

Recombinaison homologue : nouveaux vecteurs, nouvelles perspectives

La modification de gènes par recombinaison homologue est un outil très puissant d'étude de leur fonction. De nouveaux vecteurs, fondés sur le système de recombinaison Cre-*loxP* du bactériophage P1 ou, plus récemment, le système équivalent de levure FLP/FRT, laissent entrevoir une étude plus fine des gènes mutés. Ils permettent de créer des mutations « propres », où les gènes de sélection sont éliminés du *locus* étudié et ne peuvent donc avoir d'influence sur les gènes voisins. Ils permettent aussi une expression du gène muté contrôlée dans le temps, ce qui rend possible l'étude, à l'âge adulte, de gènes dont l'absence ou la mutation sont létales au stade embryonnaire.

Stéphane Viville

Gâce à l'utilisation de nouveaux vecteurs de recombinaison homologue, il est maintenant possible de créer des mutations ponctuelles et d'envisager de contrôler de manière spatio-temporelle l'apparition de la mutation désirée chez la souris. En effet, les deux inconvénients majeurs des vecteurs de recombinaison utilisés jusqu'à présent étaient, d'une part, qu'ils introduisaient un marqueur de sélection dans le *locus* étudié et, d'autre part, que l'effet de la mutation était immédiat, interdisant l'étude des gènes impliqués dans le développement embryonnaire à l'état adulte si leur mutation produisait un phénotype léthal. Dans cet article, nous ferons le point sur les avancées techniques récentes de la recombinaison homologue. L'utilisation de vecteurs de recombinaison fondés sur les systèmes de recombinaison spéci-

fique de sites de phage (Cre-*loxP*) ou de levure (FLP-FRT) laisse entrevoir de nouvelles perspectives qui devraient révolutionner une technique déjà très prometteuse.

La première partie de cet article sera consacrée à un rappel général de la technique de recombinaison homologue et des différents vecteurs utilisés jusqu'à présent, ce qui permettra aussi de faire le point sur les avancées techniques de la manipulation des cellules ES. La deuxième partie sera consacrée aux nouveaux vecteurs et aux vastes possibilités qu'ils offrent, aussi bien en recombinaison homologue qu'en transgénèse.

Recombinaison homologue, une technique déjà « ancienne »

L'utilisation de la recombinaison homologue dans les cellules embryon-

ADRESSE

S. Viville: docteur en pharmacie, docteur ès sciences, post-doctorant à Cambridge au Wellcome/CRC Institute. Wellcome/CRC Institute, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QR, Royaume-Uni.

RÉFÉRENCES

1. Lemarchandel V, Montagutelli X. La recombinaison homologue. De nouvelles perspectives pour la transgénèse chez les mammifères. *médecine/sciences* 1990; 6: 18-29.
2. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; 317: 230-4.
3. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
4. 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.
5. Mortensen RM, Conner DA, Chao S, Geisterfer LA, Seidman JG. Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 2391-5.
6. Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2216-20.
7. Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986; 44: 419-28.
8. Te Riele H, Maandag ER, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5128-32.
9. 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.
10. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8424-8.
11. Lallemand Y, Brûlet P. An *in situ* assessment of the routes and extents of colonisation of the mouse embryo by embryonic stem cells and their descendants. *Development* 1990; 110: 1241-8.
12. Wood SA, Pascoe WS, Schmidt C, Kemler R, Evans MJ, Allen ND. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4582-5.

naires (ES) permet de créer des souris portant une mutation préalablement choisie [1]. Smithies *et al.* furent les premiers à montrer qu'il est possible, par recombinaison homologue, de muter un gène donné dans une lignée cellulaire de mammifère (lignée dérivant d'un carcinome humain). Il s'agissait du gène de la β -globine humaine [2]. Le deuxième grand pas fut l'établissement de lignées de cellules embryonnaires de souris conservant leur pluripotentialité [3, 4]. Ces cellules peuvent être

maintenues en culture cellulaire tout en conservant leur capacité de coloniser un embryon après injection dans un blastocyste de souris. L'obtention de souris chimères, dont les lignées germinales dérivent des cellules injectées, permet d'établir une lignée de souris descendant des cellules ES injectées. Si les cellules ES ont été préalablement mutées par recombinaison homologue, on obtient des souris portant une mutation dans le gène désiré [1]. Notons qu'il est possible, par simple

