



# Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris

## Une révolution dans l'approche génétique de la biologie des mammifères

► Nous présentons dans cet article les approches expérimentales qui ont été développées ces deux dernières décennies et qui ont ouvert la voie à la modification, délibérée et programmée, du génome de la souris, un animal modèle de l'étude des mammifères. Cela a été possible grâce, d'une part, à l'isolement en culture de cellules embryonnaires totipotentes (cellules ES) capables de coloniser la lignée germinale d'un embryon hôte et, d'autre part, à la maîtrise au moins partielle du processus de recombinaison homologue entre une séquence d'ADN nu introduite de l'extérieur et l'ADN chromosomique. Depuis 1987, date de la première démonstration d'une mutagenèse « ciblée » sur un allèle résidant des cellules ES, le spectre des mutations que l'on pouvait créer s'est considérablement élargi, à tel point que quasiment tous les types de modifications génétiques peuvent maintenant être obtenus (mutations nulles et ponctuelles, délétions, translocations, etc.). Cet ensemble impressionnant de possibilités s'enrichit depuis quelques années de méthodes qui devraient permettre, à terme, d'induire une mutation dans un type cellulaire et/ou à un moment donné du développement de la

souris. Ainsi, l'approche génétique de la biologie de la souris a été bouleversée et de très nombreux résultats ont pu être obtenus, éclairant la fonction des gènes dans le développement et la physiologie des mammifères. ◀

Il y a fort longtemps que les généticiens ont reconnu l'intérêt de l'étude des mutations qui, grâce au phénotype qu'elles engendrent, permettent d'éclairer la fonction des gènes au sein desquels elles se sont produites. Cependant, chez les organismes complexes comme la souris, un modèle de choix pour l'étude des mammifères, les mutations obtenues ont été longtemps limitées à celles repérées au hasard des élevages et concernaient pour l'essentiel des modifications visibles du phénotype (couleur du pelage, morphologie, comportement, etc.); en particulier, très peu de mutations entraînant des défauts de développement ont pu être collectées de cette façon. Face à cette situation, la possibilité de créer de manière délibérée et contrôlée des modifications génétiques constituait une sorte de rêve déjà énoncé il y a plus d'un demi-siècle par Avery *et al.* [1], dans une étude fameuse dans laquelle ces auteurs démontraient en utilisant des bactéries que l'ADN est le support chimique des caractères héréditaires: « *Biologists have long attempted by chemical means to induce in higher organisms predictable and specific changes which thereafter could be transmitted in series as hereditary characters.* » L'objet de cet article est

**Charles Babinet**  
**Michel Cohen-Tannoudji**

C. Babinet, M. Cohen-Tannoudji : Unité de biologie du développement, Cnrs URA 1960, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris, France.

de montrer comment ce rêve est largement devenu une réalité grâce au développement, durant ces deux dernières décennies, de méthodes qui permettent de modifier quasiment à volonté le patrimoine génétique de la souris (Tableau I). L'obtention de souris porteuses de modifications génétiques programmées par l'expérimentateur a littéralement révolutionné l'étude de quasiment tous les aspects de la biologie de cet animal et de ses différents systèmes (immunitaire, nerveux, hématopoïétique, etc.) (pour revue, voir [2]). En outre, elle permet la création de modèles murins de maladies génétiques humaines (pour revue, voir [3]) qui sont précieux pour l'étude de leur physiopathologie et éventuellement la mise au point de thérapies appropriées. Comme nous le verrons, cela a été rendu possible grâce à la rencontre heureuse de deux approches très différentes: l'une a abouti à l'isolement *in vitro* de cellules très remarquables, les cellules souches embryonnaires (pour revue, voir [4]) (cellules ES) et l'autre a permis d'identifier, chez les cellules d'eucaryotes supérieurs, les conditions nécessaires au processus de recombinaison homologue entre un ADN visiteur connu et la séquence homologue dans le chromosome [5, 6].

Tableau I

QUELQUES ÉTAPES-CLÉS DANS L'HISTOIRE DE LA MUTAGÈSE DIRIGÉE *IN VIVO* VIA LES CELLULES ES DE SOURIS\*

1976**	Souris transgéniques par infection rétrovirale d'embryons en cours de clivage
1980-1981**	Souris transgéniques par micro-injection d'ADN dans le pronucléus du zygote
1981	Établissement de lignées de cellules souches embryonnaires
1986	Souris transgéniques <i>via</i> l'obtention de chimères avec des cellules ES modifiées génétiquement
1987	Première expérience de mutagenèse dirigée : obtention de cellules ES porteuses d'une mutation nulle dans le gène <i>HPRT</i>
1989	Premières souris mutantes obtenues par recombinaison homologue dans les cellules ES
1994 à aujourd'hui	Création de remaniements chromosomiques. Création de mutations conditionnelles

\* Le lecteur intéressé par les travaux jalonnant cette histoire pourra se reporter à un numéro spécial de la revue *International Journal of Developmental Biology* (1998 ; vol. 42, n°7), qui contient les références appropriées.

\*\* Concerne les souris transgéniques par ajout de gènes (micro-injection d'ADN dans le pronucléus du zygote) qui sont exclues du domaine du présent article. Le lecteur intéressé pourra consulter le livre *Transgenic Animals : generation and use*, édité par Louis-Marie Houdebine, Harwood Academic Publishers, 1997.

**Les cellules souches embryonnaires (ES) : des véhicules extraordinaires pour la création de souris mutantes**

En 1981, deux laboratoires rapportaient l'isolement, à partir de la culture de jeunes embryons de souris, de lignées cellulaires ayant les propriétés de cellules embryonnaires totipotentes [7, 8] (Tableau II). Ces cellules, appelées cellules ES, étaient capables, après injection dans un jeune embryon, de coloniser tous les tissus y compris sa lignée germinale, donnant ainsi naissance à des chimères. Le génotype des cellules ES pouvait alors être « recyclé » *in vivo* et transmis aux générations suivantes. Il fut ensuite démontré que ces cellules pouvaient être modifiées génétiquement *in vitro*, par exemple par l'introduction d'un transgène mais surtout que les souris transgéniques correspondantes pouvaient alors être obtenues [9, 10] (figure 1). Ainsi était ouverte une voie entièrement nouvelle d'obtention de souris transgéniques, qui élargissait considérablement les possibilités de la transgenèse par micro-injection d'ADN dans le zygote. En effet, il devenait possible pour l'expérimentateur de mettre en œuvre des procédés permettant la sélection

de modifications génétiques rares dans les cellules ES, puis l'obtention des souris mutantes correspondantes.

**Recombinaison homologue dans les cellules ES : création de mutations nulles (souris knock out)**

Des études effectuées dans les années 1980, en particulier par les groupes de Smithies et de Capecchi, avaient démontré que les cellules de mammi-

fères possèdent l'appareil enzymatique nécessaire à la recombinaison entre une séquence d'ADN exogène et la séquence homologue présente *in situ* dans les chromosomes, même s'il s'agit d'un événement relativement rare en comparaison de l'intégration au hasard de ce même ADN [5, 6]. Dans un premier temps, ces résultats furent mis à profit par ces deux équipes pour créer – ou, au contraire, pour corriger – des mutations nulles dans le gène *hprt* [11, 12]: en effet, ces deux types d'événements peuvent être directement sélectionnés après transfection du vecteur de ciblage porteur de la mutation désirée, par l'ajout de drogues dans le milieu de culture. Malgré la fréquence variable et généralement faible des événements de recombinaison homologue, ces expériences ont pu être étendues par la suite à des gènes dont les mutations nulles ne sont pas sélectionnables, grâce à différentes astuces soit de sélection, soit de criblage (figure 2). A ce jour, plusieurs centaines de gènes ont été invalidés de la sorte et les souris mutantes correspondantes créées [13]. L'analyse des phénotypes engendrés par ces mutations a apporté de très nombreuses lumières sur la fonction des gènes concernés. Dans certains cas, elle a en outre permis de révéler l'influence du fonds génétique sur l'expression d'une mutation donnée (pour revue, voir [14]), ou d'examiner d'éventuelles relations génétiques entre des gènes appartenant, par exemple, à une même famille (pour revue, voir [15]) [16].

