est possible, elle devrait permettre d'obtenir des cultures d'un type cellulaire unique sans avoir besoin d'utiliser le FACS.

Afin de tester cette hypothèse et d'évaluer la faisabilité d'une telle méthode, nous avons établi une collaboration avec K. Kobayashi et I. Mori (Nagoya University, Japan). Le groupe de I. Mori s'intéresse à la thermotaxie et aux mécanismes de mémoire de température chez *C. elegans*. Dans ce contexte, ils utilisent des cultures cellulaires de *C. elegans* pour étudier les effets des changements de température sur les neurones thermosensoriels AFD et les interneurons AIY, de manière spécifique, en excluant les effets des connections synaptiques et des molécules sécrétées par d'autres cellules environnantes (communication personnelle de K. Kobayashi et I. Mori). Afin de combiner la culture de neurones AFD et AIY avec la sélection de cellules sur la base de la résistance à un antibiotique, deux types de lignées extrachromosomiques de *C. elegans* ont été construites. La première porte le transgène $p_{gcy-8}::puro::TagRFP::3'UTR\ unc-54$ qui confère l'expression de la protéine fusion Puro::TagRFP dans les neurones sensoriels AFD (Figure 45 A). La deuxième porte le transgène $p_{ttx-3}::puro::gfp::3'UTR\ unc-54$ qui confère l'expression de la protéine fusion Puro::GFP dans les interneurons AIY (Figure 45 B). La protéine fusion Puro::GFP confère la résistance à *C. elegans* à la puromycine (communication personnelle de J. Semple et B. Lehner); ainsi, les neurones thermosensoriels AFD et les interneurons AIY des lignées décrites ci-dessus portent le gène de résistance à la puromycine. Des expériences de mise au point de la sélection des neurones AFD ou AIY en culture sur la base de la résistance à la puromycine sont en cours de réalisation par nos collaborateurs.

Si la mise en place d'un tel protocole de sélection était possible, les expériences de culture cellulaire de *C. elegans* seraient fortement simplifiées par l'usage des méthodes classiques de sélection des cellules recombinantes.

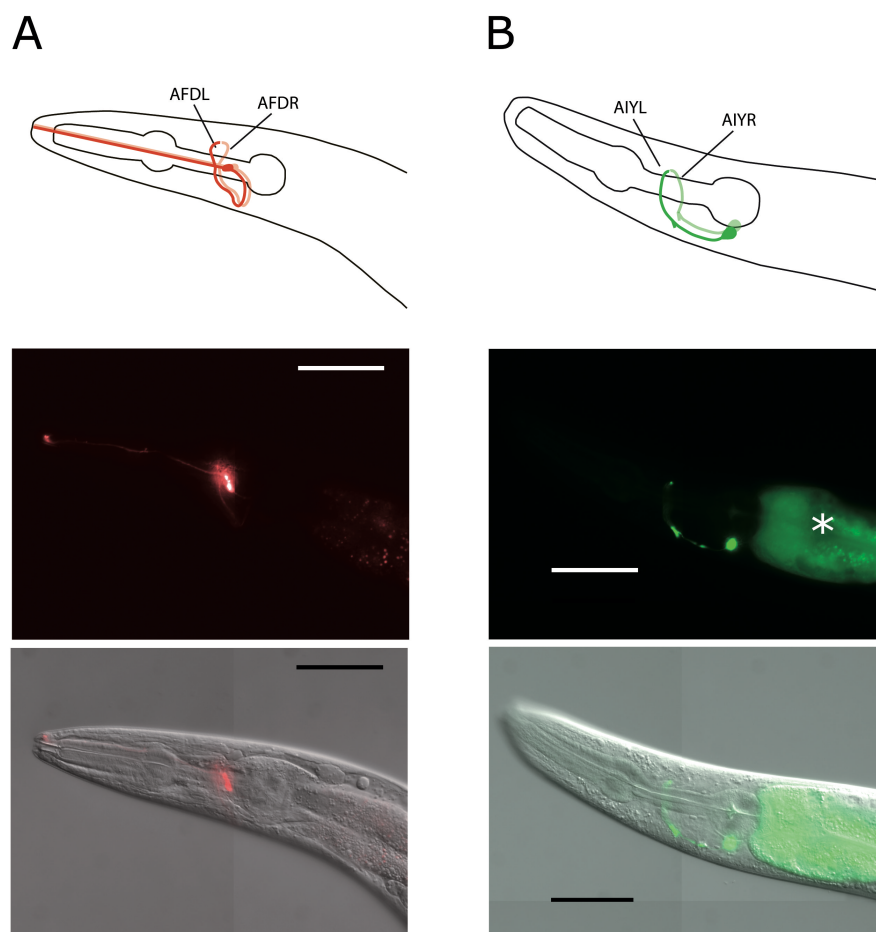


Figure 45 : Lignées de *C. elegans* portant les transgènes $\rho_{gcy-8}::puro::Tagrfp::3'UTR\ unc-54$ (A) et $\rho_{ttx-3}::puro::gfp::3'UTR\ unc-54$ (B). En haut, schéma représentant la position des neurones AFD (A) et AIY (B) gauche (L) et droite (R). Au centre, images de fluorescence. L'astérisque signale l'autofluorescence des cellules de l'intestin. En bas, superposition de l'image de fluorescence et l'image Nomarski. Pour chaque image et schéma, la partie dorsale des vers est en haut, la partie antérieure à gauche. Barre d'échelle : 50 μm .

7. Conclusion

Le marqueur de sélection à base de la résistance au G-418 développé dans le cadre de mes travaux de thèse s'est avéré être un système de sélection des vers transgéniques efficace et flexible. Avec le système de sélection *puro*, ils représentent une nouvelle catégorie de marqueurs génétiques pour la transgénèse de *C. elegans* qui s'ajoute à la boîte à outil du ver. Ces systèmes, qui ont leurs propres avantages et inconvénients, se présentent comme une alternative aux autres catégories de marqueurs génétiques classiquement utilisés.

Depuis la publication des travaux sur le système *neo*, celui-ci a connu un grand succès au sein de la communauté *C. elegans*. Les vecteurs *neo* ont été distribués dans

une vingtaine de laboratoires travaillant sur le ver et depuis qu'ils sont accessibles sur l'organisme de distribution de plasmides Addgene (www.addgene.org), vingt autres laboratoires se les ont procurés. Au total, plus de 40 laboratoires dans le monde ont souhaité tester le système. Aujourd'hui, nous avons la confirmation que certains de ces laboratoires l'ont adopté, en particulier dans le cadre d'expériences qui n'étaient pas facilement réalisables auparavant avec les marqueurs génétiques classiquement utilisés, comme par exemple les expériences de locomotion suite au sauvetage d'un phénotype par un gène candidat (communication personnelle de F. Calahorro et M. R. Rubio).

La distribution des vecteurs *neo* au sein de la communauté *C. elegans* permet aussi aux autres chercheurs d'identifier les points faibles de la technique et d'apporter des améliorations au système. Ainsi, deux nouvelles méthodes de préparation des boîtes sélectives ont été proposées depuis. La première consiste à ajouter une solution d'antibiotique sur des boîtes NGM coulées et inoculées normalement avec *E. coli*, de manière à ce que l'antibiotique soit absorbé par le milieu NGM (communication personnelle de Z. Pincus). L'autre méthode consiste à ajouter une solution d'antibiotique directement sur les F₁ adultes présents sur une boîte NGM inoculée suite à l'injection d'un P₀, ce qui permet la sélection des vers transgéniques à partir de la génération F₂ (communication personnelle de C. Frøkjær-Jensen). Ces deux méthodes, qui se sont montrées jusqu'à présent très efficaces, facilitent grandement la fabrication de boîtes sélectives et permettent l'utilisation de milieu sélectif frais à tout moment. Ce type d'amélioration va certainement permettre d'adapter le système *neo* aux besoins précis de la communauté *C. elegans*.

Finalement, il est important de signaler que la naissance de l'idée des systèmes de sélection à base d'antibiotiques dans différents laboratoires de la communauté *C. elegans* et le développement en parallèle des marqueurs *puro* et *neo* témoignent du besoin que la communauté avait de disposer de ce type de système. Le développement des systèmes *puro* et *neo* n'est certainement que le début de la construction d'une nouvelle catégorie de marqueurs génétiques basés sur la résistance aux drogues.

Bibliographie

A

- Albertson, D. G., A. M. Rose, et al. (1997). Chromosome organization, Mitosis, and Meiosis. *C. elegans II*. J. S. Riddell, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 43-78.
- Alcazar, R. M., R. Lin, et al. (2008). "Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **180**(3): 1275-88.
- Altun, Z. F. and D. H. Hall. (2008). "Handbook of *C. elegans* Anatomy " *WormAtlas* <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>.
- Antoshechkin, I. and P. W. Sternberg (2007). "The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research." *Nat Rev Genet* **8**(7): 518-32.
- Arnone, M. I., L. D. Bogarad, et al. (1997). "Green Fluorescent Protein in the sea urchin: new experimental approaches to transcriptional regulatory analysis in embryos and larvae." *Development* **124**(22): 4649-4659.
- Aronoff, R., R. Baran, et al. (2001). "Molecular identification of *smg-4*, required for mRNA surveillance in *C. elegans*." *Gene* **268**(1-2): 153-64.
- Ashburner, M. (1989). Transgenesis and the manipulation of genes and gene expression. Markers and vectors. *Drosophila: A laboratory Handbook*. M. Ashburner, K. G. Golic and R. S. Hawley, Cold Spring Harbour Laboratory Press: 320-326.
- Atkinson, P. W., A. C. Pinkerton, et al. (2001). "Genetic transformation systems in insects." *Annu Rev Entomol* **46**: 317-46.
- Aurelio, O., D. H. Hall, et al. (2002). "Immunoglobulin-domain proteins required for maintenance of ventral nerve cord organization." *Science* **295**(5555): 686-90.
- Avery, O. T., C. M. Macleod, et al. (1944). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *Pneumococcal* types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III." *J Exp Med* **79**(2): 137-58.

B

- Bacaj, T., M. Tevlin, et al. (2008). "Glia are essential for sensory organ function in *C. elegans*." *Science* **322**(5902): 744-7.
- Baird, S. E. and H. M. Chamberlin (2006). "*Caenorhabditis briggsae* methods." *WormBook*: 1-9.
- Ballinger, D. G. and S. Benzer (1989). "Targeted gene mutations in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9402-6.

- Ballweber, L. R. (2006). "Endoparasite control." Vet Clin North Am Food Anim Pract **22**(2): 451-61.
- Bar-Nun, S., Y. Shneyour, et al. (1983). "G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes." Biochim Biophys Acta **741**(1): 123-7.
- Barrett, P. L., J. T. Fleming, et al. (2004). "Targeted gene alteration in *Caenorhabditis elegans* by gene conversion." Nat Genet **36**(11): 1231-7.
- Baum, P. D. and G. Garriga (1997). "Neuronal migrations and axon fasciculation are disrupted in *ina-1* integrin mutants." Neuron **19**(1): 51-62.
- Bazopoulou, D. and N. Tavernarakis (2009). "The NemaGENETAG initiative: large scale transposon insertion gene-tagging in *Caenorhabditis elegans*." Genetica **137**(1): 39-46.
- Beadle, G. W. and E. L. Tatum (1941). "Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*." Proc Natl Acad Sci U S A **27**(11): 499-506.
- Bennett, R. P., C. A. Cox, et al. (1998). "Fusion of green fluorescent protein with the Zeocin-resistance marker allows visual screening and drug selection of transfected eukaryotic cells." Biotechniques **24**(3): 478-82.
- Berezikov, E., C. I. Bargmann, et al. (2004). "Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation." Nucleic Acids Res **32**(4): e40.
- Berg, P. and J. E. Mertz (2010). "Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology." Genetics **184**(1): 9-17.
- Berghammer, A. J., M. Klingler, et al. (1999). "A universal marker for transgenic insects." Nature **402**(6760): 370-1.
- Berglund, A. C., E. Sjolund, et al. (2008). "InParanoid 6: eukaryotic ortholog clusters with inparalogs." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D263-6.
- Bessereau, J. L. (2006). "Transposons in *C. elegans*." WormBook: 1-13.
- Bessereau, J. L., A. Wright, et al. (2001). "Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line." Nature **413**(6851): 70-4.
- Bianchi, L., B. Gerstbrein, et al. (2004). "The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation." Nat Neurosci **7**(12): 1337-44.
- Birch, R. G. (1997). "Plant transformation: problems and strategies for practical application." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48**: 297-326.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, et al. (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-62.
- Blaxter, M. (1998). "*Caenorhabditis elegans* is a nematode." Science **282**(5396): 2041-6.

- Blaxter, M. and D. Bird (1997). Parasitic nematodes. *C. elegans* II. J. S. Riddell, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 851-878.
- Blochlinger, K. and H. Diggelmann (1984). "Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells." *Mol Cell Biol* **4**(12): 2929-31.
- Bradley, A., M. Evans, et al. (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." *Nature* **309**(5965): 255-6.
- Brauchle, M., K. Kiontke, et al. (2009). "Evolution of early embryogenesis in rhabditid nematodes." *Dev Biol* **335**(1): 253-62.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **77**(1): 71-94.
- Brenner, S., F. Jacob, et al. (1961). "An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis." *Nature* **190**: 576-581.
- Britton, C., D. L. Redmond, et al. (1999). "Identification of promoter elements of parasite nematode genes in transgenic *Caenorhabditis elegans*." *Mol Biochem Parasitol* **103** (2): 171-81.
- Broverman, S., M. MacMorris, et al. (1993). "Alteration of *Caenorhabditis elegans* gene expression by targeted transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10): 4359-63.
- Buechner, M., D. H. Hall, et al. (1999). "Cystic canal mutants in *Caenorhabditis elegans* are defective in the apical membrane domain of the renal (excretory) cell." *Dev Biol* **214**(1): 227-41.
- Burbea, M., L. Dreier, et al. (2002). "Ubiquitin and AP180 regulate the abundance of GLR-1 glutamate receptors at postsynaptic elements in *C. elegans*." *Neuron* **35**(1): 107-20.
- C**
- Cassada, R. C. and R. L. Russell (1975). "The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **46**(2): 326-42.
- Cecconi, F. and B. I. Meyer (2000). "Gene trap: a way to identify novel genes and unravel their biological function." *FEBS Lett* **480**(1): 63-71.
- Chalfie, M. (2009). "GFP: Lighting up life." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(25): 10073-80.
- Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* **263**(5148): 802-5.
- Chamberlin, H. M. (2010). "*C. elegans* select." *Nat Meth* **7**(9): 693-695.

- Chan, A. W., K. Y. Chong, et al. (2001). "Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes." Science **291**(5502): 309-12.
- Chelur, D. S., G. G. Ernstom, et al. (2002). "The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel." Nature **420**(6916): 669-73.
- Christensen, M., A. Estevez, et al. (2002). "A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells." Neuron **33**(4): 503-14.
- Chudakov, D. M., S. Lukyanov, et al. (2005). "Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging." Trends Biotechnol **23**(12): 605-13.
- Ciche, T. (2007). "The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*." WormBook: 1-9.
- Clark, D. V., D. S. Suleman, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of the *dpy-20* gene of *Caenorhabditis elegans*." Mol Gen Genet **247**(3): 367-78.
- Clark, S. G., X. Lu, et al. (1994). "The *Caenorhabditis elegans* locus *lin-15*, a negative regulator of a tyrosine kinase signaling pathway, encodes two different proteins." Genetics **137**(4): 987-97.
- Clary, L. M. and P. G. Okkema (2010). "The EGR family gene *egrh-1* functions non-autonomously in the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *C. elegans*." Development **137**(18): 3129-37.
- Coghlan, A. (2005). "Nematode genome evolution." WormBook: 1-15.
- Coghlan, A., T. J. Fiedler, et al. (2008). "nGASP, the nematode genome annotation assessment project." BMC Bioinformatics **9**: 549.
- Cohen, S. N., A. C. Chang, et al. (1973). "Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(11): 3240-4.
- Colbere-Garapin, F., F. Horodniceanu, et al. (1981). "A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells." J Mol Biol **150**(1): 1-14.
- Costantini, F. and E. Lacy (1981). "Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line." Nature **294**(5836): 92-4.
- Crompton, D. W. (2001). "Ascaris and ascariasis." Adv Parasitol **48**: 285-375.
- Cui, M. and M. Han (2007). "Roles of chromatin factors in *C. elegans* development." WormBook: 1-16.
- Cullen, D., S. A. Leong, et al. (1987). "Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, *hph*." Gene **57**(1): 21-6.

D

- Dal Santo, P., M. A. Logan, et al. (1999). "The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*." Cell **98**(6): 757-67.
- Davies, J. (1994). "Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes." Science **264** (5157): 375-82.
- Davies, J. and A. Jimenez (1980). "A new selective agent for eukaryotic cloning vectors." Am J Trop Med Hyg **29**(5 Suppl): 1089-92.
- Davis, R. E., A. Parra, et al. (1999). "Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8687-92.
- de la Luna, S., I. Soria, et al. (1988). "Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker." Gene **62**(1): 121-6.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-37.
- Delattre, M. and M. A. Felix (2001). "Polymorphism and evolution of vulval precursor cell lineages within two nematode genera, *Caenorhabditis* and *Oscheius*." Curr Biol **11** (9): 631-43.
- Dernburg, A. F., J. Zalevsky, et al. (2000). "Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line." Genes Dev **14**(13): 1578-83.
- Dieterich, C., S. W. Clifton, et al. (2008). "The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism." Nat Genet **40**(10): 1193-8.
- Dumont, J., K. Oegema, et al. (2010). "A kinetochore-independent mechanism drives anaphase chromosome separation during acentrosomal meiosis." Nat Cell Biol **12** (9): 894-901.
- Dupuy, D., N. Bertin, et al. (2007). "Genome-scale analysis of *in vivo* spatiotemporal promoter activity in *Caenorhabditis elegans*." Nat Biotechnol **25**(6): 663-8.
- Dupuy, D., Q. R. Li, et al. (2004). "A first version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome." Genome Res **14**(10B): 2169-75.

E

- Ebert, K. M., J. P. Selgrath, et al. (1991). "Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression." Biotechnology (N Y) **9**(9): 835-8.

Epstein, H. F., R. H. Waterston, et al. (1974). "A mutant affecting the heavy chain of myosin in *Caenorhabditis elegans*." J Mol Biol **90**(2): 291-300.

Evans, T. C. (2006). "Transformation and microinjection." WormBook.

F

Fan-Minogue, H. and D. M. Bedwell (2008). "Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity." RNA **14**(1): 148-57.

Felix, M. A. (2006). "*Oscheius tipulae*." WormBook: 1-8.

Felix, M. A. (2008). "RNA interference in nematodes and the chance that favored Sydney Brenner." J Biol **7**(9): 34.

Felix, M. A., M. Labouesse, et al. (2002). Caenorhabditis elegans, Un organisme modèle en biologie, Hermann Editeurs des Sciences et des Arts.

French-Constant, R. H. and M. Q. Benedict (2000). Resistance genes as candidates for insect transgenesis. Insect transgenesis. Methods and Applications. A. M. Handler and A. A. James, CRC Press: 109-121.

Fire, A. (1986). "Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*." EMBO J **5**(10): 2673-2680.

Fire, A., D. Albertson, et al. (1991). "Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle." Development **113**(2): 503-14.

Fire, A., K. Kondo, et al. (1990). "Vectors for low copy transformation of *C. elegans*." Nucleic Acids Res **18**(14): 4269-70.

Fire, A. and R. H. Waterston (1989). "Proper expression of myosin genes in transgenic nematodes." EMBO J **8**(11): 3419-28.

Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.

Fischer, S. E. (2010). "Small RNA-mediated gene silencing pathways in *C. elegans*." Int J Biochem Cell Biol **42**(8): 1306-15.

Fitch, D. H., B. Bugaj-Gaweda, et al. (1995). "18S ribosomal RNA gene phylogeny for some *Rhabditidae* related to *Caenorhabditis*." Mol Biol Evol **12**(2): 346-58.

Fitch, D. H. and S. W. Emmons (1995). "Variable cell positions and cell contacts underlie morphological evolution of the rays in the male tails of nematodes related to *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **170**(2): 564-82.

- Fitch, D. H. and W. Kelley Thomas (1997). Evolution. *C. elegans* II. J. S. Riddell, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. Priess, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 815-850.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, et al. (1995). "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd." *Science* **269**(5223): 496-512.
- Flemming, A. J., Z. Z. Shen, et al. (2000). "Somatic polyploidization and cellular proliferation drive body size evolution in nematodes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5285-90.
- Flytzanis, C. N., A. P. McMahon, et al. (1985). "Persistence and integration of cloned DNA in postembryonic sea urchins." *Dev Biol* **108**(2): 431-42.
- Fox, R. M., S. E. Von Stetina, et al. (2005). "A gene expression fingerprint of *C. elegans* embryonic motor neurons." *BMC Genomics* **6**: 42.
- Fox, R. M., J. D. Watson, et al. (2007). "The embryonic muscle transcriptome of *Caenorhabditis elegans*." *Genome Biol* **8**(9): R188.
- Fraley, R. T., S. G. Rogers, et al. (1983). "Expression of bacterial genes in plant cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(15): 4803-7.
- Freedman, D. J. and S. M. Beverley (1993). "Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*." *Mol Biochem Parasitol* **62**(1): 37-44.
- Friedrich, G. and P. Soriano (1991). "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice." *Genes Dev* **5**(9): 1513-23.
- Frøkjær-Jensen, C., M. W. Davis, et al. (2010). "Targeted gene deletions in *C. elegans* using transposon excision." *Nat Methods* **7**(6): 451-453.
- Frøkjær-Jensen, C., M. W. Davis, et al. (2008). "Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*." *Nat Genet* **40**(11): 1375-83.
- Frøkjær-Jensen, C., K. S. Kindt, et al. (2006). "Effects of voltage-gated calcium channel subunit genes on calcium influx in cultured *C. elegans* mechanosensory neurons." *J Neurobiol* **66**(10): 1125-39.

G

- Gama Sosa, M. A., R. De Gasperi, et al. (2010). "Animal transgenesis: an overview." *Brain Struct Funct* **214**(2-3): 91-109.
- Gastmann, S., A. Dunkler, et al. (2007). "A molecular toolbox for manipulating *Eremothecium coryli*." *Microbiol Res* **162**(4): 299-307.

- Gatignol, A., M. Baron, et al. (1987). "Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn 5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **207**(2-3): 342-8.
- Ghedini, E., S. Wang, et al. (2007). "Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*." Science **317**(5845): 1756-60.
- Gibbs, R. A., G. M. Weinstock, et al. (2004). "Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution." Nature **428**(6982): 493-521.
- Giordano, T. J. and W. T. McAllister (1990). "Optimization of the hygromycin B resistance-conferring gene as a dominant selectable marker in mammalian cells." Gene **88**(2): 285-8.
- Goetinck, S. and R. H. Waterston (1994). "The *Caenorhabditis elegans* muscle-affecting gene *unc-87* encodes a novel thin filament-associated protein." J Cell Biol **127**(1): 79-93.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, et al. (1996). "Life with 6000 genes." Science **274**(5287): 546, 563-7.
- Goldberg, D. A., J. W. Posakony, et al. (1983). "Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the drosophila germ line." Cell **34**(1): 59-73.
- Golovan, S. P., R. G. Meidinger, et al. (2001). "Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure." Nat Biotechnol **19**(8): 741-5.
- Gong, S., C. Zheng, et al. (2003). "A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes." Nature **425**(6961): 917-25.
- González-Estévez, C., T. Momose, et al. (2003). "Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(24): 14046-14051.
- Gordon, J. W., G. A. Scangos, et al. (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7380-4.
- Gossler, A., A. L. Joyner, et al. (1989). "Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes." Science **244**(4903): 463-5.
- Goyard, S. and S. M. Beverley (2000). "Blasticidin resistance: a new independent marker for stable transfection of *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **108**(2): 249-52.
- Granato, M., H. Schnabel, et al. (1994). "Genesis of an organ: molecular analysis of the *pha-1* gene." Development **120**(10): 3005-17.

- Granato, M., H. Schnabel, et al. (1994). "*pha-1*, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*." Nucleic Acids Res **22**(9): 1762-3.
- Grant, W. N., S. J. Skinner, et al. (2006). "Heritable transgenesis of *Parastrongyloides trichosuri*: a nematode parasite of mammals." Int J Parasitol **36**(4): 475-83.
- Gritz, L. and J. Davies (1983). "Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*." Gene **25**(2-3): 179-88.
- Guiliano, D. B. and M. L. Blaxter (2006). "Operon conservation and the evolution of trans-splicing in the phylum Nematoda." PLoS Genet **2**(11): e198.
- Gupta, B. P., R. Johnsen, et al. (2007). "Genomics and biology of the nematode *Caenorhabditis briggsae*." WormBook: 1-16.
- H**
- Haber, J. E. (2000). "Partners and pathways repairing a double-strand break." Trends Genet **16**(6): 259-64.
- Hallem, E. A., M. Rengarajan, et al. (2007). "Nematodes, bacteria, and flies: a tripartite model for nematode parasitism." Curr Biol **17**(10): 898-904.
- Hammarlund, M., M. T. Palfreyman, et al. (2007). "Open syntaxin docks synaptic vesicles." PLoS Biol **5**(8): e198.
- Hammer, R. E., S. D. Maika, et al. (1990). "Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders." Cell **63**(5): 1099-112.
- Hammer, R. E., V. G. Pursel, et al. (1985). "Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection." Nature **315**(6021): 680-3.
- Han, M. and P. W. Sternberg (1991). "Analysis of dominant-negative mutations of the *Caenorhabditis elegans let-60ras* gene." Genes Dev **5**(12A): 2188-98.
- Handler, A. M. (2000). An introduction to the history and methodology of insect gene transfer. Insect transgenesis . Methods and Applications. A. M. Handler and A. A. James, CRC Press: 3-26.
- Handler, A. M. (2001). "A current perspective on insect gene transformation." Insect Biochem Mol Biol **31**(2): 111-28.
- Handler, A. M. and S. D. McCombs (2000). "The *piggyBac* transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome." Insect Mol Biol **9**(6): 605-12.

- Handler, A. M., S. D. McCombs, et al. (1998). "The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7520-5.
- Harfe, B. D. and A. Fire (1998). "Muscle and nerve-specific regulation of a novel NK-2 class homeodomain factor in *Caenorhabditis elegans*." Development **125**(3): 421-9.
- Hashmi, S. and R. Gaugler (1997). "Application of micromechanical piercing structures for genetic transformation of nematodes." Methods Mol Biol **62**: 393-8.
- Hashmi, S., G. Hashmi, et al. (1995). "Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection." J Invertebr Pathol **66**(3): 293-6.
- Hashmi, S., P. Ling, et al. (1995). "Genetic transformation of nematodes using arrays of micromechanical piercing structures." Biotechniques **19**(5): 766-70.
- Herrera-Estrella, L., M. D. Block, et al. (1983). "Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells." EMBO J **2**(6): 987-95.
- Herrmann, M., W. E. Mayer, et al. (2007). "The nematode *Pristionchus pacificus* (Nematoda: Diplogastriidae) is associated with the oriental beetle *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) in Japan." Zoolog Sci **24**(9): 883-9.
- Hicks, G. G., E. G. Shi, et al. (1997). "Functional genomics in mice by tagged sequence mutagenesis." Nat Genet **16**(4): 338-44.
- Higazi, T. B., A. Deoliveira, et al. (2005). "Identification of elements essential for transcription in *Brugia malayi* promoters." J Mol Biol **353**(1): 1-13.
- Higazi, T. B., A. Merriweather, et al. (2002). "*Brugia malayi*: transient transfection by microinjection and particle bombardment." Exp Parasitol **100**(2): 95-102.
- Higazi, T. B. and T. R. Unnasch (2004). "Intron encoded sequences necessary for trans splicing in transiently transfected *Brugia malayi*." Mol Biochem Parasitol **137**(1): 181-4.
- Higgs, S. and D. L. Lewis (2000). Green Fluorescent Protein (GFP) as a marker for transgenic insects. Insect transgenesis. Methods and Applications. A. M. Handler and A. A. James, CRC Press: 93-108.
- Hilliard, M. A., A. J. Apicella, et al. (2005). "*In vivo* imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents." EMBO J **24**(1): 63-72.
- Hillier, L. W., R. D. Miller, et al. (2007). "Comparison of *C. elegans* and *C. briggsae* genome sequences reveals extensive conservation of chromosome organization and synteny." PLoS Biol **5**(7): e167.

