

Les cellules souches embryonnaires de souris : une voie privilégiée de transformation génétique à l'échelle de l'animal

Il y aura bientôt quarante ans, Stevens, aux États-Unis, décrivait des tumeurs testiculaires rares et spontanées chez une lignée consanguine de souris, la lignée 129. Ces tumeurs, appelées tératocarcinomes, étaient constituées de tissus variés bien différenciés mais également de cellules souches pluripotentes. Par la suite, Stevens obtenait le développement de tumeurs du même type en greffant des crêtes génitales mâles d'un embryon dans les testicules d'un adulte et démontrait qu'elles étaient dérivées de cellules germinales primitives [1]. Des tératocarcinomes ovariens furent également décrits dans la lignée de souris LT chez laquelle on observe, dans l'ovaire, le développement parthénogénétique d'ovocytes en embryons de la période de clivage qui, dans de rares cas, évoluent vers la formation d'un tératocarcinome [1]. C'est à partir de ces tumeurs que furent isolées, dans les années 1970, les premières lignées de cellules souches embryonnaires [2] alors appelées pour cette raison cellules EC (*embryonal carcinoma cells*). De nombreuses études permirent alors de montrer que ces cellules, tant du point de vue biochimique que de celui de leurs capacités de différenciation, partageaient de nombreuses propriétés avec les cellules totipotentes du très jeune embryon. La mise au point par Gardner [3] de techniques très élégantes de micromanipulation et de microchirurgie du très jeune embryon permit d'obtenir une démonstration sans équivoque du caractère pluri- ou totipotent des cellules EC : en effet, après injection de quelques-unes de ces cellules dans la cavité d'un blastocyste hôte, Gardner et son équipe [4] ainsi que Illmensee et Mintz [5] purent obtenir des sou-

ris chimères chez lesquelles différents tissus étaient constitués en partie de cellules d'origine EC. Le point crucial était évidemment de savoir si ces cellules étaient également capables de coloniser la lignée germinale des chimères ; or, en dépit de nombreuses tentatives faites à partir de lignées cellulaires variées, il s'est avéré qu'à de très rares exceptions près, on n'observait pas la transmission, par les chimères, du génotype des cellules EC à la descendance. L'explication probable de ce défaut des cellules EC tient au fait que, dans beaucoup de cas, celles-ci étaient le siège d'aberrations chromosomiques (translocations, mono- ou multisomies partielles...) les rendant sans doute incapables à effectuer de manière normale les différentes phases de la méiose. Il faut noter également que l'ensemble des lignées de cellules EC, bien que partageant certaines propriétés rappelant celles de cellules souches embryonnaires, constituaient un groupe hétérogène quant à leur capacité à se différencier *in vitro* ou à coloniser l'embryon *in vivo* [6]. Il est probable que ces différences tiennent à l'histoire propre de chacune de ces lignées et notamment à celle de la tumeur dont elles sont dérivées. L'origine tumorale des cellules EC pouvant expliquer leur incapacité relative à se comporter comme des cellules embryonnaires totipotentes amena alors différentes équipes, et particulièrement celle de M. Evans (Cambridge, MA, USA) à tenter d'isoler des lignées à partir de la culture directe de blastocystes *in vitro*. Ces études ont donné naissance à ce qu'on pourrait appeler la deuxième génération de lignées de cellules souches embryonnaires appelées maintenant cellules ES [6] (*embryonic stem*

cells). Ces lignées, par comparaison avec les lignées EC, ont plusieurs propriétés remarquables. Une étude portant sur 17 lignées indépendantes a en effet montré que toutes sans exception étaient capables de coloniser avec une haute efficacité les tissus d'une souris issue d'un blastocyste dans lesquels quelques-unes de ces cellules avaient été injectées. La proportion de chimères ainsi que la contribution des cellules ES dans chacune des chimères s'avérait très élevée. Enfin, donnée capitale, une proportion importante des chimères obtenues sont capables de former des cellules germinales possédant le génotype ES et donc de transmettre celui-ci à la génération suivante. C'est cette propriété remarquable qui fait des cellules ES un outil unique pour l'étude de différents aspects du développement [6].

En effet, il devient possible de sélectionner dans les cultures de cellules ES tel ou tel type de modification génétique et de le réintroduire dans l'animal pour en étudier l'effet *in vivo* (figure 1). Une telle stratégie de modification génétique programmée ne peut être envisagée avec la méthode classique d'obtention de souris transgéniques par injection d'ADN dans un pronucléus de l'œuf fécondé, car le petit nombre d'œufs disponibles interdit toute méthode de sélection.

Essentiellement deux types de modifications génétiques ont été réalisés à l'aide de cellules ES : d'une part, l'introduction de mutations dans un gène donné préalablement cloné et cela grâce à la recombinaison homologue (RH) [7] ; d'autre part, l'introduction de transgènes construits de telle sorte qu'ils révèlent l'activité, soit d'un gène donné, soit d'une