Tableau II

LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES DE SOURIS

**1. Propriétés**

- Totipotence
- Croissance (quasi) illimitée *in vitro* avec maintien de la totipotence
- Sélection possible de modifications génétiques rares
- Différenciation *in vitro* en différents types cellulaires
- Colonisation des tissus d'un embryon hôte y compris sa lignée germinale
- Transfert à l'animal des modifications génétiques introduites dans les cellules ES

**2. Modifications génétiques créées par recombinaison homologue**

- Mutations nulles (*knock-out*)
- Mutations subtiles (ponctuelles, microdélétion, micro-ajout, etc.)
- Remaniements chromosomiques (délétions, inversions, translocations)
- Mutations conditionnelles

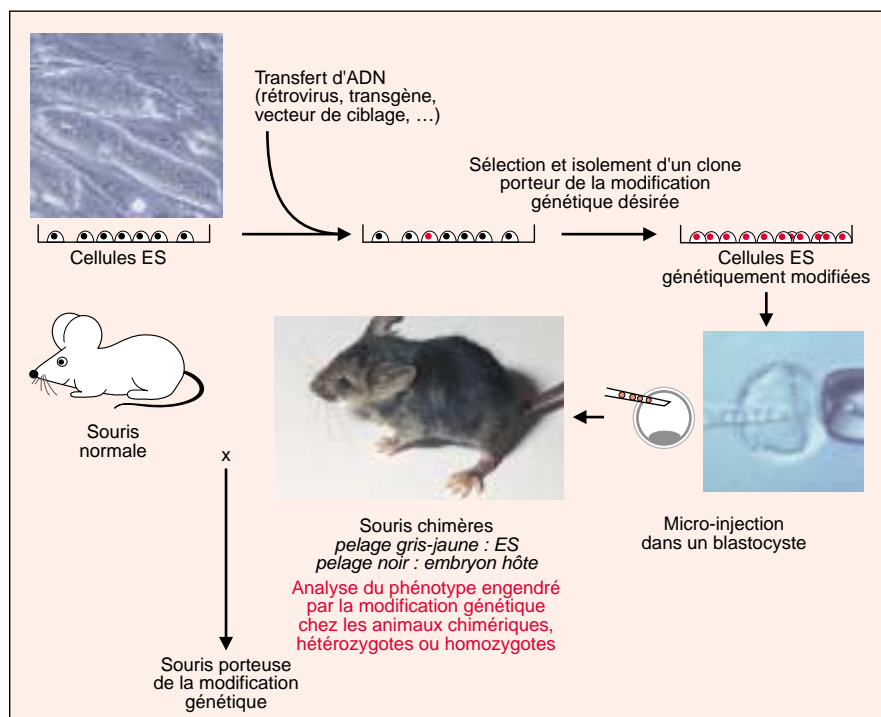


Figure 1. Les différentes étapes de la création de souris génétiquement modifiées via les cellules ES.

### Un raffinement du knock-out : le... knock-in

Une variante intéressante des vecteurs de ciblage pour l'obtention de mutations nulles résulte de l'introduction, en

phase avec la séquence codante du gène ciblé, d'un ADNc d'intérêt (figure 2). Une fois la recombinaison homologue effectuée dans le gène cible choisi, l'allèle modifié exprime l'ADNc inséré en lieu et place du gène endogène. Le choix de l'ADNc dépend

évidemment du but recherché. Par exemple, il peut s'agir de la séquence codante d'un gène rapporteur comme la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli* dont l'activité est aisément repérable, y compris à l'échelle cellulaire. Ainsi l'expression de la  $\beta$ -galactosidase mime-t-elle l'expression du gène ciblé, ce qui est très précieux pour la détermination de son profil d'expression [17], mais peut également être très utile pour suivre le destin des cellules exprimant normalement le gène cible dans le contexte d'un animal porteur de la mutation à l'état homozygote [18, 19]. Une autre utilisation de la stratégie de *knock-in* particulièrement intéressante concerne le cas de gènes appartenant à une famille multigénique ayant un profil d'expression différent et dont l'inactivation respective entraîne des phénotypes contrastés. Les protéines codées par ces gènes apparentés ont-elles une fonction équivalente? Une réponse positive à cette question indiquerait que c'est le changement de profil d'expression qui est à l'origine des phénotypes observés et non une fonction différente des protéines codées par ces gènes. De fait, d'après les quelques études publiées à ce jour (Tableau III et [20-26]), c'est généralement ce type de situation qui est observé, ce qui souligne l'importance des régions régulatrices d'un gène comme cibles d'évolution et de diversification fonctionnelles.

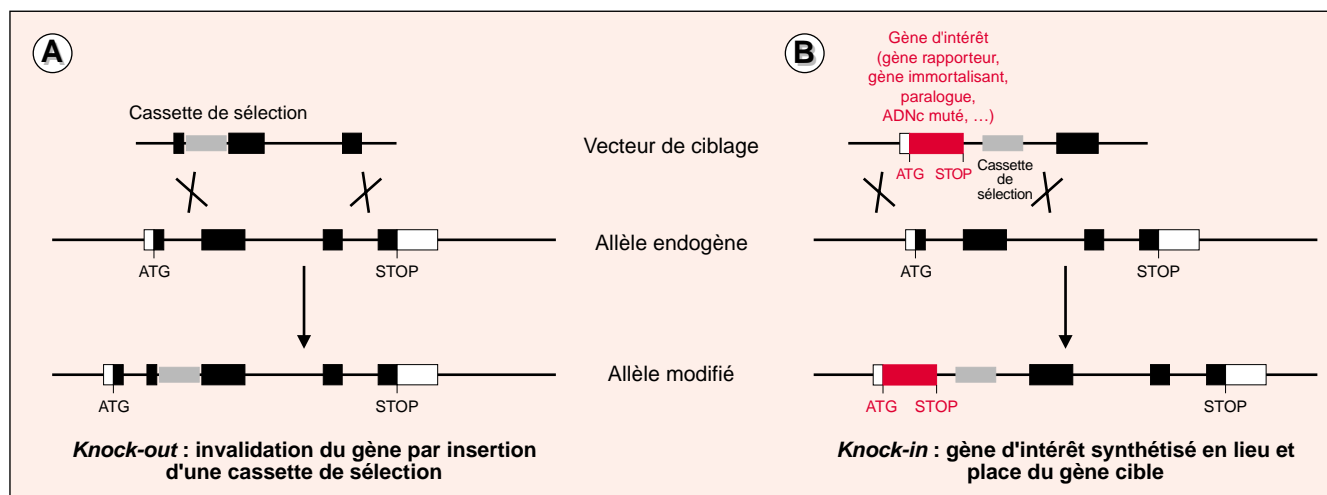


Figure 2. Principe général de la recombinaison homologue. **A. Knock-out.** Le vecteur de ciblage comporte une cassette de sélection insérée dans un exon (rectangle noir: partie codante; rectangle blanc: partie non codante) et entourée de régions d'homologie avec le gène cible. La recombinaison avec ce dernier s'effectue au niveau de ces séquences homologues et résulte en la création d'un allèle nul où l'invalidation du gène résulte de l'insertion de la cassette de sélection. **B. Knock-in.** Dans cette variante, outre l'invalidation du gène cible, un gène d'intérêt est introduit dans le locus. Après recombinaison homologue, ce gène d'intérêt est placé sous le contrôle du promoteur et des séquences régulatrices du gène cible et est donc synthétisé en lieu et place du gène cible.

**Des mutations nulles aux mutations subtiles**

Si les mutations nulles sont un instrument d'analyse génétique très puissant, il est clair que d'autres types de mutations plus subtiles (mutations ponctuelles, petites délétions ou insertions) peuvent être également très utiles. Elles permettent, d'une part, de raffiner l'analyse fonctionnelle d'un gène (par exemple, en changeant un acide aminé dans un domaine particulier de la protéine et en observant les effets induits) et, d'autre part, de créer des modèles murins de maladies génétiques humaines : ces dernières, en effet, sont rarement engendrées par des mutations nulles (par exemple, 60 % des mutations entraînant la mucoviscidose chez l'homme sont du type ΔF508 [27], c'est-à-dire correspondent à la délétion d'un seul acide aminé, la phénylalanine, dans la protéine CFTR – *cystic fibrosis transmem-*