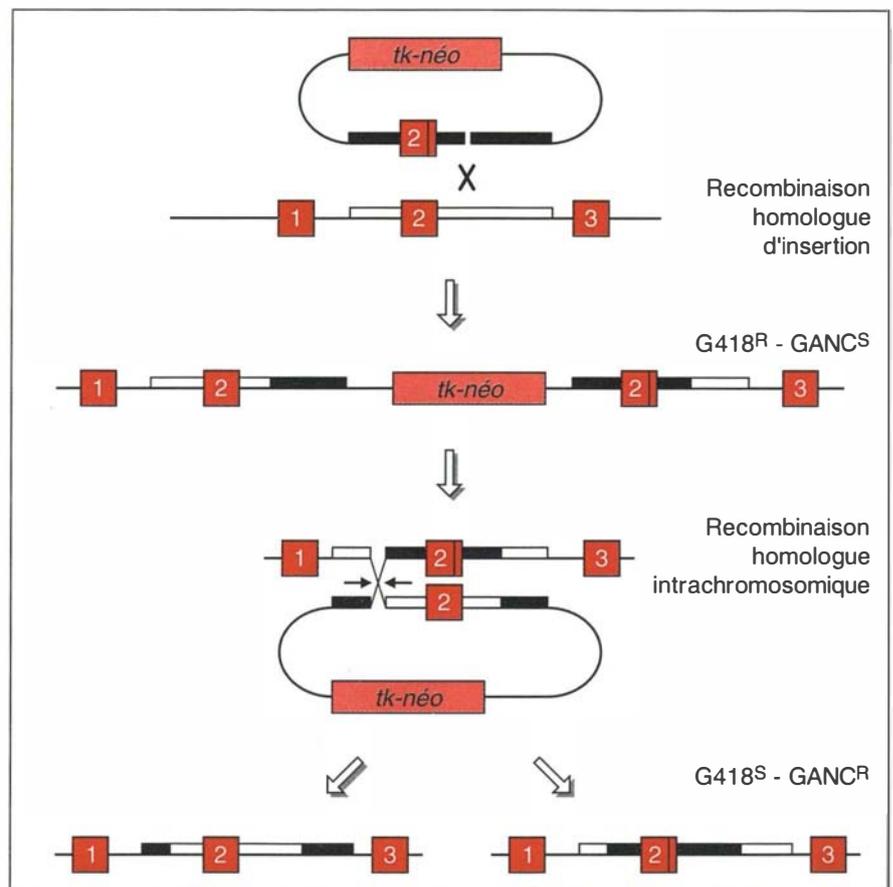


Figure 1. **Introduction d'une mutation ponctuelle dans un gène donné.** La technique dite du hit and run permet de créer une mutation ponctuelle en deux étapes de recombinaison homologue. La première étape se fait avec un vecteur recombinant d'insertion comportant la mutation souhaitée (représentée par une barre verticale en 2) et les gènes de sélection tk et néo. L'insertion par recombinaison homologue, sélectionnée pour le phénotype G418^R, conduit à la duplication des régions homologues. Cette duplication peut provoquer un deuxième événement de recombinaison homologue intrachromosomique. Il en résulte, soit la perte des séquences nouvellement introduites, soit celle des séquences endogènes. Le deuxième cas laisse en place la mutation ponctuelle désirée. Dans les deux cas, il y a perte du gène tk et les cellules ont alors un phénotype résistant au Ganciclovir (GANC^r).

augmentation de la concentration de généticine (G418), d'obtenir des clones de cellules ES portant la mutation à l'état homozygote [5]. Décrite ainsi, la technique semble d'une facilité déconcertante : c'est loin d'être le cas ! En effet, cette technique est très longue à mettre en œuvre :

- La construction des vecteurs de recombinaison homologue peut être délicate car l'ADN génomique est, dans l'ensemble, plus difficile à manipuler que l'ADNc. Les améliorations de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) qui permet maintenant d'amplifier des fragments de très grande taille (jusqu'à 35 kb [6]) peuvent faciliter cette construction.

- La recombinaison homologue reste un événement rare. L'utilisation de vecteurs permettant un enrichissement des clones ayant recombiné [7], que nous décrivons ultérieurement [8], et l'utilisation d'ADN isogénique facilitent la détection et l'obtention des clones recombinants.

