

## ANNEXE XI L'INVALIDATION DES GÈNES

Cette opération vise à modifier le fonctionnement d'un gène choisi par l'expérimentateur dans une cellule ou dans un animal. Elle est surtout utilisée chez la souris et réclame de nombreuses manipulations. Jusqu'à présent, environ 5000 gènes ont été invalidés, sur les quelque 20000 que contiennent les chromosomes de cet animal. Il existe deux variantes principales de la technique (*gene knock out* et *gene knock in*), suivant que le gène visé est remplacé par une version non fonctionnelle, ou par une version fonctionnelle, mais modifiée. Nous nous contenterons de décrire brièvement la première variante, dont il existe deux versions principales, suivant que le gène ciblé est mis hors service de manière permanente ou conditionnelle.

### XI.A. INVALIDATION PERMANENTE

La première opération consiste à invalider *in vitro* le gène cible (*a*), en remplaçant une partie de sa séquence par celle d'un gène conférant une résistance à un antibiotique (la néomycine). On fait ensuite pénétrer le gène invalidé (*a*<sup>-</sup>) dans des cellules ES\*\*, en espérant qu'une recombinaison homologue permettra au gène artificiel de se substituer à un allèle du gène résident. La cellule transformée\* devient hétérozygote (*a*<sup>+</sup>/*a*<sup>-</sup>) ou hémizygotique (*a*<sup>-</sup><sup>XY</sup>), si le gène visé se trouve sur le chromosome X et que l'on utilise pour l'invalidation des cellules ES mâles, de génotype sexuel XY. L'allèle *a*<sup>-</sup> rend la cellule résistante à la néomycine, donc capable de proliférer dans un milieu contenant cet antibiotique et d'y fonder un clone.

Pour obtenir des cellules homozygotes *a*<sup>-</sup>/*a*<sup>-</sup>, deux méthodes peuvent être utilisées. La première consiste à invalider l'allèle intact en transformant de nouveau des cellules *a*<sup>+</sup>/*a*<sup>-</sup> au moyen du gène manipulé *in vitro*. La seconde méthode, plus laborieuse, oblige à modifier la lignée germinale des souris en y intégrant des cellules ES *a*<sup>+</sup>/*a*<sup>-</sup>, puis à croiser les animaux de manière à produire des homozygotes. L'opération se fait au début du développement, sur des embryons obtenus par fécondation *in vitro*. On injecte un groupe de cellules transformées dans un blastocyste, qui peut en incorporer un grand nombre. Si l'embryon survit, on l'implante dans l'utérus d'une mère porteuse, où il se développe et donne naissance à une souris à lignée germinale mixte, qui produira deux types de gamètes (*a*<sup>+</sup> et *a*<sup>-</sup>) et transmettra le gène invalidé à une partie de ses descendants. Repérés, puis croisés entre eux, les animaux *a*<sup>+</sup>/*a*<sup>-</sup> engendrent un quart d'homozygotes *a*<sup>-</sup>/*a*<sup>-</sup>.

Les mutants *a*<sup>-</sup>/*a*<sup>-</sup> ont des phénotypes variables. Certains se développent de manière tout à fait normale. C'est ce que font par exemple les homozygotes *p53*<sup>-/-</sup>. D'autres meurent *in utero* en présentant diverses malformations. C'est ce qui se produit chez les homozygotes *rb*<sup>-/-</sup>, dont le placenta se développe anormalement. Si l'invalidation n'a pas de conséquence apparente, cela signifie que le gène visé ne gouverne aucun processus indispensable au développement, ou que sa fonction peut être prise en charge par d'autres gènes. Lorsque les fœtus ne sont pas viables, leurs cellules peuvent malgré tout être mises en culture. C'est le cas notamment pour les cellules *rb*<sup>-/-</sup>. Il faut en conclure que le gène

invalidé laisse en état de marche les mécanismes fondamentaux permettant aux cellules de vivre et de se multiplier, mais joue un rôle essentiel au cours du développement.

## XI.B. INVALIDATION CONDITIONNELLE

Ce système vise à mettre un gène hors d'état de fonctionner sur commande. Celui qui est le plus utilisé, appelé Cre-lox, consiste à encadrer l'ADN du gène manipulé in vitro par deux courtes séquences (37 pb), qui sont reconnues par une recombinase d'origine bactérienne (Cre). Le gène de cet enzyme peut être placé sous le contrôle d'un promoteur inséré dans un virus ou actif dans un seul type de cellules (hépatocytes, adipocytes, etc.). Son produit déclenche une recombinaison entre le gène résident et le gène invalidé, ce qui entraîne le remplacement du premier par le second.

Si le gène *cre* est introduit dans un virus, l'invalidation ne se produit que si l'on infecte les animaux. S'il est piloté par un promoteur actif seulement dans un certain type de cellules, elle se déclenche au cours de la gamétogenèse ou du développement, à un stade où la différenciation cellulaire s'instaure.

### BIBLIOGRAPHIE

Babinet C, Cohen-Tannoudji M. Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris. *Med Sci* 2000; **16**: 31-42.

Donehower, LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; **356**: 215-21.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an *Rb* mutation in the mouse. *Nature* 1992; **359**: 295-300.

Wu L de Bruin A, Saavedra HI Starovic M *et al.* Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. *Nature* 2003; **421**: 942-7.