*brane receptor*). Lorsque des allèles mutés de ce type sont créés, il est particulièrement nécessaire de se débarrasser des séquences de sélection qui pourraient interférer avec la régulation de l'expression du gène ciblé ou de gènes adjacents. Cela a d'ailleurs été démontré dans plusieurs études (pour revue, voir [28]) et s'avère tellement vrai que des mutations hypomorphes dans un gène ont pu être créées en introduisant la cassette de sélection aux abords de sa région 5' [29]. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour créer ce que l'on peut appeler des mutations « propres » (allèle muté dépourvu de séquences étrangères) [30] (pour revue, voir [31]). Nous en décrivons deux dans la figure 3. Nous nous arrêterons sur celle qui utilise le système Cre/loxP car nous verrons qu'il a de multiples intérêts au-delà de l'obtention de mutations « propres » (pour revue, voir [32]). La protéine Cre est une recombinaise, identifiée chez le bactériophage P1, qui agit lorsqu'elle reconnaît dans un segment d'ADN, une séquence de 34 paires de bases appelée loxP (pour revue, voir [33]) (figure 4A-B). Lorsque deux sites loxP sont orientés dans le même sens, la protéine Cre induit la délétion du segment d'ADN situé entre eux; en revanche, si les sites loxP sont en orientation opposée, la recombinaison entraîne son inversion (figure 4C). Notons aussi que l'activité de la recombinaise Cre ne nécessite ni co-facteur, ni topologie particulière de l'ADN. De plus, la protéine Cre fonctionne dans les cellules eucaryotes [34]. Comme l'indique la figure 3, ces propriétés du système Cre/loxP pourraient être mises à profit pour la création d'allèles porteurs de mutations « subtiles » et « propres ». Notons qu'à l'issue de ce scénario, l'allèle muté porte un site loxP; néanmoins, jusqu'à présent, aucune indication d'une interférence de ce site avec l'expression génétique n'a pu être mise en évidence.

Tableau III

QUELQUES EXEMPLES DE *KNOCK-IN*

Gène inséré → Gène invalidé	Phénotype du <i>knock-out</i>	Phénotype du <i>knock-in</i>	Réf
<i>Cycline E</i> → <i>Cycline D1</i> (protéines impliquées dans le cycle cellulaire)	Défauts neurologiques Anomalies de la rétine et du tissu mammaire	Restauration complète d'un phénotype normal	[25]
<i>Otx2</i> → <i>Otx1</i> (facteurs de transcription à homéodomaine)	Épilepsie Anomalies du cortex télencéphalique dorsal et des systèmes visuel et auditif	Suppression de l'épilepsie et des anomalies de la corticogenèse mais anomalies de l'oreille interne maintenues	[24]
<i>Otx1</i> → <i>Otx2</i>	Gastrulation anormale Absence de structure antérieure dès E6	Gastrulation normale Structures antérieures normales à E7-E8 mais perte de la régionalisation des structures antérieures à E9*	[26]
<i>Myogénine</i> → <i>Myf5</i> (facteurs de transcription impliqués dans la différenciation myogénique)	Malformation de la cage thoracique Létalité périnatale	Restauration complète d'un phénotype normal	[23]
<i>Mesp1</i> → <i>Mesp2</i> (facteur de transcription de type b-HLH)	Mort périnatale Absence de segmentation somitique Défauts du squelette	Restauration complète d'un phénotype normal	[22]
<i>En2</i> → <i>En1</i> (facteur de transcription à homéodomaine)	Mort périnatale Absence de la région cerveau postérieur/cerveau moyen Anomalies des membres	Disparition des défauts cérébraux mais maintien des anomalies des membres	[20, 21]

\* Cette perte secondaire est due au fait que la protéine OTX2 semble nécessaire pour la régulation de l'expression du gène otx2. Dans les mutants *Otx1* → *Otx2*, le gène *Otx2* (et donc la production de protéine OTX1) n'est pas induit dans la plaque neurale antérieure. E: jour de développement embryonnaire.

## Délétions via le ciblage dans les cellules ES : vers une analyse génétique globale du génome de la souris

La mutagenèse dirigée via les cellules ES est, comme nous l'avons vu, une technique précieuse pour l'analyse de la fonction des gènes. Cependant cette approche est limitée aux gènes déjà connus et clonés. Dans une perspective d'analyse fonctionnelle globale du génome de la souris, cette démarche de génétique inverse doit être nécessairement complétée par des stratégies qui permettraient non seulement

d'accumuler des mutations, mais également de les localiser de manière précise. Ainsi, les gènes correspondants pourraient être éventuellement identifiés et clonés et faire à leur tour l'objet de mutagenèse ciblée.

Au cours des quinze dernières années, ont été développées des méthodes de mutagenèse chimique (non dirigée et au hasard) très efficaces chez la souris : ainsi, l'utilisation du N-éthyl-N-nitroso-urée (ENU) [35] (pour revue, voir [36]), un agent mutagène extrêmement puissant, permet-elle, chez la souris mâle, d'obtenir une mutation dans un gène donné dans un gamète sur 700 (ce qui équi-

vaut à un taux de mutation par locus d'environ  $1,5 \times 10^{-3}$ , et est considérable). L'action de l'ENU résulte la plupart du temps en la création de mutations ponctuelles. Reste évidemment, une fois les mâles traités par l'ENU et donc porteurs de mutations dans leurs spermatogonies, à mettre en œuvre une approche pour le repérage et la collecte des mutations. Ceux-ci seraient grandement facilités, dans le cas des mutations récessives, si l'on disposait de délétions discrètes réparties sur l'ensemble du génome : en effet, le croisement entre individus porteurs d'une délétion dans une région donnée et d'individus porteurs