- Les cellules ES, malgré l'apparition d'excellentes lignées (la lignée D3 de Gossler *et al.* [9], la lignée RI de Nagy *et al.* [10], par exemple), sont très sensibles aux conditions de culture et possèdent un génome instable donnant naissance à des anomalies chromosomiques qui semblent conférer un avantage de croissance sur les cellules normales, mais qui rendent les cellules inutilisables car elle ne permettent pas la transmission germinale. L'idéal serait que chaque laboratoire utilisant cette technique isole ses propres cellules ES de façon à avoir un passage très précoce.

- L'injection des cellules ES dans les blastocystes, bien que plus accessible que l'injection dans des ovocytes utilisée pour la transgénèse, reste délicate et demande un matériel sophistiqué ; cependant, trois nouveautés sont à noter : l'injection de morulas, pratiquée par Brûlet *et al.* [11], serait plus facile et donnerait de meilleurs résultats en terme de transmission germinale. Malheureusement, cette technique s'accompagne d'une mortalité embryonnaire très élevée ; deuxièmement, par coculture de cellules ES avec des embryons au stade huit cellules, on peut développer des agrégats qui formeront *in vitro* des blastocystes à la masse interne colonisée par les cellules ES. Après transfert de ces blastocystes, il

est possible d'obtenir des souris chimeres [12]. C'est la technique la plus prometteuse du fait de sa simplicité et de son efficacité ; la troisième possibilité est de faire des agrégats entre des cellules de morula rendues tétraploïdes par électrofusion et des cellules ES [13]. Il se forme un agrégat susceptible de produire *in vitro* un blastocyste qui, après implantation, peut donner naissance à une souris viable dérivant à 100 % des cellules ES, les cellules tétraploïdes ne participant qu'à la formation des tissus extra-embryonnaires. Jusqu'à présent, une seule lignée de cellules ES a permis d'obtenir ce résultat, il s'agit d'un passage très précoce de la lignée RI [10].

- Le transfert des blastocystes après injection reste le point le plus facile à réaliser, surtout après toutes les difficultés qui auront précédé.

Les vecteurs de recombinaison homologue de première génération

Deux types de vecteurs de recombinaison homologue sont classiquement utilisés.

Les vecteurs dits de remplacement

Ce sont les vecteurs classiques qui permettent de remplacer un gène cible par une construction comportant des séquences homologues interrompues par un marqueur de sélection (généralement le gène *néo*) qui a une double fonction : muter le gène étudié et lui conférer une propriété permettant de sélectionner les cellules transfectées. De façon à sélectionner les cellules ayant subi un événement de recombinaison homologue, différentes astuces ont été élaborées.

- L'utilisation d'un marqueur de sélection négative, tel que le gène de la thymidine kinase (*tk*) qui, en présence de ganciclovir, tue les cellules. Le gène placé à l'une des extrémités du vecteur sera éliminé lors d'un événement de recombinaison homologue, ce qui confère un phénotype résistant au ganciclovir. En revanche, une intégration aléatoire conserve le gène *tk*, les cellules sont donc sensibles et meurent. C'est le principe dit de double sélection positive et négative [7].

- Il est encore possible d'utiliser un gène de sélection dépourvu de signal poly A, ce qui rend son transcrit très instable : il s'agit de la technique du « piège à poly A ». L'intégration par recombinaison homologue fournissant un signal poly A rend plus stable le transcrit du gène de sélection et, en théorie, seules les cellules ayant subi une recombinaison homologue pourront être sélectionnées [14].

- La technique dite du « piège à promoteur » consiste à utiliser une construction où le gène de sélection, dépourvu de promoteur, est placé en phase de lecture avec le gène à muter, n'autorisant ainsi une expression du gène de sélection qu'en cas de recombinaison homologue. Cette technique semble donner d'excellents résultats [15]. Il faut, cependant, s'assurer que le gène étudié est exprimé dans les cellules ES. De plus, il est possible d'utiliser un gène de sélection correspondant à la fusion entre le gène de la β -galactosidase et le gène *néo* (gène β -*géo*), ce qui permet de clairement établir l'expression du gène étudié [16]. L'utilisation des sites internes d'entrée ribosomique (IRES pour *internal ribosomal entry site*), qui permettent un redémarrage de la traduction au sein d'un ARNm, simplifie ce type de construction dans la mesure où il n'est plus nécessaire de placer le gène de sélection en phase de lecture [17, 18].