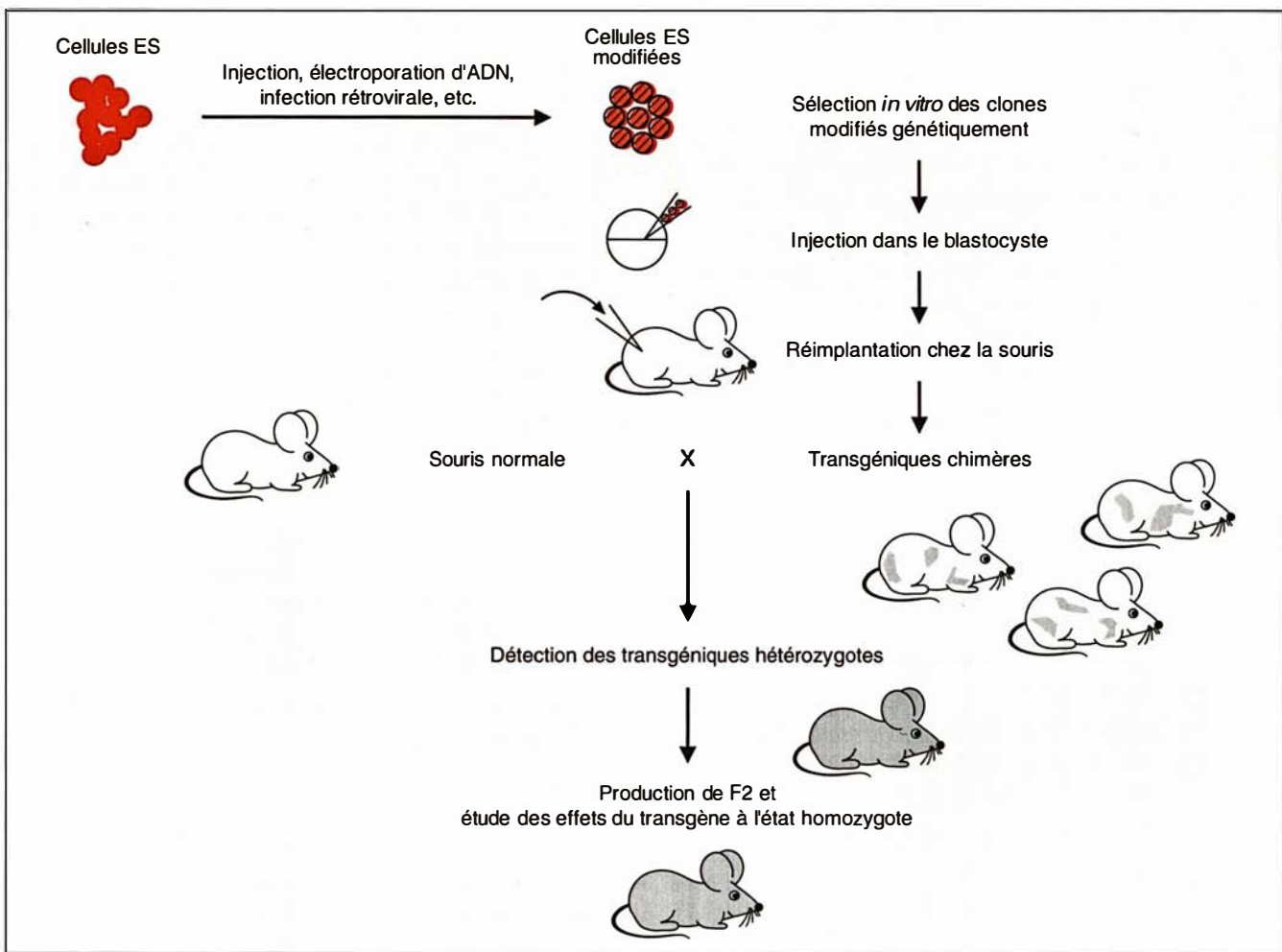


Figure 1. **Transgénèse utilisant les cellules ES.** Les cellules ES cultivées *in vitro* peuvent être modifiées génétiquement par divers moyens (mutagenèse, transfection d'ADN, infection rétrovirale, etc.). Les clones modifiés sont sélectionnés, puis injectés dans des blastocystes receveurs. Les cellules ES proviennent d'une lignée présentant un pelage agouti (gris) et les blastocystes d'une lignée albinos (blanche) ou non-agouti (noire). Les mâles chimériques (qui présentent des taches grises sur une pelage blanc ou noir) sont accouplés avec des femelles de la même lignée que celle qui a fourni les blastocystes. Les individus transgéniques hétérozygotes ainsi obtenus sont gris car le caractère agouti est dominant, alors que les caractères albinos et non-agouti sont récessifs. Les hétérozygotes sont croisés entre eux afin d'observer les effets du gène modifié à l'état homozygote. (D'après Montagutelli et al., médecine/sciences 1990 ; 6 : 18-29, figure 1.)

séquence activatrice (*enhancer*) particulière : on parle alors de « piège » à gène (*gene trap*) et de « piège » à activateur (*enhancer trap*) [8].

Les cellules ES et la recombinaison homologue : mutagenèse dirigée *in vivo*

La possibilité d'introduire à volonté des mutations dans les gènes de la souris est évidemment d'un intérêt considérable : en effet, le phénotype des individus porteurs de ces mutations à l'état homozygote ou même hétérozygote ouvre une voie d'import-

tance vers l'élucidation de la fonction de ces gènes. Le schéma général d'obtention de cellules ES mutées dans un gène donné qui a été mis au point en particulier avec le gène HPRT dont les mutations sont directement sélectionnables [9, 10] (figure 2) repose sur un scénario dont le principe de base est assez simple : un transgène est construit contenant les séquences de ces gènes au sein desquelles est insérée une « cassette » permettant l'expression d'un gène de résistance à un antibiotique, cette cassette étant placée à l'intérieur d'un

exon de manière à empêcher la formation d'un ARN messager fonctionnel. Deux agencements différents des séquences homologues entraînent l'un, le remplacement des séquences endogènes par le transgène ; l'autre, l'insertion de ce dernier dans le gène endogène (figure 2). Après transfection du transgène dans les cellules ES, la culture de celles-ci en présence de l'antibiotique permet de sélectionner les clones ayant intégré le transgène. La difficulté majeure à résoudre tient alors au fait que la proportion des clones ayant intégré le transgène par