- Hirsh, D., K. J. Kemphues, et al. (1985). "Genes affecting early development in *Caenorhabditis elegans*." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **50**: 69-78.
- Hirth, K. P., C. A. Edwards, et al. (1982). "A DNA-mediated transformation system for *Dictyostelium discoideum*." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7356-60.
- Hobert, O. (2002). "PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*." Biotechniques **32**(4): 728-30.
- Hodda, M. and D. C. Cook (2009). "Economic impact from unrestricted spread of potato cyst nematodes in australia." Phytopathology **99**(12): 1387-93.
- Hodgkin, J. (1985). "Novel nematode amber suppressors." Genetics **111**(2): 287-310.
- Hodgkin, J. A. and S. Brenner (1977). "Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Genetics **86**(2 Pt. 1): 275-87.
- Hoffmann, W., G. Petit, et al. (2000). "*Litomosoides sigmodontis* in mice: reappraisal of an old model for filarial research." Parasitol Today **16**(9): 387-9.
- Hong, R. L. and R. J. Sommer (2006). "*Pristionchus pacificus*: a well-rounded nematode." Bioessays **28**(6): 651-9.
- Hong, S. G., M. K. Kim, et al. (2009). "Generation of red fluorescent protein transgenic dogs." Genesis **47**(5): 314-22.
- Hope, I. A. (1991). "'Promoter trapping' in *Caenorhabditis elegans*." Development **113**(2): 399-408.
- Houdebine, L. M. (2005). "Use of transgenic animals to improve human health and animal production." Reprod Domest Anim **40**(4): 269-81.
- Houdebine, L. M. (2006). "La première protéine pharmaceutique préparée dans le lait d'animaux transgéniques approuvée par l'Agence européenne du médicament." L'observatoire de la génétique http://omics-ethics.org/observatoire/zoom/zoom_06/z_no29_06/z_no29_06_01.html.
- Houdebine, L. M. (2007). "Transgenic animal models in biomedical research." Methods Mol Biol **360**: 163-202.
- Hubner, M. P., M. N. Torrero, et al. (2009). "*Litomosoides sigmodontis*: a simple method to infect mice with L3 larvae obtained from the pleural space of recently infected jirds (*Meriones unguiculatus*)." Exp Parasitol **123**(1): 95-8.
- Human Genome Project Information. (2009). "<http://genomics.energy.gov>." U.S. Department of Energy Office of Science.
- Hunt, T. (1976). "Control of globin synthesis." Br Med Bull **32**(3): 257-61.

Hunt-Newbury, R., R. Viveiros, et al. (2007). "High-throughput *in vivo* analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Biol **5**(9): e237.

Hutter, H. (2000). "New ways to look at axons in *Caenorhabditis elegans*." Microsc Res Tech **48**(1): 47-54.

Hutter, H. (2004). "Five-colour *in vivo* imaging of neurons in *Caenorhabditis elegans*." J Microsc **215**(Pt 2): 213-8.

I

Inoue, T., M. Ailion, et al. (2007). "Genetic analysis of dauer formation in *Caenorhabditis briggsae*." Genetics **177**(2): 809-18.

Iwaki, T., M. Figuera, et al. (2003). "Rapid selection of *Drosophila* S2 cells with the puromycin resistance gene." Biotechniques **35**(3): 482-4, 486.

J

Jackson, D. A., R. H. Symons, et al. (1972). "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(10): 2904-9.

Jackstadt, P., T. P. Wilm, et al. (1999). "Transformation of nematodes via ballistic DNA transfer." Mol Biochem Parasitol **103**(2): 261-6.

Jaenisch, R. and B. Mintz (1974). "Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1250-4.

Jansen, G., E. Hazendonk, et al. (1997). "Reverse genetics by chemical mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*." Nat Genet **17**(1): 119-21.

Jansen, G., K. L. Thijssen, et al. (1999). "The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*." Nat Genet **21**(4): 414-9.

Jasinskiene, N., C. J. Coates, et al. (1998). "Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3743-7.

Jasmer, D. P., A. Goverse, et al. (2003). "Parasitic nematode interactions with mammals and plants." Annu Rev Phytopathol **41**: 245-70.

Jin, Y. (1999). Transformation. C. elegans, a practical approach. I. A. Hope, Oxford: 69-96.

Jorgensen, E. M. and S. E. Mango (2002). "The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*." Nat Rev Genet **3**(5): 356-69.

Jorgensen Lab C. *elegans* Mos1 techniques. (2009). <http://sites.google.com/site/jorgensenmossci/Home>.

K

Kaiser, R. J., S. L. MacKellar, et al. (1989). "Specific-primer-directed DNA sequencing using automated fluorescence detection." *Nucleic Acids Res* **17**(15): 6087-102.

Kalinna, B. H. and P. J. Brindley (2007). "Manipulating the manipulators: advances in parasitic helminth transgenesis and RNAi." *Trends Parasitol* **23**(5): 197-204.

Kamakura, T., K. Yoneyama, et al. (1990). "Expression of the blasticidin S deaminase gene (bsr) in tobacco: fungicide tolerance and a new selective marker for transgenic plants." *Mol Gen Genet* **223**(2): 332-4.

Kamath, R. S., A. G. Fraser, et al. (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi." *Nature* **421**(6920): 231-7.

Kass, E. M. and M. Jasin (2010). "Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways." *FEBS Lett* **584**(17): 3703-8.

Kelly, W. G. and A. Fire (1998). "Chromatin silencing and the maintenance of a functional germline in *Caenorhabditis elegans*." *Development* **125**(13): 2451-6.

Kelly, W. G., S. Xu, et al. (1997). "Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene." *Genetics* **146**(1): 227-38.

Kerr, R., V. Lev-Ram, et al. (2000). "Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*." *Neuron* **26**(3): 583-94.

Kimura, M., T. Kamakura, et al. (1994). "Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*." *Mol Gen Genet* **242**(2): 121-9.

Kimura, M., A. Takatsuki, et al. (1994). "Blasticidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* **1219**(3): 653-9.

Kiontke, K. and D. H. Fitch (2005). "The phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids." *WormBook*: 1-11.

Klein, T. M., E. D. Wolf, et al. (1987). "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells." *Nature* **327**(6117): 70-73.

Klemenz, R., U. Weber, et al. (1987). "The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*." *Nucleic Acids Res* **15**(10): 3947-59.

- Kokoza, V., A. Ahmed, et al. (2001). "Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector *pBac[3xP3-EGFP afm]*." *Insect Biochem Mol Biol* **31**(12): 1137-43.
- Koles, K., P. H. van Berkel, et al. (2004). "N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits." *Glycobiology* **14**(1): 51-64.
- Kolotuev, I. and B. Podbilewicz (2008). "Changing of the cell division axes drives vulva evolution in nematodes." *Dev Biol* **313**(1): 142-54.
- Korswagen, H. C., R. M. Durbin, et al. (1996). "Transposon *Tc1*-derived, sequence-tagged sites in *Caenorhabditis elegans* as markers for gene mapping." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14680-5.
- Kotra, L. P., J. Haddad, et al. (2000). "Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(12): 3249-56.
- Kramer, J. M., R. P. French, et al. (1990). "The *Caenorhabditis elegans rol-6* gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen." *Mol Cell Biol* **10**(5): 2081-9.
- Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2004). "Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle." *Nat Genet* **36**(7): 775-80.
- Kuroyanagi, H., T. Kobayashi, et al. (2006). "Transgenic alternative-splicing reporters reveal tissue-specific expression profiles and regulation mechanisms *in vivo*." *Nat Methods* **3**(11): 909-15.
- Kuroyanagi, H., G. Ohno, et al. (2007). "The Fox-1 family and SUP-12 coordinately regulate tissue-specific alternative splicing *in vivo*." *Mol Cell Biol* **27**(24): 8612-21.
- L**
- Labrousse, A. M., M. D. Zappaterra, et al. (1999). "*C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane." *Mol Cell* **4**(5): 815-26.
- Lai, L., D. Kolber-Simonds, et al. (2002). "Production of *alpha-1,3-galactosyltransferase* knockout pigs by nuclear transfer cloning." *Science* **295**(5557): 1089-92.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Lee, M. G. and L. H. Van der Ploeg (1990). "Homologous recombination and stable transfection in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*." *Science* **250**(4987): 1583-7.

- Lee, M. G. and L. H. van der Ploeg (1991). "The hygromycin B-resistance-encoding gene as a selectable marker for stable transformation of *Trypanosoma brucei*." Gene **105** (2): 255-7.
- Lehner, B., J. Tischler, et al. (2006). "RNAi screens in *Caenorhabditis elegans* in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions." Nat Protoc **1**(3): 1617-20.
- Li, X., H. C. Massey, Jr., et al. (2006). "Successful transgenesis of the parasitic nematode *Strongyloides stercoralis* requires endogenous non-coding control elements." Int J Parasitol **36**(6): 671-9.
- Lints, R. and D. H. Hall. (2009). "Reproductive system, germ line." WormAtlas <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/germ%20line/Germframeset.html>.
- Lok, J. B. and D. Artis (2008). "Transgenesis and neuronal ablation in parasitic nematodes: revolutionary new tools to dissect host-parasite interactions." Parasite Immunol **30** (4): 203-14.
- Lok, J. B. and H. C. Massey, Jr. (2002). "Transgene expression in *Strongyloides stercoralis* following gonadal microinjection of DNA constructs." Mol Biochem Parasitol **119**(2): 279-84.
- Lopez, M. G., V. Alfonso, et al. (2010). "Trans-complementation of polyhedrin by a stably transformed Sf9 insect cell line allows occ- baculovirus occlusion and larval per os infectivity." J Biotechnol **145**(2): 199-205.
- Loria, P. M., A. Duke, et al. (2003). "Two neuronal, nuclear-localized RNA binding proteins involved in synaptic transmission." Curr Biol **13**(15): 1317-23.

M

- Maduro, M. and D. Pilgrim (1995). "Identification and cloning of *unc-119*, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system." Genetics **141**(3): 977-88.
- Maisonhaute, C. and G. Echali er (1986). "Stable transformation of *Drosophila* Kc cells to antibiotic resistance with the bacterial neomycin resistance gene." FEBS Lett **197** (1-2): 45-9.
- Mantei, N., W. Boll, et al. (1979). "Rabbit beta-globin mRNA production in mouse L cells transformed with cloned rabbit beta-globin chromosomal DNA." Nature **281**(5726): 40-6.

- Martin, E., H. Laloux, et al. (2002). "Identification of 1088 new transposon insertions of *Caenorhabditis elegans*: a pilot study toward large-scale screens." Genetics **162**(1): 521-4.
- Martin, R. G., J. H. Matthaei, et al. (1962). "Ribonucleotide composition of the genetic code." Biochem Biophys Res Commun **6**: 410-4.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, et al. (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species." Nat Biotechnol **17**(10): 969-73.
- McGrane, V., J. O. Carlson, et al. (1988). "Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration." Am J Trop Med Hyg **39**(5): 502-10.
- McInnis, D. O., D. S. Haymer, et al. (1990). "*Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Transient Expression of a Heterologous Gene for Resistance to the Antibiotic Geneticin." Annals of the Entomological Society of America **83**: 982-986.
- Mello, C. and A. Fire (1995). "DNA transformation." Methods Cell Biol **48**: 451-82.
- Mello, C. C., J. M. Kramer, et al. (1991). "Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences." EMBO J **10**(12): 3959-70.
- Miller, L. H., R. K. Sakai, et al. (1987). "Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*." Science **237**(4816): 779-81.
- Miyabayashi, T., M. T. Palfreyman, et al. (1999). "Expression and function of members of a divergent nuclear receptor family in *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **215**(2): 314-31.
- Mlodzik, M., N. E. Baker, et al. (1990). "Isolation and expression of scabrous, a gene regulating neurogenesis in *Drosophila*." Genes Dev **4**(11): 1848-61.
- Moerman, D. G. and R. J. Barstead (2008). "Towards a mutation in every gene in *Caenorhabditis elegans*." Brief Funct Genomic Proteomic **7**(3): 195-204.
- Moerman, D. G., J. E. Kiff, et al. (1991). "Germline excision of the transposable element *Tc1* in *C. elegans*." Nucleic Acids Res **19**(20): 5669-72.
- Morris, A. C., P. Eggleston, et al. (1989). "Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA." Med Vet Entomol **3**(1): 1-7.
- Morrow, J. F., S. N. Cohen, et al. (1974). "Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(5): 1743-7.
- Mouse Genome Database. (2011). <http://www.informatics.jax.org>.
- Mueller, C., A. Graessmann, et al. (1978). "Mapping of early SV40-specific functions by microinjection of different early viral DNA fragments." Cell **15**(2): 579-85.

- Muir, W. M. (2004). "The threats and benefits of GM fish." EMBO Rep **5**(7): 654-9.
- Mulligan, R. C., B. H. Howard, et al. (1979). "Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome." Nature **277**(5692): 108-14.
- Murai, N., J. D. Kemp, et al. (1983). "Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors." Science **222**(4623): 476-82.
- Myers, E. W., G. G. Sutton, et al. (2000). "A whole-genome assembly of *Drosophila*." Science **287**(5461): 2196-204.

N

- Nathoo, A. N., R. A. Moeller, et al. (2001). "Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species." Proc Natl Acad Sci U S A **98** (24): 14000-5.
- National Bioresource Project - *C. elegans*. (2009). "NBRP- *C. elegans*." <http://www.shigen.nig.ac.jp/c.elegans/index.jsp>.
- Nirenberg, M. W., J. H. Matthaei, et al. (1963). "Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA." Fed Proc **22**: 55-61.

O

- O'Brochta, D. A. and A. M. Handler (2008). Perspectives on the state of insect transgenics. Transgenesis and the management of vector-borne disease. A. S., Landes Bioscience and Springer Science: 1-18.
- O'Connor, M. J. and W. Chia (2002). "Gene transfer in *Drosophila*." Methods Mol Biol **180**: 27-36.
- Okano, K., N. Miyajima, et al. (1992). "Basic conditions for the drug selection and transient gene expression in the cultured cell line of *Bombyx mori*." In Vitro Cell Dev Biol **28A** (11-12): 779-81.
- Ostro, M. J., D. Giacomoni, et al. (1978). "Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome-mediated insertion into a human cell line." Nature **274**(5674): 921-3.
- Ozato, K., H. Kondoh, et al. (1986). "Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken delta-crystallin gene in medaka embryos." Cell Differ **19**(4): 237-44.

P

- Palmiter, R. D., R. L. Brinster, et al. (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." Nature **300** (5893): 611-5.

- Palmiter, R. D., H. Y. Chen, et al. (1982). "Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring." Cell **29**(2): 701-10.
- Pardee, A. B., F. Jacob, et al. (1958). "The role of the inducible alleles and the constitutive alleles in the synthesis of beta-galactosidase in zygotes of *Escherichia coli*." C R Hebd Seances Acad Sci **246**(21): 3125-8.
- Park, K. H., L. Hernandez, et al. (2005). "A family of K⁺ channel ancillary subunits regulate taste sensitivity in *Caenorhabditis elegans*." J Biol Chem **280**(23): 21893-9.
- Pellicer, A., D. Robins, et al. (1980). "Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer." Science **209**(4463): 1414-22.
- Perez, P., G. Tiraby, et al. (1989). "Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation." Plant Mol Biol **13**(4): 365-73.
- Pfeifer, T. A., D. D. Hegedus, et al. (1997). "Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin resistance gene for use as a dominant selectable marker in dipteran and lepidopteran insect cell lines." Gene **188**(2): 183-90.
- Pires da Silva, A. (2005). "*Pristionchus pacificus* genetic protocols." WormBook: 1-8.
- Plasterk, R. H. and J. T. Groenen (1992). "Targeted alterations of the *Caenorhabditis elegans* genome by transgene instructed DNA double strand break repair following *Tc1* excision." EMBO J **11**(1): 287-90.
- Plasterk, R. H., Z. Izsvak, et al. (1999). "Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements." Trends Genet **15**(8): 326-32.
- Polanowska, J., J. S. Martin, et al. (2004). "Tandem immunoaffinity purification of protein complexes from *Caenorhabditis elegans*." Biotechniques **36**(5): 778-80, 782.
- Praitis, V., E. Casey, et al. (2001). "Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **157**(3): 1217-26.

Q

- Qin, L., G. Smant, et al. (1998). "Cloning of a trans-spliced glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and expression of its putative promoter region in *Caenorhabditis elegans*." Mol Biochem Parasitol **96**(1-2): 59-67.

R

- Rechsteiner, M. (1978). "Red cell-mediated microinjection." Natl Cancer Inst Monogr(48): 57-64.

- Rechtsteiner, A., S. Ercan, et al. (2010). "The histone H3K36 methyltransferase MES-4 acts epigenetically to transmit the memory of germline gene expression to progeny." PLoS Genet **6**(9).
- Reece-Hoyes, J. S., J. Shingles, et al. (2007). "Insight into transcription factor gene duplication from *Caenorhabditis elegans* Promoterome-driven expression patterns." BMC Genomics **8**: 27.
- Rexroad, C. E., Jr., R. E. Hammer, et al. (1989). "Production of transgenic sheep with growth-regulating genes." Mol Reprod Dev **1**(3): 164-9.
- Riddle, D. L., T. Blumenthal, et al. (1997). C. elegans II, Cold Sping Harbor Laboratory Press.
- Ripps, M. E., G. W. Huntley, et al. (1995). "Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 689-93.
- Robert, V. and J. L. Bessereau (2007). "Targeted engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome following Mos1-triggered chromosomal breaks." EMBO J **26**(1): 170-83.
- Robert, V. J., M. W. Davis, et al. (2008). "Gene conversion and end-joining-repair double-strand breaks in the *Caenorhabditis elegans* germline." Genetics **180**(1): 673-9.
- Robert, V. J., I. Katic, et al. (2009). "*Mos1* transposition as a tool to engineer the *Caenorhabditis elegans* genome by homologous recombination." Methods **49**(3): 263-9.
- Roschlau, K., P. Rommel, et al. (1989). "Gene transfer experiments in cattle." J Reprod Fertil Suppl **38**: 153-60.
- Rubin, G. M. and A. C. Spradling (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors." Science **218**(4570): 348-53.
- Rubin, G. M. and A. C. Spradling (1983). "Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*." Nucleic Acids Res **11**(18): 6341-51.
- Rusconi, S. and W. Schaffner (1981). "Transformation of frog embryos with a rabbit beta-globin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(8): 5051-5.
- Rushforth, A. M., B. Saari, et al. (1993). "Site-selected insertion of the transposon Tc1 into a *Caenorhabditis elegans* myosin light chain gene." Mol Cell Biol **13**(2): 902-10.

S

- Sagasti, A., N. Hisamoto, et al. (2001). "The CaMKII UNC-43 activates the MAPKKK NSY-1 to execute a lateral signaling decision required for asymmetric olfactory neuron fates." Cell **105**(2): 221-32.
- Sakai, R. K. and L. H. Miller (1992). "Effects of heat shock on the survival of transgenic *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) under antibiotic selection." J Med Entomol **29**(2): 374-5.
- Salkoff, L., A. Butler, et al. (2001). "Evolution tunes the excitability of individual neurons." Neuroscience **103**(4): 853-9.
- Sambrook, J. F. and I. Russell (2001). Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2**: 33-38, 50-58.
- Sarin, S., S. Prabhu, et al. (2008). "*Caenorhabditis elegans* mutant allele identification by whole-genome sequencing." Nat Methods **5**(10): 865-7.
- Sasaki, E., H. Suemizu, et al. (2009). "Generation of transgenic non-human primates with germline transmission." Nature **459**(7246): 523-7.
- Schlager, B., W. Roseler, et al. (2006). "HAIRY-like transcription factors and the evolution of the nematode vulva equivalence group." Curr Biol **16**(14): 1386-94.
- Schlager, B., X. Wang, et al. (2009). "Molecular cloning of a dominant roller mutant and establishment of DNA-mediated transformation in the nematode *Pristionchus pacificus*." Genesis **47**(5): 300-4.
- Schulze, J. and E. Schierenberg (2009). "Embryogenesis of *Romanomermis culicivorax*: an alternative way to construct a nematode." Dev Biol **334**(1): 10-21.
- Scott, B. B. and C. Lois (2005). "Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16443-7.
- Semple, J. I., R. Garcia-Verdugo, et al. (2010). "Rapid selection of transgenic *C. elegans* using antibiotic resistance." Nat Methods **7**(9): 725-7.
- Shashikant, C. S. and F. H. Ruddle (2003). "Impact of transgenic technologies on functional genomics." Curr Issues Mol Biol **5**(3): 75-98.
- Shu, L., C. R. Katholi, et al. (2003). "Analysis of the *Brugia malayi* HSP70 promoter using a homologous transient transfection system." Mol Biochem Parasitol **128**(1): 67-75.
- Silhavy, T. J. and J. R. Beckwith (1985). "Uses of *lac* fusions for the study of biological problems." Microbiol Rev **49**(4): 398-418.

- Skarnes, W. C., J. E. Moss, et al. (1995). "Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development." Proc Natl Acad Sci U S A **92** (14): 6592-6.
- Smiley, R. W., R. G. Whittaker, et al. (2005). "Plant-Parasitic Nematodes Associated with Reduced Wheat Yield in Oregon: *Heterodera avenae*." J Nematol **37**(3): 297-307.
- Sobkow, L., H.-H. Epperlein, et al. (2006). "A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration." Developmental Biology **290**(2): 386-397.
- Sommer, R. J., L. K. Carta, et al. (1994). "The evolution of cell lineage in nematodes." Dev Suppl: 85-95.
- Somvanshi, V. S., B. Kaufmann-Daszczuk, et al. (2010). "*Photorhabdus* phase variants express a novel fimbrial locus, mad, essential for symbiosis." Mol Microbiol.
- Souza, L. M., T. C. Boone, et al. (1984). "Application of recombinant DNA technologies to studies on chicken growth hormone." J Exp Zool **232**(3): 465-73.
- Spradling, A. C. and G. M. Rubin (1982). "Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes." Science **218**(4570): 341-7.
- Stanford, W. L., J. B. Cohn, et al. (2001). "Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond." Nat Rev Genet **2**(10): 756-68.
- Steel, M., J. Moss, et al. (1998). "Gene-trapping to identify and analyze genes expressed in the mouse hippocampus." Hippocampus **8**(5): 444-57.
- Stein, L. D., Z. Bao, et al. (2003). "The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics." PLoS Biol **1**(2): E45.
- Steller, H. and V. Pirrotta (1985). "A transposable P vector that confers selectable G418 resistance to *Drosophila* larvae." EMBO J **4**(1): 167-171.
- Stewart, T. A. and B. Mintz (1981). "Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(10): 6314-8.
- Stinchcomb, D. T., J. E. Shaw, et al. (1985). "Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*." Mol Cell Biol **5**(12): 3484-96.
- Stone, S. and J. E. Shaw (1993). "A *Caenorhabditis elegans act-4::lacZ* fusion: use as a transformation marker and analysis of tissue-specific expression." Gene **131**(2): 167-73.

- Streit, A., W. Li, et al. (1999). "Homologs of the *Caenorhabditis elegans* masculinizing gene *her-1* in *C. briggsae* and the filarial parasite *Brugia malayi*." Genetics **152**(4): 1573-84.
- Stuart, G. W., J. V. McMurray, et al. (1988). "Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos." Development **103**(2): 403-12.
- Suarez, C. E. and T. F. McElwain (2009). "Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites." Int J Parasitol **39**(3): 289-97.
- Sulston, J. E. and J. Hodgkin (1988). Methods. The nematode *Caenorhabditis elegans*. W. B. Wood and The Community of C elegans Researchers, CSH Press: 587-606.
- Sulston, J. E., H. R. Horvitz, et al. (1988). Appendix 3. Cell lineage. The nematode *Caenorhabditis elegans*. W.B. Wood and The Community of C elegans Researchers, CSH Press: 457-489.
- Suzuki, H., R. Kerr, et al. (2003). "*In vivo* imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation." Neuron **39**(6): 1005-17.
- Szybalska, E. H. and W. Szybalski (1962). "Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 2026-34.
- T**
- Tabara, H., A. Grishok, et al. (1998). "RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence." Science **282**(5388): 430-1.
- Tamura, T., C. Thibert, et al. (2000). "Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori*L. using a *piggyBac* transposon-derived vector." Nat Biotechnol **18**(1): 81-4.
- Tanaka, N., H. Yamaguchi, et al. (1963). "Mechanism of action of phleomycin, a tumor-inhibitory antibiotic." Biochem Biophys Res Commun **10**: 171-4.
- Tarailo-Graovac, M., J. Wang, et al. (2010). "Duplication of *cyb-3* (cyclin B3) suppresses sterility in the absence of *mdf-1*/MAD1 spindle assembly checkpoint component in *Caenorhabditis elegans*." Cell Cycle **9**(24): 4858-65.
- Tatar, M. (2000). "Transgenic organisms in evolutionary ecology." Trends Ecol Evol **15**(5): 207-211.
- Tavernarakis, N., S. L. Wang, et al. (2000). "Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes." Nat Genet **24**(2): 180-3.

- Thacker, C., J. A. Sheps, et al. (2006). "*Caenorhabditis elegans dpy-5* is a cuticle procollagen processed by a proprotein convertase." Cell Mol Life Sci **63**(10): 1193-204.
- Thatcher, J. D., C. Haun, et al. (1999). "The DAF-3 Smad binds DNA and represses gene expression in the *Caenorhabditis elegans* pharynx." Development **126**(1): 97-107.
- The *C. elegans* Gene Knockout Consortium, D. G. Moerman, et al. (2001-2005). "The *C. elegans* Gene Knockout Consortium." <http://celeganskoconsortium.omrf.org/default.aspx>.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." Science **282**(5396): 2012-8.
- The Hope's Laboratory Expression Pattern Database. "The Hope's Laboratory Expression Pattern Database." <http://bgypc059.leeds.ac.uk/~web/databaseintro.htm>.
- Thomas, J. H. (2008). "Genome evolution in *Caenorhabditis*." Brief Funct Genomic Proteomic **7**(3): 211-6.
- Timmons, L. and A. Fire (1998). "Specific interference by ingested dsRNA." Nature **395** (6705): 854.
- Toepfer, S., B. Kurtz, et al. (2004). "Influence of soil on the efficacy of entomopathogenic nematodes in reducing *Diabrotica virgifera virgifera* in maize." J Pest Sci (2004) **83** (3): 257-264.
- Toms, N., J. Cooper, et al. (2001). "High copy arrays containing a sequence upstream of *mec-3* alter cell migration and axonal morphology in *C. elegans*." BMC Dev Biol **1**: 2.
- Troemel, E. R., J. H. Chou, et al. (1995). "Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*." Cell **83**(2): 207-18.
- V**
- Vanderslice, R. and D. Hirsh (1976). "Temperature-sensitive zygote defective mutants of *Caenorhabditis elegans*." Dev Biol **49**(1): 236-49.
- Vastenhouw, N. L., K. Brunschwig, et al. (2006). "Gene expression: long-term gene silencing by RNAi." Nature **442**(7105): 882.
- Vazquez, D. (1974). "Inhibitors of protein synthesis." FEBS Lett **40**(0): suppl:S63-84.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Villeneuve, A. (2003). Les zoonoses dues aux nématodes. Les zoonoses parasitaires. L'infection chez les animaux et chez l'homme. M. I. p. d. I. U. d. Montréal.

Viney, M. E. and J. B. Lok (2007). "*Strongyloides* spp." WormBook: 1-15.

Vogel, B. E. and E. M. Hedgecock (2001). "Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions." Development **128**(6): 883-94.

W

Wagner, E. F., T. A. Stewart, et al. (1981). "The human beta-globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(8): 5016-20.

Wagner, T. E., P. C. Hoppe, et al. (1981). "Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(10): 6376-80.

Walden R. and W. R. (1995). "Gene-transfer and plant-regeneration techniques." Trends in Biotechnology **13**: 324-331.

Waldron, C., E. B. Murphy, et al. (1985). "Resistance to hygromycin B: A new marker for plant transformation studies." Plant Mol Biol **5**: 103-108.

Walker, V. K. (1990). Gene transfer in insects. Advances in cell culture. K. Maramorosch, Academic Press. **7**: 87-124.

Waterston, R. H. (1981). "A second informational suppressor, SUP-7 X, in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **97**(2): 307-25.

Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature **420**(6915): 520-62.

Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature **171**(4356): 737-8.

Way, J. C. and M. Chalfie (1988). "*mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*." Cell **54**(1): 5-16.

Wenick, A. S. and O. Hobert (2004). "Genomic *cis*-regulatory architecture and *trans*-acting regulators of a single interneuron-specific gene battery in *C. elegans*." Dev Cell **6** (6): 757-70.

White, J. G., D. G. Albertson, et al. (1978). "Connectivity changes in a class of motoneurone during the development of a nematode." Nature **271**(5647): 764-6.

White, J. G., E. Southgate, et al. (1988). Appendix 2. Neuroanatomy. The nematode *Caenorhabditis elegans*. W. B. Wood and The Community of *C. elegans* Researchers, CSH Press: 433-455.