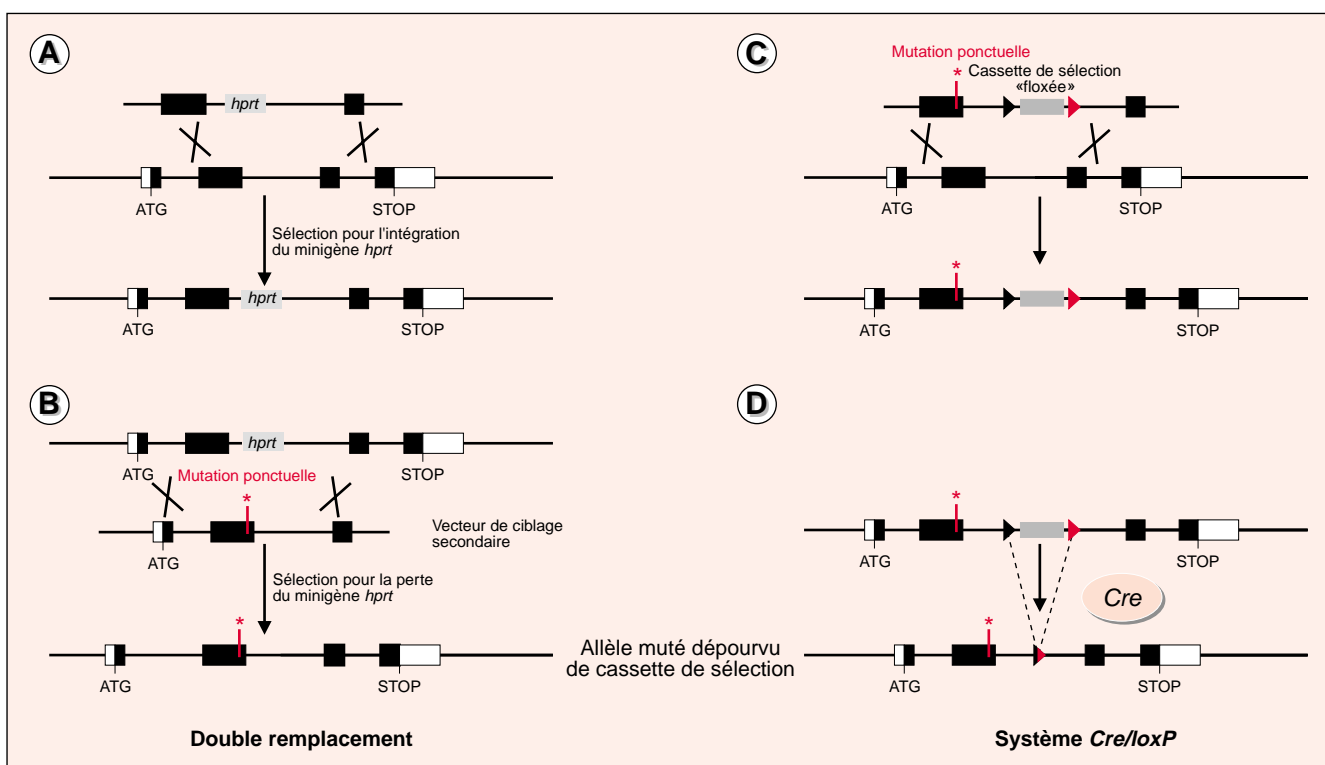
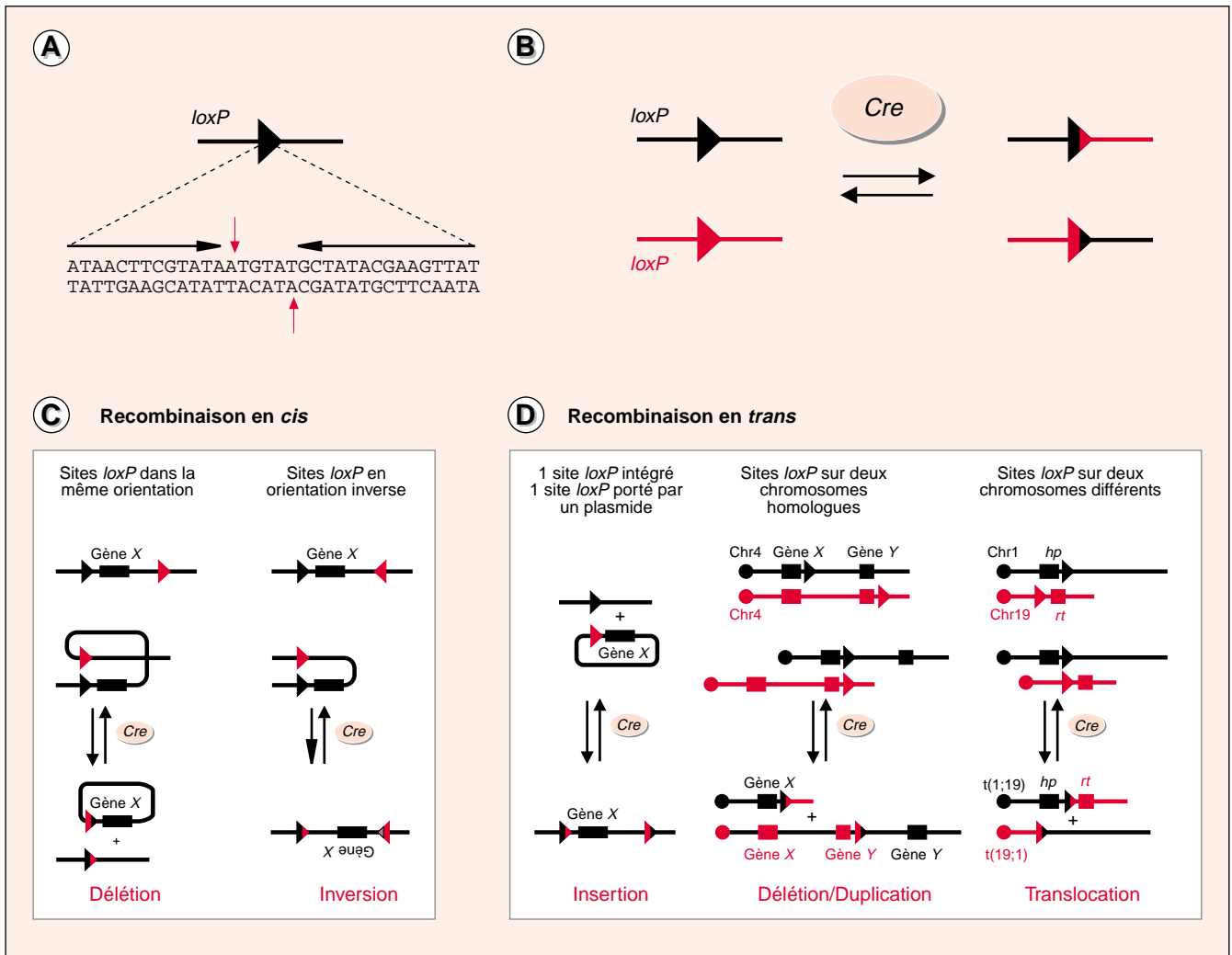


Figure 3. **Mutations « propres ».** La persistance, dans l'allèle modifié, d'une cassette de sélection avec son propre promoteur et des séquences activatrices fortes peut avoir des effets sur le locus cible et les locus avoisinants. S'agissant de la création de mutations subtiles (mutations ponctuelles, petites délétions et insertions) il est préférable d'éliminer les cassettes de sélection. Les deux stratégies les plus utilisées pour créer ce type de modification sont schématisées sur cette figure. À gauche : la stratégie de double remplacement. Cette approche nécessite l'utilisation d'une lignée de cellules ES *hprt*, mutée pour le gène *hprt*. La première étape (A) consiste en l'introduction dans le gène cible d'une cassette d'expression pour le gène *hprt*. La sélection des cellules recombinantes (*hprt*<sup>+</sup>) s'effectue en présence de HAT. Dans un deuxième temps (B), ces cellules sont transfectées avec un deuxième vecteur de remplacement présentant une mutation subtile et dépourvu de cassette de sélection. L'événement de recombinaison homologue, qui aboutit à la perte de la cassette d'expression *hprt*, est sélectionné en présence de 6-TG. L'utilisation d'autres vecteurs de remplacement portant des modifications différentes permet de créer rapidement plusieurs allèles pour le même gène cible. À droite : utilisation du système Cre/loxP (voir figure 4). Dans un premier temps (C), le gène cible est modifié à l'aide d'un vecteur de ciblage comprenant une mutation subtile et une cassette de sélection « floxée », c'est-à-dire entourée de 2 sites loxP dans la même orientation. Dans un deuxième temps (D), l'expression transitoire de la recombinase Cre dans les cellules recombinantes induit la délétion de la cassette de sélection. En dehors de la modification subtile souhaitée, seul un site loxP de 34 pb persiste dans l'allèle modifié final. La position de ce site loxP est choisie de manière à ne pas interférer avec l'expression du gène cible (en général dans un intron).





**Figure 4. Le système Cre/loxP et ses applications.** Le site loxP, symbolisé ici par un triangle, est une séquence de 34 pb composée de deux séquences palindromiques de 13 pb séparées par une séquence de 8 pb (A). La recombinaise Cre reconnaît spécifiquement cette séquence, provoque la coupure de l'ADN (flèches rouges, A) et induit la recombinaison de l'ADN de part et d'autre des deux sites loxP de la manière illustrée en B. Cette réaction est réversible. Plusieurs types d'événements de recombinaison peuvent être produits suivant que les deux sites loxP sont portés par la même molécule d'ADN (recombinaison en cis) ou par deux molécules d'ADN différentes (recombinaison en trans) et suivant l'orientation respective des deux sites loxP (l'orientation d'un site loxP est donnée par la séquence de 8 pb non palindromique). Recombinaison en cis (C). Si les deux sites loxP sont dans la même orientation, la région d'ADN située entre ces sites est déléetée lors de la recombinaison. Ce type de configuration est utilisé pour créer des mutations « propres » (élimination de la cassette de sélection, voir figure 3), des mutations conditionnelles (voir figure 5) et des délétions. Si les deux sites loxP sont en orientation inverse, la recombinaison conduit à l'inversion de la région comprise entre les sites. Recombinaison en trans (D). Dans le cas où un site loxP est intégré dans le génome et l'autre site est porté par un plasmide circulaire, il peut y avoir insertion de séquences portées par le plasmide au niveau du site loxP intégré. Néanmoins, l'insertion étant défavorisée par rapport à la délétion (c'est-à-dire la réaction inverse), ce type d'événement nécessite l'utilisation de sites loxP mutés (voir conclusions/perspectives). Dans le cas où les sites loxP sont tous les deux intégrés dans le génome, la recombinaison en trans induit des remaniements chromosomiques : délétions, duplications ou translocations. Ces événements de recombinaison sont rares et doivent être sélectionnés pour être observés. Pour ce faire, il est possible d'utiliser des cassettes de sélection tronquées et non fonctionnelles hp-loxP et loxP-rt. Après recombinaison entre les sites loxP, et seulement dans ce cas, une cassette hp-loxP-rt fonctionnelle (le site loxP restant est situé dans un intron) est reconstruite, permettant de sélectionner le remaniement chromosomique désiré. Par ailleurs, l'orientation relative des sites loxP par rapport à l'axe centro-téломérique des chromosomes est importante. En effet, dans le cas d'une mauvaise orientation relative, l'événement de recombinaison aboutirait à la formation de chromosomes acentriques ou dicentriques qui, du fait de leur grande instabilité, seraient éliminés de la cellule.

de mutations introduites par l'ENU permet, en principe et grâce à l'haploïdie fonctionnelle de la région porteuse de la délétion, d'identifier le(s) gène(s) responsable(s) des phénotypes obtenus, puisque, par hypothèse, les mutations seront confrontées à une délétion sur l'autre chromosome. Ce type de scénario, dont l'utilité pour l'approche génétique a été démontrée de manière spectaculaire chez la drosophile, apparaissait difficile à étendre à la souris, du fait de la relative rareté des délétions répertoriées chez cet animal. A cet égard, le ciblage par recombinaison homologue dans les cellules ES combiné aux propriétés du système Cre/loxP ouvre de toutes nouvelles perspectives (pour revue, voir [37]) (figure 4C-D). Cette stratégie a été validée en 1995 par l'obtention de souris porteuses de délétions de plusieurs centimorgans (cM) [38]. Par une stratégie différente, You *et al.* ont également obtenu des délétions de dimensions variables autour d'un locus donné [39]. Dans le futur, une collection de délétions pourrait être accumulée et donc servir, en combinaison avec la mutagenèse par l'ENU, à la réalisation d'un projet à long terme d'analyse fonctionnelle globale du génome de la souris. L'enrichissement constant des cartes génétiques de la souris et de l'homme permet de plus d'orienter le choix vers des régions génomiques qui sont riches en gènes et/ou correspondent à des régions candidates pour des maladies génétiques humaines.