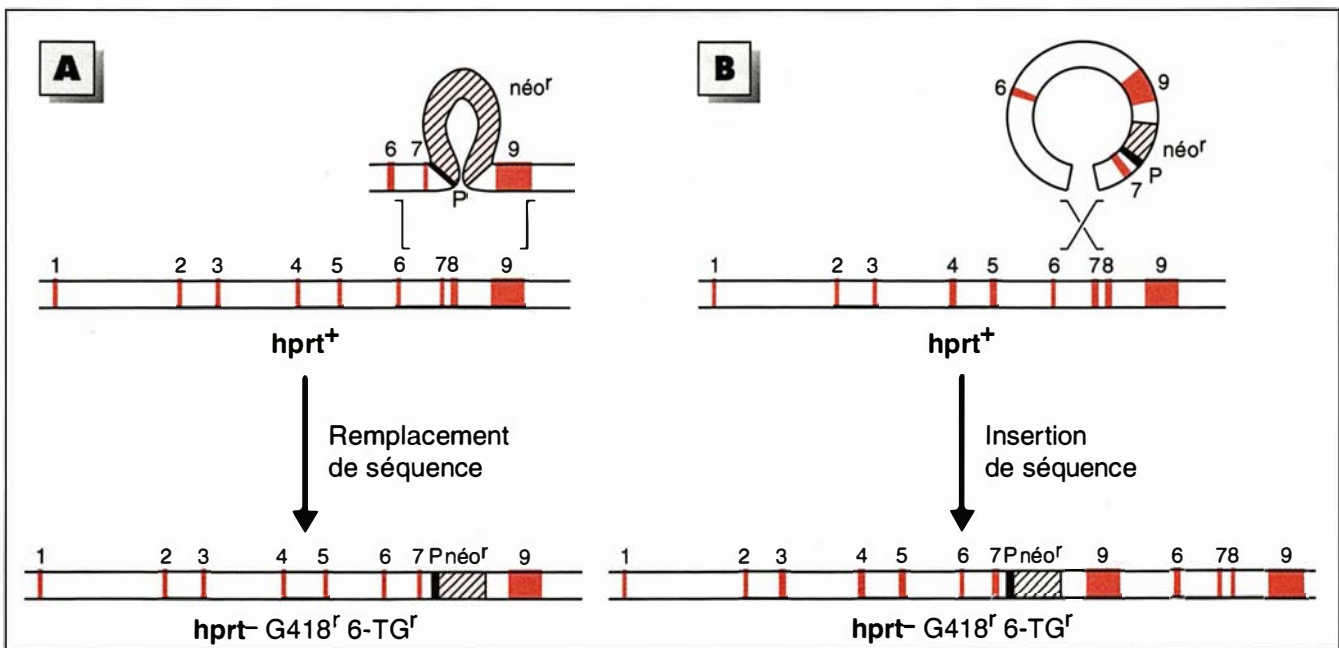


Figure 2. **Mutations du gène HPRT par RH : vecteurs d'insertion et vecteurs de remplacement.** Ces vecteurs entraînent soit le remplacement (A), soit la duplication (B) des séquences endogènes. Dans les deux cas, une mutation nulle est créée par interruption de la séquence du gène endogène tandis que la cellule devient résistante au G418 grâce à la présence dans l'exon 8, du gène bactérien de résistance à la néomycine (Néo^r). Noter que, dans ce cas, l'événement de RH est directement sélectionnable car les cellules HPRT⁻ deviennent résistantes à la 6-thioguanine (6-TG^r). (D'après Montagutelli et al., médecine/sciences 1990 ; 6 : 18-29, figure 3.)

RH (donc au site du gène endogène) est généralement très faible (de l'ordre de 1/1000 à 1/100 000) chez les cellules d'eucaryotes supérieurs et ce, contrairement à ce que l'on observe chez des organismes plus simples comme la levure, les trypanosomes ou les Leishmania. Pour tourner cette difficulté, deux types de démarche (non exclusifs l'un de l'autre) ont été employés : d'une part, le raffinement du procédé de criblage par l'utilisation de méthodes très sensibles comme la PCR (figure 3) ; d'autre part, la mise au point de techniques de sélection permettant d'enrichir la culture de cellules ES transfectées en cellules ayant intégré le transgène par RH ; deux exemples en sont donnés dans la figure 4, applicables à des gènes non exprimés (figure 4A) [11] ou exprimés (figure 4B) [12] dans les cellules ES. Bien que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le processus de RH dans les cellules ES soient encore loin d'être connus dans le détail, on peut dégager, de l'ensemble des travaux effectués à ce jour, un certain

nombre de données concernant le taux de RH et qui ont un intérêt opérationnel : (1) il apparaît que ce taux est variable d'un gène à l'autre ; (2) la longueur d'homologie du transgène avec le gène endogène est un

paramètre important [9] : plus les séquences homologues sont longues, plus élevé est le taux de RH, avec toutefois — semble-t-il — une taille limite au-delà de laquelle l'addition d'un surplus de séquences homo-

Figure 4. **Deux méthodes d'enrichissement en événements de recombinaison homologue.** A. **Cas d'un gène non exprimé dans les cellules ES : double sélection positive et négative.** La séquence introduite comporte deux gènes néo et HSV-tk, placés sous le contrôle de promoteurs actifs dans les cellules ES, permettant de ce fait leur fonctionnement indépendamment du site d'insertion. La cassette néo rend la cellule résistante au G418 ; la cassette HSV-tk la rend sensible au gancyclovir (Ganc). 1. L'intégration aléatoire du transgène a lieu par ses extrémités et concerne donc la totalité des séquences introduites. Les cellules sont alors résistantes au G418 et sensibles au gancyclovir. 2. Lors d'un événement de recombinaison homologue, le gène néo placé au cœur des zones d'homologie est intégré, alors que le gène HSV-tk est éliminé. La cellule devient donc résistante à la fois au G418 et au gancyclovir, et le gène endogène X est inactivé. B. **Cas d'un gène exprimé dans les cellules ES : sélection simple.** Le transgène introduit comporte un seul gène de sélection, inséré dans un exon, en phase avec la séquence codante, et sans promoteur. La zone homologue ne recouvre pas le promoteur du gène cible. 1. Lors d'une intégration au hasard, la probabilité que le gène néo se trouve sous la dépendance d'un promoteur est faible, la cellule est donc sensible au G418. 2. Lors d'un événement de recombinaison homologue, le gène néo se retrouve sous la dépendance du promoteur du gène endogène. Une protéine de fusion X^{néo} est produite conférant la résistance au G418.

gues paraît avoir un moindre effet [13] ; (3) l'introduction de séquences étrangères, même de grande longueur, au sein du transgène semble ne pas interférer avec le processus de RH [14] ; (4) le taux de RH obtenu avec les vecteurs de remplacement se révèle nettement plus élevé que celui obtenu avec les vecteurs d'insertion [15].