- White, J. G., E. Southgate, et al. (1986). "The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*." Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences **314**(1165): 1-340.
- Wigler, M., R. Sweet, et al. (1979). "Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes." Cell **16**(4): 777-85.
- Williams, B. D. (1995). "Genetic mapping with polymorphic sequence-tagged sites." Methods Cell Biol **48**: 81-96.
- Williams, D. C., T. Boulin, et al. (2005). "Characterization of *Mos1*-mediated mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*: a method for the rapid identification of mutated genes." Genetics **169**(3): 1779-85.
- Wilm, T., P. Demel, et al. (1999). "Ballistic transformation of *Caenorhabditis elegans*." Gene **229**(1-2): 31-5.
- Wittlieb, J., K. Khalturin, et al. (2006). "Transgenic *Hydra* allow *in vivo* tracking of individual stem cells during morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6208-11.
- Wold, B., M. Wigler, et al. (1979). "Introduction and expression of a rabbit beta-globin gene in mouse fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5684-8.
- Wurst, W., J. Rossant, et al. (1995). "A large-scale gene-trap screen for insertional mutations in developmentally regulated genes in mice." Genetics **139**(2): 889-99.
- X**
- Xu, T. and G. M. Rubin (1993). "Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues." Development **117**(4): 1223-37.
- Y**
- Yeung, P. K. (2000). "Transgenic antithrombin III (Genzyme)." IDrugs **3**(6): 669-73.
- Yin, X. J., H. S. Lee, et al. (2008). "Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein." Biol Reprod **78**(3): 425-31.
- Yochem, J., L. R. Bell, et al. (2004). "The identities of *sym-2*, *sym-3* and *sym-4*, three genes that are synthetically lethal with *mec-8* in *Caenorhabditis elegans*." Genetics **168**(3): 1293-306.
- Yochem, J., T. Gu, et al. (1998). "A new marker for mosaic analysis in *Caenorhabditis elegans* indicates a fusion between *hyp6* and *hyp7*, two major components of the hypodermis." Genetics **149**(3): 1323-34.

Z

Zhao, Z., T. J. Boyle, et al. (2008). "Comparative analysis of embryonic cell lineage between *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **314**(1): 93-9.

Zhao, Z., S. Flibotte, et al. (2010). "New tools for investigating the comparative biology of *Caenorhabditis briggsae* and *C. elegans*." *Genetics* **184**(3): 853-63.

Zhu, Z., L. He, et al. (1985). "Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758)." *Journal of Applied Ichthyology* **1**(1): 31-34.

Annexes

Annexe 1 : Liste complète des souches et lignées de nématodes

Souche	Espèce
N2	<i>Caenorhabditis elegans</i>
AF16	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
PS312	<i>Pristionchus pacificus</i>
DF5006	<i>Rhabditella axei</i>
DF5012	<i>Rhabditoides regina</i>
Lignées	
<i>C. elegans</i>	Génotype
CB907	<i>dpy-5(e907)/dpy-5(e907) I</i>
DP38	<i>unc-119(ed3)/unc-119(ed3) III</i>
EN5271	<i>kr5271/kr5271 I</i>
EN5273	<i>kr5273/kr5273 X</i>
BC8949	<i>dpy-5(e907)/dpy-5(e907) I ; sEx2909[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pCeh361 ; C.e gDNA]</i>
BC8950	<i>dpy-5(e907)/dpy-5(e907) I ; sEx2910[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pCeh361 ; C.e gDNA]</i>
BC8951	<i>dpy-5(e907)/dpy-5(e907) I ; sEx2911[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pCeh361 ; C.e gDNA]</i>
DUD0001	<i>N2 ; dudEx01[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i>]</i>
DUD0002	<i>N2 ; dudEx02[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i>]</i>
DUD0003	<i>N2 ; dudEx03[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i>]</i>
DUD0004	<i>N2 ; dudEx04[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i>]</i>
DUD0007	<i>N2 ; dudEx07[pDD04neo ρmec-7::<i>gfp</i> ; pRF4]</i>
DUD0008	<i>N2 ; dudEx08[pDD04neo ρmec-7::<i>gfp</i> ; pRF4]</i>
DUD0009	<i>N2 ; dudEx09[pDD04neo ρmec-7::<i>gfp</i> ; pRF4]</i>
DUD0010	<i>N2 ; dudEx10[pDD04neo ρmec-7::<i>gfp</i> ; pRF4]</i>
DUD0011	<i>N2 ; dudEx11[pDD04neo ρmec-7::<i>gfp</i> ; pRF4]</i>
DUD0012	<i>unc-119(ed3)/unc-119(ed3) III ; dudEx12[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pdestDD03]</i>
DUD0013	<i>unc-119(ed3)/unc-119(ed3) III ; dudEx13[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pdestDD03]</i>
DUD0014	<i>unc-119(ed3)/unc-119(ed3) III ; dudEx14[pDD04neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pdestDD03]</i>
DUD0015	<i>kr5273/kr5273 X ; dudEx15[pRG5273neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0016	<i>kr5273/kr5273 X ; dudEx16[pRG5273neo ρmyo-2::<i>gfp</i> ; pCB101 ; pJL44]</i>

Lignées**C. elegans****Génotype**

DUD0017	<i>kr5273/kr5273 X ; dudEx17[pRG5273neo ρmyo-2::gfp ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0018	<i>kr5273/kr5273 X ; dudEx18[pRG5273neo ρmyo-2::gfp ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0019	<i>kr5273/kr5273 X ; dudEx19[pRG5273neo ρmyo-2::gfp ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0020	<i>kr5273/kr5273 X ; dudEx20[pRG5273neo ρmyo-2::gfp ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0021	<i>kr5271/kr5271 I ; dudEx21[pRG5271neo ρmyo-2::gfp ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0022	<i>kr5271/kr5271 I ; dudEx22[pRG5271neo ρmyo-2::gfp ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0023	<i>kr5271/kr5271 I ; dudEx23[pRG5271neo ρmyo-2::gfp ; pCB101 ; pJL44]</i>
DUD0024	<i>dudSi01[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0025	<i>dudSi02[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0026	<i>dudSi03[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0027	<i>dudSi04[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0028	<i>dudSi05[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0029	<i>dudSi06[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] I</i>
DUD0030	<i>dudSi07[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] I</i>
DUD0033	<i>N2 ; dudEx25[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0034	<i>N2 ; dudEx26[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0035	<i>N2 ; dudEx27[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0036	<i>N2 ; dudEx28[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0037	<i>N2 ; dudEx29[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0038	<i>N2 ; dudEx30[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0039	<i>N2 ; dudEx31[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0040	<i>N2 ; dudEx32[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0041	<i>N2 ; dudEx33[pAK062puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0042	<i>N2 ; dudEx34[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0043	<i>N2 ; dudEx35[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0044	<i>N2 ; dudEx36[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0045	<i>N2 ; dudEx37[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0046	<i>N2 ; dudEx38[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0047	<i>N2 ; dudEx39[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0048	<i>N2 ; dudEx40[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0049	<i>N2 ; dudEx41[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0050	<i>N2 ; dudEx42[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>

Lignées***C. elegans*****Génotype**

DUD0051	<i>N2 ; dudEx43[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0052	<i>N2 ; dudEx44[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0053	<i>N2 ; dudEx45[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0054	<i>N2 ; dudEx46[pSAS318puro ; pdestDD04neo ; C.e gDNA]</i>
DUD0055	<i>dudSi09[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0056	<i>dudIs01[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] ?</i>
DUD0057	<i>dudSi10[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0058	<i>dudSi11[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0059	<i>dudSi12[ρmyo-2::gfp ; ρrps-27::neo::3'UTR unc-54] X</i>
DUD0060	<i>N2 ; dudEx47[pRG01 ; pdestDD04neo ; pRF4]</i>

Lignées***C. briggsae*****Génotype**

DUD0005	<i>AF16 ; dudEx05[pDD04neo ρmyo-2::gfp ; C.b gDNA]</i>
DUD0006	<i>AF16 ; dudEx06[pDD04neo ρmyo-2::gfp ; C.b gDNA]</i>

Annexe 2 : Liste des plasmides

Plasmide	Description
<i>pdestDD04neo</i>	<i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> ; <i>attR4::ccdB::Cm::attL1::gfp::3'UTR unc-54</i> vecteur de destination pour l'insertion d'un promoteur en amont de la GFP ; confère la résistance au G-418
<i>pDD04neo p_{myo-2::gfp}</i>	<i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> ; <i>p_{myo-2::gfp}</i> ; confère la résistance au G-418 et l'expression de la GFP dans le pharynx
<i>pDD04neo p_{mec-7::gfp}</i>	<i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> ; <i>p_{mec-7::gfp}</i> ; confère la résistance au G-418 et l'expression de la GFP dans les neurones sensoriels du toucher
<i>pRG01</i>	<i>p_{rps-27::neo::gfp::3'UTR unc-54}</i> ; confère l'expression de la GFP dans toutes les cellules
<i>pRG5271neo</i>	vecteur matrice de réparation pour les insertions au locus <i>kr5271</i> ; il porte le transgène <i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> comme marqueur de co-insertion et un site de clonage (SalI, EcoRI, XmaI, SmaI)
<i>pdestRG5271neo</i>	vecteur matrice de réparation pour les insertions au locus <i>kr5271</i> ; il porte le transgène <i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> comme marqueur de co-insertion et <i>attR4::ccdB::Cm::attL1::gfp::3'UTR unc-54</i> pour l'introduction d'un promoteur en amont de la GFP, tous les deux flanqués par les régions homologues
<i>pRG5271neo p_{myo-2::gfp}</i>	vecteur matrice de réparation pour l'insertion du transgène <i>p_{myo-2::gfp}</i> au locus <i>kr5271</i> ; il porte le transgène <i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> comme marqueur de co-insertion
<i>pRG5273neo</i>	vecteur matrice de réparation pour les insertions au locus <i>kr5273</i> ; il porte le transgène <i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> comme marqueur de co-insertion et un site de clonage (XhoI, EcoRV, XmaI, SmaI)
<i>pdestRG5273neo</i>	vecteur matrice de réparation pour les insertions au locus <i>kr5273</i> ; il porte le transgène <i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> comme marqueur de co-insertion et <i>attR4::ccdB::Cm::attL1::gfp::3'UTR unc-54</i> pour l'introduction d'un promoteur en amont de la GFP, tous les deux flanqués par les régions homologues
<i>pRG5273neo p_{myo-2::gfp}</i>	vecteur matrice de réparation pour l'insertion du transgène <i>p_{myo-2::gfp}</i> au locus <i>kr5273</i> ; il porte le transgène <i>p_{rps-27::neo::3'UTR unc-54}</i> comme marqueur de co-insertion
<i>pAK062</i>	<i>p_{ttx-3::gfp::3'UTR unc-54}</i> ; confère l'expression de la GFP dans les interneurons AIY
<i>pAK062puro</i>	<i>p_{ttx-3::puro::gfp::3'UTR unc-54}</i> ; confère l'expression de la protéine fusion Puro::GFP dans les interneurons AIY
<i>pSAS318</i>	<i>p_{gcy-8::Tagrfp::3'UTR unc-54}</i> ; confère l'expression de la TagRFP dans les neurones AFD
<i>pSAS318puro</i>	<i>p_{gcy-8::puro::Tagrfp::3'UTR unc-54}</i> ; confère l'expression de la protéine fusion Puro::TagRFP dans les neurones AFD

Plasmide	Description
<i>pCB101</i>	<i>p_{rgef-1}::DsRed2::3'UTR unc-54</i> ; confère l'expression de la DsRed2 dans le système nerveux
<i>pJL43</i>	<i>p_{glh-2}::transposase</i> ; confère l'expression de la transposase dans la lignée germinale (Bessereau et al. 2001)
<i>pJL44</i>	<i>p_{hsp16-48}::transposase</i> ; confère l'expression de la transposase suite à un choc thermique (Bessereau et al. 2001)
<i>pCeh361</i>	<i>dpy-5(+)</i> ; sauve le phénotype Dpy de la lignée CB907 par complémentation génique (Thacker et al. 2006)
<i>pdestDD03</i>	<i>unc-119(+)</i> ; <i>attR4::ccdB::Cm::attR2</i> ; sauve le phénotype Unc de la lignée DP38 par complémentation génique (Dupuy et al. 2004)
<i>pBCN22-R4-R3</i>	<i>p_{rpl-28}::puro::3'UTR let-858</i> ; <i>attR3::ccdB::Cm::attR4</i> ; <i>p_{myo-2}::mCherry::3'UTR unc-54</i> confère la résistance à la puromycine et l'expression de la mCherry dans le pharynx (Semple et al. 2010)

Annexe 3 : Liste des amorces

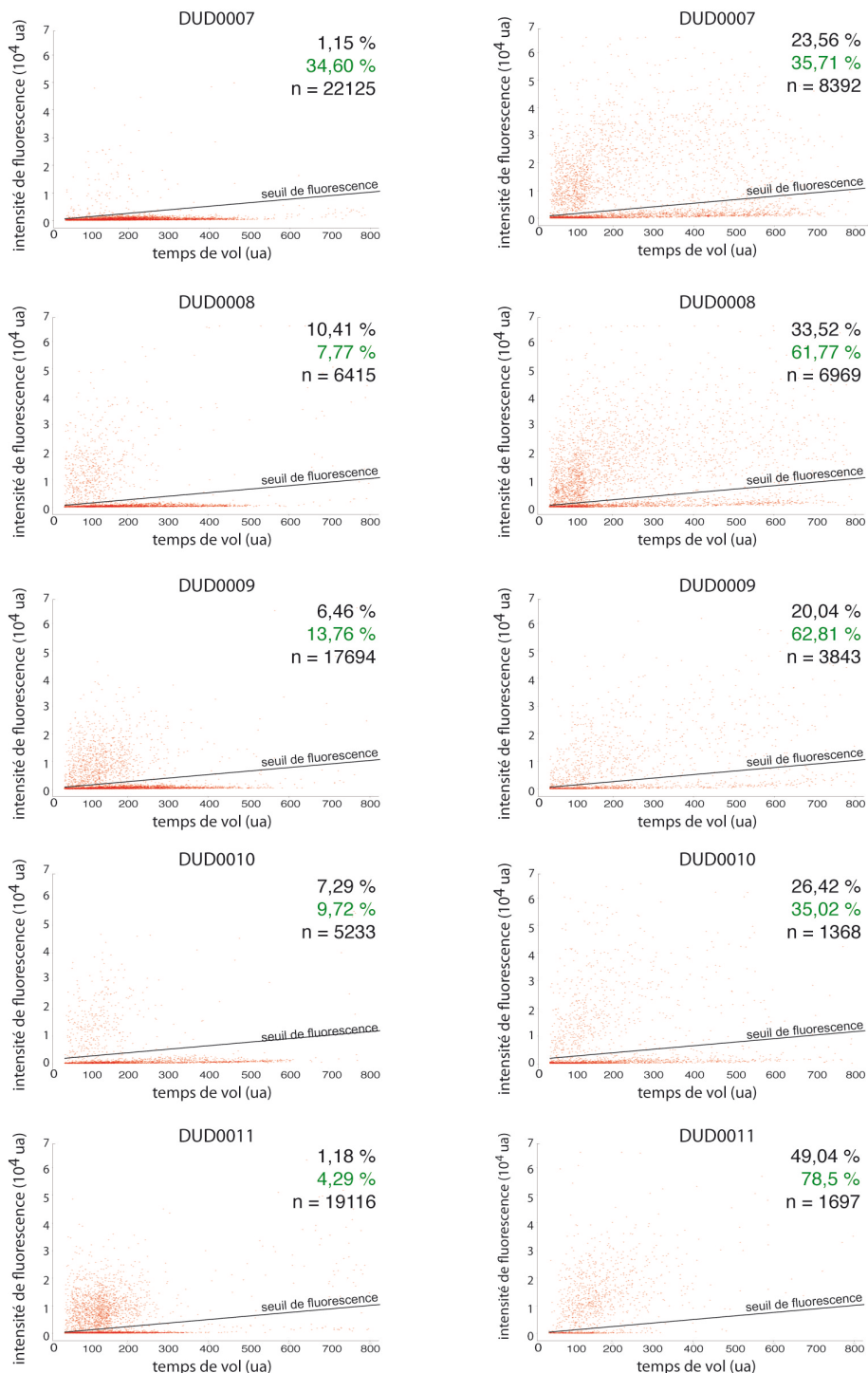
Amorce	Séquence 5'->3' (site de restriction en gras)	Enzyme de restriction
M13 F	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	
M13 R	CAGGAAACAGCTATGACCATG	
oVR266	GACAAAGACGTGTAGTTGCG	
oVR261	GAAATAGAGGGCAGTTCAACG	
oJL115	GCTCAATTCGCGCCAAACTATG	
Rps-27 fwd	TTA AGGGCCC ATTTCTAAATTTTAGTTTAATA	ApaI
Prs-27 rev	GTGCAATCCATCTTGTTCAATCATTTTTATTCCACTTGTGAGC	
Neo fwd	GCTCAACAAGTGGAAATAAAAATGATTGAACAAGATGGATTGCAC	
Neo rev	ATGTTGAAGAGTAATTGGACTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAA	
utr fwd	TTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCCAATTACTCTTCAACAT	
UTRrev2	TTA CTCGAG AAACAGTTATGTTTGGTATATTGGGAATG	XhoI
PdestDD fwd	TTA AGGGCCC TTGGATCCTCTAGAGCGGCCGC	ApaI
PdestDD rev-2	TTA AGGGCCC AAAGCTGGTACCGGTCCGGAATT	ApaI
iz51	ATGAGTAAAGGAGAAGAACT	
iz52	CTATTTGTATAGTTCATCCA	
org89	GTTAGTCTCAAAACTCGTATTA	
org98	CGGG GTACCA ATTTTCATACCTTAAACTCC	KpnI
org99	CGGCG GGGCC TATATATATATATATTTCC	ApaI
org102	CGGG GTACCG TATTATAATTCCAAAAACACAG	KpnI
org103	CTA GGGCC CGTCAATTGAGTGACGAGGC	ApaI
org109	GGCGGCCGCTACCTGATTGATTCTGTCAG	
org110	GGGGATCCAAGCTTCGATGATCCAGCTGCAGGTTCCAC	
org111	CG CCCCGGG TAGATTACATCAAGCTCAAG	SmaI
org112	TCTTATAT GCGGCCG CGGATGATGGGCATCGTCACTC	NotI
org113	TCTTATAT GCGGCCG CCGGGACAAGAAGACATGATCG	NotI
org114	CG CCCCGGG TATATATATATTGGGATGCAC	SmaI
org115	AGGTTCGACGGTATCGATAAGC	
org119	GACTCACTATAGGGCGAATTGG	
org120	TTAAACTAAAATTTAGAAATGG	
org145	GTCGGAGGGAACAGGGAATG	
org146	GGGACGCATGATGACGTTCCC	
org172	TCCC CCCGGG ATGACCGAGTACAAGCCCAC	XhoI

Amorce	Séquence 5'->3' (site de restriction en gras)	Enzyme de restriction
org173	CC GGTACCT TGGCACCGGGCTTGCGGGTC	KpnI
org174	CCATGGAACAGGTAGTTTTCCAGT	
org175	TTGATTCTCATGGTCTGGGTGCCC	
org177	CCC AAGCTT ATTTCTAAATTTTAGTTTAA	HindIII
org178	GG GGTACCT TGAAGAACTCGTCAAGAAGGC	KpnI
org225	CGTAATGTTCCGCAATCGTG	

Amorces pour qPCR

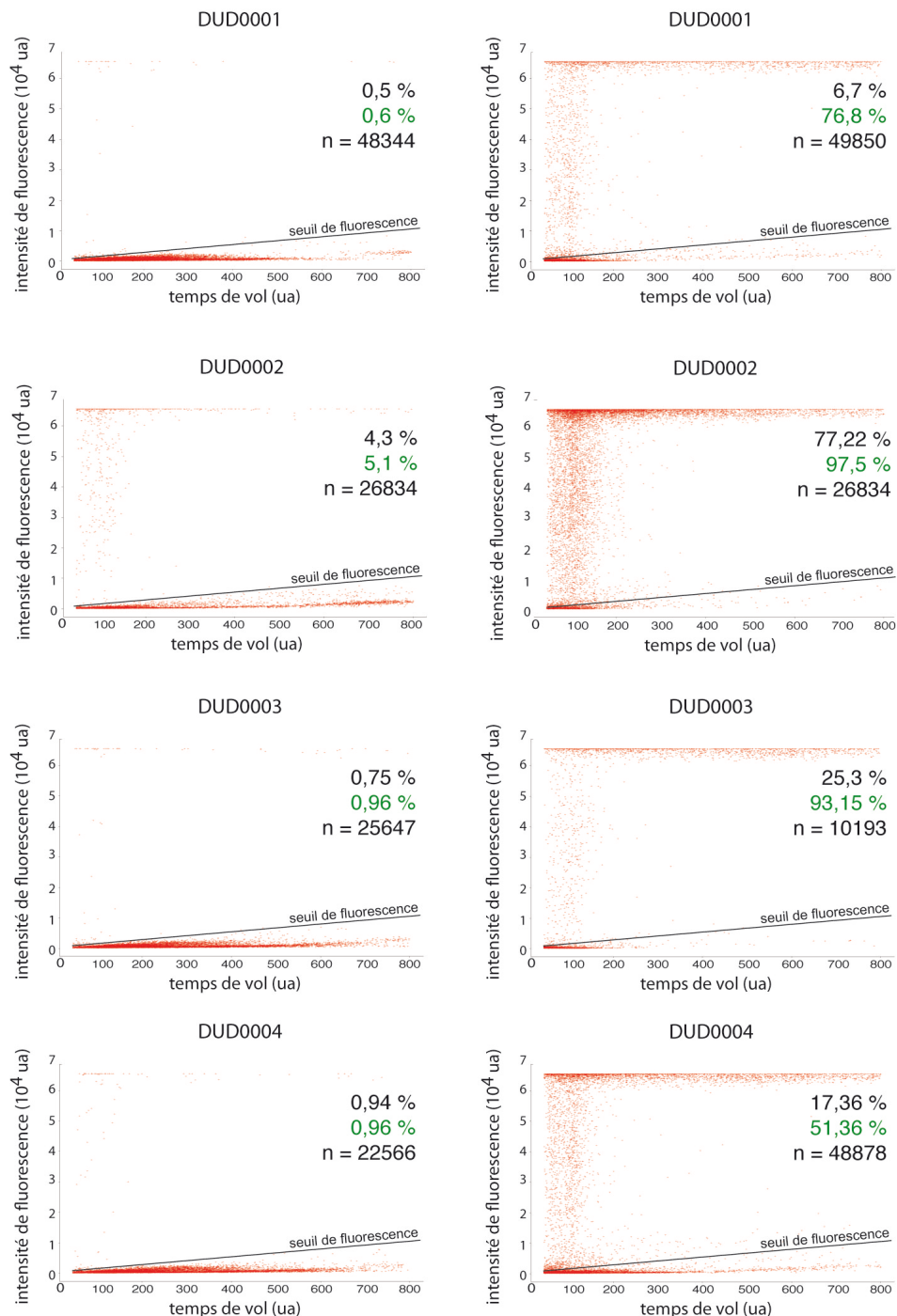
Gène	Séquence des amorces 5'->3'
<i>neo</i>	GGATCTCGTCGTGACCCATG
	ATCCAGAAAAGCGGCCATT
<i>gfp</i>	TCCTTTTACCAGACAACCATTACCT
	GTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTTT
<i>unc-119</i>	ACAAAAAATGCGGGAGAAGAGA
	CCGAACACCCCTGGTTCATA
71L	TTCGGAACAATTTGAAGCATTG
	AAATGCCATGCAAGATAAGTGAAG
73R	CCAATGCACCCACAGCTAAA
	GGGTCCACGTCATGAATCCTT

Annexe 4 : Analyse de populations des lignées DUD0007 à DUD0011 au COPAS Biosort



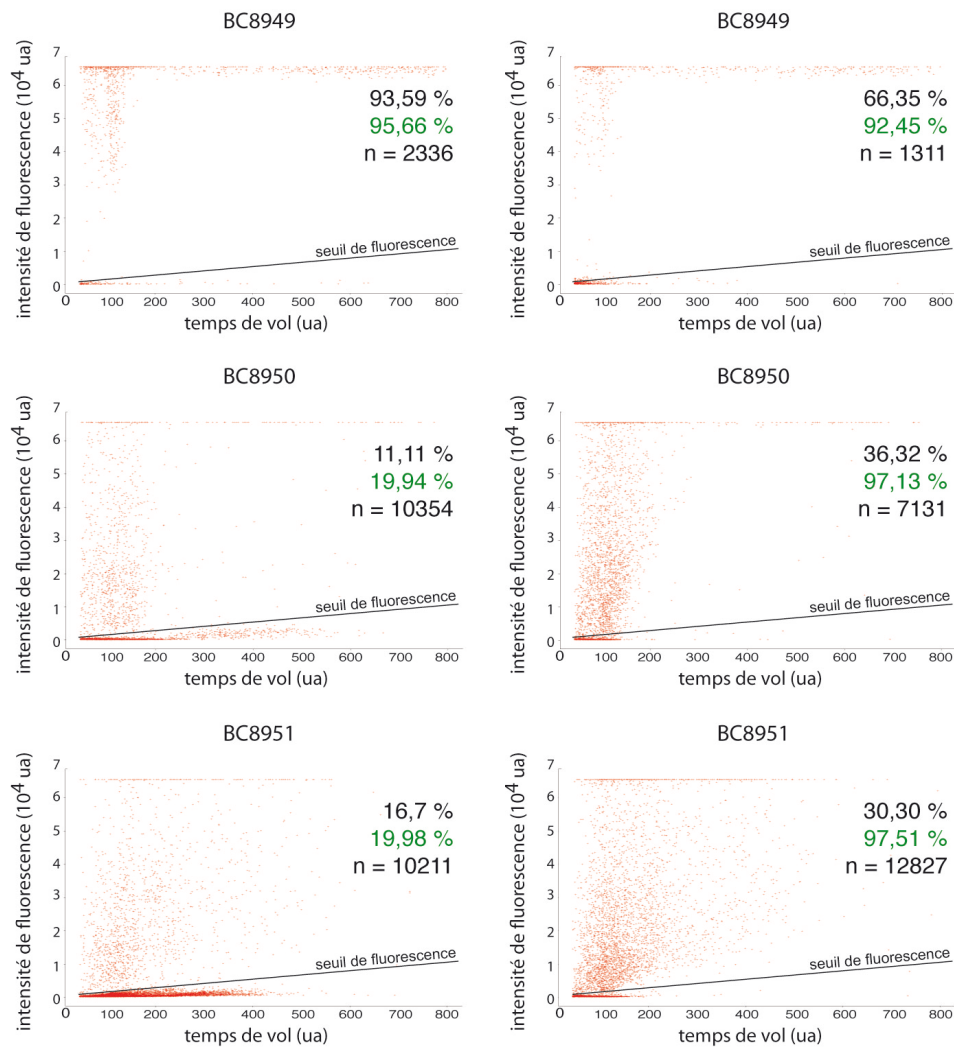
Exemples d'analyses de populations des lignées de *C. elegans* portant le transgène $p_{mec-7}::gfp$, cultivées sur du milieu NGM contrôle (à gauche) ou sur du milieu sélectif (à droite). Le pourcentage d'individus transgéniques dans la population totale est marqué en haut à droite en noir. Le pourcentage d'individus transgéniques L2 à adultes (avec un temps de vol supérieur à 150) est marqué en vert. n : nombre d'individus analysés. Ici, analyse de populations contenues dans des boîtes de 6 cm de diamètre.

Annexe 5 : Analyse de populations des lignées DUD0001 à DUD0004 au COPAS Biosort



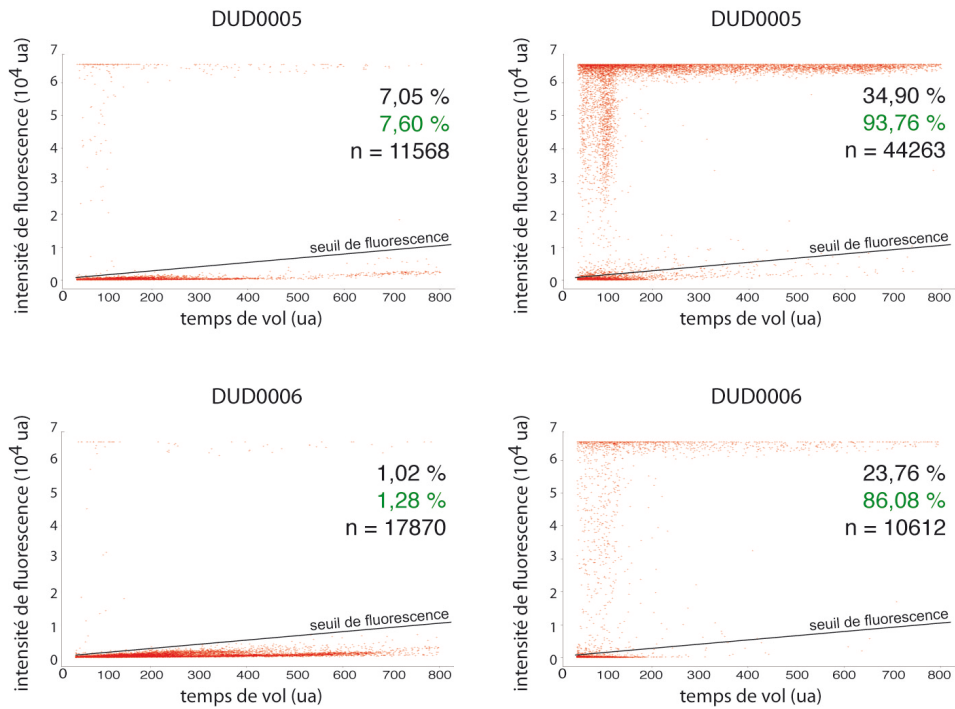
Exemples d'analyses de populations des lignées de *C. elegans* portant le transgène $p_{myo-2}::gfp$ dans un concatémère extrachromosomique répétitif, cultivées sur du milieu NGM contrôle (à gauche) ou sur du milieu sélectif (à droite). Le pourcentage d'individus transgéniques dans la population totale est marqué en haut à droite en noir. Le pourcentage d'individus transgéniques L2 à adultes (avec un temps de vol supérieur à 150) est marqué en vert. n : nombre d'individus analysés. Ici, analyse de populations contenues dans des boîtes de 9 cm de diamètre.