Les vecteurs d'insertion

Ce type de vecteur est très peu utilisé. Du fait de l'intégration par recombinaison homologue, il se produit une duplication des séquences homologues, ce qui rend l'événement très instable car une deuxième recombinaison, intrachromosomique cette fois, peut intervenir et éliminer le gène de sélection.

Les vecteurs décrits précédemment présentent l'inconvénient majeur de bouleverser le *locus* étudié en y introduisant un nouveau gène. Or, l'introduction du gène de sélection peut éventuellement fausser les résultats, surtout lors de l'étude de gènes en *cluster* comme les gènes *Hox*. De plus, ces vecteurs ne permettent pas la création de mutations fines. C'est surtout afin de remédier à ces problèmes que de nouvelles approches ont été élaborées.

Les vecteurs de deuxième génération

Dans l'optique de créer des mutations uniquement de quelque paires de bases et ne laissant pas de vecteur de sélection dans le site étudié, différentes techniques ont été testées.

La première, qui de prime abord semble la plus simple, consiste à co-électroporer le vecteur de recombinaison portant la mutation souhaitée avec un vecteur de sélection [19]. En effet, s'il y a recombinaison homologue, le vecteur de sélection s'intégrera théoriquement dans un autre site. Cela permettrait, en croisant les souris chimères obtenues, une ségrégation différente des deux événements et donc l'élimination du gène de sélection. On peut ainsi obtenir des souris portant une mutation très fine. Malheureusement, il semble que les deux molécules d'ADN cointègrent presque systématiquement.

Une deuxième technique, *a priori* simple, consiste à injecter le gène muté dans les cellules ES, sans marqueur de sélection, et à rechercher l'événement de recombinaison par PCR [20]. En effet, la sélection n'est pas nécessaire car toutes les cellules ayant reçu la microinjection auront intégré l'ADN. Les principaux obstacles à cette technique sont la difficulté que représente la microinjection dans les cellules ES, qui sont de petites cellules, et le nombre important de cellules dans lesquelles il est nécessaire de faire l'injection. De plus, il semble qu'elles supportent mal ce traitement. Jusqu'à présent, aucune lignée de souris obtenue par ce procédé n'a été décrite.

La troisième technique est fondée sur l'élégante idée d'utiliser le deuxième événement de recombinaison qui peut se produire lors de l'utilisation d'un vecteur d'insertion. En effet, théoriquement du moins, il est possible, par un double événement de

RÉFÉRENCES

13. Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990 ; 110: 815-21.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. Kim DG, Kang HM, Jang SK, Shin HS. Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus. *Mol Cell Biol* 1992 ; 12: 3636-43.

18. Mountford P, Zevnik B, Düwel A, Nichols J, Li M, Dani C, Robertson M, Chambers I, Smith A. Diccronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91: 4303-7.

19. Reid LH, Shesely EG, Kim HS, Smithies O. Cotransformation and gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11: 2769-77.

20. Zimmer A, Gruss P. Production of chimaeric mice containing embryonic stem (ES) cells carrying a homeobox *Hox 1.1* allele mutated by homologous recombination. *Nature* 1989 ; 338: 150-3.

21. Hasty P, Ramirez SR, Krumlauf R, Bradley A. Introduction of a subtle mutation into the *Hox-2.6* locus in embryonic stem cells [published erratum appears in *Nature* 1991 ; 353(6339):94]. *Nature* 1991 ; 350: 243-6.

