

MUTAGENÈSE DIRIGÉE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE DANS LES CELLULES ES

O. BROCA^(1,3), V. BELLO⁽²⁾

(1) Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette.

(2) UMR 7622, Laboratoire de Biologie du Développement, Campus Jussieu, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) Bâtiment C, Boîte courrier 24, 9 quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05.

(3) Unité Fonctionnelle de Biologie de la Reproduction, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris.

RÉSUMÉ

Depuis une vingtaine d'années, l'obtention de souris dont le patrimoine génétique a été volontairement modifié par l'expérimentateur a révolutionné la biologie. En effet, il est désormais possible d'invalider un gène et de transmettre cette modification génétique induite *in vitro* à la descendance. L'isolement en culture des cellules souches embryonnaires (ES) et la découverte du mécanisme de recombinaison homologue entre deux séquences d'ADN, vers la fin des années 1980, ont ainsi largement contribué à l'essor des techniques de mutagenèse dirigée. Aujourd'hui, la mutagenèse dirigée par recombinaison homologue dans les cellules ES est une technique puissante et largement utilisée à travers le monde. Parallèlement, d'autres techniques d'invalidation ciblée de gènes émergent. Ces outils génétiques, que nous allons décrire dans cet article, permettent non seulement de mieux comprendre la fonction des gènes sur le plan fondamental en autorisant l'étude de leur rôle physiologique au niveau de l'organisme entier, mais également de produire des animaux qui portent des mutations similaires à celles présentes dans les maladies génétiques humaines dont nous présenterons trois exemples : le syndrome de Lesch-Nyhan, la polyposé adénomateuse familiale et la dystrophie musculaire de Duchenne.

Mots-clés : knock-out. knock-in. knock-down. interférence ARN. morpholinas.

SUMMARY

Site specific mutagenesis by homologous recombination in embryonic stem cells

Twenty years ago, the production of mice whose genomes have been deliberately modified revolutionised biology. Indeed, it is now possible to eliminate a gene's expression to various levels in desired locations, and also to broadcast these genetic modifications created *in vitro* to the progeny. The isolation and culture of embryonic stem cells (ES) and the discovery of the mechanism of homologous recombination between two sequences of DNA in the 80's, have contributed to the development of site-directed mutagenesis. Today, site specific mutagenesis by homologous recombination in embryonic stem cells is a powerful technique and is widely used throughout the world. In parallel, new techniques to invalidate targeted genes are emerging. These genetics tools, which we will introduce, allow for a better understanding of a gene's function both in fundamental and clinical research. It is now possible to create murine models of human genetic diseases including Lesch-Nyhan syndrome, Adenomatous Polyposis and Duchenne muscular dystrophy which we will discuss as examples.

Key words: knock-out. knock-in. knock-down. RNA interference. morpholinas.

INTRODUCTION

L'étude des mutations permet d'apprécier, par l'intermédiaire des phénotypes qu'elles engendrent, 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 longtemps été limitées à celles repérées au hasard des élevages et ne concernaient pour l'essentiel que des modifications visibles du phénotype (couleur du pelage, morphologie, comportement...) [18, 43]. En particulier, les mutations concernant les anomalies de développement échappaient le plus souvent à l'expérimentateur.

Depuis une vingtaine d'années, l'amélioration des techniques et des méthodes de biologie moléculaire a

révolutionné la biologie en ouvrant la possibilité de modifier quasiment à volonté le patrimoine génétique de la souris. L'obtention de souris porteuses de modifications génétiques programmées par l'expérimentateur [55] a ainsi permis l'étude de ses différents systèmes (immunitaire, nerveux, hématopoïétique...) et la compréhension des processus de développement.

Cette modification délibérée du patrimoine génétique de la souris a été rendue possible grâce à l'essor des techniques de transgénèse [53]. La transgénèse correspond au transfert expérimental d'une séquence d'ADN dans un organisme dans des conditions qui permettent la transmission de cette nouvelle séquence à la descendance. Cet essor a probablement trouvé son point culminant avec d'une part l'isolement en culture de cellules embryonnaires pluripotentes (cellules ES) [14, 40], capables de coloniser la lignée germinale de l'embryon hôte [4], et d'autre part la maîtrise du processus de recombinaison homologue entre une

séquence d'ADN du gène étudié et l'ADN génomique [63]. Depuis 1987, date de la première démonstration d'une mutagenèse ciblée dans les cellules ES [11, 69], la création de mutations de types variés, affectant soit un gène soit des régions génomiques entières, fournit des informations dans la compréhension de la fonction des gènes et du génome, dans la biologie et la physiologie de la souris et autorise également la création de modèles murins de maladies génétiques humaines. Aujourd'hui, parallèlement aux techniques de recombinaison homologue, de nouvelles méthodes dites de knock-down, basées sur l'inhibition de la traduction, émergent et permettent également d'étudier le silence des gènes.

LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES ET LEUR UTILISATION DANS LA MODIFICATION DU GÉNOME DE SOURIS

L'utilisation couplée des techniques de biologie moléculaire assurant la mise en œuvre de la recombinaison homologue dans les cellules ES permet de modifier le génome en intervenant sur le développement pré-implantatoire.

Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches se définissent comme des cellules indifférenciées dont les propriétés consistent d'une part à s'autorenouveler afin de maintenir un réservoir permanent de cellules et d'autre part à donner naissance à des cellules différenciées (*tableau I*).

Les cellules souches embryonnaires ou cellules ES (Embryonic Stem Cells) sont caractérisées par leur capacité à engendrer tous les types cellulaires de l'organisme, y compris les cellules germinales. Isolées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste, leur découverte dans les années 1980 [14, 40] marque un tournant dans l'obtention de souris transgéniques. Cultivées dans des conditions adéquates *in vitro* notamment en présence de *leukemia inhibitory factor* (LIF) qui permet le maintien de la pluripotence [21, 72], les cellules de la masse cellulaire interne se divisent indéfiniment sans se différencier. Injectées dans un jeune embryon, elles sont capables de coloniser tous les tissus de l'organisme. À ce titre, elles participent à l'embryogenèse et elles sont présentes par la suite

dans les différents tissus du souriceau dans lequel elles ont été implantées. Les souris chimères ainsi obtenues, constituées de cellules issues des cellules ES transfectées et du blastocyste receveur, peuvent être à l'origine de lignées. En effet, les cellules ES peuvent participer à la gamétogenèse, ce qui conduit à l'introduction de modifications durables du génome et à leur transmission à la descendance [55].

Le caractère pluripotent des cellules souches embryonnaires leur confère un intérêt particulier pour introduire des modifications du génome et établir ainsi des lignées de souris transgéniques (*tableau II*).

La mutagenèse dirigée par recombinaison homologue dans les cellules ES

La technique de mutagenèse dirigée consiste à invalider un gène d'intérêt grâce à la recombinaison précise entre une séquence d'ADN exogène et la séquence homologue présente *in situ*. Contrairement à la technique de transgénèse classique qui ne permet que des insertions aléatoires dans le génome hôte, la mutagenèse ciblée par recombinaison homologue permet des modifications précises et variées (gain ou perte de fonction, substitution, micro délétion, invalidation conditionnelle...) des gènes cibles.

Bien qu'il s'agisse d'un événement rare en comparaison à l'intégration au hasard de l'ADN (technique de transgénèse par micro-injection d'ADN), la recombinaison homologue permet l'obtention de lignées transgéniques par l'intégration d'une séquence d'ADN homologue (similitude sur au moins 5 kilobases).

Création de mutations nulles : le knock-out

La stratégie du knock-out consiste à remplacer, par recombinaison homologue dans les cellules ES, un gène cible par une séquence mutée de ce gène. Il s'agit donc d'inactiver le gène d'intérêt.

La mise en œuvre de cette technique nécessite plusieurs étapes successives (*figure 1*).

La première étape consiste à construire le vecteur de recombinaison. Il s'agit tout d'abord d'isoler le gène d'intérêt, de l'amplifier par PCR avant de le modifier pour introduire la mutation d'intérêt. La séquence ainsi obtenue est associée à des marqueurs de sélection, permettant d'une part de différencier les cellules ES qui ont intégré le vecteur (sélection positive utilisant le plus souvent le gène de résistance à la néomycine)

TABLEAU I. — Les différents types de cellules souches et leurs propriétés.

TABLE I. — *Stem cells and their properties.*

Catégorie de cellules souches	Propriétés	Exemples
Totipotentes	Cellules capables d'engendrer un embryon.	• Œuf fécondé • Embryon de 2 à 8 cellules.
Pluripotentes	Cellules capables de former tous les tissus de l'organisme mais qui ne peuvent à elles seules engendrer un embryon.	• Cellules souches embryonnaires (ES), issues de la partie interne du blastocyste (stade 40 cellules).
Multipotentes	Cellules capables d'être à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées tout en s'autorenouvelant.	• Les plus connues : les cellules souches hématopoïétiques.
Unipotentes	Cellules capables de ne former qu'une sorte de cellules indifférenciées, tout en s'autorenouvelant.	• Cellules satellites musculaires

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2059684>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2059684>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)