Annexe 6 : Analyse de populations des lignées BC8949 à BC8951 au COPAS Biosort



Exemples d'analyses de populations des lignées de *C. elegans* portant le transgène *pmyo-2::gfp* dans un concatémère chromosomique complexe, cultivées sur du milieu NGM contrôle (à gauche) ou sur du milieu sélectif (à droite). Le pourcentage d'individus transgéniques dans la population totale est marqué en haut à droite en noir. Le pourcentage d'individus transgéniques L2 à adultes (avec un temps de vol supérieur à 150) est marqué en vert. n : nombre d'individus analysés. Ici, analyse de populations contenues dans des boîtes de 6 cm de diamètre.

Annexe 7 : Analyse de populations des lignées DUD0005 et DUD0006 au COPAS Biosort



Exemples d'analyses de populations des lignées de *C. briggsae* portant le transgène *pmyo-2::gfp* dans un concatémère extrachromosomique complexe, cultivées sur du milieu NGM contrôle (à gauche) ou sur du milieu sélectif (à droite). Le pourcentage d'individus transgéniques dans la population totale est marqué en haut à droite en noir. Le pourcentage d'individus transgéniques L2 à adultes (avec un temps de vol supérieur à 150) est marqué en vert. n : nombre d'individus analysés. Ici, analyse de populations contenues dans des boîtes de 9 cm de diamètre.

Annexe 8 : News and Views

C. elegans select

The technical toolkit for *Caenorhabditis elegans* expands to include experimental selection using antibiotic resistance genes.

Helen M Chamberlin, Nat Methods. 2010 Sep;7(9):693-5.

C. elegans select

Helen M Chamberlin

The technical toolkit for *Caenorhabditis elegans* expands to include experimental selection using antibiotic resistance genes.

Genetic selection systems that use antibiotics in combination with antibiotic resistance genes are the workhorse of any molecular biology laboratory. These flexible tools allow stringent, conditional selection of experimentally manipulated individuals. Until now, however, their broad application has been limited to studies in single-cell organisms, cultured cells and plants. New work reported in Semple *et al.*¹ and Giordano-Santini *et al.*² in this issue of *Nature Methods* applies these selection systems to *C. elegans* and related nematodes, adding this powerful method to the *C. elegans* molecular biology toolkit^{1,2}.

Introduction of experimental DNA into cells to produce stably transmitted transgenes is an essential tool to incorporate new or modified genes into research organisms or to otherwise manipulate their genomes.

In *C. elegans*, transgenes can be rapidly produced by injection of experimental DNA (such as plasmid DNA) directly into the gonad of a parental worm³. In the offspring, the injected DNA is assembled into large, extrachromosomal arrays by recombination. Conveniently, the transgenic arrays can incorporate representatives of any DNAs included in an injected mixture, bypassing the need to covalently link the experimental DNA to other reporter DNA included as a transformation positive control. These arrays are replicated and transmitted through mitosis and meiosis in a semistable manner in the worm, even without the inclusion of chromosomal features such as telomere or centromere sequences in the injected DNA.

Although the relative ease with which these *C. elegans* multicopy extrachromosomal transgenes can be produced has led

to their widespread use, there are substantial limitations. These include the fact that the multiple copies of the experimental gene will express in unpredictable—frequently excessive—amounts. Additionally, expression from the transgenes can be silenced or induce cosuppression (silencing of homologous gene sequences on the chromosome), especially in the germline^{4,5}. Furthermore, injected marker systems used to identify the transgenes can be identified visually but generally do not provide ‘selection’ strategies in which non-transgene-bearing worms do not survive. When selection is incorporated, the system requires introduction of specific *C. elegans* mutations into the genetic background of an experimental strain, limiting the use of such strategies in large-scale experiments and in non-*C. elegans* nematodes.

Some of these shortcomings have been recently addressed by the optimization of methodology for integration of a single-copy transgene into a chromosomal locus, using a transposon excision and repair strategy⁶. Although this method addresses the problems of transgene expression amount and silencing that arise from multiple gene copies, it is still constrained by the selection marker systems available for *C. elegans*.

Enter Semple *et al.*¹ and Giordano-Santini *et al.*², to provide the missing piece of the puzzle. These groups turned to antibiotic resistance gene systems that are widely used in eukaryotic cells (such as yeast and cultured cells) to expand the transgenic marker selection systems available for *C. elegans*. They show that worms with constitutive expression of antibiotic resistance genes (*PuroR* or *NeoR*) are healthy and that the gene expression confers resistance to drug concentrations (puromycin or G-418), which will otherwise kill the worms. Notably, Semple *et al.*¹ bypass a problem encountered in the past by other researchers (the relative inaccessibility of cells in intact worms to externally administered antibiotic, necessitating large treatment doses) by including small amounts of detergent when they subjected worms to drug selection. Both groups also show that their selection systems are

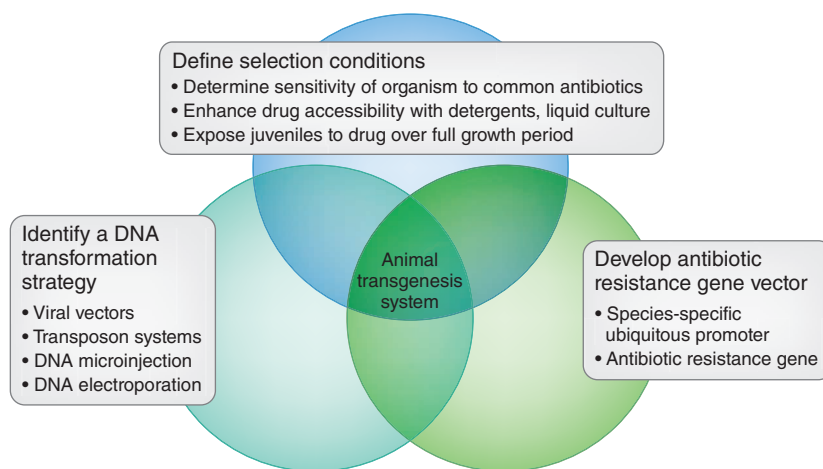


Figure 1 | Developing animal transgenesis methods. The selection approach of Semple *et al.*¹ and Giordano-Santini *et al.*² combined with identification of species-appropriate DNA transformation strategies yields a general scheme to develop a transgenic system for experimental animals.

Helen M. Chamberlin is at the Department of Molecular Genetics, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA. e-mail: chamberlin.27@osu.edu

responsive with a single copy of the antibiotic resistance gene and work with the transposon excision-and-repair method. This results in a streamlined single-copy, integrated transgene system that benefits from the strict conditionality and flexibility of antibiotic selection.

The benefits of the described antibiotic selection systems extend beyond the single-copy transgene application. Indeed, when the systems are used as the markers to maintain traditional extrachromosomal transgenes, they result in populations of worms that retain the transgene at essentially 100% frequency, improving the reproducibility and consistency of experiments carried out with these traditional transgenes. They can also be used with other nematode species that lack the full genetic toolbox of *C. elegans*. Both groups show the selection system works in the related *C. briggsae*, and Giordano-Santini *et al.*² demonstrate G-418 sensitivity in various nematode species.

An exciting prospect for the work is its definition of a methodological approach that might be applied to many invertebrate experimental animals (Fig. 1). The use of an antibiotic resistance system means that a detailed genetic analysis is not required before developing transgenesis methods for an experimental species. Consequently, the work uncovers a long-term opportunity for pan-species transgenesis in comparative studies of gene function and gene evolution.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The author declares no competing financial interests.

1. Semple, J. *et al.* *Nat. Methods* **7**, 725–727 (2010).
2. Giordano-Santini, R. *et al.* *Nat. Methods* **7**, 721–723 (2010).
3. Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. *EMBO J.* **10**, 3959–3970 (1991).
4. Kelly, W.G., Xu, S., Montgomery, M.K. & Fire, A. *Genetics* **146**, 227–238 (1997).
5. Dernburg, A.F., Zalevsky, J., Colaiácovo, M.P. & Villeneuve, A.M. *Genes Dev.* **14**, 1578–1583 (2000).
6. Frøkjær-Jensen, C. *et al.* *Nat. Genet.* **40**, 1375–1383 (2008).

short or long, micrometer-diameter pillars spaced by a few micrometers so that mesenchymal stem cells (MSCs)—which are about 10 micrometers in diameter in suspension—could adhere to the tops of many pillars all at once.

MSCs are adult stem cells that can be obtained from many human tissues and can be induced to differentiate into cells that express markers for various solid mesenchymal tissues such as fat, muscle, cartilage and bone. Empirically established cocktails of soluble factors, when added to cultured MSCs, will stimulate them to differentiate over days to weeks into select lineages. Adhesion to plastic culture dishes is the usual means by which MSCs are separated from tissues, and these cells must adhere in order to survive and differentiate in culture. However, MSCs will certainly attach to other substrates, and some physical properties of the substrate seem to affect how the cells respond, with wider implications for how cells in general respond to soluble factors, including drugs.

In their work, Chen and colleagues adsorbed the extracellular matrix molecule fibronectin to the flat tops of the pillars so that cell membrane adhesion receptors could engage the pillars, but such cell attachment does not stop at the cell membrane. Receptors that mediate adhesion are quickly linked to the actin cytoskeleton, which also contains highly active myosin similar to that found in muscle. What this means is that cells adhere and pull in a manner similar to someone grabbing and lifting a barbell. If the pillars are long, a cell pulls with relative ease and deflects the tops of posts by many micrometers, whereas if the pillars are short, then the cell cannot deflect the tops of posts very much at all. For insight, grab a plastic ruler with a hand at either end; you will find it rather easy to bend, but if you bring your hands closer together (say by a factor of ten) then the ruler will be harder to bend to the same extent (in fact, 1,000-fold more force is needed). Arrays of long pillars are therefore effectively equivalent to a soft substrate, perhaps as soft as fat, whereas arrays of short pillars might be perceived by cells as effectively stiff or rigid like bone (Fig. 1).

Past work with various gels of different elasticity had indeed shown that matrix elasticity can direct lineage specification of stem cells. Very soft gels that mimic brain tissue tend to be inductive for neuronal genes^{2,3}, whereas an intermediate elasticity

Stem cells feel the difference

Amnon Buxboim & Dennis E Discher

Arrays of microposts of different heights generate substrates with different flexibility, on which cells can be grown.

Fat is softer than bone, and mimicking this difference with flexible substrates has been observed to influence the differentiation of adult stem cells. In this issue of *Nature Methods*, Chen and co-workers have made dense arrays of various-flexibility pillars for cells to adhere on top of and show that the potency of soluble factors that induce either fat or bone depends on pillar flexibility¹.

Cells lack eyes to see differences in substrates, but they do possess tactile mechanisms that allow them to feel differences. Using a silicone rubber material commonly used to caulk the gaps between tile and tub and using methods for micro-molding widely adapted from the computer industry for lab-on-a-chip microfluidics, Chen and co-workers made arrays of

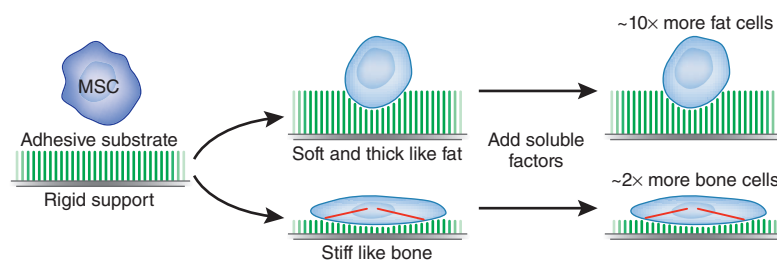


Figure 1 | Adherent stem cells need to attach to a solid substrate to survive, but whether the cells attach to a substrate that is soft or one that is stiff can influence differentiation.

Amnon Buxboim and Dennis E. Discher are at the University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA. e-mail: discher@seas.upenn.edu

Annexe 9 : Article

An antibiotic selection marker for nematode transgenesis

Rosina Giordano-Santini, Stuart Milstein, Nenad Svrzikapa, Domena Tu, Robert Johnsen, David Baillie , Marc Vidal & Denis Dupuy

Nat Methods. 2010 Sep;7(9):721-3. Epub 2010 Aug 22.

An antibiotic selection marker for nematode transgenesis

Rosina Giordano-Santini¹, Stuart Milstein²⁻⁴, Nenad Svrzikapa²⁻⁴, Domena Tu⁵, Robert Johnsen⁵, David Baillie⁵, Marc Vidal²⁻⁴ & Denis Dupuy¹

We have developed a nematode transformation vector carrying the bacterial neomycin resistance gene (*NeoR*) and shown that it could confer resistance to G-418 on both wild-type *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. This selection system allows hands-off maintenance and enrichment of transgenic worms carrying non-integrated transgenes on selective plates. We also show that this marker can be used for Mos1-mediated single-copy insertion in wild-type genetic backgrounds (MosSCI-biotic).

Antibiotic-resistance genes are commonly used as markers to monitor the introduction of exogenous genetic material into cells. Although they are widely used for genetic manipulation of cultured eukaryotic cells, yeast and bacteria¹, antibiotic selection systems have not so far been used for nematode transgenesis. Most genetic markers for nematode transgenesis have been based on easy-to-score phenotypes²⁻⁵. With a few exceptions^{3,5}, these markers do not provide a selective advantage, making the enrichment and maintenance of a transgenic population time-consuming. Moreover, with the exception of fluorescence-based methods, these systems rely on the use of mutant strains that are scarce in nematode species other than *C. elegans*⁶⁻⁸.

We tested five nematode species and found that they were sensitive to G-418, a drug that inhibits protein synthesis in eukaryotes

and prokaryotes and that is commonly used as a selective agent for eukaryotic cells¹. Young larvae were more sensitive to G-418 than adults, probably because they are more dependent on their protein synthesis machinery for development. For each species, we determined a critical G-418 concentration, corresponding to the optimal selective conditions, at which young larvae were unable to develop and died after a few days, whereas young adults lived and were able to lay eggs (Fig. 1a).

We developed nematode transformation vectors carrying *NeoR* under the control of the ubiquitous promoter of *C. elegans* ribosomal protein gene *rps-27* (Fig. 1b,c). *NeoR* is widely used to confer resistance to G-418 to eukaryotic cells¹. We injected wild-type *C. elegans* and *C. briggsae* with pDD04Neo also carrying the fluorescent reporter *C.e. pmyo-2::gfp*. We then placed single injected P₀ parents onto nematode growth medium plates containing G-418 at the critical concentration (selective plates) and allowed them to lay eggs at 20 °C. After 3 or 4 d, we screened plates for F₁ adults and we isolated them onto selective plates. We obtained several independent extrachromosomal G-418-resistant lines for both species. It was possible to identify at a glance plates from the F₁ generation in which transmission of the array occurred, as only transgenic worms could give rise to mixed-stage populations of worms. These results showed that pDD04Neo confers resistance to G-418 on wild-type *C. elegans* and *C. briggsae* and allows hands-off selection of transgenic worms in the presence of the drug. To facilitate cloning experiments, we designed pdestDD04Neo (Fig. 1b) as a destination vector

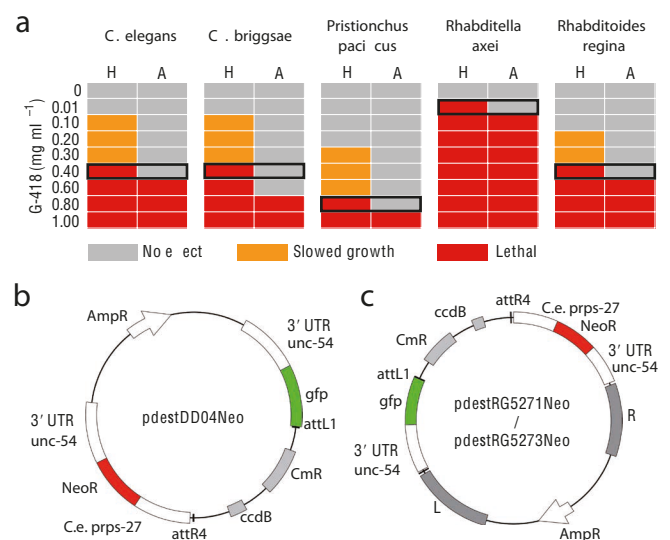
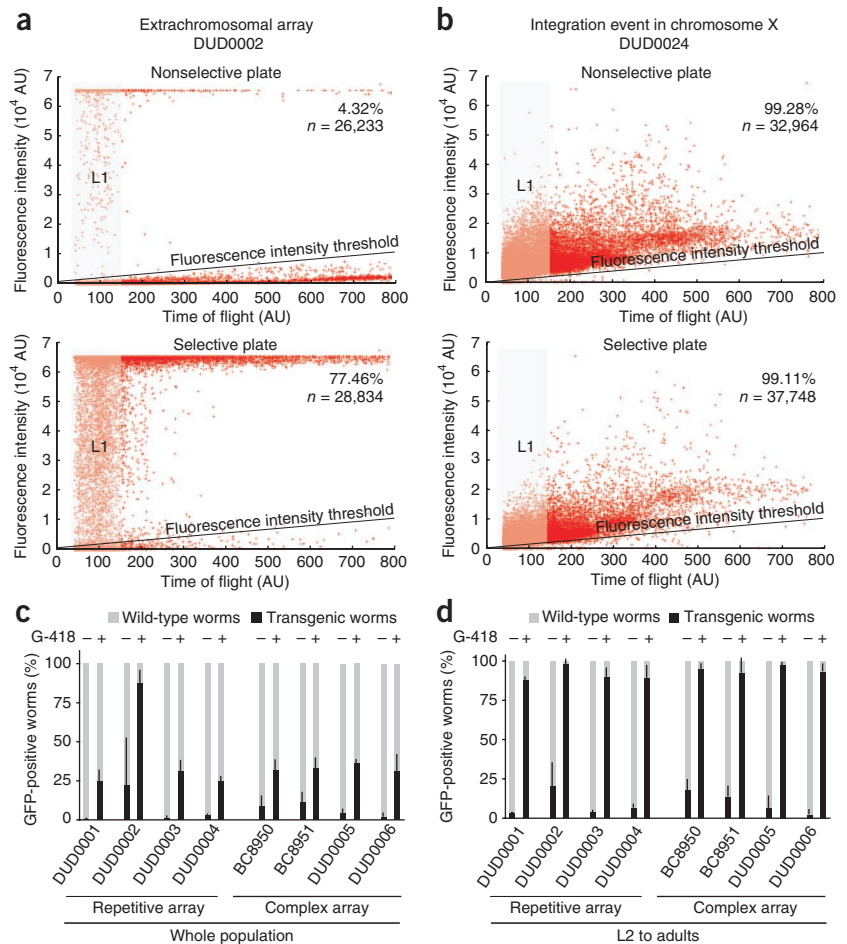


Figure 1 | NeoR as a genetic marker for nematode transgenesis.

(a) Sensitivity of wild-type nematodes to G-418. Gravid adults (A) or hatchlings (H) were placed on selective plates with the indicated drug concentrations and growth was monitored for 1 month. Black frames indicate critical concentrations that were lethal for larvae but not for adults. (b) The pdestDD04Neo vector carries the bacterial neomycin resistance gene (*NeoR*) under the control of the *C. elegans* *rps-27* promoter. (c) The pdestRG5271Neo and pdestRG5273Neo MosSCI-biotic destination vectors carry the *NeoR* selection cassette and a Promoterome-compatible Gateway cassette upstream of *gfp* both flanked by homologous regions corresponding to the left (L) and right (R) flanking sides of the Mos-1 insertion site of strains EN5271 and EN5273, respectively.

¹Genome Regulation and Evolution, INSERM U869, Institut Européen de Chimie et Biologie, Pessac, France. ²Center for Cancer Systems Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA. ³Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA. ⁴Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ⁵Department of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada. Correspondence should be addressed to D.D. (d.dupuy@iecb.u-bordeaux.fr).

Figure 2 | Enrichment of NeoR transgenic lines in the presence of G-418. **(a,b)** Scatter plots from COPAS Profiler sorting of transgenic populations grown on nonselective (top) or selective (bottom) plates for a line carrying a repetitive extrachromosomal array **(a, DUD0002)** or a single-copy insertion of the transgene on chromosome X **(b, DUD0024)**. Each data point represents one worm; fluorescence intensity in arbitrary units (AU) is plotted against time of flight (that is, the number of data points collected by the sensor, which is proportional to the size of the worms). The indicated fluorescence intensity threshold separates transgenic from wild-type worms. The percentage of GFP-positive worms relative to the total population and the total number of worms analyzed are shown. **(c,d)** Percentage of enrichment of NeoR transgenic worms. The percentage of GFP-positive worms for the indicated strains are plotted (black bars). They are calculated relative to the whole analyzed population ($n \approx 5,000$ worms; **c**) or population excluding L1 larvae on the basis of size **(d)**. Error bars, s.d.; $n = 3$.



for introducing promoters from the Promoterome resource⁹ upstream of *gfp*¹⁰.

To assess the enrichment we could achieve using *NeoR*, we grew extrachromosomal G-418-resistant lines of *C. elegans* and *C. briggsae* on selective plates. Just before starvation, we measured the percentage of transgenic worms in the populations, on the basis of GFP expression, using a COPAS Profiler (a fluorescence-assisted nematode sorter, Union Biometrica) (**Fig. 2**). When worms were grown on nonselective plates, transgenic worms represented 6.82% of the total population on average owing to the instability of the array³ (**Fig. 2c**). When worms were grown at the critical G-418 concentration, the mean enrichment percentage reached 37.68% (three independent experiments with six *C. elegans* and two *C. briggsae* stable lines each). As the sorter also counted arrested or dead wild-type larvae, this value underestimates the actual enrichment. When we calculated enrichment percentages excluding L1 larvae on the basis of size, worms expressing GFP represented 93.09% of worms from L2 to adults, on average (**Fig. 2d**). The percentage of transgenic worms could reach up to 99.5% and was independent of species and transmission rate. We also carried out preliminary selection experiments in liquid medium (M9 buffer), in which we obtained 25–125-fold enrichment of transgenic worms, after a 1:10,000 dilution with wild-type worms, in one generation (4 d) (**Supplementary Table 1**). To our knowledge, this is the first evidence of a nematode transformation marker allowing near-perfect enrichment of non-integrated transgenic populations.

We obtained G-418-resistant lines by injection of either circular pDD04Neo_{pmyo-2::gfp} (yielding transgenic worms with repetitive extrachromosomal arrays) or a complex mixture of linear plasmid and digested conspecific genomic DNA (yielding transgenic worms with complex extrachromosomal arrays). Some progeny of *C. elegans* lines with repetitive extrachromosomal

arrays showed germline morphological defects and lower fertility even in the absence of the drug (data not shown), although the lines could still be efficiently propagated on selective plates over many generations without manual maintenance. This phenotype is unlikely to be a side effect of the expression of *NeoR* itself as extrachromosomal arrays are silenced in the germline³. Conversely, silencing of the pDD04neo array might lead to a co-suppression effect¹¹. This hypothesis is supported by the observation that both *C. elegans* and *C. briggsae* NeoR transgenic lines carrying complex arrays did not show this phenotype. Array composition did not have an effect on the efficiency of G-418 selection (**Fig. 2c,d**).

In the course of this work we have maintained more than 12 strains on selective media for several months without observing any adverse effect on the resistant worms other than the accumulation of dead eggs and arrested larvae due to the instability of the extrachromosomal array. There is no indication that G-418 causes harm to non-mosaic transgenic worms that are properly protected by the transgene. However it remains possible that the presence of G-418 in the medium affects the outcome of certain types of experiment. For such cases the use of integrated lines or preselected resistant individuals should overcome the problem.

To test whether this selection system was compatible with the recently described Mos1-mediated single-copy insertion method (MosSCI)¹², we selected two strains with an intergenic Mos1 insertion (EN5271, EN5273). For each of them we built a repair template vector containing the *NeoR* cassette and a *pmyo-2::gfp* transgene between ~1.4 kb of homologous chromosomal DNA from each

flanking side of the *Mos1* element insertion site, as described¹² (Fig. 1c). We co-injected these vectors together with a vector encoding a transposase under the control of a heat-shock promoter (pJL44) and a vector carrying *p_{rgef-1}::DsRed2* (pCB101). As expected, the obtained extrachromosomal array strains were resistant to G-418 and expressed GFP in the pharynx and *DsRed2* in the nervous system. After exposing the worms to heat shock¹³, we allowed their progeny to proliferate and screened for integration events by identifying G-418-resistant individuals that expressed GFP in the pharynx and did not express *DsRed2* (ref. 12). We confirmed insertion events by PCR (Supplementary Fig. 1) and checked that the worms carried a single copy of the inserted transgene by quantitative PCR (qPCR) (Supplementary Figs. 2 and 3). Thus, we demonstrated that our antibiotic selection system could be used in the context of *MosSCI* (Fig. 2b). This combined *MosSCI*-biotic method can be used directly on any strain from the NemaGENETAG¹⁴ collection without the need to introduce a mutant *unc-119*, which is typically used as a co-insertion marker for *MosSCI*, into the genetic background¹² (Supplementary Table 2).

Another commonly used method for *C. elegans* transformation is microparticle bombardment³. We did not succeed in using G-418 selection with this technique as clear-cut selection cannot be obtained in excessive crowding conditions and ballistic transformation requires a very large population of target worms.

Antibiotic selection has several advantages over commonly used nematode transformation markers. First, rescue of nonlethal mutations such as *unc-119* or *dpy-5* requires the use of specific mutant backgrounds^{3,4} that might not be appropriate for some biological studies; by contrast, antibiotic resistance can be used with any genetic background including transgenic or mutant strains of interest. Second, maintenance and enrichment of non-integrated transgenic lines using existing markers is done by manually picking transgenic worms. This process is time consuming and may limit experiments that need many transgenic worms.

It is also possible that antibiotic resistance markers might prove useful for nematodes other than *C. elegans* and *C. briggsae*. Commonly used markers rely on mutant strains or dominant alleles, which are not always available for other nematode species, although some genes such as *C.e.rol-6(su-1006)* and *C. elegans* fluorescent reporters have been shown to work in other *Caenorhabditis* species⁸. Although many efforts have been made to apply *C. elegans* transgenesis methods to other species, the lack of a convenient selection system remains a limitation for comparative and evolutionary studies^{6–8}. Here we have shown that five nematode species are sensitive to G-418; it should therefore be possible to use a common G-418 resistance marker for transgenesis in other species as well.

Finally, the use of antibiotic resistance markers for nematode transgenesis can be expanded to other drugs¹⁵, which should enable the development of a wide range of powerful applications.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Methods website.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by the Program INSERM "Avenir" (D.D.), la Fondation Bettencourt-Schueller (D.D.), le Conseil Régional d'Aquitaine (D.D.), la Fondation pour la Recherche Médicale (D.D.), Natural Science and Engineering Research Council of Canada (D.B.) and le Ministère Français de l'Enseignement de la Recherche et des Technologies (R.G.-S.). We thank I.A. Hope, J. Ewbanks and J.L. Bessereau for discussions and access to facilities; and T. Leste-Lasserre and G. Drut for discussion about qPCR. EN5271 and EN5273 and *MosSCI* related plasmids were provided by J.L. Bessereau (INSERM U1024, Institute of Biology of the École Normale Supérieure). The *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the National Center for Research Resources of the US National Institutes of Health, provided the nematode species.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.M. and N.S. performed preliminary experiments under the supervision of M.V. D.D. designed and supervised the project and constructed the pDD04neo vector with N.S. Microinjections were performed by R.G.-S. and D.T. under the supervision of D.D., D.B. and R.J. R.G.-S. constructed *MosSCI*-biotic related vectors, characterized the transgenic worms and wrote the manuscript with D.D.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

- Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. & Garapin, A.C. *J. Mol. Biol.* **150**, 1–14 (1981).
- Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D. & Ambros, V. *EMBO J.* **10**, 3959–3970 (1991).
- Praitis, V., Casey, E., Collar, D. & Austin, J. *Genetics* **157**, 1217–1226 (2001).
- Thacker, C., Sheps, J.A. & Rose, A.M. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1193–1204 (2006).
- Granato, M., Schnabel, H. & Schnabel, R. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1762–1763 (1994).
- Schlager, B., Wang, X., Braach, G. & Sommer, R.J. *Genesis* **47**, 300–304 (2009).
- Zhao, Z. *et al. Genetics* **184**, 853–863 (2010).
- Streit, A. *et al. Genetics* **152**, 1573–1584 (1999).
- Dupuy, D. *et al. Genome Res.* **14**, 2169–2175 (2004).
- Fire, A., Kondo, K. & Waterston, R. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4269–4270 (1990).
- Dernburg, A.F., Zalevsky, J., Colaïcovo, M.P. & Villeneuve, A.M. *Genes Dev.* **14**, 1578–1583 (2000).
- Frokjaer-Jensen, C. *et al. Nat. Genet.* **40**, 1375–1383 (2008).
- Robert, V.J., Katic, I. & Bessereau, J.L. *Methods* **49**, 263–269 (2009).
- Bazopoulou, D. & Tavernarakis, N. *Genetica* **137**, 39–46 (2009).
- Semple, J.I., Garcia-Verdugo, R. & Lehner, B. *Nat. Methods* advance online publication, doi:10.1038/nmeth.1495 (22 August 2010).

