

## Mutations provoquées par ciblage génique

Les nouvelles  
de ce numéro  
ont été préparées par :  
Pascale Briand  
Jean-Claude Dreyfus  
Jean-Pierre Grünfeld  
Axel Kahn  
Marc Peschanski

Dans une nouvelle antérieure, *médecine/sciences* décrivait (*m/s* n° 6, vol. 3, p. 368) la possibilité de créer des modèles animaux de maladies génétiques par insertion de rétrovirus dans le génome. Cette méthode gardait un défaut : les insertions rétrovirales se font au hasard et provoquent des lésions incontrôlables en plus de celle que l'on vise. C'est donc une découverte importante que celle du ciblage génique (*gene targeting*) qui permet de ne modifier que le gène désiré. Le principe en est le suivant : des séquences d'ADN, introduites dans des cellules en culture, peuvent subir une recombinaison homologe avec l'ADN correspondant des chromosomes cellulaires. Dans certaines cellules, la séquence introduite prend le pas sur la séquence native, et sera transmise aux cellules de la descendance. Le ciblage génique doit être en principe aussi efficace pour provoquer une mutation nouvelle que pour la corriger. De fait, les deux articles qui viennent de décrire cette technique fournissent un exemple de ces deux possibilités. Dans les deux cas, l'enzyme explorée est l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT), qui présente deux avantages : d'une part, lié au chromosome X, ce gène n'existe qu'en un exemplaire ; une seule mutation sera donc suffisante ; d'autre part et surtout, on peut aisément, selon le milieu de culture, sélectionner à volonté cellules normales ou mutées. Dans les deux cas également, les cellules réceptrices sont des cellules d'embryon de souris (*embryo-derived stem cells*, appelées ES), parce qu'elles sont pluripotentes. Réintroduites dans des blastocystes de souris, elles contribuent à la formation de chimères (*m/s* n° 6, vol. 3, p. 368). Le travail de Thomas et Capecchi [1] décrit de façon précise les conditions du succès : pour la réussite du ciblage génique, il est capital de maintenir, entre le gène transféré et le gène cellulaire, une homologie aussi grande que possible. Ils utilisent donc la totalité du gène HPRT avec ses neuf exons ; ils introduisent, au niveau de l'exon 8, un gène de résistance à la néomycine *neo<sup>r</sup>*, qui confère aux cellules qui en sont dotées la capacité de pousser sur le milieu dit G418. Le gène ainsi transféré, qui a perdu toute activité HPRT, peut remplacer le gène sauvage. Les cellules qui ont intégré le nouveau gène au niveau du locus HPRT sauvage résistent à la fois au G418 et à l'analogue de base 6-thioguanine car elles sont déficientes en l'activité HPRT qui est nécessaire à la transformation du 6-TG en nucléotide pouvant être intégré à l'ADN. La proportion de cellules déficientes en HPRT n'est que de 1 sur 1 000 par rapport à l'ensemble de celles qui ont subi la mutation *neo*. Mais le fait essentiel est que toutes les lignées qui sont G418<sup>r</sup> et 6-TG<sup>r</sup> ont une seule copie du gène HPRT, porteuse du gène *neo* dans l'exon 8 : le gène altéré a donc bien remplacé le gène sauvage et n'a pas été inséré en un autre point du génome.

Le travail du groupe de Smithies [2] a consisté, à l'inverse, à guérir une lignée de cellules ES dont le gène HPRT était partiellement délété, à l'aide d'un plasmide contenant les séquences correctes correspondant à la zone délétée, ainsi qu'une partie commune destinée à assurer une homologie suffisante. La fréquence des succès est comparable à celle du travail précédent. Bien entendu, dans les deux cas, les cellules ES peuvent être injectées dans des blastocystes d'embryons de souris pour créer ou guérir *in vivo* un déficit en HPRT.

Il est donc désormais théoriquement possible de pratiquer le ciblage génique dans n'importe quel gène, la difficulté étant de sélectionner les événements de recombinaisons homologues au sein des recombinaisons au hasard, mille fois plus fréquentes. Les deux groupes prévoient d'étendre la technique à des déficits plus difficiles à sélectionner que celui en HPRT ; des méthodes d'enrichissement, ou de positionnement du gène *neo<sup>r</sup>* tel qu'il ne puisse s'exprimer qu'au voisinage du gène ciblé sont en cours d'étude, et pourraient permettre à terme d'obtenir des souris de tout génotype souhaité.

J.-C. D.

1. Thomas KR, Capecchi M. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cell. *Cell* 1987 ; 51 : 503-12.

2. 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.