### **L'obtention de remaniements chromosomiques facilitée par l'expression de la protéine Cre dans la lignée germinale mâle**

L'expression récemment démontrée de la protéine Cre dans la lignée germinale mâle de souris transgéniques permet de simplifier le processus permettant de créer des remaniements chromosomiques chez la souris en effectuant une partie des opérations directement *in vivo*; en effet, des souris transgéniques pour un gène de fusion *Sycp1-Cre* (dans lequel les séquences régulatrices du gène *Sycp1* codant pour la protéine 1 du complexe synaptonémal gouvernent l'expression de la protéine Cre), expriment la protéine Cre de

manière extrêmement spécifique au cours de la prophase de la première division méiotique des cellules germinales mâles, à un moment où l'appariement chromosomique débute et où les *crossing-over* sont donc facilités [40]. Si l'on croise des souris porteuses de sites *loxP* sur des chromosomes homologues avec ces dernières, on obtient, chez les mâles doubles-transgéniques issus de ce croisement, des spermatozoïdes contenant des délétions ou des duplications de la région génomique située entre les sites *loxP* (figure 4D). Cette approche constitue potentiellement un outil puissant d'analyse fonctionnelle de régions génomiques complexes: par exemple, la question de la signification fonctionnelle du regroupement des gènes *Hox* en complexes peut être abordée, en variant leur nombre ou leur position au sein de ces complexes (*m/s* 1999, n°4, p.560) [41].

### **La mutagenèse conditionnelle: une nouvelle dimension de l'analyse fonctionnelle du génome**

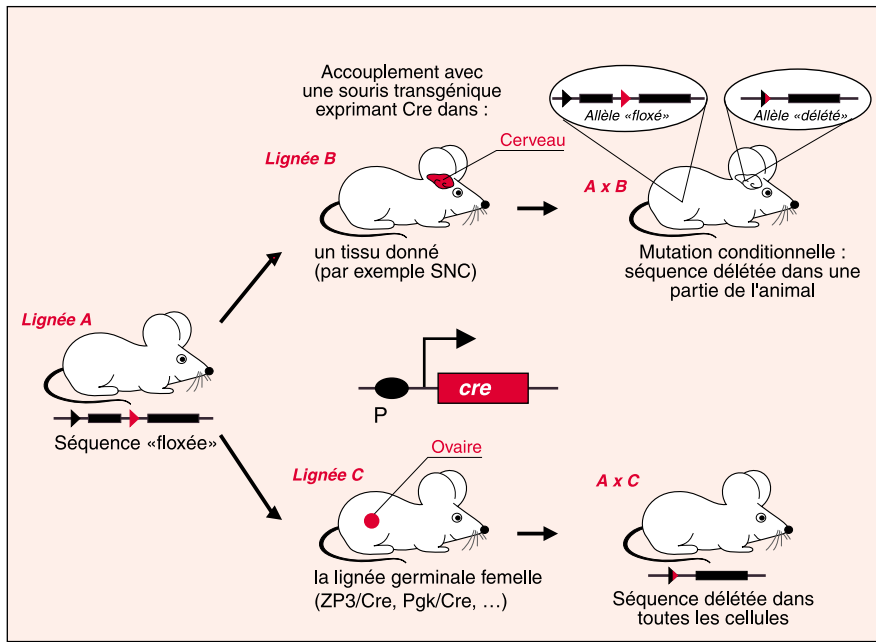
#### **Le système Cre/loxP: ciblage de la protéine Cre par un transgène de fusion**

Nous avons indiqué l'intérêt considérable pour l'analyse fonctionnelle du génome de la création programmée de souris porteuses de modifications génétiques variées (mutations nulles, mutations discrètes, remaniements chromosomiques...). Cependant, ces situations, dans lesquelles les souris mutantes portent la mutation dans toutes leurs cellules, ont aussi leurs limites notamment pour deux types de raisons: (1) dans le cas où la mutation entraîne à l'état homozygote une létalité embryonnaire (un cas extrême est celui où la mutation entraîne la mort cellulaire), il devient impossible d'étudier la fonction éventuelle du gène, au-delà du moment où les embryons meurent et donc pendant toute la vie adulte; (2) un gène peut avoir un profil d'expression très large et son invalidation entraîner un phénotype complexe qui affecte de multiples tissus. Il serait alors utile, pour simplifier l'analyse, de créer des souris porteuses de la mutation seulement dans l'un ou l'autre de ces tissus.

Pour tenter de dépasser ces limitations de la mutagenèse dirigée *in vivo*, différentes équipes ont cherché dans les années récentes à mettre au point des stratégies permettant la survenue conditionnelle d'une mutation chez l'animal en cours de développement ou chez l'adulte (pour revue, voir [31]) [42]. Ici encore, ces stratégies reposent sur les propriétés remarquables du système Cre/loxP. Il s'agit (figure 5), dans un premier temps, de créer des souris porteuses d'un allèle dans lequel deux sites *loxP* encadrent une partie essentielle du gène d'intérêt sans pour autant perturber son fonctionnement, en les plaçant par exemple dans les introns (on parle alors d'allèle « floxé »). S'agissant d'un gène dont les mutations nulles sont létales à l'état homozygote, on vérifiera que les souris homozygotes pour l'allèle floxé sont parfaitement viables. On les croise alors avec une souris transgénique exprimant la recombinase dans un type cellulaire particulier grâce à l'emploi de séquences régulatrices appropriées dans le transgène (la recombinase entraîne l'excision des séquences situées entre les sites *loxP* et donc induit une mutation nulle dans le type cellulaire dans lequel le transgène s'exprime). Cette stratégie est d'une très grande puissance, car elle permet non seulement de contourner le problème de la létalité embryonnaire qui se produit lorsque toutes les cellules de l'embryon portent la mutation, mais encore d'examiner l'effet de cette mutation, en principe dans n'importe quel tissu, pourvu que l'on dispose d'une lignée de souris transgéniques exprimant la protéine Cre dans le tissu en question (Tableau IV et [43-47]).

#### **Systèmes inductibles**

Un raffinement supplémentaire consiste à contrôler l'induction de la mutation, non seulement dans l'espace comme nous venons de le voir, mais également dans le temps. Pour ce faire, la protéine Cre est exprimée sous la forme d'une protéine de fusion avec le domaine de fixation au ligand d'un récepteur des stéroïdes (LBD) [48, 49]; cette protéine de fusion ne présente pas d'activité Cre (figure 6). En revanche, en présence d'un ligand approprié, un changement de conformation se pro-



**Figure 5. Le système Cre/loxP in vivo.** Il est possible de faire fonctionner le système Cre/loxP directement dans la souris. Les applications les plus courantes de ce type d'approche sont représentées sur cette figure et nécessitent l'utilisation de deux types de souris. La première souris (lignée A), obtenue après recombinaison homologue dans les cellules ES, comporte dans son génome une séquence (exons, séquences régulatrices, promoteur, cassette de sélection...) « floxée ». L'autre souris est une souris transgénique exprimant la recombinase Cre sous le contrôle d'un promoteur donné. Si ce promoteur dirige l'expression de Cre dans la lignée germinale femelle (lignée C), les animaux issus d'un croisement entre une femelle C et un mâle A seront porteurs de la délétion dans toutes leurs cellules, l'événement de recombinaison ayant eu lieu dès le stade zygote grâce à la recombinase accumulée dans l'ovocyte. Dans le cas où le promoteur dirige l'expression de Cre dans un ou quelques types cellulaires (lignée B), les animaux issus d'un croisement entre une souris A et une souris B seront mosaïques: les types cellulaires exprimant la recombinase porteront un allèle délété alors que les autres cellules de l'animal porteront un allèle « floxé ». SNC: système nerveux central; P: promoteur.