Annexe 10 : Communication

Antibiotic markers for rapid selection and easy maintenance of transgenic nematodes

Rosina Giordano-Santini, Jennifer Semple, Denis Dupuy and Ben Lehner

THE WORM BREEDER'S GAZETTE VOLUME 18 NUMBER 2 | JUNE 2010

Antibiotic markers for rapid selection and easy maintenance of transgenic nematodes

Rosina Giordano-Santini¹, Jennifer Semple², Denis Dupuy¹ and Ben Lehner^{2,3}

¹Genome Regulation and Evolution, Inserm Unit 869, and Institut Européen de Chimie et Biologie, Bordeaux, France, ²EMBL-CRG Systems Biology Unit, Barcelona, Spain, ³ICREA, CRG, UPF, Barcelona, Spain

Correspondence to: Denis Dupuy (d.dupuy@iecb.u-bordeaux.fr), Ben Lehner (ben.lehner@crg.es)

C. elegans transgenes are usually maintained as unstable extrachromosomal arrays, requiring the manual picking of animals using visible markers. This can be laborious and limiting for some assays. To overcome these shortcomings, our two groups independently developed methods for using antibiotic selection in *C. elegans*. We developed nematode transformation vectors carrying antibiotic resistance genes (Neomycin and Puromycin, respectively) and found that they could be used as very efficient selection markers. Selection can be performed in both liquid media and on agar plates, and has no obvious effect on phenotype. The two selection systems allow hands-off maintenance and enrichment of non-integrated transgenic animals, as well as isolation of MosSCI-generated single copy integrants. No particular genetic background is needed and both selection protocols also work in *C. briggsae*. We hope therefore that the approach will be useful to many worm biologists, including those working on species other than *C. elegans*. To our knowledge this is the first time that antibiotic resistance markers have been successfully used in whole animals, and so the approach may open up opportunities for research using other 'non-model' organisms.

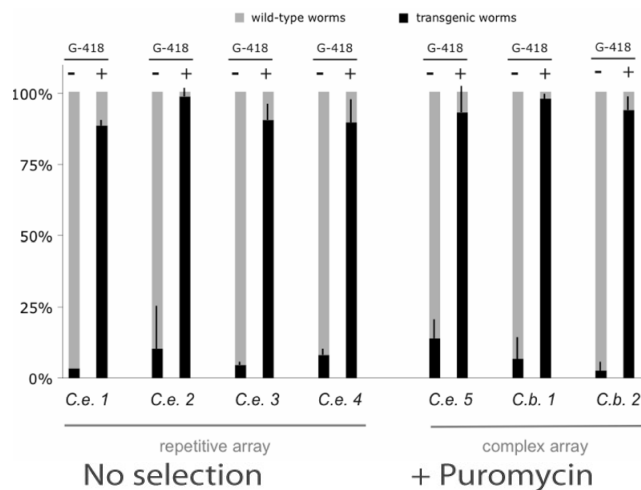


Figure 1: Hands-off enrichment of neomycin-resistant transgenic animals on G-418-NGM plates. For four *C. elegans* repetitive array lines (C.e. 1 to 4) and 3 complex array lines C.e. 5 and *C. briggsae* (C.b.) 1 and 2, the proportion of GFP positive is measured, using COPAS, after expansion from three transgenic adults, for ~5,000 animals excluding L1 that can be arrested non-resistant animals.

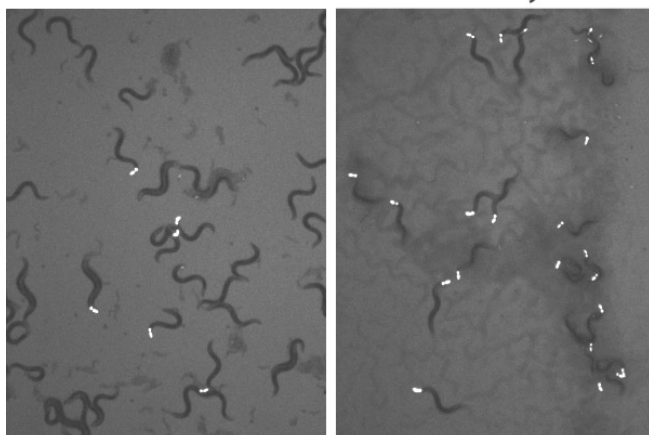


Figure 2: *C. elegans* L1 larvae carrying an extrachromosomal array with the puromycin resistance gene and a *Pmyo-2::mCherry* pharyngeal marker were cultured in liquid NGM in the absence (left) or presence (right) of puromycin. After 4 days the worms were plated on non-selective seeded NGM plates and the surviving worms photographed two days later.

Annexe 11 : Revue scientifique

Selectable genetic markers for nematode transgenesis

Rosina Giordano-Santini, Denis Dupuy

Cell Mol Life Sci. 2011 Jun;68(11):1917-27

Selectable genetic markers for nematode transgenesis

Rosina Giordano-Santini · Denis Dupuy

Received: 27 January 2011 / Revised: 3 March 2011 / Accepted: 10 March 2011
© Springer Basel AG 2011

Abstract The nematode *Caenorhabditis elegans* has been used to study genetics and development since the mid-1970s. Over the years, the arsenal of techniques employed in this field has grown steadily in parallel with the number of researchers using this model. Since the introduction of *C. elegans* transgenesis, nearly 20 years ago, this system has been extensively used in areas such as rescue experiments, gene expression studies, and protein localization. The completion of the *C. elegans* genome sequence paved the way for genome-wide studies requiring higher throughput and improved scalability than provided by traditional genetic markers. The development of antibiotic selection systems for nematode transgenesis addresses these requirements and opens the possibility to apply transgenesis to investigate biological functions in other nematode species for which no genetic markers had been developed to date.

Keywords *Caenorhabditis elegans* · Nematodes · Antibiotics · Transgenesis · Genetics · Model organisms

Introduction

Since Sydney Brenner deliberately chose *Caenorhabditis elegans* as a simple multicellular eukaryotic model organism [1], the number of researchers using this model has steadily grown. Over the past four decades, the worm has become a powerful system with which to study a large

spectrum of biological processes in many fields, such as genetics, development, aging, neurobiology, immunology, and evolution [2]. The success of *C. elegans* is due to favorable characteristics with respect to laboratory study (including small size, 3 day life cycle, self-fertilization, several hundred progeny, ease of cultivation, and cryopreservation), a completely sequenced genome, and last but not least, the ease of DNA transformation. Since its development in the 1980s [3], DNA transformation of *C. elegans* has proven to be an extremely powerful tool to study gene function in the nematode, and it rapidly became an invaluable technique of *C. elegans* research.

C. elegans transgenesis: what for?

Transgenesis of *C. elegans* has been widely used for various purposes: to validate gene function by rescuing a mutant phenotype using a wild-type copy of the DNA [4–6], to study gene expression patterns without the need to obtain specific antibodies [7–11], to interfere with biological processes by overexpression or ectopic expression of wild-type or mutant genes [9], to analyze the site of gene action by mosaic analysis [12, 13], and also to screen for regulatory promoter sequences using a promoter-trap approach [14]. With the introduction of the green fluorescent protein (GFP) in 1994 [10], *C. elegans* transgenesis gained in popularity and found new applications [15]. The animal's transparency and thin diameter (70 µm) allow the direct visualization of GFP and GFP variants in live animals. As a result, some otherwise tedious studies became easier to achieve, for example, the study of gene expression patterns in living animals [16, 17], the localization of proteins to specific cells and subcellular compartments [18–20], and the study of spatial relationships of individual

R. Giordano-Santini · D. Dupuy (✉)
Genome Regulation and Evolution, Inserm U869,
Université de Bordeaux, Institut Européen de Chimie et Biologie
(IECB), 2, rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France
e-mail: d.dupuy@iecb.u-bordeaux.fr

cells [21], an achievement only previously possible through electron-micrograph reconstructions [22]. After the completion of the *C. elegans* genome sequence [23], large-scale projects also benefited from reporter genes and the ease of *C. elegans* transgenesis. The generation of hundreds of reporter gene fusions also allowed the analysis of DNA sequences and gene expression patterns at a genomic scale [24–27]. In short, transgenesis is an indispensable tool for almost every study of *C. elegans* biology.

C. elegans transgenesis: how?

Stable transformation of *C. elegans* was first achieved by microinjection of the DNA of interest into the syncytial gonad of the hermaphrodite [3, 28]. Exogenous DNA (plasmid or PCR product) is directly introduced into the cytoplasm of the germline. Then, as individual oocytes separate from the syncytium, it is incorporated into fertilized eggs. The exogenous DNA undergoes intermolecular ligation leading to the formation of tandem repeats of about 80–300 plasmid copies, also referred to as multicopy extrachromosomal arrays [3, 28]. These arrays are semi-stable, thus displaying non-Mendelian segregation and leading to mosaic animals. An array that is transmitted to the F₂ generation is generally inherited by the following generations with a characteristic transmission rate ranging

from 10 to 90% [28] (Figs. 1, 2). It is also possible to inject the DNA of interest with high concentrations of single-stranded oligonucleotides containing 50 bases [28]. Oligonucleotides seem to promote integration of the plasmid into the genome in a random fashion, leading to stable integrated lines. However, integrants are obtained at low frequency ranging from 1 in 20 to 1 in 100 integrants per injected parent, making the technique relatively inefficient. Another variant consists of injecting the exogenous DNA directly into oocyte nuclei [29]. This technique combined with the use of poisonous DNA sequences that are lethal at high copy number leads to the formation of low-copy extra-chromosomal arrays or the random integration of a low-copy number of the transgene into the genome. Although strains obtained by this method are stable, injection into the nuclei of oocytes is technically difficult and integrants are obtained at a comparatively low frequency.

A second technique for *C. elegans* transgenesis, micro-particle bombardment [30, 31], was popularized about 10 years ago and is a relatively easy method for the generation of integrated lines. With the use of commercially available particle delivery systems, it is possible to bombard more than 100,000 worms at a time with DNA-coated beads. Transgenic animals are identified through *unc-119(ed3)* rescue, a gene marker that allows for the partial selection of transgenic animals in starvation conditions where mutants are dying due to their inability to enter the *Dauer* stage

Fig. 1 Comparison between traditional non-selectable genetic markers (*left*) and antibiotic resistance markers (*right*) in the context of microinjection. When visual phenotypic markers are used for nematode transgenesis by microinjection, transgenic F₁ worms need to be screened and isolated by hand by an experimentalist (*left*), while antibiotic selection offers the possibility of hands-off selection and maintenance of stable transgenic lines (*right*). In the case of antibiotic resistance markers, F₁ isolation by hand ensures clonal homogeneity of isolated strains, but further maintenance can be done by chunking without further visual screening as long as the animals are kept on antibiotic-containing medium. *In the presence of antibiotic, wild-type larvae are unable to develop and die after a few days

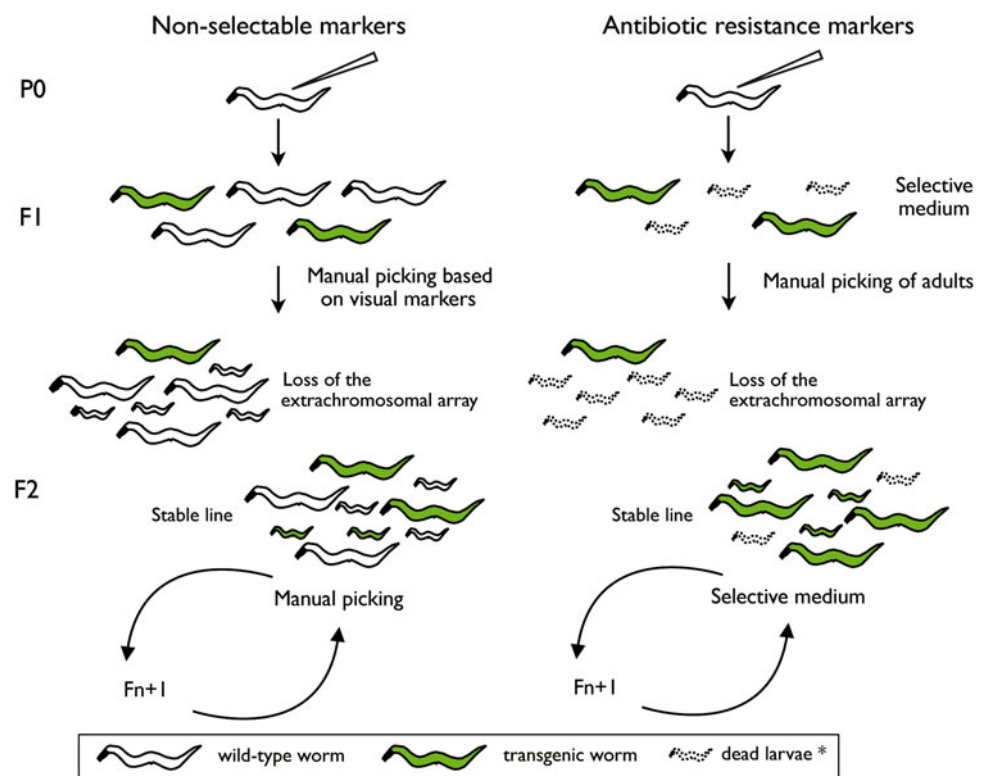
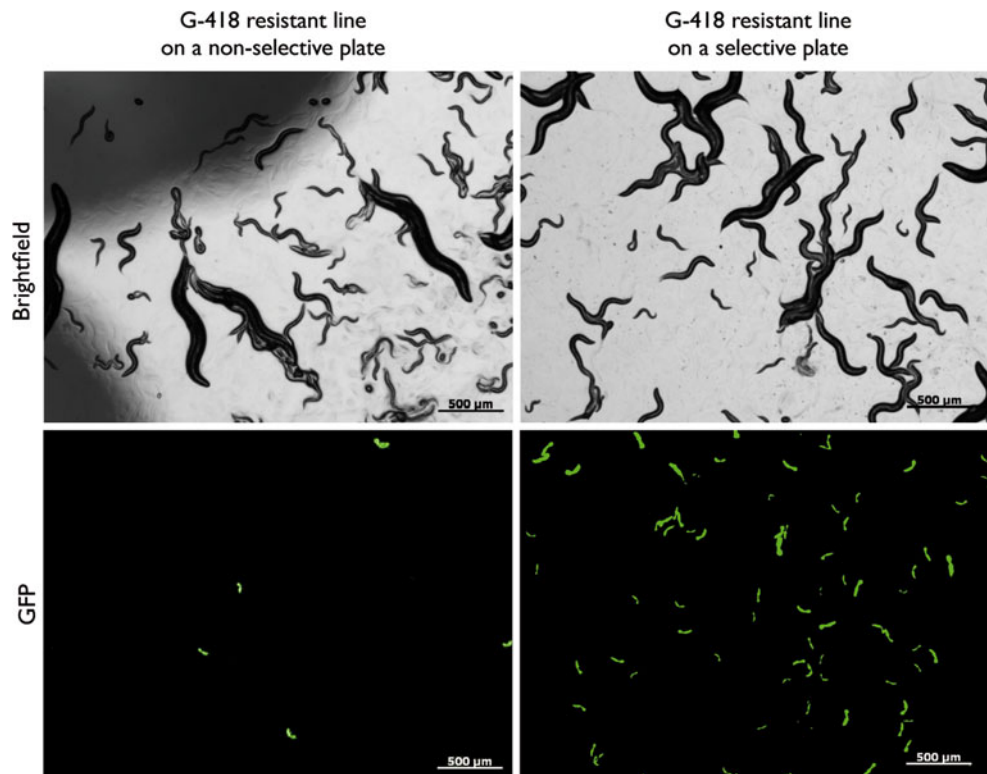


Fig. 2 Hands-off maintenance of an extrachromosomal *C. elegans* line on antibiotic-selective medium. An extrachromosomal *C. elegans* line carrying the NeoR nematode cassette and a $p_{myo-2}::gfp$ reporter (worms carrying $p_{myo-2}::gfp$ express GFP in the pharynx) amplified on a plate without G-418 (*left*) and on a plate supplemented with G-418 at the critical concentration (selective plate) (*right*). After several generations and in the absence of a selective agent, the extrachromosomal array is lost and transgenic animals are rare (*left*) while on selective plates wild-type worms are eliminated at the L1 stage and the transgenic population is enriched without manual maintenance



(worms in this state of diapause and dormancy are able to survive in starvation conditions) [32]. Transgenic worms obtained this way also carry extrachromosomal arrays, but random integration events are observed in around 1/4 to 1/8 of the transgenic lines thus obtained [26, 30]. These lines carry a lower copy number of the transgene than lines carrying extrachromosomal arrays.

C. elegans genetic markers

Three main issues arise during the establishment and analysis of transgenic *C. elegans*: (1) the identification of transformed animals in the F₁ generation, (2) the maintenance of nonintegrated transgenic lines, and (3) obtaining large numbers of transgenic animals to carry out further experiments. The identification of transformed animals is achieved by the use of transformation markers that are co-injected with the DNA of interest. Co-injected DNAs contribute to the extrachromosomal array in proportions relative to their concentration in the injection mix [28]. In the case of microparticle bombardment, the transgene and transformation marker are generally carried by the same plasmid [30]. Transformation markers belong to three different categories. The first group includes the rescue of nonlethal mutations by wild-type copies of the corresponding gene, such as rescue of *dpy-20(e1282ts)*, *dpy-5(e907)* (both Dumpy) [33, 34], *pha-1(e2123ts)*

(embryonic lethal at 25°C) [35], *lin-15(n765ts)* (multivulva at 22.5°C or higher temperatures) [36], and *unc-119(ed3)* (uncoordinated and unable to enter *Dauer* stage upon starvation) [32]. Secondly, there are dominant phenotype markers such as *unc-22* antisense DNA, which leads to lower mobility, twitching, and egg-laying defect [37], and *rol-6(su1006)*, a gain of function mutation that results in a right-hand roller phenotype [28]. The final category consists of fluorescent reporter constructs, such as *sur-5::gfp* (expresses GFP in all cell nuclei) [13] or *myo-2::gfp* (expresses GFP in the pharynx) [38]. All these genetic markers have their own relative advantages and limitations. Rescue of nonlethal mutations requires the use of specific mutant strains that are often more difficult to inject than wild-type animals. Dominant phenotype markers confer phenotypes that may interfere with subsequent experiments and may not be compatible with every mutant background. Finally, most transformation markers do not provide a selective advantage over the wild-type population, thus requiring hands-on maintenance of nonintegrated transgenic lines. A few exceptions to the latter are *pha-1* and *unc-119*, which allow a partial positive selection of transgenic animals. However, the selective capacity of *pha-1* is limited to specific temperatures [35, 36], and *unc-119* can only provide a selective advantage in starving conditions [30] (Table 1).

The limits of these selectable markers make most non-integrated lines unsuitable for experiments where a large

Table 1 Genetic markers for *C. elegans* transformation

Marker	Recipient strain	Selection	Picking	Final phenotype
Phenotypic rescue				
<i>unc-119</i> ^a	<i>unc-119 -/-</i>	Upon starvation*	Yes	Rescued*
<i>pha-1</i>	<i>pha-1 -/-</i>	Selective temperature*	No*	Rescued*
<i>dpy-5</i>	<i>dpy-5 -/-</i>	No	Yes	Rescued*
<i>dpy-20</i>	<i>dpy-20 -/-</i>	No	Yes	Rescued*
<i>lin-15</i>	<i>lin-15 -/-</i>	Selective temperature*	Yes	Rescued*
Dominant phenotype				
<i>unc-22</i>	<i>unc-22 wt</i>	No	Yes	Mutant
<i>rol-6</i> ^{a,b}	<i>rol-6 wt</i>	No	Yes	Mutant
Fluorescent markers				
<i>GFP</i> ^{a,b}	<i>GFP</i> -*	No	Yes	GFP +
Antibiotic resistance				
<i>NeoR</i> ^a	G-418 sensitive	+G-418*	No*	Wt or mutant ^{c*}
<i>PuroR</i> ^a	Puromycin sensitive	+Puromycin*	No*	Wt or mutant ^{c*}

Asterisks indicate advantageous features

^a Also amenable for *Caenorhabditis briggsae* transformation

^b Equivalent markers exist for *Pristionchus pacificus*

^c Antibiotic resistance markers do not rely on endogenous nematode genes, they can therefore be used on wild-type animals as well as any mutants of interest without changing the initial phenotype

number of transgenic worms is needed, for example, for protein purification [39]. Therefore, past researchers wanting to perform biochemistry on transgenic animals had to generate integrated transgenic lines.

Genomic integration of transgenes

The most popular technique to obtain integrated lines, apart from microparticle bombardment as mentioned above, is via mutagenesis-induced integration [40]. After exposure of nonintegrated lines to X-rays or gamma-rays, extrachromosomal arrays can be incorporated into the genome in a random fashion. However, as with all random integration events, there may be accompanying modifications of the expression of the array by genomic enhancers, a mutant phenotype may be caused by integration at a particular loci, and because other mutations can be introduced by the mutagenesis procedure, all integrants have to be backcrossed several times after integration, making the technique tedious and time-consuming.

A new method for transgene integration was recently developed that allows the insertion of a single copy of a transgene into a defined site [41]. This method, called *MosI*-mediated single-copy insertion (*MosSCI*), is based on the use of the fruit fly transposon *MosI* and its mobilization by a transposase (Fig. 3). Briefly, a *C. elegans* strain carrying a single insertion of *MosI* is injected with a transposase source, a repair template vector carrying the

transgene, and transformation markers for the identification of worms carrying the extrachromosomal array thus formed. The repair template is composed of the gene of interest and a co-insertion marker, both flanked by 1.5 kb of genomic DNA corresponding to the right and left sequences adjacent to the *MosI* insertion locus. After expression of the transposase, *MosI* excision creates a double-strand break in the genomic DNA that is repaired by gene conversion using the repair template in the extrachromosomal array, leading to the insertion of the gene of interest and the co-insertion marker into the genome. Insertion events can then be distinguished from nonintegrated transgenes by identifying animals expressing the co-insertion marker while lacking the transformation markers contained solely in the extrachromosomal array. Because the technique has been developed using *unc-119(ed3)* rescue as a co-insertion marker, the strains carrying the desired *MosI* insertion have to be previously crossed with *unc-119(ed3)* [41]. This method, therefore, is not suitable for cases where the *unc-119(ed3)* mutant background may interfere with the study or if the desired *MosI* insertion site is too close to the *unc-119* locus [42].

The creation of integrated lines, no matter the technique of choice, represents a laborious process. Most of the difficulties inherent in the generation of integrated transgenes in *C. elegans* can potentially be avoided if a transformation marker could provide a direct selective advantage when present in extrachromosomal arrays without requiring any specific genetic background.

Antibiotic markers

Antibiotics, combined with antibiotic resistance genes, have been widely used as genetic selection systems in transformation processes. Antibiotic selection was first developed for bacteria in the 1970s and rapidly proved its usefulness for molecular biologists [43]. Thanks to the availability of broad-spectrum antibiotics, this stringent selection system was expanded to simple eukaryotic model organisms, and although most antibiotic resistance genes are of bacterial origin, they were easily adapted to eukaryotes by using 3' and 5' untranslated regulatory sequences [44]. Indeed, antibiotic selection systems have been developed for yeast [45–48], mammalian and insect cells [49–54], plant cells [55–57], fungus [58–61], amoeba [62], and protozoans [63–66]. In 1985, Steller and Pirrotta [67] used the broad-spectrum antibiotic G-418 and its corresponding resistance gene to select transformed *Drosophila* larvae and thus demonstrated that it was also possible to expand antibiotic resistance to metazoans. The resistance gene was expressed under a drosophilid promoter, and the progeny of injected individuals were selected at the larval stage in the presence of food containing the antibiotic. At a concentration lethal for wild-type larvae, transformed larvae were able to grow as fast as untransformed individuals in the absence of the drug. This system was shown to be a fairly efficient method to avoid mass screening for transgenic individuals in *Drosophila* and inspired its use for nondrosophilid insect transformation. Attempts were made to use this system for three different species of mosquitos [68–70], a Mediterranean fruit fly, and a migratory locust [71] for which genetic markers were not available at the time. In all of these experiments, antibiotic selection highly reduced the size of the population to screen, and transgenic individuals could be found in the resistant pool. However, the presence of numerous false positives (nontransgenic resistant individuals) warranted verification of transformation events by molecular biology methods. Since conditions for a strict selection of transgenic insects could not be determined, the method was not further developed. Yet, this work demonstrated that antibiotic resistance markers provide a versatile transformation system compatible with metazoan transgenesis and allowing the elimination of most nontransformed individuals.

Antibiotic markers for *C. elegans*

As with other metazoans, nematodes are sensitive to broad-spectrum antibiotics, such as G-418, puromycin, and phleomycin [72, 73]. G-418 and puromycin interfere with the function of ribosomes and block protein synthesis in

eukaryotes and prokaryotes [51, 74], while phleomycin inhibits DNA synthesis, again both in eukaryotes and prokaryotes [75]. G-418 has been shown to be toxic to *C. elegans* in liquid and solid culture at concentrations higher than 0.1 mg/ml [72, 73]. As had already been shown in *Drosophila* [67], hatchlings are more sensitive to the drug than young adults, probably due to a higher dependency on their protein synthesis machinery for development. Accordingly, Giordano-Santini and co-workers defined a critical concentration of G-418 for solid culture (0.4 mg/ml), at which L1 larvae are unable to develop and die after a few days while young adults are unaffected and are able to lay eggs. Puromycin is also toxic to *C. elegans* both in liquid and solid culture, at concentrations similar to that of G-418 [73]. Finally, the sensitivity of *C. elegans* to phleomycin has so far only been shown in liquid culture and is relatively low, presumably because cells in intact worms are relatively inaccessible to the drug [73]. This finding is supported by the observation that the addition of mild detergents in liquid culture enhances nematode sensitivity to all three tested antibiotics [73].

Once sensitivity had been established, antibiotic resistance genes were adapted for their expression in *C. elegans* [72, 73]. Antibiotic resistance cassettes for nematodes are composed of three elements: (1) a strong endogenous promoter from a gene with an ubiquitous expression pattern, to allow for continuous gene expression in all tissues (this ensures the detoxification of every cell during development, regardless of the drug intake pathway), (2) the corresponding antibiotic resistance gene, and (3) an endogenous 3' untranslated region (UTR) to ensure efficient processing of transcripts and mRNA stability. Following this scheme, the puromycin *N*-acetyl-transferase (PuroR) and the aminoglycoside phosphotransferase 3'(II) (NeoR) genes, which detoxify puromycin and G-418 respectively, were put under the control of promoters for *C. elegans* ribosomal protein genes, *rpl-28* and *rps-27*, and included well characterized endogenous 3' UTR. *C. elegans* transformed with $p_{rpl-28}::PuroR::3' UTR let-858$ and $p_{rps-27}::NeoR::3' UTR unc-54$ are resistant to puromycin and G-418, respectively [72, 73]. Indeed, *C. elegans* carrying extrachromosomal arrays containing these cassettes as well as single copies of the genes are able to survive and proliferate in the presence of lethal concentrations of antibiotics. This procedure enables the use of antibiotic resistance cassettes as selection markers for nematode transgenesis [72, 73].

A stringent and convenient selection

When transforming *C. elegans* by microinjection, only a part of the F₁ progeny carries the exogenous DNA. The percentage of transgenic F₁ can vary depending on the

skills of the researcher, but rarely exceeds 20 transgenic F_1 per injected P_0 parent. Thus, when using nonselective transformation markers, large populations have to be screened under the dissecting microscope to look for transgenic individuals. Since extrachromosomal arrays are semi-stable, transgenic worms have to be manually selected under the microscope in order to maintain nonintegrated lines (Fig. 1).