Le scénario que nous avons décrit jusqu'ici permet en principe l'obtention de mutations « nulles ». A ce jour, environ une vingtaine de gènes, impliqués dans des systèmes biologiques variés, ont été ainsi mutagénisés, et les souris hétérozygotes puis homozygotes pour ces mutations ont été créées. Les phénotypes obtenus chez les souris homozygotes mutantes ont d'ores et déjà permis de tirer nombre d'enseignements sur la fonction des gènes correspondants (voir, par exemple, le cas de mutations introduites dans des gènes impliqués dans le système immunitaire [16]). Cependant, il est clair que l'obtention d'altérations génomiques plus subtiles que celles interrompant la phase

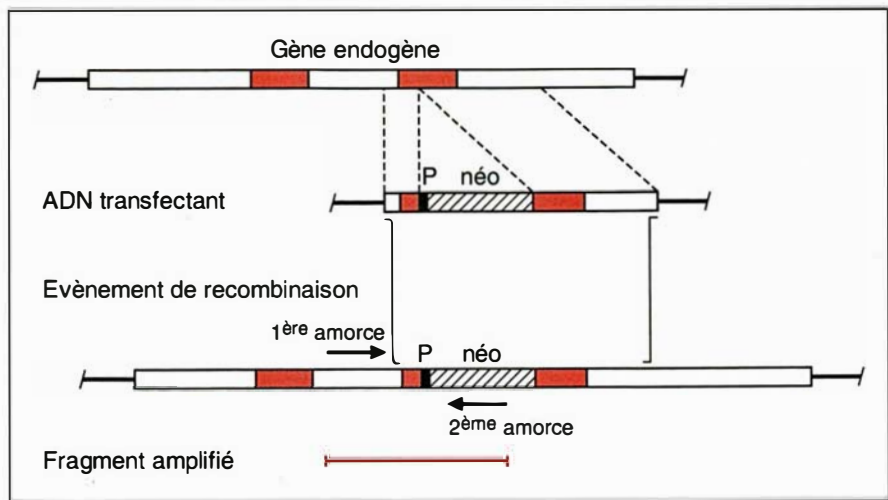
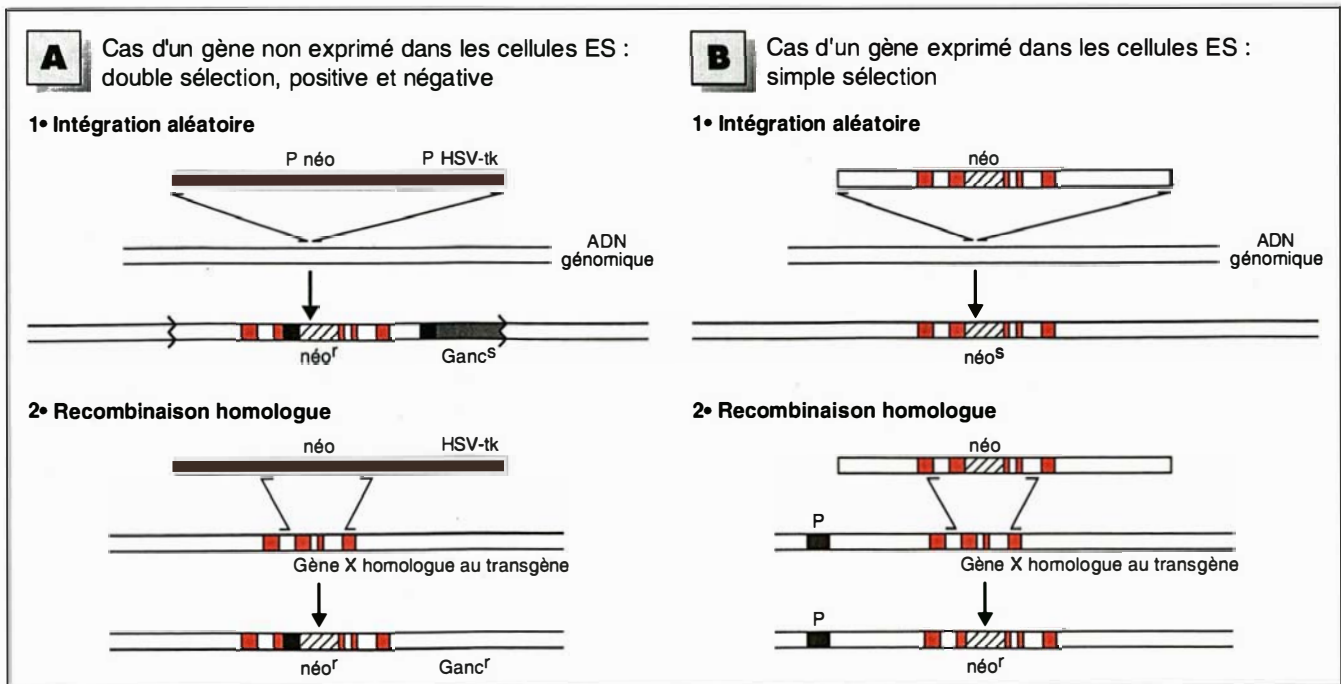