duit qui permet la restauration de l'activité Cre. Ainsi chez les souris transgéniques portant les deux allèles « floxés » du gène d'intérêt, et le transgène exprimant la protéine de fusion LBD/Cre sous la dépendance d'un promoteur spécifique d'un tissu donné, l'induction de la mutation nulle dans ce tissu peut être obtenue par l'injection, au moment voulu, du ligand approprié (figure 6). Une alternative intéressante à l'utilisation des protéines de fusion LBD/Cre a été récemment illustrée: elle consiste en l'injection, dans un tissu de la souris porteuse du gène « floxé », d'un vecteur adénoviral capable d'exprimer la Cre; ainsi, seules les cellules infectées localement par le virus expriment la mutation (Tableau IV et [44]). Pour terminer cette description rapide

des approches développées en vue de l'obtention de mutations conditionnelles, il faut mentionner la possibilité de contrôler l'expression de la recombinase en utilisant les systèmes qui permettent d'induire ou de réprimer la transcription d'un gène rapporteur. Le système le plus documenté utilise les propriétés du couple opérateur/répresseur de l'opéron bactérien tetracycline (tet) [50]. Il comprend, d'une part, un gène rapporteur mis sous la dépendance d'un promoteur minimal lié à un concatémère de séquences de l'opérateur tet (tetO), d'autre part, un gène exprimant une protéine de fusion entre le répresseur tetR et le domaine activateur de la protéine VP16 (protéine tTA). En présence de tétracycline, la protéine de fusion ne peut se fixer aux séquences

tetO et le gène rapporteur n'est pas exprimé. En l'absence de tétracycline, la protéine de fusion peut se fixer et le gène rapporteur est exprimé. Une variante utilise une protéine de fusion construite avec une version mutée du répresseur tetR et qui ne peut alors se fixer aux séquences tetO qu'en présence de tétracycline: l'activation du gène rapporteur peut donc être induite par l'ajout de l'antibiotique. La réalité du contrôle transcriptionnel obtenu à l'aide de ce système binaire a pu être démontrée aussi bien dans des cellules en culture que chez des souris transgéniques. Ainsi, cette stratégie peut être utilisée pour le contrôle temporel et spatial de l'expression de la Cre [51].

Les stratégies de mutagenèse conditionnelle que nous avons brièvement décrites restent malaisées à mettre en œuvre; elles présentent néanmoins un intérêt exceptionnel pour l'analyse des fonctions géniques et de nombreuses équipes cherchent donc à en améliorer les différentes étapes. Deux conditions, en particulier, doivent être impérativement satisfaites pour que les résultats et leur interprétation ne soient pas biaisés: (1) toute la population cellulaire sur laquelle on veut mesurer l'impact de la mutation doit exprimer la protéine Cre; (2) l'expression de la protéine Cre doit être strictement contrôlée et limitée à la population en question. Ces conditions sont difficiles à remplir, en partie du fait que l'expression de la protéine Cre est obtenue par la création de souris transgéniques conventionnelles. Or, on sait que l'expression des transgènes est soumise à un effet de position qui peut perturber la spécificité de leur expression. Un moyen de tourner la difficulté est de procéder à l'insertion par knock-in (voir ci-dessus) de la protéine Cre dans un gène dont la spécificité d'expression correspond aux types cellulaires où l'expérimentateur souhaite que la mutation soit induite [47, 52].

### Conclusions/perspectives

Si l'on observe le paysage actuel de la mutagenèse programmée in vivo chez la souris, plusieurs réflexions d'ordre différent viennent à l'esprit pour tenter de cerner les difficultés présentes et les développements futurs.

1. Tout d'abord, il est saisissant de constater que, parmi les mammifères



Tableau IV					
QUELQUES EXEMPLES DE MUTATIONS CONDITIONNELLES					
Gène cible	Phénotype de la mutation nulle	Mode de ciblage de la Cre	Tissus hôtes de la recombinaison	Phénotype de la mutation conditionnelle	Réf
<i>APC</i>	Mort embryonnaire (E 6,5)	Infection par adénovirus	Épithélium colo-rectal (site d'inoculation)	Polypes intestinaux	[44]
<i>β-caténine</i>	Mort embryonnaire (E 7,5)	<i>Knock-in (Krt1-19)</i> ou Tg ( <i>Fabp</i> )	Épithélium intestinal	Polypes intestinaux	[47]
<i>IR</i> (récepteur de l'insuline)	Acidocétose diabétique Létalité périnatale	Tg ( <i>Ins</i> )	Cellule β du pancréas	Diabète de type II	[45]
<i>BRCA1</i>	Mort embryonnaire (E 8,5)	Tg ( <i>WAP</i> )	Épithélium de la glande mammaire	Tumeurs et développement anormal de la glande mammaire	[43]
<i>NMDAR1</i>	Létalité périnatale Anomalies multiples du SNC	Tg ( <i>αCaMKII</i> )	Hippocampe (cellules pyramidales de la région CA1)	Défauts d'acquisition de la mémoire spatiale	[46]

Tg : souris transgéniques pour un gène de fusion entre les séquences codantes de la recombinaise Cre et les séquences régulatrices (incluant le promoteur) des gènes indiqués (*Fabp* : fatty acid binding protein ; *Wap* : whey acidic protein ; *αCa MKII* :  $\alpha$  calcium calmoduline dependent kinase II) ; *Krt1-19* : cytokératine 19 ; SNC : système nerveux central.

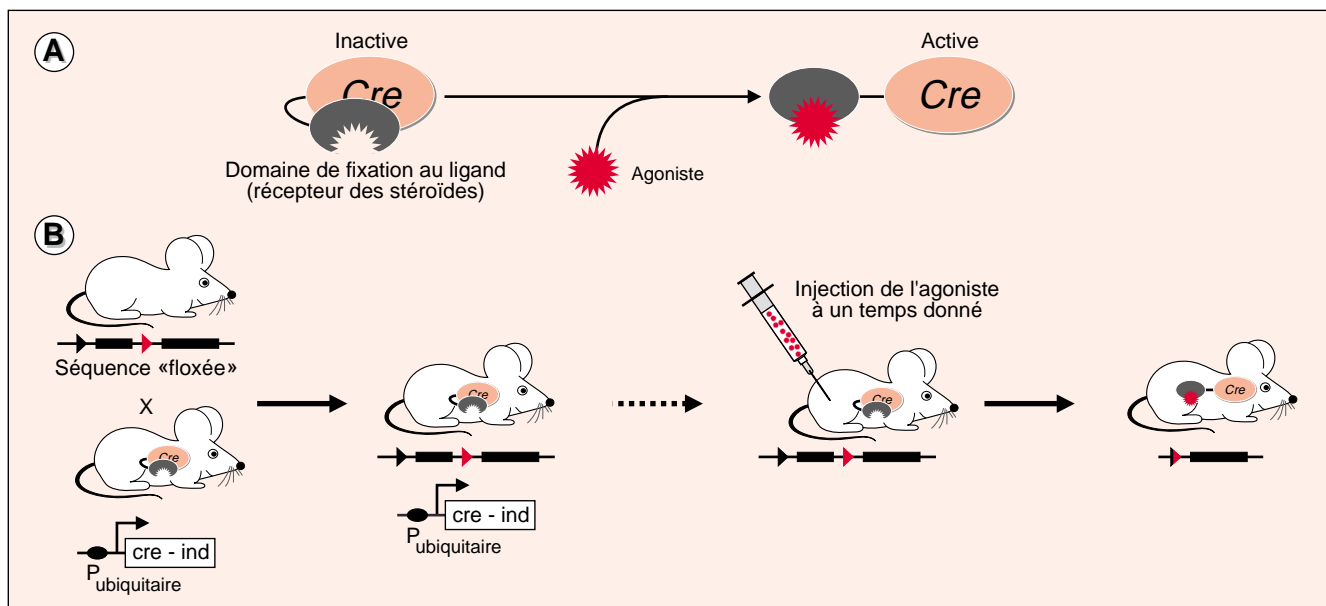


Figure 6. **Système Cre/loxP et mutations inducibles.** **A.** Cette stratégie repose sur l'utilisation d'une protéine de fusion entre la recombinaise Cre et le domaine de fixation au ligand d'un récepteur nucléaire des hormones stéroïdes. En l'absence de ligand, l'activité de la recombinaise est nulle ou très faible alors qu'en présence de ligand elle est très rapidement induite. Le domaine de liaison au ligand est une version modifiée qui présente une affinité réduite pour le ligand naturel (progestérone, œstrogène) mais augmentée pour des agonistes de synthèse (RU486, tamoxifène). L'activité de cette recombinaise Cre inducible (*Cre-ind*) est donc contrôlée par l'administration de l'agoniste. **B.** Cette stratégie peut être utilisée in vivo, chez des animaux porteurs à la fois d'une séquence « floxée » et d'un transgène codant pour la *Cre-ind* sous contrôle d'un promoteur P (ici ubiquitaire). La délétion de la séquence « floxée » est dépendante de l'administration d'agoniste à cette souris. Il est alors possible de contrôler dans le temps l'apparition d'une modification génétique ciblée. Si, au lieu d'un promoteur ubiquitaire, on utilise un promoteur spécifique, l'apparition de la modification peut alors être contrôlée dans le temps et dans l'espace.