By contrast, selection after microinjection of transgenic F_1 worms carrying antibiotic resistance cassettes can be done on NGM plates supplemented with antibiotic at the critical concentration (selective plates) (Fig. 1) [72]. In this condition, injected P_0 parents are able to lay eggs, and while wild-type L1 do not develop and die after a few days, transgenic L1 are able to reach adulthood. After isolation of adult F_1 onto new selective plates, it is possible to identify at a glance plates in which transmission of the array occurred, as only transgenic worms can give rise to mixed-stage populations. Similarly, nonintegrated lines can be easily maintained on selective plates without the need to manually pick transgenic individuals [72, 73]. They can be maintained endlessly by chunking from plate to plate when food is depleted. In short, antibiotic markers allow a clear-cut selection of transgenic F_1 and hands-off maintenance of nonintegrated lines (Table 1).

Antibiotic selection can thus be used to rapidly obtain large pure populations of transgenic worms as required for biological assays [72, 73]. Nonintegrated transgenic populations can be enriched in the presence of antibiotics in solid and liquid culture. On selective plates, it is possible to accumulate several generations until food depletion and obtain almost pure populations with all developmental stages from L2 to adults. Only arrested and dead wild-type L1 accumulate on these plates. It has been shown that enrichment of transgenic populations from L2 to adults can reach >93% on average, independent of the transmission rate [72]. Another method of enrichment is with selection in liquid medium from a mixed population of synchronized transgenic and wild-type L1. The selection process consists of a 4 day incubation in liquid NGM or M9 buffer supplemented with the corresponding antibiotic, in the presence or absence of food [73]. Because worms can be incubated at high densities (up to 50 worms per μ l), large transgenic populations can be obtained in cultures of a few milliliters in less than a week, without the need for sophisticated equipment or tedious manipulation. Enriched synchronized populations thus obtained can be transferred to nonselective plates for further experiments in cases where the presence of the antibiotic might interfere with experimental procedures. Selection of nonintegrated transgenic worms using antibiotic resistance has been shown to be as efficient as using integrated lines in the context of quantitative RT-PCR experiments

measuring the expression levels of a heat-shock-inducible transgene [73].

There is no indication that antibiotic resistance markers have any detrimental effects on nematodes. No phenotypic abnormality has been observed after G-418 or puromycin selection over several generations, aside from a slight delay in the development of resistant worms from L1 to adulthood on selective medium, as occurs with other mutant and transgenic lines [72, 73]. G-418 and puromycin do not seem to cause harm to worms that are properly protected by the corresponding resistance gene. The only adverse phenotypes observed so far are germline morphological defects and lower fertility in some animals carrying a high copy number of NeoR resistance cassette [72]. This phenotype seems to be avoided by the use of small doses of the resistance cassette in the injection mixture that is sufficient to insure proper G-418 protection [72].

MosSCI-biotics: antibiotic resistance cassettes as co-insertion markers for single-copy integration

While the use of antibiotic markers makes extrachromosomal array strains convenient and easy to manipulate, there may be cases where integration of a low copy number of the transgene may be desirable. Integration indeed prevents mosaicism [3], overexpression due to high copy number of the transgene [4], silencing in the germline [76], and changes in the expression of the transgene over several generations [30, 76, 77]. Each of these limitations can be avoided using different methods, but single-copy insertion of the gene of interest by *MosSCI* has been shown to sidestep all of these limitations at once (Fig. 3) [41].

MosSCI has been developed using *unc-119* as co-insertion marker (see above), and therefore recipient strains carrying *MosI* insertion also need to carry the *unc-119(ed3)* allele. Two intergenic *MosI* insertion sites have been used to date, for which repair template vectors carrying *unc-119* were created [41]. In theory, every *MosI* intergenic insertion from NemaGENETAG, a library of *MosI* single copy insertion lines [42] could be used for gene conversion and single-copy integration. However, the use of *unc-119* as a co-insertion marker necessitates the introduction of *unc-119(ed3)* in the genetic background beforehand.

Almost every step of the *MosSCI* protocol can be facilitated by the use of antibiotic resistance systems (Fig. 4) [72]. First, every *MosI* recipient strain from NemaGENETAG can be used without the need for crossing into an *unc-119* mutant background, making host strains easier to amplify and to inject. Second, when using the transposase source under the control of a heat-shock promoter (heat shock protocol [41]), large populations of nonintegrated adults can be easily obtained for heat-shock

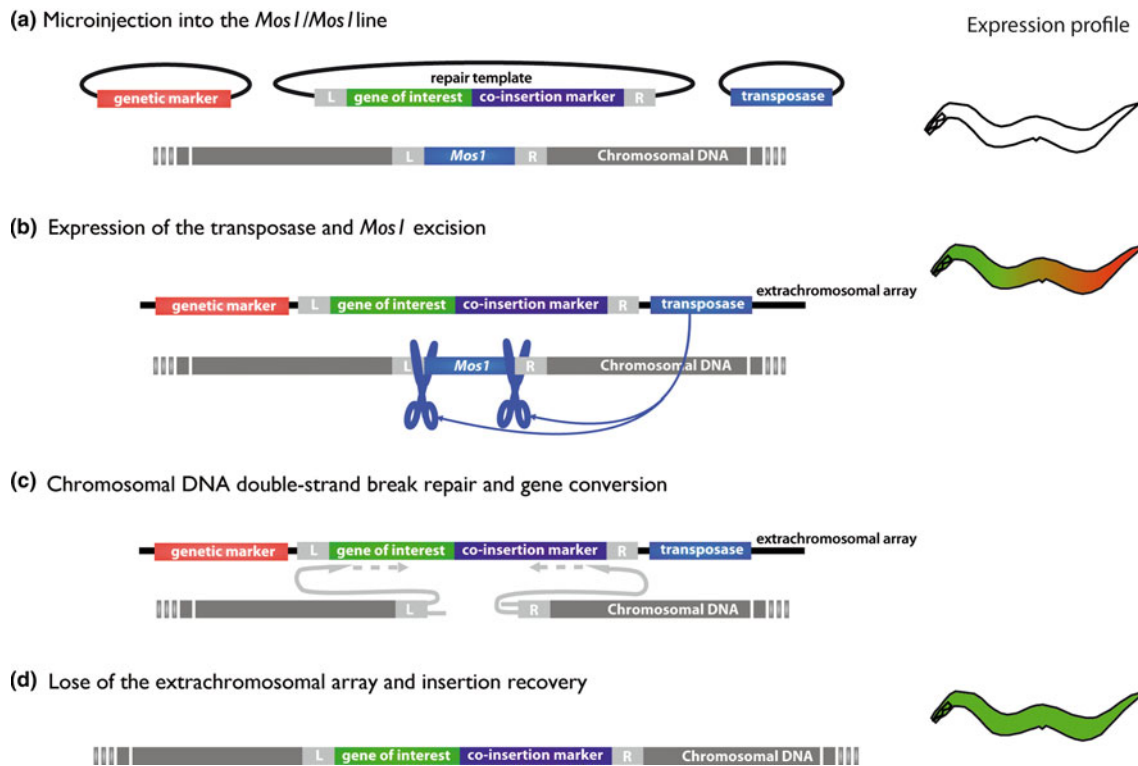


Fig. 3a–d Transgene integration by *Mos1* single-copy insertion (*MosSCI*) mechanism. The main steps of *MosSCI* are represented. On the *right* is a schematic view of the expression profile of the worm at each step. **a** Extrachromosomal array formation: a *C. elegans* strain carrying a single characterized insertion of *Mos1* is injected with a transposase source, a repair template vector, and genetic markers for the identification of worms carrying the extrachromosomal array. The repair template is composed of the gene of interest and a co-insertion marker, both flanked by 1.5 kb of genomic DNA corresponding to the right (*R*) and left (*L*) sequences flanking the *Mos1* insertion locus.

b Expression of the transposase: *Mos1* excision by the transposase creates a double-strand break in the genomic DNA. **c** Gene conversion: the double-strand break is repaired by gene conversion using the repair template in the extrachromosomal array, leading to the insertion of the gene of interest and the co-insertion marker into the genome. **d** Loss of the extrachromosomal array: insertion events are discriminated from nonintegrated transgenes by identifying animals expressing the co-insertion marker but lacking the transformation markers contained solely in the extrachromosomal array. Adapted from [41]

by hands-off enrichment on selective medium. Third, screening for insertion events is done in populations that are not crowded by nontransgenic animals, thus reducing screen populations (when using *unc-119*, insertion events can be isolated after selection under starvation conditions—*unc-119(ed3)* individuals can not enter *Dauer* stage—but the procedure implies longer culture times). Finally, once an insertion event is isolated, worms obtained by *MosSCI*-biotic do not carry the *unc-119(ed3)* allele. Some further experiments may be simplified by this feature, for example, genetic crosses. Worms carrying *unc-119* as a co-insertion marker can only be crossed with other *unc-119* mutant strains in order to allow phenotypic selection. On the other hand, antibiotic-resistant lines are convenient to cross with most strains, and selection is easily accomplished using selective plates. The availability of different antibiotic markers makes possible the use of multiple-resistance selection (i.e., when crossing a puromycin resistant insertion strain with a G-418 resistant insertion strain, double-resistant progeny should be easily

selected on G-418/puromycin plates). The combination of *MosSCI* and antibiotic selection systems (*MosSCI*-biotic) represents a convenient and effective single-copy insertion system. Indeed, the benefits of antibiotic selection also extend to single-copy transgene applications and should contribute to the development of more flexible and efficient techniques for nematode transgenesis.

More recently, another method has been developed that takes advantage of the *Mos1* excision-repair process to delete up to 25 kb of genomic DNA flanking the *Mos1* insertion site [78]. The method is called *Mos1*-mediated deletion (*MosDEL*) and has been designed to create gene-specific knockouts and simultaneous insertion of a positive selection marker. Methods to obtain knockout worms by *MosDEL* are very similar to those of *MosSCI*. Again, *unc-119* has been used as a marker for insertion and for positive selection of knockout animals. Therefore, as with *MosSCI*, a *C. elegans* strain carrying the *Mos1* insertion at the desired site has to be first crossed in the *unc-119(ed3)* mutant background. But, while with *MosSCI* the

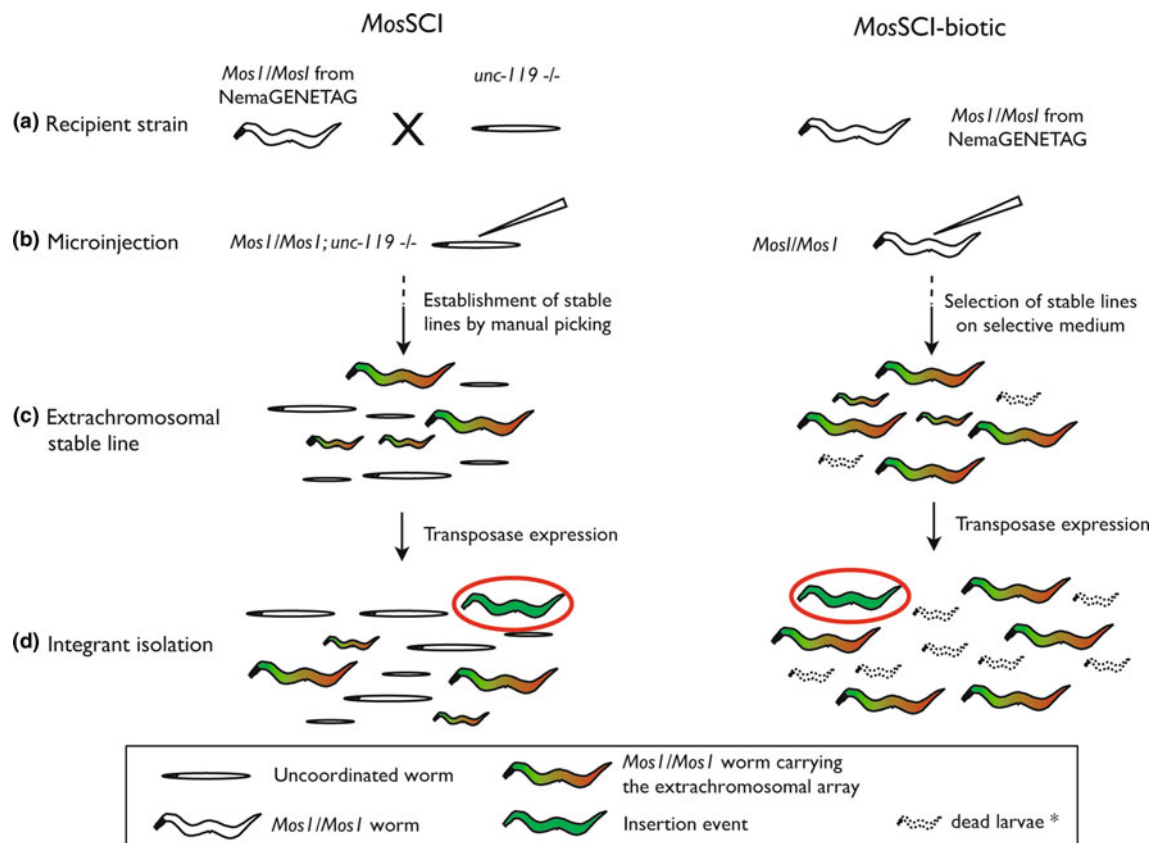


Fig. 4a–d Comparison between *MosSCI* using *unc-119* as co-insertion marker (*left*) and *MosSCI-biotic* (*right*). The use of antibiotic resistance genes as co-insertion markers facilitates almost every step of *MosSCI*. **a, b** Every *MosI* recipient strain from NemaGENETAG can be used without the need to cross into an *unc-119* mutant background, making host strains easier to amplify and to inject.

c When using the transposase source under the control of a heat-shock promoter, large populations of nonintegrated adults can be easily obtained for heat-shock by hands-off enrichment on selective medium. **d** When using an antibiotic resistance gene as co-insertion marker, screening for insertion events is done in smaller populations that are not crowded by nontransgenic worms

integration site was chosen to be intergenic, in *MosDEL* the transposon is by definition located near a gene locus and either its insertion or the desired deletion may have phenotypic effects susceptible to interaction with the *unc-119(ed3)* background. Replacing *unc-119* with an antibiotic resistance cassette as a marker should therefore dramatically enable *MosDEL* applications.

Application to other nematodes

The tremendous power of *C. elegans* as a genetic model comes from the accumulated knowledge and tools assembled by the research community over several decades. If similar tools could be developed for a number of the great variety of known nematode species it would provide an extraordinary opportunity to study the evolution of biological processes. While the process of gene discovery in free-living and parasitic nematodes has been greatly accelerated by an increasing number of nematode genome sequences, transgenesis techniques allowing functional

genetic studies have only been developed for a few nematode species. One of the major obstacles for the development of transgenesis techniques has been the lack of suitable transformation markers in species other than *C. elegans* and *Caenorhabditis briggsae*.

Developing genetic markers based on fluorescent reporters [79, 80], mutant strains, or dominant alleles [80] for new species usually implies extensive genetic analyses. On the other hand, antibiotic resistance genes can be used as transformation markers without the prerequisite for any specific genetic background. It has been shown that several nematode species including helminth parasites are sensitive to broad-spectrum antibiotics [72, 81]. Antibiotic resistance markers might therefore prove useful for researchers wanting to develop projects on nematodes lacking the *C. elegans* transgenesis toolbox. Indeed, G-418 and puromycin resistance cassettes have been shown to work also in *C. briggsae* [72, 73]. The use of NeoR and PuroR driven by *C. elegans* regulatory sequences in *C. briggsae* likely indicates that these cassettes might be used in any species from the *Caenorhabditis* family. Moreover, *C. elegans*

regulatory sequences of *let-858*, *hsp-16*, and *unc-54* genes have been shown to work in more distant species such as *Parastrongyloides trichosuri* [82] and *Heterorhabditis bacteriophora* [83], suggesting that antibiotic resistance cassettes within *C. elegans* 5' and 3' regulatory sequences might also be expressed in other nematodes. For more distantly related species where the activity of *C. elegans* regulatory sequences is not preserved, the use of endogenous regulatory sequences should enable the use of these selection systems [79, 80]. With an increasing interest in using nematodes as a model for evolutionary biology and the need for reliable transgenesis techniques for parasitic nematodes, the availability of such versatile markers will be highly advantageous. The demonstration that it is possible to use antibiotic systems as genetic markers for metazoan transgenesis might also open opportunities to develop new avenues for genetic studies in previously inaccessible small model organisms, maybe even outside of nematodes. Indeed there is a growing interest in developing transgenesis techniques for a variety of metazoan species such as *Ciona intestinalis*, *Plasmodium falciparum*, and silkworms [84–88].

Conclusion

Antibiotic resistance markers provide a new approach to nematode transgenesis forming a new category of transformation markers that circumvent most of the limitations previously displayed. They provide a strongly selectable advantage in normal growth conditions at permissive temperatures, they do not require specific mutant backgrounds, and they do not have any detectable detrimental effects on transgenic nematodes that are properly protected by the resistance cassette. They allow clear-cut selection of transgenic individuals from the F₁ generation, hands-off maintenance of nonintegrated transgenic lines, and the creation of large populations of transgenic individuals without tedious manipulation or sophisticated equipment. In a nutshell, extrachromosomal lines carrying antibiotic selection markers present the advantages of integrated lines but can be obtained more rapidly. Moreover, resistance cassettes also work in the context of single-copy insertions, making these markers compatible with transposon excision-repair methods.

To make full use of this new category of transformation markers, antibiotic selection should be adapted to microparticle bombardment. This could greatly facilitate the development of biolistic transformation in nematodes lacking nonlethal mutation rescue markers such as *unc-119(ed3)*. So far, early attempts to use resistance cassettes as a selection system for microparticle bombardment have failed because clear-cut selection cannot be obtained

in excessive crowding conditions [72]. Still, it is possible that the development of adapted procedures could bring together antibiotic selection and microparticle bombardment in the future.

So far, only G-418 and puromycin and their corresponding resistance genes have been used as selective markers for nematode transgenesis. The sensitivity of wild-type nematodes to other antibiotics, potentially in combination with mild detergents, should allow the development of new antibiotic selection markers for nematodes. For instance, a new *C. elegans* cassette is available, *prpl-28::ZeoR::3'UTR let-858*, that could be used to confer resistance to phleomycin in wild-type worms and should provide all the advantages of antibiotic selection already described (Semple and Lehner, personal communication). Following the methodology defined for the development of G-418 and puromycin selection systems, the resistance markers toolkit should be easily expanded to other drugs and other organisms [89].

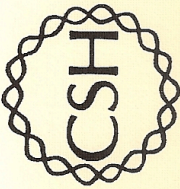
Acknowledgments We thank J. I. Semple, B. Lehner, C. Mackereith, and K. Reborá for comments on the manuscript.

References

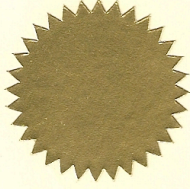
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1):71–94
- Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Preiss JR (1997) *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Stinchcomb DT, Shaw JE, Carr SH, Hirsh D (1985) Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 5(12):3484–3496
- Fire A, Waterston RH (1989) Proper expression of myosin genes in transgenic nematodes. *EMBO J* 8(11):3419–3428
- Goetinck S, Waterston RH (1994) The *Caenorhabditis elegans* muscle-affecting gene *unc-87* encodes a novel thin filament-associated protein. *J Cell Biol* 127(1):79–93
- Aronoff R, Baran R, Hodgkin J (2001) Molecular identification of *smg-4*, required for mRNA surveillance in *C. elegans*. *Gene* 268(1–2):153–164
- Way JC, Chalfie M (1988) *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 54(1):5–16
- Stone S, Shaw JE (1993) A *Caenorhabditis elegans act-4::lacZ* fusion: use as a transformation marker and analysis of tissue-specific expression. *Gene* 131(2):167–173
- Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Blik AM (1999) *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 4(5):815–826
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148):802–805
- Fire A, Kondo K, Waterston R (1990) Vectors for low copy transformation of *C. elegans*. *Nucleic Acids Res* 18(14):4269–4270
- Baum PD, Garriga G (1997) Neuronal migrations and axon fasciculation are disrupted in *ina-1* integrin mutants. *Neuron* 19(1):51–62

13. Yochem J, Gu T, Han M (1998) A new marker for mosaic analysis in *Caenorhabditis elegans* indicates a fusion between *hyp6* and *hyp7*, two major components of the hypodermis. *Genetics* 149(3):1323–1334
14. Hope IA (1991) ‘Promoter trapping’ in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 113(2):399–408
15. Hobert O, Loria P (2005) Uses of GFP in *C. elegans*. In: Chalfie M, Kain S (eds) *Green fluorescent protein: properties, applications and protocols*. Wiley, New York
16. Bacaj T, Shaham S (2007) Temporal control of cell-specific transgene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176(4):2651–2655
17. Boulin T, Etchberger JF, Hobert O (2006) Reporter gene fusions. *WormBook*. doi:10.1895/wormbook.1.106.1
18. Vogel BE, Hedgecock EM (2001) Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development* 128(6):883–894
19. Loria PM, Duke A, Rand JB, Hobert O (2003) Two neuronal, nuclear-localized RNA binding proteins involved in synaptic transmission. *Curr Biol* 13(15):1317–1323
20. Gonzalez-Serricchio AS, Sternberg PW (2006) Visualization of *C. elegans* transgenic arrays by GFP. *BMC Genet* 7:36
21. Hutter H (2000) New ways to look at axons in *Caenorhabditis elegans*. *Microsc Res Tech* 48(1):47–54
22. White JG, Albertson DG, Anness MA (1978) Connectivity changes in a class of motoneurone during the development of a nematode. *Nature* 271(5647):764–766
23. The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282(5396):2012–2018
24. Dupuy D, Bertin N, Hidalgo CA, Venkatesan K, Tu D, Lee D, Rosenberg J, Svrzikapa N, Blanc A, Carnec A, Carvunis AR, Pulak R, Shingles J, Reece-Hoyes J, Hunt-Newbury R, Viveiros R, Mohler WA, Tasan M, Roth FP, Le Peuch C, Hope IA, Johnsen R, Moerman DG, Barabasi AL, Baillie D, Vidal M (2007) Genome-scale analysis of in vivo spatiotemporal promoter activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Biotechnol* 25(6):663–668
25. Hunt-Newbury R, Viveiros R, Johnsen R, Mah A, Anastas D, Fang L, Halfnight E, Lee D, Lin J, Lorch A, McKay S, Okada HM, Pan J, Schulz AK, Tu D, Wong K, Zhao Z, Alexeyenko A, Burglin T, Sonhammer E, Schnabel R, Jones SJ, Marra MA, Baillie DL, Moerman DG (2007) High-throughput in vivo analysis of gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 5(9):e237
26. Reece-Hoyes JS, Shingles J, Dupuy D, Grove CA, Walhout AJ, Vidal M, Hope IA (2007) Insight into transcription factor gene duplication from *Caenorhabditis elegans* promoterome-driven expression patterns. *BMC Genomics* 8:27
27. Celniker SE, Dillon LA, Gerstein MB, Gunsalus KC, Henikoff S, Karpen GH, Kellis M, Lai EC, Lieb JD, MacAlpine DM, Micklem G, Piano F, Snyder M, Stein L, White KP, Waterston RH (2009) Unlocking the secrets of the genome. *Nature* 459(7249):927–930
28. Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10(12):3959–3970
29. Fire A (1986) Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 5(10):2673–2680
30. Praitis V, Casey E, Collar D, Austin J (2001) Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157(3):1217–1226
31. Wilm T, Demel P, Koop HU, Schnabel H, Schnabel R (1999) Ballistic transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 229(1–2):31–35
32. Maduro M, Pilgrim D (1995) Identification and cloning of *unc-119*, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Genetics* 141(3):977–988
33. Clark DV, Suleman DS, Beckenbach KA, Gilchrist EJ, Baillie DL (1995) Molecular cloning and characterization of the *dpy-20* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Gen Genet* 247(3):367–378
34. Thacker C, Sheps JA, Rose AM (2006) *Caenorhabditis elegans dpy-5* is a cuticle procollagen processed by a proprotein convertase. *Cell Mol Life Sci* 63(10):1193–1204
35. Granato M, Schnabel H, Schnabel R (1994) *pha-1*, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res* 22(9):1762–1763
36. Clark SG, Lu X, Horvitz HR (1994) The *Caenorhabditis elegans* locus *lin-15*, a negative regulator of a tyrosine kinase signaling pathway, encodes two different proteins. *Genetics* 137(4):987–997
37. Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG (1991) Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113(2):503–514
38. Thatcher JD, Haun C, Okkema PG (1999) The DAF-3 Smad binds DNA and represses gene expression in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Development* 126(1):97–107
39. Polanowska J, Martin JS, Fisher R, Scopa T, Rae I, Boulton SJ (2004) Tandem immunoaffinity purification of protein complexes from *Caenorhabditis elegans*. *Biotechniques* 36(5):778–780, 782
40. Mello C, Fire A (1995) DNA transformation. *Methods Cell Biol* 48:451–482
41. Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Hopkins CE, Newman BJ, Thummel JM, Olesen SP, Grunnet M, Jorgensen EM (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 40(11):1375–1383
42. Bazopoulou D, Tavernarakis N (2009) The NemaGENETAG initiative: large scale transposon insertion gene-tagging in *Caenorhabditis elegans*. *Genetica* 137(1):39–46
43. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 70(11):3240–3244
44. Davies J, Jimenez A (1980) A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am J Trop Med Hyg* 29(5 Suppl):1089–1092
45. Jimenez A, Davies J (1980) Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* 287(5785):869–871
46. Gatignol A, Baron M, Tiraby G (1987) Phleomycin resistance encoded by the *ble* gene from transposon Tn 5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 207(2–3):342–348
47. Kimura M, Kamakura T, Tao QZ, Kaneko I, Yamaguchi I (1994) Cloning of the blasticidin S deaminase gene (*BSD*) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Mol Gen Genet* 242(2):121–129
48. Gritz L, Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25(2–3):179–188
49. Colbere-Garapin F, Horodniceanu F, Kourilsky P, Garapin AC (1981) A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J Mol Biol* 150(1):1–14
50. Blochlinger K, Digelmann H (1984) Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eukaryotic cells. *Mol Cell Biol* 4(12):2929–2931
51. de la Luna S, Soria I, Pulido D, Ortin J, Jimenez A (1988) Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker. *Gene* 62(1):121–126
52. Pfeifer TA, Hegedus DD, Grigliatti TA, Theilmann DA (1997) Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of