Figure 3. Détection des recombinants homologues par amplification génique. L'ADN extrait d'un groupe de cellules transfectées est mis en présence de deux amorces : l'une spécifique de séquences du gène situées à l'extérieur de la région d'homologie, l'autre spécifique de la modification introduite par l'ADN transfectant (dans ce cas, la 2^e amorce est spécifique du gène de résistance à la néomycine [néo^r]). La réaction d'amplification n'a lieu que lorsque l'ADN exogène s'est inséré dans la séquence endogène. La sensibilité de la méthode permet le repérage des événements de RH, même lorsque ceux-ci concernent une très petite proportion de la population cellulaire (■ : exons ; □ : introns ; ▨ : néo). (D'après Montagutelli et al., médecine/sciences 1990 ; 6 : 18-29, figure 5.)



codante — comme, par exemple, des mutations ponctuelles dans les régions régulatrices ou dans telle ou telle partie des régions codantes — est également d'un grand intérêt. Un tel résultat a été obtenu récemment grâce à un système utilisant deux sélections successives (figure 5A) qui devrait en principe être applicable à n'importe quel gène [17]. On peut envisager un autre scénario dans lequel on utilise un transgène portant une mutation ponctuelle et où la « cassette » de sélection serait située dans un intron (figure 5B) [18]. Pour achever ce panorama des utilisations de la RH dans les cellules ES, il faut noter un dernier type d'altération génétique, qui devrait s'avérer extrêmement utile pour l'étude fonctionnelle des gènes. Celui-ci consiste à insérer en phase dans les séquences codantes du transgène, un gène rapporteur : le gène de la β -galactosidase d'*E. coli*, dont l'activité est aisément repérable à l'échelle cellulaire grâce à une coloration bleue spécifique [14, 19]. Après recombinaison homologue dans les cellules ES, l'un des allèles du gène endogène devrait donc gouverner, non plus la synthèse de son propre produit, mais celle de la β -galactosidase. Les souris transgéniques obtenues à partir de cellules ES ainsi modifiées ont un double avantage par rapport à celles que l'on pourrait obtenir par la méthode « classique » (injection du transgène

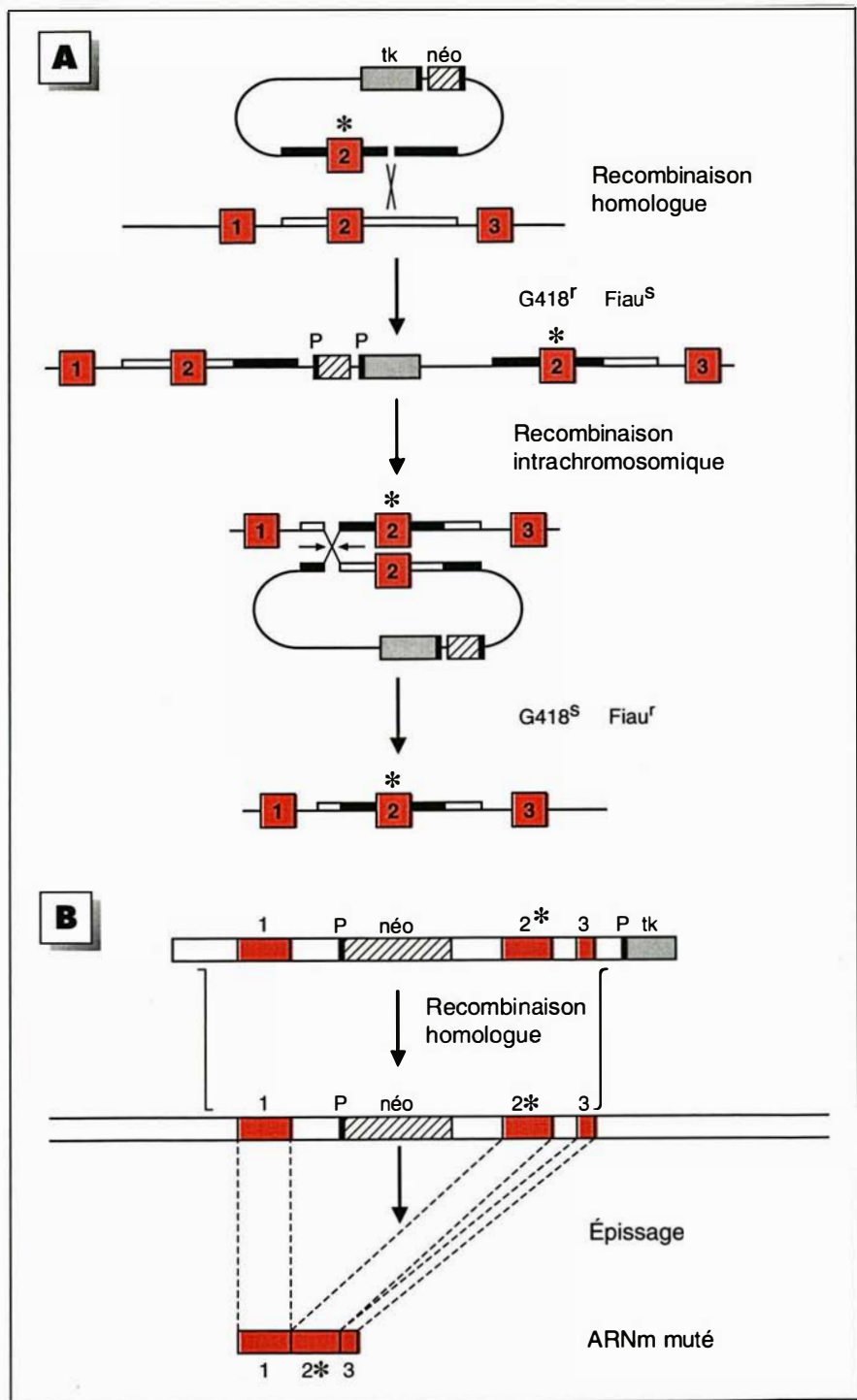


Figure 5. **Deux scénarios pour l'introduction d'une mutation ponctuelle dans un gène endogène par RH.** **A.** La méthode du hit and run. (D'après Hasty et al. [17]). Un vecteur d'insertion contenant une cassette de sélection positive (*neo* : résistance G418) et une négative (*tk*) (sensibilité à la drogue FIAU) ainsi qu'une mutation ponctuelle ici dans l'exon 2* du gène. Les cellules transfectées sont d'abord soumises à la sélection par le G418 (*neo^r*) et les clones ayant subi la RH sont repérés. Ces clones qui sont *G418^r* et *FIAU^s* sont alors cultivés et soumis à la sélection par le FIAU, ce qui permet de sélectionner des cellules chez lesquelles une recombinaison intrachromosomique