étudiés, la modification programmée de la lignée germinale n'est accessible que chez la souris de laboratoire. En effet, jusqu'à présent, il a été impossible – malgré de multiples tentatives – d'isoler des cellules de type ES, capables de coloniser la lignée germinale et de pousser, *in vitro*, chez d'autres mammifères, avec peut-être l'exception de l'espèce humaine [53], mais, dans ce cas-là, la preuve de la colonisation de la lignée germinale reste, pour des raisons évidentes et jusqu'à plus ample informé, inaccessible. Pour être à même d'isoler des lignées de cellules ES chez d'autres espèces, il faudrait sans doute combler une lacune criante, à savoir notre connaissance très limitée de ce qui confère à une cellule le statut de cellule souche totipotente. Certes, des résultats spectaculaires ont été obtenus dans le domaine du « clonage » de certains mammifères (lapins, bovins et, tout récemment, souris) (pour revue, voir [54]) qui permettraient de tourner la difficulté: ainsi, après ciblage d'un gène donné par recombinaison homologue dans des cellules somatiques, l'organisme muté pourrait être reconstitué par transfert nucléaire du noyau d'une cellule mutée dans un ovocyte énucléé. Cependant, outre les rendements de clonage qui restent encore très faibles, se pose également le problème de la recombinaison homologue dans les cellules somatiques qui paraît beaucoup moins efficace que dans les cellules ES (pour revue, voir [55]).

2. Nous avons mis l'accent dans cet article sur l'intérêt de l'obtention, *via* la mutagenèse programmée des cellules ES, d'individus mutants pour l'étude de tel ou tel problème biologique. Cet intérêt est évidemment considérable. Cependant, deux autres atouts des cellules ES méritent d'être soulignés. Le premier résulte des capacités de différenciation des cellules ES *in vitro*: ainsi, depuis quelques années, un certain nombre d'équipes s'efforcent de mettre au point des conditions expérimentales permettant d'orienter cette différenciation vers telle ou telle voie (cellules musculaires, hématopoïétiques, nerveuses, etc.) [56] (pour revue, voir [57]). Une fois ces systèmes mis au point, l'introduction dans les cellules ES de mutations dans des gènes impliqués de manière présomptive dans la

voie de différenciation étudiée devrait apporter de nouvelles lumières sur leur fonction. Deuxièmement, certains aspects du phénotype engendré par une modification génétique donnée (mutation nulle à l'état homozygote, allèle dominant négatif) peuvent être éclairés par la création de chimeres entre des cellules ES génétiquement modifiées et des embryons sauvages (pour revue, voir [58]). En particulier, ce type d'analyse permet de rechercher si une mutation a un caractère cellulaire autonome ou non.

3. Sur un plan purement méthodologique, il faut noter qu'en dépit de l'utilisation très répandue de la mutagenèse dirigée chez la souris, elle reste d'un abord difficile et coûteux aussi bien en temps qu'en crédits. A cet égard, l'émergence de nouveaux scénarios devrait permettre à terme de rendre plus efficace et plus rapide la création de mutations. Ces scénarios, pour l'essentiel, tirent avantage de l'existence de systèmes enzymatiques qui interviennent dans les processus de recombinaison. L'un d'entre eux, le système *Cre/loxP*, a été largement présenté ci-dessus. Il s'agirait ici de tenter d'utiliser la réaction, catalysée par la recombinase *Cre*, d'intégration d'un ADN circulaire porteur d'un site *loxP* dans un site génomique d'intérêt, également porteur d'un site *loxP* (figure 4D). Normalement, c'est la réaction inverse (délétion intramoléculaire) qui est favorisée. Cependant, des « astuces » (fondées sur l'utilisation de sites *loxP* mutés) permettent de favoriser la réaction d'insertion [59]. Une autre approche repose sur l'observation d'une stimulation importante de la recombinaison au niveau de cassures double-brin dans l'ADN. Cette cassure peut être obtenue en utilisant une méganucléase, *I-SceI*, isolée de la levure et qui reconnaît un site spécifique de 18 bp. Ainsi, une fois créé (par recombinaison homologue dans les cellules ES) un allèle d'un gène d'intérêt porteur d'un site *I-SceI*, des modifications génétiques variées pourraient être introduites de manière itérative, et avec une grande efficacité, par co-transfection d'un vecteur d'expression pour *I-SceI*, permettant la cassure double-brin, et d'un vecteur de réparation, permettant l'introduction de la modification désirée [60, 61]. A terme, l'un et l'autre type

d'approches pourraient rendre possible la mutagenèse dirigée *in ovo*, ce qui constituerait à l'évidence, une simplification considérable.

4. Enfin, en dépit de l'intérêt de la mutagenèse dirigée que nous avons souligné tout au long de cet article, sa mise en œuvre reste artisanale, en quelque sorte au coup par coup: clonage de gène d'intérêt, constructions des vecteurs appropriés, dérivation des souris mutantes correspondantes. Environ 1 000 gènes ont été « traités » de la sorte, donc une minorité par rapport aux 80 à 100 000 gènes que contient le génome de la souris ou de l'homme. Les programmes de séquençages fourniront peu à peu ces gènes, jusqu'au séquençage complet du génome de la souris dans peu d'années. Il serait donc intéressant de développer des outils permettant de « mutagéniser » n'importe quel gène, en court-circuitant l'étape de clonage. A cet égard, il faut noter une approche en cours de développement et qui repose sur une stratégie de piège à gène dans les cellules ES (pour revue, voir [62]): un vecteur approprié permet en principe de piéger n'importe quel gène, qu'il soit exprimé ou non; on dispose ainsi d'une banque de clones de cellules ES « étiquetées » et chez lesquels l'insertion du vecteur de piégeage entraîne l'inactivation des gènes. Néanmoins, cette approche a ses limitations: d'une part, le type de mutation ainsi obtenue est stéréotypé (inactivation); d'autre part, il semble que l'insertion du transgène n'aboutit pas dans tous les cas à une inactivation totale.

En conclusion, il est clair que la recombinaison homologue dans les cellules ES de souris a tenu ses promesses. La création de mutations de types très variés, affectant soit un gène, soit des régions génomiques entières continue de fournir des enseignements de premier ordre sur la fonction des gènes et du génome dans la biologie et la physiologie de la souris et permet également de disposer de modèles murins de maladies humaines. Les développements méthodologiques récents, qui reposent en particulier sur l'utilisation de protéines intervenant dans le processus de recombinaison, ne manqueront pas d'élargir ces possibilités, à la fois qualitativement et quantitativement ■

## Remerciements

Les auteurs remercient vivement Patricia Baldacci, Chantal Kress, Xavier Montagutelli et Dominique Morello de leurs suggestions constructives.