- the Zeocin resistance gene for use as a dominant selectable marker in dipteran and lepidopteran insect cell lines. *Gene* 188(2):183–190
53. Okano K, Miyajima N, Takada N, Kobayashi M, Maekawa H (1992) Basic conditions for the drug selection and transient gene expression in the cultured cell line of *Bombyx mori*. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A(11–12):779–781
 54. Lopez MG, Alfonso V, Carrillo E, Taboga O (2010) Trans-complementation of polyhedrin by a stably transformed Sf9 insect cell line allows occ- baculovirus occlusion and larval per os infectivity. *J Biotechnol* 145(2):199–205
 55. Herrera-Estrella L, Block MD, Messens E, Hernalsteens JP, Montagu MV, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J* 2(6):987–995
 56. Perez P, Tiraby G, Kallerhoff J, Perret J (1989) Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol Biol* 13(4):365–373
 57. Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour SL, Malcolm SK (1985) Resistance to hygromycin B: a new marker for plant transformation studies. *Plant Mol Biol* 5:103–108
 58. Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56(1):117–124
 59. Gastmann S, Dunkler A, Walther A, Klein K, Wendland J (2007) A molecular toolbox for manipulating *Eremothecium coryli*. *Microbiol Res* 162(4):299–307
 60. Cullen D, Leong SA, Wilson LJ, Henner DJ (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph. *Gene* 57(1):21–26
 61. Jain S, Durand H, Tiraby G (1992) Development of a transformation system for the thermophilic fungus *Talaromyces* sp. CL240 based on the use of phleomycin resistance as a dominant selectable marker. *Mol Gen Genet* 234(3):489–493
 62. Dubin M, Nellen W (2010) A versatile set of tagged expression vectors to monitor protein localisation and function in *Dictyostelium*. *Gene* 465(1–2):1–8
 63. Brunk CF, Navas P (1988) Transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation and parameters effecting cell survival. *Exp Cell Res* 174(2):525–532
 64. Freedman DJ, Beverley SM (1993) Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 62(1):37–44
 65. Goyard S, Beverley SM (2000) Blasticidin resistance: a new independent marker for stable transfection of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 108(2):249–252
 66. Suarez CE, McElwain TF (2009) Stable expression of a GFP-BSD fusion protein in *Babesia bovis* merozoites. *Int J Parasitol* 39(3):289–297
 67. Steller H, Pirrotta V (1985) A transposable P vector that confers selectable G418 resistance to *Drosophila* larvae. *EMBO J* 4(1):167–171
 68. Miller LH, Sakai RK, Romans P, Gwadz RW, Kantoff P, Coon HG (1987) Stable integration and expression of a bacterial gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 237(4816):779–781
 69. Morris AC, Eggleston P, Crampton JM (1989) Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. *Med Vet Entomol* 3(1):1–7
 70. McGrane V, Carlson JO, Miller BR, Beaty BJ (1988) Microinjection of DNA into *Aedes triseriatus* ova and detection of integration. *Am J Trop Med Hyg* 39(5):502–510
 71. Handler AM, O’Brochta DA (1991) Prospects for gene transformation in insects. *Annu Rev Entomol* 36:159–183
 72. Giordano-Santini R, Milstein S, Svrcikapa N, Tu D, Johnsen R, Baillie D, Vidal M, Dupuy D (2010) An antibiotic selection marker for nematode transgenesis. *Nat Methods* 7(9):721–723
 73. Semple JI, Garcia-Verdugo R, Lehner B (2010) Rapid selection of transgenic *C. elegans* using antibiotic resistance. *Nat Methods* 7(9):725–727
 74. Bar-Nun S, Shneyour Y, Beckmann JS (1983) G-418, an elongation inhibitor of 80s ribosomes. *Biochim Biophys Acta* 741(1):123–127
 75. Tanaka N, Yamaguchi H, Umezawa H (1963) Mechanism of action of phleomycin, a tumor-inhibitory antibiotic. *Biochem Biophys Res Commun* 10:171–174
 76. Kelly WG, Xu S, Montgomery MK, Fire A (1997) Distinct requirements for somatic and germline expression of a generally expressed *Caenorhabditis elegans* gene. *Genetics* 146(1):227–238
 77. Hammarlund M, Palfreyman MT, Watanabe S, Olsen S, Jorgensen EM (2007) Open syntaxin docks synaptic vesicles. *PLoS Biol* 5(8):e198
 78. Frokjaer-Jensen C, Davis MW, Hollopeter G, Taylor J, Harris TW, Nix P, Lofgren R, Prestgard-Duke M, Bastiani M, Moerman DG, Jorgensen EM (2010) Targeted gene deletions in *C. elegans* using transposon excision. *Nat Methods* 7(6):451–453
 79. Li X, Massey HC Jr, Nolan TJ, Schad GA, Kraus K, Sundaram M, Lok JB (2006) Successful transgenesis of the parasitic nematode *Strongyloides stercoralis* requires endogenous non-coding control elements. *Int J Parasitol* 36(6):671–679
 80. Schlager B, Wang X, Braach G, Sommer RJ (2009) Molecular cloning of a dominant roller mutant and establishment of DNA-mediated transformation in the nematode *Pristionchus pacificus*. *Genesis* 47(5):300–304
 81. Shiomi K, Omura MJA (2004) Antiparasitic agents produced by microorganisms. *Proc Jpn Acad* 80:245–258
 82. Grant WN, Skinner SJ, Newton-Howes J, Grant K, Shuttleworth G, Heath DD, Shoemaker CB (2006) Heritable transgenesis of *Parastrongyloides trichosuri*: a nematode parasite of mammals. *Int J Parasitol* 36(4):475–483
 83. Hashmi S, Hashmi G, Gaugler R (1995) Genetic transformation of an entomopathogenic nematode by microinjection. *J Invertebr Pathol* 66(3):293–296
 84. Corbo JC, Levine M, Zeller RW (1997) Characterization of a notochord-specific enhancer from the Brachyury promoter region of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* 124(3):589–602
 85. Wilson DW, Crabb BS, Beeson JG (2010) Development of fluorescent *Plasmodium falciparum* for in vitro growth inhibition assays. *Malar J* 9:152
 86. Matsuoka T, Awazu S, Shoguchi E, Satoh N, Sasakura Y (2005) Germline transgenesis of the ascidian *Ciona intestinalis* by electroporation. *Genesis* 41(2):67–72
 87. Guo X-Y, Dong L, Wang S-P, Guo T-Q, Wang J-Y, Lu C-D (2004) Introduction of foreign genes into silkworm eggs by electroporation and its application in transgenic vector test. *Acta Biochim Biophys Sin* 36(5):323–330
 88. Maher B (2009) Evolution: biology’s next top model? *Nature* 458(7239):695–698
 89. Chamberlin HM (2010) *C. elegans* select. *Nat Methods* 7(9):693–695




Cold Spring Harbor Laboratory




Primus Inter Pares

This Is To Certify That *Resina Giordano*
Attended And Survived The Cold Spring Harbor Course On
Caenorhabditis elegans

Between The Dates Of August 9th And August 24th In The Year
Two Thousand and Eight


Arshad Desai

Mei Zhen


Shawn Ahmed



*Valorisation des compétences des docteurs
« un nouveau chapitre de la thèse »[®]*

Rosina Giordano-Santini

Ecole doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

Université de rattachement : Université Victor Ségalen, Bordeaux II

Mentor : Isabelle Huygebaert

**« Expression génique chez le nématode
Caenorhabditis elegans »**

Date probable de présentation orale « NCT » : le 15 Mai 2010

Sujet académique de la thèse : « Développement d'un nouveau marqueur de transgénèse chez le nématode *Caenorhabditis elegans* »

Directeur de thèse : Denis Dupuy

Date probable de soutenance de thèse : Avril 2010

*Un grand merci à Isabelle Huygebaert d'avoir accepté d'être ma tutrice et de m'avoir accompagnée tout au long du Nouveau Chapitre de la Thèse®.
Je remercie aussi l'Association Bernard Grégory de m'avoir donné la possibilité de suivre ce programme.*

<i>I</i>	<i>Une thèse en deux étapes</i>	1
<i>II</i>	<i>Projet de thèse « Développement d'un nouveau marqueur de transgénèse chez le nématode Caenorhabditis elegans »</i>	2
II.1	Présentation du projet	2
II.2	La thèse dans son contexte	2
II.3	Moi dans le contexte du projet	3
<i>III</i>	<i>Déroulement, gestion et coût estimé du projet</i>	5
III.1	Préparation et cadrage du projet	5
III.2	Conduite de projet	6
III.2.a	Planification et étapes d'avancement	6
III.2.b	Gestion de problèmes	6
III.2.c	Communication avec les partenaires, collaborateurs et sous-traitants	7
III.3	Estimation et prise en charge du coût du projet	7
<i>IV</i>	<i>Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles acquises durant la thèse</i>	9
IV.1	Domaines d'expertise scientifique	9
IV.1.a	Neurosciences	9
IV.1.b	Ingénieur Génétique	9
IV.2	Définir une stratégie scientifique	10
IV.3	Mettre en place et gérer des projets de recherche	10
IV.4	Méthodes de travail « à la pailasse »	11
IV.5	Travail en équipe	11
IV.6	Communication	12
IV.7	Mon réseau professionnel	12
<i>V</i>	<i>Résultats et impact de la thèse</i>	13
<i>VI</i>	<i>Identifications de pistes professionnelles</i>	14
<i>VII</i>	<i>L'oral du NCT®</i>	15
VII.1	Mes attentes	15
VII.1.a	Un entretien pour mieux connaître le monde des biotechnologies	15
VII.1.b	Un entretien pour m'introduire dans le milieu scientifique Uruguayen.....	16
VII.2	Mes démarches	16
VII.2.a	Un contact européen	16
VII.2.b	Des contacts uruguayens	16
VII.2.c	« El que busca, encuentra »	17
<i>VIII</i>	<i>Conclusion</i>	18

I Une thèse en deux étapes

Ingénieur en Biochimie diplômée de l'Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Toulouse, j'ai intégré en Octobre 2007 le laboratoire de Neurosciences Interactions neurones-glie dirigé par Stéphane Oliet pour la réalisation d'un doctorat. J'ai travaillé un an sous la direction de Jean-Pierre Mothet sur le projet intitulé « Protéomique des vésicules astrogliales, identification du transporteur vésiculaire de la D-sérine ». Ce sujet faisait partie intégrante d'une théorie innovatrice dans le domaine des neurosciences, développée depuis une dizaine d'années : le rôle actif des cellules gliales dans la transmission synaptique. Durant cette première année, j'ai travaillé avec des pionniers de l'interaction neurone-glie et j'ai bénéficié de formations prestigieuses qui ont été à la clef de mes réussites à venir. Des différences d'ordre professionnel et personnel avec mon directeur de thèse m'ont amené à revoir mon projet de carrière et à rediriger mon projet de doctorat. Avec l'accord du laboratoire et de l'Ecole Doctorale j'ai pris le choix d'intégrer un autre laboratoire pour commencer un nouveau projet de thèse.

Ainsi, depuis Octobre 2008, je travaille sous la direction de Denis Dupuy dans son laboratoire Régulation du Génome et Evolution. Le sujet de thèse s'intitule « Développement d'un nouveau marqueur de transgénèse chez le nématode *Caenorhabditis elegans* ». Ce projet est basé sur le développement d'un nouvel outil de sélection de vers transgéniques destiné aux laboratoires travaillant sur *C. elegans* comme modèle biologique.

Dans le cadre de ce mémoire ayant comme objet l'identification et la valorisation des compétences acquises durant mon doctorat, j'ai fait le choix de mettre en premier plan le projet réalisé au laboratoire Régulation du Génome et Evolution. Ainsi, l'analyse du cadre général, du déroulement et des résultats et impacts de la thèse feront référence uniquement à ce projet. Quant à ma première année de doctorat dans le laboratoire de neurosciences, je tiens à préciser que ce fut une expérience extrêmement enrichissante, non seulement du point de vue professionnel mais aussi personnel. Ainsi, je ferai référence aux apports de cette première expérience professionnelle dès que nécessaire.

II Projet de thèse « Développement d'un nouveau marqueur de transgénèse chez le nématode *Caenorhabditis elegans* ».

II.1 Présentation du projet

Caenorhabditis elegans est un ver de petite taille utilisé comme modèle animal dans de nombreux laboratoires travaillant dans des domaines aussi variés que le Développement, l'Immunologie ou les Neurosciences entre autres. Introduit en 1970 par Sydney Brenner (prix Nobel 2002), ce modèle biologique se répandit relativement vite dans des laboratoires de recherche du monde entier. À la clef de son succès, un cycle de vie très court et peu d'exigences en termes de culture, ce qui fait de *C. elegans* un modèle animal à faible coût, permettant l'obtention de résultats scientifiques à court terme. La malléabilité de son génome et le développement de techniques de transgénèse ont aussi assuré le succès de ce modèle.

La construction de lignées transgéniques est une technique maîtresse des laboratoires travaillant sur *C. elegans*. Les animaux transgéniques sont obtenus soit par l'injection d'ADN exogène dans les gonades de vers adultes soit par bombardement d'une population de vers adultes par des billes couvertes d'ADN. Dans les deux cas, c'est seulement une partie de leur descendance qui porte l'ADN exogène et qui est donc transgénique. Ceci implique l'utilisation de marqueurs permettant l'identification facile et rapide des vers portant le transgène versus les vers sauvages. De même, de manière générale, les vers transgéniques ne transmettent pas le transgène à la totalité de leur progéniture ; le marqueur reste alors essentiel pour identifier et isoler les animaux transgéniques à chaque génération et assurer ainsi la maintenance des lignées. Jusqu'à présent, les marqueurs disponibles assurent pour la plupart une identification facile des animaux portant le transgène, mais la maintenance des lignées par le tri reste une étape essentielle.

Afin de s'affranchir de la maintenance manuelle et de rentabiliser ainsi le temps de travail du manipulateur, j'ai développé dans le cadre de ma thèse un marqueur de transgénèse qui, de part sa nature, permet l'enrichissement des populations transgéniques en éliminant les vers sauvages. Ce nouveau marqueur, « NeoR », est un gène qui confère la résistance à la généticine, une drogue mortelle pour les vers sauvages. Les animaux transgéniques porteurs de ce marqueur sont résistants à cette drogue et sont capables de se développer et de se reproduire en sa présence. Ainsi, en présence de généticine, la sélection et l'enrichissement des populations transgéniques se fait systématiquement, sans avoir besoin de trier les vers manuellement.

Ce nouvel outil est destiné aux laboratoires travaillant sur *C. elegans* et promet des nombreuses applications. J'ai déjà eu l'occasion de présenter ce nouveau marqueur dans un congrès international et un congrès national où il a été accueilli par la communauté *C. elegans* avec un grand enthousiasme.

II.2 La thèse dans son contexte

Dans le cadre du laboratoire Régulation du Génome et Evolution, ce nouveau marqueur a été développé dans l'intérêt de rentabiliser le temps de travail et d'assurer une meilleure gestion de la maintenance des lignées transgéniques. En effet, les études effectuées au sein du laboratoire sont basées sur des cribles à haut débit nécessitant pour la plupart un grand

nombre d'animaux et de lignées transgéniques. Si on tient compte du temps de manipulation d'un expérimentateur, la maintenance des lignées par le tri manuel peut demander plus de 10 % du temps de travail (basé sur des observations effectuées au sein du laboratoire dans le cadre d'expériences propres au laboratoire). L'utilisation du nouveau marqueur « NeoR » permet alors de s'affranchir de cette étape et de libérer ainsi du temps de travail de l'expérimentateur. Cet outil est surtout intéressant pour des petites structures qui disposent d'une main d'œuvre réduite.

Ainsi, l'enrichissement des populations transgéniques de manière systématique par sélection en présence d'une drogue, tel « NeoR », est un système qui séduit déjà d'autres laboratoires *C. elegans*. D'ailleurs, ce concept est né simultanément dans un autre laboratoire européen, où ils ont développé le même outil mais basé sur une autre drogue, la puromycine. Ceci donne du poids à cette technique et montre d'autant plus son intérêt au sein de la communauté *C. elegans*. Il ne s'agit pas de deux systèmes concurrents, mais bel et bien de deux systèmes complémentaires. Ces deux outils, mis à disposition des laboratoires *C. elegans*, offriront d'avantage de possibilités en termes de transgénèse (possibilité de doubles transgéniques résistants...).

II.3 Moi dans le contexte du projet

Quand j'ai intégré le laboratoire Régulation du Génome et Evolution, le projet avait été commencé par Denis Dupuy lui-même ; des expériences préliminaires montraient déjà le potentiel de la technique. Mais le développement de cet outil nécessitait un expérimentateur à plein temps, maîtrisant la culture de *C. elegans* et les techniques de transgénèse chez le ver.

À ce moment, je redéfinissais mon projet de doctorat et j'étais à la recherche d'un laboratoire d'accueil qui me permette d'intégrer un projet prometteur avec la possibilité d'obtenir des résultats scientifiques et donc une publication à court terme. Lors de ma première année de doctorat dans le laboratoire Relations neurones-glie, j'avais effectué un séjour de trois mois à l'Université de Birmingham en Alabama (Etats-Unis) dans un laboratoire de Neurosciences travaillant, en partie, chez le nématode *C. elegans*. L'objectif était d'importer ce modèle dans le laboratoire à Bordeaux pour développer mon projet de doctorat sur le ver. J'ai ainsi bénéficié aussi d'une formation aux laboratoires Cold Spring Harbor à New York (Etats-Unis). Cette formation intensive de deux semaines a pour but de former des jeunes scientifiques du monde entier à la maîtrise de *C. elegans* comme modèle biologique du point de vue théorique et pratique. C'est ainsi que j'ai acquis les connaissances et l'expérience nécessaires pour intégrer le laboratoire de Denis Dupuy et mener à bien le projet de développement du marqueur « NeoR ».

Le choix de ce projet dans mon projet de carrière me permettait de mettre en pratique mes connaissances acquises durant ma première année de doctorat et d'accéder à un projet porteur donnant suite à des publications dans des journaux scientifiques hautement reconnus.

Mais intégrer le laboratoire de Denis Dupuy présentait aussi un défi : faire partie d'une petite structure émergente (Equipe Avenir), seul laboratoire travaillant sur *C. elegans* à Bordeaux. Ce type de structures est synonyme d'obligation de résultats et de rentabilité, puisqu'il s'agit de structures probatoires d'une durée de quatre ans. Mes expériences professionnelles passées avaient eu lieu dans des grandes structures au sein d'institutions reconnues internationalement. Il s'agissait donc d'acquérir une nouvelle culture de travail. Cette expérience m'a permis de connaître ce type de structures avec ses avantages et ses inconvénients. J'ai aussi eu l'occasion d'intégrer le groupe en même temps que ses deux autres membres (un thésard et une postdoctorante). Ces derniers, n'ayant jamais travaillé sur *C. elegans*, j'ai eu l'occasion de partager mon savoir et de les former ainsi aux pratiques de

cultures des nématodes. Les échanges étaient bilatéraux, puisque, n'ayant pas eu de formation en Génétique, j'ai pu aussi profiter de leur savoir dans la matière.

III Déroulement, gestion et coût estimé du projet

III.1 Préparation et cadrage du projet

Le projet de thèse que j'ai choisi de développer est un projet d'ordre technique. Il ne s'agit pas ici de répondre à une question biologique mais de mettre au point un outil et son protocole associé de façon à ce qu'il puisse être utilisé de manière reproductible et fiable. À différence d'un projet de recherche fondamentale, le projet technique présente un objectif fixe, un but à atteindre, représenté par l'outil tel qu'il a été conçu « sur le papier ». Il s'agit donc d'une démarche « essai-erreur », où l'expérimentateur teste différentes approches de manière empirique pour ensuite retenir celle qui rejoint le mieux l'objectif attendu, et ainsi pour chaque étape du projet. Les projets d'ordre technique représentent un risque principal qui est celui de la faisabilité. L'idée peut-être innovante sur le papier, mais elle peut rencontrer de nombreuses limites une fois sur le terrain. Ces limites sont d'autant plus importantes lorsqu'on travaille avec du vivant. Par exemple, les techniques de transgénèse chez le ver présentent encore aujourd'hui des questions sans réponses. Nul ne connaît le mécanisme biologique exact qui permet aux vers de retenir et exprimer l'ADN exogène. Le marqueur de transgénèse même si prometteur en théorie, pourrait se heurter à des limites biologiques dans la pratique. Cependant, l'idée seule d'un marqueur de transgénèse facilitant la maintenance des lignées transgéniques signifie une avancé considérable pour la communauté *C. elegans*. Le rapport bénéfice-risque et les expériences préliminaires prometteuses ont permis de donner le feu vert au projet.

Pour le développement de ce projet, j'ai travaillé seule sous la direction de Denis Dupuy. La limite principale fut le manque des appareils de microinjection nécessaires à la transgénèse des vers, technique maîtresse du projet. Il a fallu donc trouver des laboratoires d'accueil me permettant d'utiliser leurs infrastructures le temps des expériences ainsi que des collaborateurs qui puissent produire des vers transgéniques dans le cadre du projet lorsque je n'étais pas en mesure de me déplacer par manque de temps, par exemple. Ainsi, Denis Dupuy a fait appel à ses connaissances pour trouver un ou plusieurs laboratoires de confiance qui puissent m'accueillir à titre gratuit et un laboratoire qui accepte de collaborer dans le cadre de ce projet. Nous avons ainsi collaboré avec le laboratoire de David Baillie à Vancouver (Canada) et j'ai été accueillie par Ian Hope à Leeds (Angleterre), puis par Jonhatan Ewbank à Marseille (France) le temps de mes expériences de transgénèse. Plus tard, une fois le marqueur « NeoR » développé et afin de le valider dans le cadre d'une technique de génétique précise, nous avons fait appel à un laboratoire d'accueil spécialisé dans cette technique afin de bénéficier de leur savoir faire (laboratoire de Jean-Louis Bessereau à Paris).

Nous avons eu un troisième type de partenaire qui a joué un rôle essentiel dans le déroulement du projet. Des chercheurs à Barcelone (Espagne), Jennifer Semple et Ben Lehner, développaient eux aussi un marqueur de sélection pour la transgénèse de *C. elegans* basé sur la résistance à une drogue. Du point de vue de l'impact scientifique de la technique, ceci laissait transparaître l'urgence de la demande par les laboratoires *C. elegans* d'un marqueur permettant la maintenance systématique des lignées transgéniques. La technique prenait ainsi une plus grande ampleur. Cependant, du point de vue d'une éventuelle publication scientifique, ce groupe jouait le rôle de concurrent ; une fois la technique publiée, une deuxième publication semblable n'aurait certainement pas eu la même portée. Afin de ne pas

être concurrent mais tout au contraire, de tirer le meilleur parti de cette situation, la solution a été de continuer à travailler en parallèle et de co-soumettre l'article scientifique (i.e. une soumission simultanée présentée sous une même lettre à l'éditeur). Ainsi, chaque groupe aurait son propre article scientifique. Les deux articles soumis en parallèle au même journal bénéficieraient d'une plus grande notoriété aux yeux de l'éditeur.

III.2 Conduite de projet

III.2.a Planification et étapes d'avancement

La conduite du projet s'est appuyée sur des points d'avancement déterminés par des réunions ou événements à différents niveaux. Par ordre de périodicité, on trouve (a) les réunions hebdomadaires avec mon directeur de thèse, (b) les réunions mensuelles de laboratoire, (c) les missions de courte durée et (d) les événements ponctuels extérieurs au laboratoire (congrès).

(a) Réunions hebdomadaires. Chaque semaine nous faisons le point sur les expériences réalisées et les résultats obtenus et redéfinissons ensemble la conduite à suivre en réalisant une liste de tâches organisées par ordre de priorité. Cette liste d'objectifs à court terme était la seule directive précise. J'étais libre de gérer mon temps et d'organiser les tâches à ma façon. Mon rôle consistait non seulement à planifier et réaliser les expériences mais aussi à préparer le matériel nécessaire et à gérer le stock de consommables.

(b) Réunions de laboratoire. Les réunions de laboratoire faisaient participer tous les membres de l'équipe. Elles avaient pour but de discuter sur les éventuelles difficultés rencontrées par chacun sur son projet et d'apporter des points de vue extérieurs aux projets respectifs. Les présentations se faisaient à l'oral avec un tableau blanc comme support.

(c) Missions de courte durée. Tout au long de la thèse, j'ai été amenée à effectuer des missions de courte durée (une à deux semaines) dans les laboratoires d'accueil (cf. Préparation et cadrage du projet). Ces missions avaient pour but d'obtenir des vers transgéniques dans le cadre du projet. Elles marquaient aussi un point d'avancement car elles donnaient des échéances quant à la préparation du matériel technique, comme les vecteurs d'ADN nécessaires à la transgénèse, par exemple.

(d) Événements ponctuels. Les événements ponctuels m'ont aussi amené moi et mon directeur de thèse à devoir prendre du recul et faire un bilan sur l'avancement du projet. Ces événements extérieurs au laboratoire étaient les bienvenus pour s'éloigner de la pratique et resituer le projet dans son contexte scientifique. Les journées de l'Ecole Doctorale, le rapport de mi-thèse et plus particulièrement les congrès internationaux et nationaux, ont été des occasions de clarifier notre vue sur le projet, de faire le point sur les conclusions tirées et d'envisager les perspectives. En particulier, les congrès étaient l'occasion de présenter la technique à des membres de la communauté *C. elegans* et de cerner ainsi les attentes des scientifiques quant à la technique que nous développons. Des discussions avec d'autres scientifiques travaillant sur le domaine permettaient aussi de clarifier des doutes et de redéfinir certaines stratégies d'expérimentation.

III.2.b Gestion de problèmes

À des occasions ponctuelles, j'ai été confrontée à des situations de « crise » où la planification des expériences a dû être laissée de côté pour se concentrer sur des problèmes rencontrés dans la pratique. Longtemps après les premières expériences de transgénèse, l'étape de validation du marqueur « NeoR » déjà bien avancée, j'ai remarqué que le marqueur était toxique pour

une partie de la population de vers transgéniques. Ceci était un problème majeur car si la source du problème n'était pas identifiée, il aurait pu mettre en cause la validité du marqueur et donc la faisabilité de la technique. Il a donc fallu se concentrer sur ce problème, émettre des hypothèses et les tester. Il était imminent de générer une grande quantité de vers transgéniques pour tester différentes conditions. C'est à ce moment que nous avons établi la collaboration avec nos partenaires de Vancouver (Canada) qui disposent de l'infrastructure et la main d'œuvre nécessaires pour la génération d'un grand nombre d'animaux transgéniques. Ainsi, j'ai pu continuer avec le programme de validation du marqueur pendant que les conditions de transgénèse étaient testées en parallèle par nos collaborateurs.

III.2.c Communication avec les partenaires, collaborateurs et sous-traitants

Les échanges avec nos collaborateurs et partenaires des laboratoires d'accueils se sont fait principalement par mail. Une fois le premier contact établi par Denis Dupuy, je me chargeais de la communication et des demandes. Je rédigeais les mails (en français ou en anglais) avec les protocoles à suivre pour nos collaborateurs ou les demandes d'accueil pour les autres laboratoires. Denis Dupuy se chargeait des communications avec le groupe à Barcelone concernant la publication de l'article scientifique et l'avancement du projet. Mes échanges avec ce partenaire concernaient les aspects pratiques du projet directement associés aux expériences et aux difficultés rencontrées.

De manière très ponctuelle, nous avons fait appel à des sous-traitants lorsque mon temps de travail n'était pas suffisant pour remplir les tâches planifiées ou lorsque nous avions besoin de technologies de pointe accessibles uniquement à travers des plateformes. Nous avons par exemple délégué la construction de vecteurs d'ADN au plateau technique de l'institut. Il s'agissait alors de planifier l'expérience et de définir le cahier de charges. Nous avons aussi fait appel à la plateforme de qPCR pour des expériences ponctuelles.

III.3 Estimation et prise en charge du coût du projet

Le coût total consolidé de ce projet de thèse s'élève à 240 000 € (voir Annexe Tableau du coût consolidé de la thèse). *C. elegans* est un modèle biologique à faible coût ; les consommables liés à la culture du ver ne représentent pas un coût élevé (4,13 % du total). D'ailleurs, le seul consommable qui représente une dépense importante est le G-418 (généticine), la drogue utilisée pour développer le marqueur « NeoR » (~30% des consommables). Une partie importante du coût du projet (28,43 % du total) est due à l'achat d'équipement. J'ai intégré le laboratoire de Denis Dupuy un an après son installation sur Bordeaux et de ce fait, j'ai utilisé durant ma thèse des équipements neufs. Les principales dépenses sont ainsi les salaires (doctorant et directeur de recherche, 43,44 %) suivi par l'achat d'équipements.

Les fonds ayant permis de financer ce projet classés par ordre décroissant de participation, sont :

(a) la dotation Inserm (60 000 €/an pour une équipe Avenir). 20 % de cette dotation sont alloués à l'institut d'accueil du laboratoire, l'Institut Européen de Chimie et de Biologie, pour les charges communes (électricité, téléphone, entretien des locaux, etc...). Cette dotation permet aussi d'acheter les consommables et de payer les missions, ainsi qu'une partie des équipements. Elle assure ainsi 39,5% du coût de la thèse.

(b) l'allocation du Ministère de l'Enseignement, de la Recherche et des Technologies paye le salaire du doctorant (31,63 % du coût).

(c) la dotation de la Région Aquitaine permet de payer 60% du prix des équipements (17 % du coût)

(d) la dotation de la fondation Bettencourt-Schueller paye le salaire du directeur de recherche (11,7 %).

De toutes ces dotations, seule la dotation Inserm est assurée par le contrat Avenir. Les autres dotations correspondent à des demandes de financement.

IV Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles acquises durant la thèse

IV.1 Domaines d'expertise scientifique.