s'est produite avec exclusion des séquences étrangères (plasmide, cassettes *tk* et *neo*) : les clones ainsi obtenus sont porteurs de la mutation ponctuelle présente à l'origine dans le vecteur d'insertion. **B.** Le vecteur est du même type que les vecteurs de remplacement de la figure 2, mais le gène de résistance au G418 (*neo^r*) est inséré dans un intron, précédé du promoteur en permettant l'expression (P). Une mutation ponctuelle a été préalablement introduite dans les séquences génomiques (dans l'exon 2*). Lors de la formation de l'ARNm, la cassette P-*neo* est éliminée par épissage.

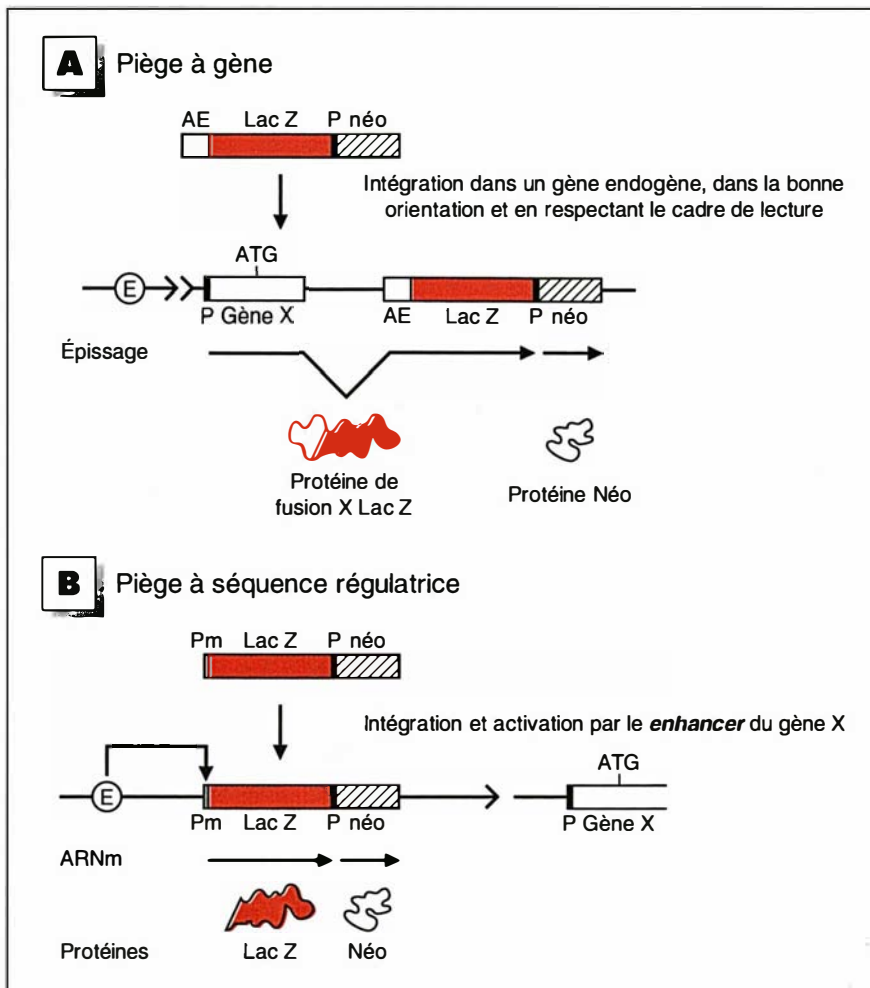


Figure 6. **A. Pièges à gène.** Le piège à gène est constitué d'un accepteur d'épissage en 5' (AE) des séquences de la β -galactosidase Lac Z sans promoteur (■), ainsi que d'une cassette de sélection fonctionnant indépendamment (P-néo). La β -galactosidase pourra s'exprimer sous forme d'une protéine de fusion, si le transgène s'intègre en phase dans un gène endogène. **B. Pièges à séquences activatrices.** Le piège à séquence activatrice contient un promoteur minimum (P^m) (avec seulement une TATA box) branché sur les séquences de la β -galactosidase (avec son propre ATG) et une cassette de sélection. La β -galactosidase pourra s'exprimer si le transgène s'intègre au voisinage de séquences activatrices (E). (D'après [20].)

de fusion dans le pronucléus de l'œuf fécondé) : d'une part, l'insertion du transgène par RH entraîne l'inactivation d'un des deux allèles du gène endogène ; d'autre part, l'expression de la β -galactosidase est soumise à toutes les régulations propres au gène endogène : il est donc possible de repérer à l'échelle cellulaire les régions où le gène est exprimé, et cela aussi bien chez les individus hétérozygotes que chez les homozygotes. Notons que cette approche, qui

permet un ciblage aussi spécifique, pourrait être étendue à d'autres gènes rapporteurs comme, par exemple, des oncogènes en vue de l'immortalisation de populations cellulaires particulières.