## RÉFÉRENCES

- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. 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* 1944; 79: 137-58.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244: 1288-92.
- Smithies O. Animal models of human genetic diseases. *Trends Genet* 1993; 9: 112-6.
- Gardner RL, Brook FA. Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol* 1997; 41: 235-43.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; 317: 230-4.
- Wong EA, Capecchi MR. Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays. *Somat Cell Mol Genet* 1986; 12: 63-72.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
- Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9065-9.
- Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 1986; 323: 445-8.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, et al. Targetted correction of a mutant *HPRT* gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987; 330: 576-8.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-12.
- The Transgenic/Targetted Mutation Database, <http://tbase.jax.org/>.
- Banbury Conference on genetic background in mice. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Neuron* 1997; 19: 755-9.
- Rudnicki MA, Jaenisch R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* 1995; 17: 203-9.
- Horan GS, Ramirez SR, Featherstone MS, et al. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4* and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev* 1995; 9: 1667-77.
- Li Z, Mericskay M, Agbulut O, et al. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol* 1997; 139: 129-44.
- Schneider-Maunoury S, Topilko P, Seitanidou T, et al. Disruption of *Krox-20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 1993; 75: 1199-214.
- Tajbakhsh S, Rocancourt D, Buckingham M. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in *myf-5* null mice. *Nature* 1996; 384: 266-70.
- Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL. Rescue of the *En-1* mutant phenotype by replacement of *En-1* with *En-2*. *Science* 1995; 269: 679-82.
- Hanks MC, Loomis CA, Harris E, et al. *Drosophila engrailed* can substitute for mouse *Engrailed1* function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* 1998; 125: 4521-30.
- Saga Y. Genetic rescue of segmentation defect in *MesP2*-deficient mice by *MesP1* gene replacement. *Mech Dev* 1998; 75: 53-66.
- Wang Y, Jaenisch R. Myogenin can substitute for *Myf5* in promoting myogenesis but less efficiently. *Development* 1997; 124: 2507-13.
- Suda Y, Nakabayashi J, Matsuo I, Aizawa S. Functional equivalency between *Otx2* and *Otx1* in development of the rostral head. *Development* 1999; 126: 743-57.
- Geng Y, Whoriskey W, Park MY, et al. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* 1999; 97: 767-77.
- Acampora D, Avantaggiato V, Tuorto F, et al. Differential transcriptional control as the major molecular event in generating *Otx1<sup>-/-</sup>* and *Otx2<sup>-/-</sup>* divergent phenotypes. *Development* 1999; 126: 1417-26.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.
- Fiering S, Bender MA, Groudine M. Analysis of mammalian cis-regulatory DNA elements by homologous recombination. *Meth Enzymol* 1999; 306: 42-66.
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An *Fgf-8* mutant allelic series generated by *Cre*- and *Flp*-mediated recombination. *Nat Genet* 1998; 18: 136-41.
- Moore RC, Hope J, McBride PA, et al. Mice with gene targeted prion protein alterations show that *Prnp*, *Sinc* and *Prni* are congruent. *Nat Genet* 1998; 18: 118-24.
- Cohen-Tannoudji M, Babinet C. Beyond « knock-out » mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 929-38.
- Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the *Cre/lox* system. *Methods* 1998; 14: 381-92.
- Kilby NJ, Snaith MR, Murray JAH. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 1993; 9: 413-21.
- Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the *Cre* recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5166-70.
- Bode VC. Ethylnitrosourea mutagenesis and the isolation of mutant alleles for specific genes located in the T region of mouse chromosome 17. *Genetics* 1984; 108: 457-70.
- Brown SD, Peters J. Combining mutagenesis and genomics in the mouse-closing the phenotype gap. *Trends Genet* 1996; 12: 433-5.
- Justice MJ, Zheng B, Woychik RP, Bradley A. Using targeted large deletions and high-efficiency N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis for functional analyses of the mammalian genome. *Methods* 1997; 13: 423-36.
- Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. Chromosome engineering in mice. *Nature* 1995; 378: 720-4.
- You Y, Bergstrom R, Klemm M, et al. Chromosomal deletion complexes in mice by radiation of embryonic stem cells. *Nat Genet* 1997; 15: 285-8.
- Vidal F, Sage J, Cuzin F, Rassoulzadegan M. *Cre* expression in primary spermatocytes: a tool for genetic engineering of the germ line. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 274-80.
- Herault Y, Rassoulzadegan M, Cuzin F, Duboule D. Engineering chromosomes in mice through targeted meiotic recombination (TAMERE). *Nat Genet* 1998; 20: 381-4.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossman H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-6.

**RÉFÉRENCES**

43. Xu X, Wagner KU, Larson D, *et al.* Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet* 1999; 22: 37-43.

44. Shibata H, Toyama K, Shioya H, *et al.* Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the *Apc* gene. *Science* 1997; 278: 120-3.

45. Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, *et al.* Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 1999; 96: 329-39.

46. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996; 87: 1327-38.

47. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, *et al.* Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J* 1999; 18: 5931-42.

48. Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, *et al.* Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1404-11.

49. Feil R, Brocard J, Mascrez B, *et al.* Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10887-90.

50. Baron U, Schnappinger D, Helbl V, *et al.* Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1013-8.

51. Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1091-6.

52. Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1317-8.

53. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.

54. Wolf E, Zakhartchenko V, Brem G. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *J Biotechnol* 1998; 65: 99-110.

55. Sedivy JM, Dutriaux A. Gene targeting and somatic cell genetics: a rebirth or a coming of age? *Trends Genet* 1999; 15: 88-90.

56. Brustle O, Jones KN, Learish RD, *et al.* Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285: 754-6.

57. Keller GM. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 862-9.

58. Rossant J, Spence A, Rossant J. Chimeras and mosaics in mouse mutant analysis. *Trends Genet* 1998; 14: 358-63.

59. Araki K, Araki M, Yamamura K. Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 868-72.

60. Donoho G, Jasin M, Berg P. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homo-

logous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 4070-8.

61. Cohen-Tannoudji M, Robine S, Choulika A, *et al.* I-SceI - induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1444-8.

62. Camus A, Barra J, Babinet C. À la recherche de gènes impliqués dans le développement embryonnaire de la souris: le « piégeage » de gènes. *Med Sci* 1998; 14: 1157-66.

**ms2000**

**Summary**

**Twenty years of programmed modifications of the mouse genome: a revolution in the genetic approach of mammalian biology**

The ability to introduce genetic modifications in the germline of complex organisms has been a long standing goal of those who study developmental biology. In this regard, the mouse, a favorite model for the study of mammals, is unique: indeed not only is it possible since the late seventies, to add genes to the mouse genome like in several other complex organisms but also to perform gene replacement and modification. This has been made possible via two technological breakthroughs: (1) the isolation and culture of embryonic stem cells (ES), which have the unique ability to colonize all the tissues of an host embryo including its germline; (2) the development of methods allowing homologous recombination between an incoming DNA and its cognate chromosomal sequence (gene « targeting »). As a result, it has become possible to create mice bearing null mutations in any cloned gene (knock-out mice). Such a possibility has revolutionized the genetic approach of almost all aspects of the biology of the mouse. In recent years, the scope of gene targeting has been widened even more, due to the refinement of the knock-out technology: other types of genetic modifications may now be created, including subtle mutations (point mutations, micro deletions or insertions, etc.) and chromosomal rearrangements such as large deletions, duplications and translocations. Finally, methods have been devised which permit the creation of conditional mutations, allowing the study of gene function throughout the life of an animal, when gene inactivation entails embryonic lethality. In this paper, we present an overview of the methods and scenarios used for the programmed modification of mouse genome, and we underline their enormous interest for the study of mammalian biology.



**INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER  
WORLD HEALTH ORGANIZATION**

**POSTDOCTORAL POSITION  
ON « GENOMIC INSTABILITY AND CARCINOGENESIS »**

**ONE OR TWO POSTDOCTORAL FELLOWSHIPS ARE IMMEDIATELY AVAILABLE TO WORK ON GENOMIC INSTABILITY AND CARCINOGENESIS. THE INCUMBENTS WILL BE INVOLVED IN THE PROJECTS TO STUDY MICROSATELLITE INSTABILITY IN HUMAN ORAL CANCER CARCINOGENESIS IN MSH2 KNOCK-OUT MICE AND/OR RELATIONSHIP BETWEEN GENOMIC INSTABILITY AND GENE METHYLATION.**

**EXPERIENCE IN MICROSATELLITE ANALYSIS, CHEMICAL CARCINOGENESIS OR ANALYSIS OF GENE METHYLATION AND EXPRESSION IS NECESSARY.**

**THE STIPEND IS OF THE ORDER OF US\$22,000 PER YEAR (TAX-FREE) AND THE POST IS FOR ONE YEAR.**

**APPLICANTS MAY SEND THEIR CV AND NAMES OF 3 REFEREES TO MRS CHANTAL DÉCHAUX UNIT OF MULTISTAGE CARCINOGENESIS ARC, BY E-MAIL AT: [DECHAUX@ARC.FR](mailto:DECHAUX@ARC.FR) OR FAX: (+ 33) (0) 472 73 84 42.**

**DEADLINE FOR RECEIPT OF APPLICATIONS:  
29 FEBRUARY 2000**

**TIRÉS À PART**

C. Babinet.