Ingénieur Biochimique de formation, j'ai acquis durant la carrière d'ingénieur la capacité d'adaptation à des domaines divers des sciences du vivant. En effet, la formation d'ingénieur en Biochimie de l'INSA est une carrière pluridisciplinaire apportant une double compétence en sciences de la vie et sciences de l'ingénieur. J'ai ainsi acquis les méthodologies pour aborder et développer des projets, affronter et résoudre des problèmes, et ceci non pas dans un domaine précis, mais de manière plus générale dans les domaines des sciences de la vie. Ces compétences m'ont permis de réaliser différents stages de recherche pendant mes études d'ingénieur dans des domaines variés, allant de la Microbiologie aux Neurosciences. J'ai appris grâce à ces stages à être autodidacte, c'est-à-dire à apprendre par moi-même les connaissances théoriques dans des domaines particuliers, nécessaires pour le développement des projets. C'est ainsi que, sans avoir eu de formation académique en Neurosciences auparavant, j'ai intégré le laboratoire « Interactions neurones-glie » pour mon stage de Master 2 Recherche et plus tard le doctorat. De la même manière, j'ai pu ensuite intégrer un laboratoire de Génétique.

mots clefs : autodidacte ; adaptabilité

IV.1.a Neurosciences

Durant mon Master 2 Recherche et ma première année de doctorat, j'ai acquis des connaissances dans le domaine de l'interaction neurones-glie, plus particulièrement sur la libération de D-sérine par exocytose astrogliale. Au sein d'un laboratoire pionnier dans le domaine, j'ai profité des échanges privilégiés avec ses chercheurs et aussi des réunions de laboratoire et des conférences d'invités de renom. Dans le cadre du projet « Protéomique des vésicules astrogliales, identification du transporteur vésiculaire de la D-sérine », j'ai utilisé et mis en place des techniques de biologie cellulaire comme le fractionnement subcellulaire, l'immunoisolement de vésicules et l'immunocytochimie. J'ai appris la maîtrise de la culture primaire d'astrocytes. J'ai réalisé des tests préliminaires de dynamique de transport vésiculaire par spectrophotométrie et radioactivité. J'ai utilisé des techniques de chimie et biochimie tel le western blot et l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

mots clefs : interactions neurones-glie ; biologie cellulaire

IV.1.b Ingénieur Génétique

Dans le cadre du projet « Développement d'un nouveau marqueur de transgènes chez le nématode *Caenorhabditis elegans* » je me suis spécialisée dans l'ingénierie génétique, c'est à dire le développement d'outils pour la manipulation du génome, chez le nématode *C. elegans*. Lors du développement de ce projet, j'ai acquis des compétences dans deux domaines. D'un côté j'ai appris à maîtriser *C. elegans* comme modèle biologique. Lorsqu'on travaille avec ce modèle, on est très rapidement amené à apprendre différents aspects de sa biologie et de son comportement, connaissances qui permettent d'utiliser ce modèle dans tout autre domaine des

sciences de la vie. Dans ce cadre j'ai appris les techniques de culture et de transgénèse chez le nématode (microinjection et bombardement) ainsi que l'utilisation d'outils associés (COPAS - Complex Object Parametric Analyzer and Sorter, microscopie). D'autre part, j'ai utilisé durant ce projet des techniques de biologie moléculaire tel PCR, clonage, qPCR et des techniques associées. J'ai appris à travailler avec des séquences d'ADN *in silico*.

mots clefs : *C. elegans* ; biologie moléculaire

IV.2 Définir une stratégie scientifique

Sur le plan théorique, j'ai déjà eu l'occasion de définir un programme de recherche et de mettre en place des stratégies scientifiques (techniques choisies, compétences requises) pour développer un projet. Ce fut lors du concours d'admission à l'Ecole Doctorale de Bordeaux pour l'obtention d'une bourse d'allocation du Ministère de l'Enseignement, de la Recherche et des Technologies. Dans ce contexte, j'ai monté un projet de recherche dans un domaine autre que celui de ma spécialité (j'ai choisi le métabolisme du Fer alors que je postulais pour une thèse en Neurosciences). Pour cela, j'ai tout d'abord identifié grâce à une étude bibliographique les questions biologiques clefs jusque-là sans réponse dans le domaine (veille scientifique). J'ai ensuite « découpé » la question en différentes étapes et identifié les techniques appropriées pour répondre à chacune de ces questions (veille technique). J'ai énuméré les résultats possibles à chaque expérience et en déduit les hypothèses qui en découlaient. Finalement, j'ai établi différentes stratégies suivant les possibles enchaînements d'hypothèses. Ce programme de recherche fictif a été évalué par un jury de vingt chercheurs et enseignants-chercheurs. J'ai été classée deuxième sur quatre-vingt-dix-huit étudiants.

Au-delà de cet exercice théorique, les deux projets de thèse que j'ai abordés durant ces trois dernières années m'ont permis de suivre la mise en place de vrais programmes de recherche et de stratégies scientifiques par mes encadrants. J'ai suivi et analysé leurs décisions de mise en place des stratégies scientifiques, ce qui m'a permis d'apprendre non seulement deux manières différentes de travailler mais surtout d'identifier les décisions clefs et les erreurs à ne pas reproduire. J'ai aussi eu l'occasion de lire des demandes de financements et de voir ainsi le niveau scientifique et la méthodologie nécessaires pour écrire un projet de recherche.

Finalement, dans le cadre du projet « Développement d'un nouveau marqueur de transgénèse chez le nématode *Caenorhabditis elegans* » j'ai participé activement à la mise en place de la stratégie scientifique en identifiant des objectifs à court terme et en redéfinissant le programme de recherche lorsqu'on rencontrait des problèmes. Par exemple, lorsque j'ai été confronté au problème de toxicité du marqueur « NeoR », j'ai défini avec mon directeur une stratégie de « crise » pour laquelle nous avons fait intervenir des collaborateurs (voir § Gestion de problèmes).

mots clefs : veille scientifique ; veille technique

IV.3 Mettre en place et gérer des projets de recherche

La partie « Conduite de projet » de ce rapport montre que durant ces trois dernières années d'expérience professionnelle, j'ai appris à gérer un projet de recherche. Je sais organiser mon temps de manière à atteindre les objectifs en temps voulu (objectifs à court terme d'une semaine à l'autre, préparation de matériel pour un départ en mission, réalisation d'expériences en temps limité pour soumettre un article). Je sais faire le point sur les résultats à des moments stratégiques pour mieux organiser la suite des événements. Je sais respecter la

planification des réunions et m'adapter à des planifications différentes suivant le besoin du projet (rapprochement des réunions en période de « crise »...), de la même manière que je sollicite des réunions supplémentaires avec mon encadrant quand j'ai des informations importantes à communiquer. Je sais prendre des décisions pour faire avancer le projet. Par exemple, je vais décider d'une nouvelle expérience qui n'était pas prévue dans les objectifs si je considère qu'elle est utile pour l'avancement du projet.

mots clefs : organisation ; flexibilité ; prise de décisions

IV.4 Méthodes de travail « à la paille »

Du point de vue pratique, je travaille de manière méticuleuse quand il est nécessaire. J'ai appris à identifier les situations où il faut savoir être méticuleux et celles où l'être peut représenter une perte de temps. Ainsi, faire des expériences en prenant soin du moindre détail permet de gagner du temps et d'identifier plus facilement des possibles sources d'erreur. Dans d'autres situations, se passer du détail n'affecte pas le résultat final et permet de gagner du temps. Je sais résoudre des problèmes « à la paille » de manière autonome. En m'aidant de recherches bibliographiques, je sais re-adapter des protocoles à des conditions particulières d'expérimentation pour lesquelles les protocoles classiques ne fonctionnent pas. Par exemple, pour l'obtention de *C. briggsae* transgéniques, il a fallu changer de protocole de transgénèse car celui utilisé pour *C. elegans* s'est avéré ne pas être adapté. Je sais aussi gérer le stock de consommables pour qu'il ne devienne pas un élément limitant du projet. Je sais analyser et interpréter des résultats et les traiter de manière à les rendre lisibles pour la communication. Lorsque je ne suis pas capable d'exploiter les résultats par moi-même, je sais m'adresser aux bonnes personnes qui ont les connaissances nécessaires pour m'aider (contacts de mon réseau professionnel, par exemple). Je sais tenir un cahier de manipulations et organiser les données ; c'est ainsi que dans le laboratoire « Interactions neurones-glie » ils se sont servis de mes notes et documents pour continuer les expériences et exploiter mes résultats après mon départ. De la même manière, je tiens une documentation personnelle avec des protocoles détaillés, ce qui me permet d'avoir l'information « à portée de main ».

mots clefs : méticuleuse ; autonome ; prise d'initiative ; interprétation de résultats ; documentation fiable

IV.5 Travail en équipe

Même si, pendant la thèse, j'ai été amenée à travailler seule, j'ai été formée au travail en équipe durant ma carrière d'ingénieur. De plus, j'ai fait du sport collectif pendant 15 ans (handball à niveau pré-régional et rugby universitaire) et j'ai occupé le poste de capitaine dans chacune des équipes que j'ai intégrées. J'aime le contact avec les gens et l'esprit de collaboration. Ainsi, j'ai intégré cette année le comité d'organisation de la Journée des Jeunes Chercheurs à l'Institut Européen de Chimie et Biologie. Le comité est composé de 12 étudiants en thèse et post-doctorants et nous organisons ces journées de manière indépendante. En équipe, je sais dire ce que je pense sans imposer mes idées, je sais mettre en valeur des idées des autres lorsque je les considère intéressantes et je cherche à m'assurer que les objectifs soient atteints à la fin de chaque réunion. Je sais aussi prendre des initiatives lorsque je considère qu'il a des tâches délaissées. Travailler en équipe représente pour moi une source de motivation. J'aime d'autant plus les équipes pluridisciplinaires ou chaque individu apporte une particularité.

mots clefs : assertivité

IV.6 Communication

Dans le cadre de la thèse, j'ai eu l'occasion à différentes reprises de présenter mes travaux sous forme de poster (congrès international, journée de l'Ecole Doctorale) ou de présentation orale (congrès national, présentation au jury de mi-thèse) en anglais. J'ai aussi écrit un article scientifique en anglais en binôme avec mon directeur de thèse. Je sais communiquer avec un public d'experts et je sais aussi vulgariser pour communiquer à un public de non-spécialistes (lors des portes ouvertes du laboratoire pendant la Fête de la Science, par exemple). Ces deux dernières années, j'ai donné des cours en Licence 1 de Psychologie à l'Université de Bordeaux II, pour lesquels j'ai dû vulgariser des sujets de biologie pour les rendre accessibles à des étudiants de première année. J'ai pris conscience à travers de ces cours la manière dont on peut transmettre notre état d'esprit à l'auditoire ; ainsi je sais transmettre mon enthousiasme et je suis consciente aussi du danger de pouvoir transmettre le manque de motivation.

Ma langue maternelle est l'espagnol et je suis bilingue en français. Ayant appris l'anglais dans une institution privée en Uruguay, et après avoir séjourné à de plusieurs reprises dans des pays anglophones, je communique en anglais à l'oral et à l'écrit.

mots clefs : français/espagnol/anglais ; communicative

IV.7 Mon réseau professionnel

Aujourd'hui, j'ai un réseau professionnel composé de deux groupes. Le premier est composé par le réseau dans la recherche que j'ai développé à l'occasion de mes stages en laboratoire et plus particulièrement pendant ma thèse. J'ai de nombreux contacts dans la communauté *C. elegans* que j'ai su établir lors de la formation à Cold Spring Harbour aux Etats-Unis et lors de mes nombreux séjours en laboratoires d'accueil. Cette partie du réseau est entretenue principalement lors des congrès et par échange de mails. Dans ce premier groupe, on trouve aussi des chercheurs dans le domaine des Neurosciences en France et à l'international et quelques contacts dans la recherche en Uruguay. Le deuxième groupe, je l'ai développé lors de ma carrière d'ingénieur. Il s'agit de contacts qui se trouvent à l'interface entre la recherche publique et privée ; ce sont principalement des professeurs de l'INSA ou des ingénieurs que j'ai pu rencontrer spontanément à différentes occasions. J'inclus aussi dans ce groupe d'autres ingénieurs de l'INSA de Toulouse avec qui je garde contact. Finalement, je ne laisse pas de côté mon réseau personnel en Uruguay qui me permet à travers de connaissances, d'ajouter des contacts à mon réseau professionnel.

V Résultats et impact de la thèse

Aujourd'hui, le marqueur « NeoR » pour la transgénèse de *C. elegans* a été validé et il est en processus de publication. Il a été accueilli avec beaucoup d'enthousiasme par des chercheurs de la communauté *C. elegans* lors des congrès ce qui montre son aspect utile et innovateur. Nous avons donc déjà commencé à partager l'outil avec d'autres laboratoires à l'internationale. Au sein de l'équipe Régulation du Génome et Evolution, il est prévu que le marqueur soit utilisé dans le cadre d'autres projets. Je vois alors ce projet comme un succès et je suis fière de l'avoir mener à bout.

Du point de vue personnel, la thèse a représenté une expérience professionnelle et humaine. La « thèse en deux étapes » m'a permis de connaître deux structures de laboratoires différentes : une grande structure (une trentaine de personnes) et une petite structure Avenir (quatre personnes). J'ai eu l'occasion de connaître différents types de management et j'ai été confrontée à des problèmes de relations humaines. J'ai suivi de près comment ces situations ont été gérées et j'ai appris à identifier différents types de personnalités (assertive, agressive, manipulatrice...). J'espère que ces observations me permettront de mieux choisir mon futur employeur en adéquation avec ma personnalité et mes attentes. Côté professionnel, j'ai su aussi identifier les aspects de la recherche qui me conviennent et ceux qui m'ont manqué durant la réalisation de la thèse. J'ai apprécié la veille scientifique et technique et l'exercice intellectuel. J'ai regretté le manque de travail en équipe. Finalement, et grâce à l'analyse effectuée dans le cadre du NCT®, j'ai identifié des points faibles que je n'ai pas su améliorer durant la thèse. Si je suis de nature assertive lorsque je travaille en équipe, je manque de capacité de négociation avec la hiérarchie. L'identification de ces éléments, positifs et négatifs, devrait m'aider à mieux cibler des pistes professionnelles.

Cependant, faire la « thèse en deux étapes » veut dire que le temps passé dans le laboratoire Régulation du Génome et Evolution s'est limité à deux ans de projet. Pendant ce temps, j'ai eu l'occasion de développer un projet technique et je n'ai pas abordé de projet de recherche fondamentale. Même si j'ai été formée à la recherche par la recherche, certains scientifiques ou futurs employeurs peuvent me le reprocher. Pour acquérir cette expérience, si je le souhaite, je pourrai faire un an de plus de thèse pour appliquer le marqueur « NeoR » à une problématique biologique. Cependant, je dois mesurer les avantages et les inconvénients de cette décision et apprendre à négocier avec mon encadrant. D'un côté, si la publication du marqueur « NeoR » est acceptée, j'aurais la possibilité de finir la thèse au bout de deux ans de projet et d'obtenir mon diplôme de docteur. L'expérience en recherche fondamentale je pourrai l'acquérir dans le cadre d'un contrat post-doctoral où je serai reconnue en tant que Docteur. D'un autre côté, je peux choisir de rester six mois ou un an de plus en tant qu'étudiante pour développer un autre projet de recherche. Six mois me paraissent courts pour aborder une nouvelle thématique et obtenir des résultats exploitables et je ne suis pas certaine aujourd'hui que ce soit indispensable pour ma carrière professionnelle.

VI Identifications de pistes professionnelles

Dans le cadre de mon projet professionnel, j'ai l'intention d'occuper un poste où je puisse combiner le travail en équipe et la recherche. Je souhaite rester dans le domaine des biotechnologies et intégrer si possible des petites structures émergentes. Ce projet professionnel peut être atteint de deux manières : soit en intégrant directement un poste dans une entreprise, soit en réalisant un contrat post-doctoral dans le privé. Cependant, la première option est très vite limitée : les offres d'emploi pour des chercheurs dans le privé demandent une expérience dans la recherche de au moins deux ans après la thèse. L'option du contrat post-doctoral dans le privé serait donc une alternative et un tremplin pour accéder ensuite à des postes de chercheurs.

Un point d'interrogation vient s'ajouter au projet professionnel et il concerne la mobilité. Expatriée depuis huit ans en France, je souhaite aujourd'hui tenter une expérience professionnelle dans mon pays d'origine, l'Uruguay. Cependant, le nombre d'entreprises en biotechnologies est réduit et mon réseau dans la recherche publique ou privée en Uruguay n'est pas pour l'instant suffisamment développé. Des mesures prises dans le cadre de l'oral du NCT® devraient me permettre de rentrer en contact avec des scientifiques uruguayens, d'évaluer les possibilités d'emploi et de mesurer mon écart « culturel » avec eux. Pour cela j'ai déjà des contacts qui pourront m'aiguiller vers des professionnels. D'un autre côté, je garde en tête la possibilité de déménager dans un pays anglophone pour perfectionner mon anglais. Mais cette option reste pour l'instant en suspens car aujourd'hui je ressens le besoin de rétablir des liens avec l'Uruguay.

Finalement, la décision d'allonger la thèse de 6 mois ou un an aura aussi une conséquence sur l'identification des pistes professionnelles. Aujourd'hui je ne suis pas encore en mesure de viser des pistes concrètes puisque je ne suis pas encore prête à intégrer le marché de l'emploi. Mais j'avance !

VII L'oral du NCT®

VII.1 Mes attentes

Dans le cadre de cet exercice, je suis amenée à présenter mon bilan de compétences devant des professionnels. Il ne s'agit pas ici d'une simple formalité académique, mais au contraire, il s'agit d'entrer en contact avec des professionnels du milieu dans lequel je souhaite travailler et d'élargir et approfondir ainsi mon réseau professionnel. Le choix des personnes est stratégique, car pour faire de cet exercice une expérience enrichissante, il faut que ses acteurs soient ouverts à un échange bilatéral. Par échange bilatéral, j'entends un retour critique avec les points forts et les points faibles à améliorer dans mon profil et dans ma manière de me présenter et d'aborder un entretien. J'entends aussi un échange de questions réponses, non seulement concernant mon profil, mais j'attends de ces personnes qu'elles puissent me renseigner sur les milieux professionnels vers lesquels je veux me diriger. Je souhaite qu'ils me permettent d'enquêter sur leurs milieux professionnels pour confirmer ou corriger mes *a priori*. Finalement, il s'agit ici d'une occasion pour « distribuer ma carte de visite ».

Il y a deux milieux professionnels que je souhaite approcher via cet exercice. Le premier concerne les entreprises de biotechnologies en France et en Europe. Pour cela, je vais faire appel au réseau de mon Ecole d'ingénieurs de Toulouse. Le deuxième concerne un domaine plus large qui englobe les biotechnologies, la recherche privée et la recherche publique en Uruguay. À travers cet exercice, je souhaite me rapprocher du milieu scientifique uruguayen pour mieux envisager ainsi un possible retour dans mon pays d'origine. Ces deux approches sont pour moi complémentaires. Connaître les entreprises de biotechnologies en Europe pourrait aussi me permettre de me rapprocher des biotechnologies uruguayennes. D'ailleurs, la plupart des scientifiques travaillant aujourd'hui en Uruguay ont fait une partie de leur formation et ont acquis une partie de leur expérience professionnelle à l'étranger (France, Suède, Etats-Unis...).

VII.1.a Un entretien pour mieux connaître le monde des biotechnologies

Lors de ma formation d'ingénieur, j'ai réalisé les divers stages facultatifs et obligatoires dans des laboratoires de recherche publique. Ce choix m'a permis de garder un projet de carrière cohérent et diriger plus facilement ma carrière d'ingénieur vers la recherche. N'ayant pas eu d'expérience professionnelle dans une entreprise privée, je souhaite, à travers l'oral NCT®, comprendre et me rapprocher du monde des biotechnologies. Je veux savoir quel type de structure et quelle culture d'entreprise correspond à mon profil et mes attentes. Je veux aussi savoir quel type de poste est disponible pour les jeunes Docteurs et quelle est leur évolution de carrière. Je suis particulièrement intéressée par les rapports recherche privée- recherche publique, quel type de collaboration est possible et si la recherche privée permet aussi de publier ses travaux scientifiques.

Finalement, je souhaite apprendre sur l'avenir des biotechnologies. Aujourd'hui, de plus en plus d'entreprises privées dans le domaine pharmaceutique, par exemple, font appel à des laboratoires publics ou à d'autres entreprises pour sous-traiter leurs projets de recherche. Il serait intéressant pour moi aujourd'hui d'identifier quels seront les acteurs de la recherche demain pour pouvoir mieux viser les secteurs qui recrutent.

VII.1.b Un entretien pour m'introduire dans le milieu scientifique Uruguayen

Aujourd'hui, j'envisage de me rapprocher de la communauté scientifique uruguayenne. Non seulement pour envisager un éventuel retour dans mon pays d'origine, mais aussi pour pouvoir dans un futur établir des collaborations scientifiques avec des laboratoires locaux. En tant qu'expatriée et sachant qu'aujourd'hui l'Uruguay est un pays en essor qui compte sur son capital intellectuel pour avancer, je souhaite participer de manière active à la construction d'une communauté scientifique uruguayenne solide.

Des recherches bibliographiques sur des journaux et magazines uruguayens m'ont permis de tirer les conclusions suivantes. Le principal enjeu de la recherche uruguayenne actuelle est le rapprochement de la recherche académique (synonyme de « publique » en Uruguay) et la recherche appliquée (synonyme de « privée »). Le gouvernement n'ayant pas de fonds publics suffisants pour relancer la recherche académique, la clef est dans l'investissement de fonds privés dans la recherche publique. Pour cela, tous les efforts sont aujourd'hui concentrés sur le rapprochement des secteurs public et privé. Cependant, les collaborations public-privé en Uruguay ne sont pas encore rentrées dans les mœurs. Quelques rares collaborations commencent à peine à se développer. Dans ce contexte, le rôle des biotechnologies est essentiel. De mon côté, après avoir vécu plus de huit ans en France et grâce à ma double culture ingénieur-chercheur, je suis en mesure de comprendre ces enjeux. Participer de manière active au renforcement de la recherche en Uruguay est pour moi extrêmement motivant.

VII.2 Mes démarches

VII.2.a Un contact européen

Pour aborder le sujet des biotechnologies en Europe, j'ai choisi de contacter Pierre Monsan. Pierre Monsan est un professeur de l'INSA de Toulouse et de l'Ecole des Mines de Paris. Il est responsable de l'équipe « Biocatalyse » au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés CNRS/INRA (LISBP) à l'INSA de Toulouse. Il participe à des conseils scientifiques d'entreprises de biotechnologie en Europe : Biocydex, entreprise de chimie, spécialisée dans la vectorisation de principes actifs ; Cryolog, spécialisée dans la traçabilité de la fraîcheur de produits thermosensibles et Danisco Venture, industrie alimentaire. Il préside le Comité Consultatif Régional pour la Recherche et le Développement Technologique du Conseil Régional Midi-Pyrénées.

M Monsan a accepté de me recevoir le Vendredi 21 Mai 2010.

VII.2.b Des contacts uruguayens

Pour rentrer en contact avec des scientifiques uruguayens j'ai fait appel à mon carnet d'adresses personnel. J'ai pu obtenir les coordonnées de différentes personnes dans le milieu public et privé. Ainsi, j'ai contacté par courrier électronique Mme María Noel Álvarez, Docteur en Biochimie, travaillant à la Universidad de la República, Facultad de Medicina, au Département de Biochimie. En tant que chercheur dans la recherche académique, elle est en mesure de me faire connaître l'organisation et le fonctionnement de la recherche publique (types de poste, besoin ou pas d'un concours, salaires, rythme de travail...). Avec elle, j'échange des mails dans le style questions-réponses.

D'autre part, j'ai eu l'occasion de faire parvenir mon CV à Mme Mary Lopretti à travers de connaissances. Mme Lopretti est directrice du Département de Bioprocédés et Biotechnologies au Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) et travaille sur les biomatériaux et les bioénergies. Même si je ne suis pas directement concernée par son domaine d'études, entrer en contact avec elle devrait me permettre de me rapprocher des

biotechnologies uruguayennes. Après des brefs échanges par courrier électronique, elle m'a proposé de faire suivre mon CV à des connaissances travaillant dans le domaine des biotechnologies biomédicales.

VII.2.c « El que busca, encuentra »

En faisant des recherches sur internet sur les biotechnologies en Uruguay j'ai lu une interview à M Gianfranco Grompone sur un hebdomadaire uruguayen. Responsable de la Cellule de Valorisation de l'Institut Pasteur à Montevideo, Uruguay, M Grompone est chargé des relations recherche académique – entreprises. Avant d'arriver à ce poste, il a effectué un parcours semblable au mien : ancien élève du Lycée Français à Montevideo, il a obtenu une bourse du gouvernement français pour effectuer ses études supérieures en France. Il a ainsi obtenu son diplôme d'Ingénieur en Agroalimentaire et son diplôme de Docteur en Sciences de la Vie à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. Pendant la réalisation d'un post-doctorat en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris, il est entré en contact avec Danone Research où il a occupé le poste de chef de l'équipe de Biologie Cellulaire. Chercheur à Danone Research, il a monté lui-même le projet de son retour en Uruguay en tant que Chargé de relations avec l'Amérique du Sud. Son parcours m'a permis de mieux envisager un possible retour en Uruguay.

Je suis rentrée en contact avec M Grompone par courrier électronique et en quelques jours j'ai pu convenir d'un entretien avec lui lors d'un de ses séjours à Paris (Samedi 1^{er} Mai 2010). Ainsi, j'ai pu faire un entretien spontané en appliquant les outils acquis dans le cadre du NCT®. J'ai pu discuter de points clefs comme le retour au pays ou l'insertion dans la communauté scientifique uruguayenne, avec quelqu'un ayant eu les mêmes questionnements que moi. L'entretien a été plus qu'enrichissant car non seulement il a partagé avec moi son expérience personnelle mais il m'a aussi ouvert les portes de la communauté scientifique uruguayenne. Il a été intéressé par mon profil professionnel, notamment dans le cadre d'un projet qu'il développe en partenariat avec Danone Research (France), Biopolis (Espagne) et l'Institut Pasteur de Montevideo où ils ont besoin de personnes avec une expertise en *C. elegans*. Ce projet n'a pas encore été accepté par tous ces partenaires, mais nous avons convenu de garder contact pour établir des collaborations de loin ou de près, pour ce projet ou dans le cadre de projets futurs.

Cet entretien m'a permis d'appliquer mes acquis du NCT® et aussi de concrétiser la recherche d'un emploi pour l'après-thèse. Il a joué le rôle de déclencheur. Finalement il m'a permis de construire un pont, non plus utopique mais réel, entre ma carrière en France et l'Uruguay.

VIII Conclusion

Isabelle Huygebaert, ma tutrice NCT®, s'est présentée lors de la première rencontre étudiants - tuteurs comme un « accélérateur de particules ». Moi et mes projets, nous sommes, dans ces termes, « des particules ».

Nos échanges m'ont permis de mettre de l'ordre dans mes idées et d'identifier mes vrais objectifs. Je suis rentrée dans une nouvelle dynamique de recherche de soi et de mon avenir proche. Je suis devenue actrice de mes projets futurs.

J'ai rencontré Isabelle Huygebaert en tant que doctorante, consciente qu'il fallait envisager la recherche d'emploi et se préparer pour l'avenir, mais avec la tête plongée dans la thèse et les expériences. Aujourd'hui, je finis le travail du NCT® toujours en tant que doctorante et même si je suis consciente qu'il faut parcourir le dernier bout de chemin pour finir la thèse, ma tête est déjà dans mon avenir de Docteur.

ESTIMATION DU COUT CONSOLIDE DE LA THESE

Montants en euros TTC							
	Nature de la dépense	Détails *		Coûts totaux (euros TTC)			
				Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1	Ressources Humaines						
1.1	Doctorant	1676,54	502,96	36	2179,50		78462,07
1.2	Directeur de Recherche	2487,00	746,10	36	3233,10	0,25	29097,9
1.3	Prime Encadrement						
1.4	Encadrant 2						
1.5	Prime Encadrement						
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)						
1.7	Sous-traitance Clonages par le plateau technique			4	50,00		200,00
	Sous-total Ressources Humaines						107760
2	Consommables						
2.1	Fournitures expérimentales	833,33		36		0,33	10000,00
2.2	Fournitures de bureau						
2.3	Autres achats (qPCR)			3	84,00		252,00
	Sous-total Consommables						10252,00
3	Infrastructures						
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat						
3.2	Loyers des locaux			36			26700,00
3.3	Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)	741,67					
3.4	Autres						
	Sous-total Infrastructures						26700,00
4	Matériel (amortissements)						
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement					
4.2	Ordinateur de bureau	0,33	3,00	1,00	1628	1,00	1628
4.3	Logiciels de bureau	1,00	1,00	1,00	197	1,00	197
4.4	Complex Object Parametric Analyzer and Sorter	0,20	3,00	1,00	200000	0,33	40000
	Appareil de bombardement	0,20	3,00	1,00	27000	1,00	16200
	Loupe	0,20	3,00	1,00	1500	0,33	300
	Incubateurs	0,20	3,00	3,00	5333	0,33	3200
	Microscope droit à fluorescence	0,20	3,00	1,00	60000	0,25	9000
	Sous-total Matériel						70525,42
5	Déplacements						
5.1	Missions en France	Transport	Hébergement + autres frais				
	Mission CIML, Marseille, Avril 2009	148,60	580,34				728,94
	Mission CIML, Marseille, Juillet 2009	81,10	661,10				742,20
	Mission ENS, Paris, Décembre 2009	113,50	212,45				325,95
	Mission ENS, Paris, Janvier 2009	121,00	450,00				571,00
5.2	Missions à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				
	Séjour de 6 semaines-University of Alabama at Birmingham, (AL, Etats-Unis) Avril-Juin 2008	1230,37	1741,50				2971,87
	Séjour de 2 semaines-University of Leeds (Angleterre) Décembre 2008	564,70	491,40				1056,10
5.3	Congrès en France	Transport	Hébergement + autres frais				
5.4	Congrès à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				
	17th International C. elegans meeting (LA, Etats-Unis)	973,50	373,29				1346,79
	Sous-total Déplacements						7742,85
6	Formation						
6.1	Formations	Inscription	Frais de déplacement				
	C. elegans course CSH, Août 2008	2670,12	1526,21				4196,33
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)	359,95		3			1079,86
	Sous-total Formation						5276,19
7	Documentation et communication						
7.1	Affranchissements, Internet, téléphone	358,33		36			12900,00
7.2	Publicité, communication, impressions	Direct	Sous-traitance agence				
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)	191,67		36			6900,00
7.4	Autres						
	Sous-total Documentation et communication						19800,00
8	Charges financières (intérêts des emprunts)						
	Sous-total Charges financières						
9	Charges exceptionnelles						
	Sous-total Charges exceptionnelles						
10	TOTAL						248056,4