Les cellules ES : un outil pour « piéger » des gènes

La stratégie de mutagenèse ciblée par RH n'est évidemment applicable qu'aux gènes clonés. Nombre de ceux-ci, comme les protooncogènes

ou les gènes à boîte homéotique, sont des candidats à un rôle dans la diversification cellulaire et le développement. Il est cependant très probable que d'autres gènes sont impliqués dans ces processus. Aussi une stratégie a-t-elle été mise au point récemment en vue d'identifier de nouveaux gènes candidats à une fonction dans le développement [8, 20, 21]. Le principe en est le suivant : il s'agit d'utiliser des transgènes dans lesquels un gène rapporteur — comme, par exemple, la β -galactosidase — est inséré de telle sorte que son expression soit dépendante de son intégration dans un gène et donc mime l'expression normale de celui-ci. Une fois ces transgènes introduits dans les cellules ES, le profil d'expression du transgène peut être examiné au cours du développement des chimères obtenues après l'injection des cellules ES modifiées. C'est l'examen judicieux de ce profil d'expression qui guide alors l'expérimentateur dans le choix de poursuivre ou non l'analyse des différents clones de cellules ES obtenus. Deux catégories de construction ont été utilisées dans ces expériences (figure 6) : les unes, appelées pièges à activateur, sont réalisées de telle sorte que l'expression du gène rapporteur dépende de la présence de séquences activatrices au voisinage du site d'insertion (figure 6B). Il faut noter qu'une telle approche, originellement utilisée chez la drosophile [22], a été d'abord tentée avec la transgénèse classique. De fait, des auteurs ont montré qu'un transgène contenant un promoteur « minimum » couplé à la β -galactosidase pouvait être activé, selon un diagramme spécifique, dans les souris transgéniques [23-25]. Cependant, l'utilisation des cellules ES permet, d'une part, le choix préalable des profils d'expression dans les chimères obtenues par injection des cellules ES dans un blastocyste et, d'autre part, l'utilisation d'un deuxième type de construction piège particulièrement intéressant, mais qui nécessite le criblage ou la sélection d'événements rares et donc s'avère impraticable à partir des œufs fécondés : il s'agit de constructions, appelées pièges à gène, qui ne peuvent exprimer le gène rapporteur que s'il est intégré de manière fonctionnelle

de transcription (figure 6A). Le but ultime de cette stratégie est évidemment de cloner les séquences activatrices ou les gènes ainsi piégés. A cet égard, le piège à gène offre une supériorité sur le piège à séquences activatrices : en effet, le clonage de ces séquences risque d'être rendu difficile si elles sont éloignées du site d'insertion du transgène ; au contraire, le principe même du piège à gène qui repose sur la formation d'un transcrit hybride (figure 6A) gène endogène- β -galactosidase, devrait rendre le clonage de l'ADN mixte et finalement du gène piégé, relativement aisé. Enfin, il faut souligner que l'insertion du transgène dans les séquences du gène endogène devrait créer dans la majorité des cas une mutation « nulle » dans l'un des deux allèles du gène piégé et donc permettre, après réintroduction dans l'animal, l'observation du phénotype éventuellement créé par cette mutation. Une étude très récente illustre la puissance de la stratégie du piégeage de gènes [26] : les auteurs utilisent un vecteur rétroviral contenant une séquence codant pour une protéine de fusion β -galactosidase-protéine de résistance au G418 (un avantage de l'introduction du transgène par infection rétrovirale est que l'insertion du rétrovirus dans l'ADN de l'hôte n'entraîne quasiment pas de réarrangement des séquences flanquantes, contrairement à ce qui se passe lorsque l'ADN est introduit par transfection). Ces séquences sont introduites dans les cellules ES par infection avec le rétrovirus recombinant qui est construit de telle sorte que les LTR sont inactivés et que la protéine de fusion ne peut être exprimée que lors de son insertion fonctionnelle dans un gène endogène. De cette manière, la quasi-totalité des clones ES résistant à la néomycine expriment également la β -galactosidase et correspondent donc à des insertions dans un gène actif dans les cellules ES. Environ une trentaine de clones indépendants ont pu être utilisés pour obtenir des chimères germinales puis des souris hétérozygotes pour l'insertion : la coloration par la β -galactosidase à différentes étapes du développement embryonnaire met en évidence des profils d'expression variés aussi bien dans le temps que

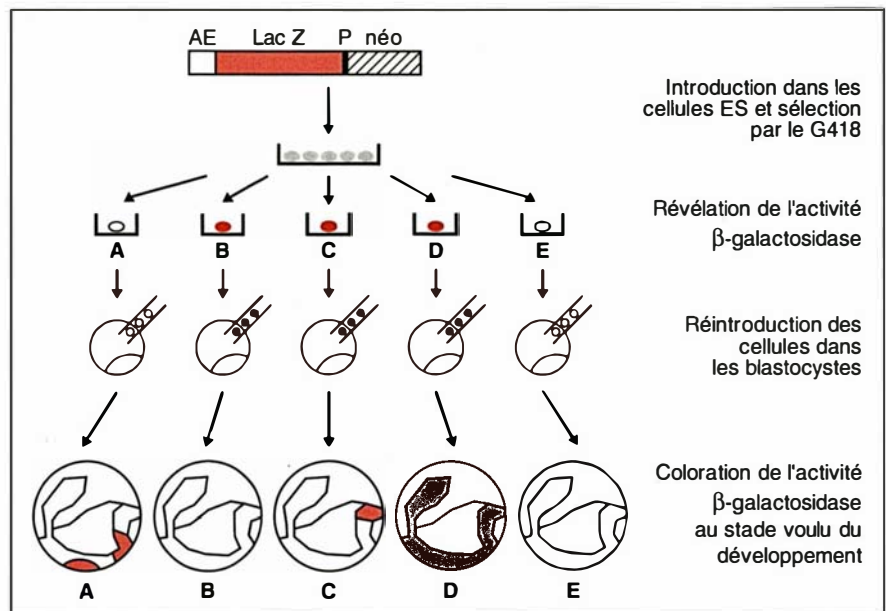


Figure 7. **Recherche de gènes impliqués dans le développement : examen du profil d'expression des gènes piégés.** Après introduction dans les cellules ES du transgène et sélection par le G 418, l'activité β -galactosidase est recherchée dans les différents clones en présence de X-gal : cellule exprimant (\bullet) et n'exprimant pas (\circ) la β -galactosidase. Certains des clones résistants au G 418 produisent de la β -galactosidase (B,C,D), d'autres non. Après injection des différents clones dans un blastocyste hôte, l'activité du gène « piégé » est recherchée dans les chimères obtenues à partir de ces blastocystes, à un stade donné du développement embryonnaire, schématisé sur la dernière ligne. Plusieurs situations sont illustrées ; A : gène activé au cours du développement ; B : gène dont l'activité est éteinte durant la même période ; C : gène dont l'activité est réglée au cours du développement ; D : gène à activité ubiquitaire et constitutive ; E : gène inactif durant la période considérée.

dans l'espace (figure 7). Parmi ces lignées de souris transgéniques, deux présentent un phénotype mutant à l'état hétérozygote et dans neuf lignées sur 24 testées, l'insertion du transgène à l'état homozygote a entraîné une létalité embryonnaire : ces neuf insertions correspondent donc, selon toute vraisemblance à l'inactivation de gènes importants dans le développement embryonnaire.

Conclusion

Grâce à l'utilisation de lignées de cellules en culture capables de coloniser la lignée germinale d'un embryon hôte, il a été possible, au cours de ces dernières années, d'étendre et de raffiner considérablement les possibilités de transformation génétique à l'échelle de l'organisme par rapport à celles déjà disponible avec la trans-

genèse « classique » réalisée par l'injection d'ADN dans le pronucléus de l'œuf fécondé. Il est devenu possible de réaliser une mutagenèse programmée des souris, pour ce qui concerne les gènes déjà clonés, et, grâce aux techniques de piégeage, d'avoir accès à de nouveaux gènes impliqués dans le développement. Il faut ajouter que les cellules ES constituent un matériel de choix pour l'étude biochimique et moléculaire du statut de cellule souche totipotente, en permettant de tourner la difficulté liée à la rareté des cellules équivalentes dans l'embryon en cours de développement. La mise en œuvre des stratégies que nous avons décrites reste relativement lourde et se trouve encore dans l'enfance, mais, compte tenu des premiers résultats obtenus et de ceux qu'on peut en attendre, il ne

fait aucun doute qu'elles seront de plus en plus utilisées pour aborder les problèmes fondamentaux qui se posent au biologiste du développement ■

Charles Babinet

Unité de génétique des mammifères, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

TIRÉS A PART

C. Babinet.

RÉFÉRENCES

1. Stevens LC. Testicular, ovarian, and embryo-derived teratomas. *Cancer Surv* 1983 ; 2 : 75-91.
2. Nicolas JF, Avner P, Gaillard J, Guénet JL, Jakob H, Jacob F. Cell lines derived from teratocarcinomas. *Cancer Res* 1976 ; 36 : 4224-31.
3. Gardner RL. Production of chimeras by injecting cells or tissue into the blastocyst. In : *Methods in Mammalian Reproduction*. New York : Academic Press, 1978 : 137-65.
4. Papaioannou V, Gardner RL, McBurney MW, Babinet C, Evans MJ. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 1978 ; 44 : 93-104.
5. Illmensee K, Mintz B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976 ; 73 : 549-53.
6. Robertson EJ, Bradley A. Production of permanent cell lines from early embryos and their use in studying developmental problems. In : Pedersen J, ed. *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. New York : Cambridge University Press, 1986 : 475-508.
7. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989 ; 244 : 1288-92.
8. Skarnes WC. Entrapment vectors : a new tool for mammalian genetics. *Biotechnology* 1990 ; 8 : 827-31.
9. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987 ; 51 : 503-12.
10. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, et al. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 1987 ; 330 : 576-8.
11. Schwartzberg PL, Goff SP, Robertson EJ. Germ-line transmission of a *c-abl* mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* 1989 ; 246 : 799-803.
12. Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the protooncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells : a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988 ; 336 : 348-52.
13. Hasty P, Rivera-Pérez J, Bradley A. The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 5586-91.
14. Mansour SL, Thomas KR, Deng C, Capecchi MR. Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse *int-2* locus by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 7688-92.
15. Hasty P, Rivera-Pérez J, Chang C, Bradley A. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 4509-17.
16. Viville S. Immunologie et recombinaison homologue : étude de l'ontogenèse des lymphocytes T. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 34-40.
17. Hasty P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, Bradley A. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature* 1991 ; 350 : 243-6.
18. Mansour SL. Gene targeting in murine embryonic stem cells : introduction of specific alterations into the mammalian genome. *GATA* 1990 ; 8 : 219-27.
19. Le Mouellic H, Lallemand Y, Brulet P. Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the *Escherichia coli* lacZ in mouse chimeric embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4712-6.
20. Rossant J, Joyner AL. Towards a molecular-genetic analysis of mammalian development. *Trends Genet* 1989 ; 5 : 277-83.
21. Gossler A, Joyner AL, Rossant J, Skarnes WC. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* 1989 ; 244 : 463-5.
22. Wilson C, Bellen HJ, Gehring W. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol* 1990 ; 6 : 674-714.
23. Allen ND, Cran DG, Barton SC, Hettle S, Reik W, Surani MA. Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. *Nature* 1988 ; 333 : 852-5.
24. Kothary R, Clapoff S, Brown A, Campbell R, Peterson A, Rossant J. A transgene containing lacZ inserted into the *dystonia* locus is expressed in neural tube. *Nature* 1988 ; 335 : 435-7.
25. Bonnerot C, Grimber G, Briand P, Nicolas JF. Patterns of expression of position-dependent integrated transgenes in mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 6331-5.
26. Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells : a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 1991 ; 5 : 1513-23.