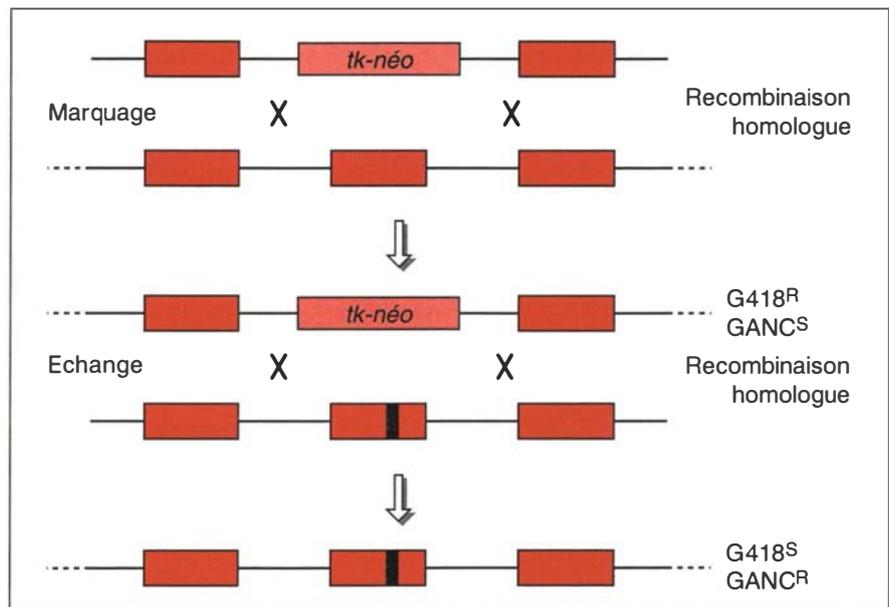


Figure 2. **Représentation du principe de la technique du «marquage et de l'échange».** Cette technique est fondée sur deux événements de recombinaison homologue. L'un, le marquage par un vecteur de remplacement, va muter le gène cible en introduisant les gènes tk et néo. La sélection des cellules recombinantes se fait en présence de G418. Le deuxième, l'échange, toujours par une recombinaison de remplacement, va réintroduire le gène étudié portant la mutation désirée (représentée par une barre noire) tout en éliminant les gènes tk et néo ; les cellules recombinantes sont alors GANCR.

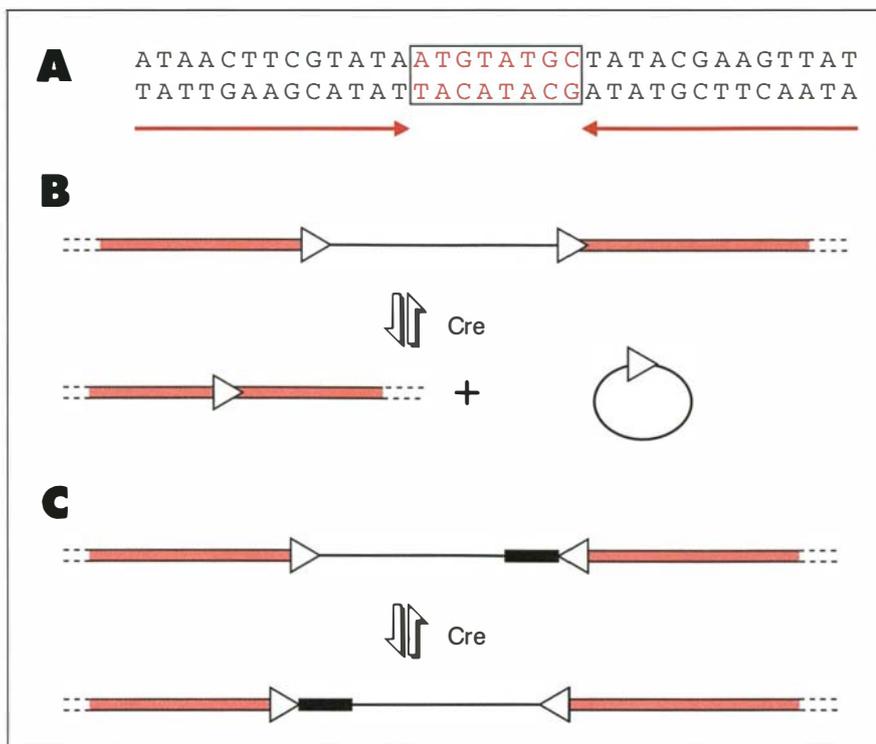


Figure 3. **Le site loxP et l'activité de l'enzyme Cre.** A. Le site loxP est composé de deux séquences palindromiques de 13 pb, soulignées par des flèches, séparées par une séquence conservée de 8 pb (encadrées). B. Si deux sites loxP (représentés par des triangles ouverts) sont placés dans la même orientation, le traitement par l'enzyme Cre conduit à la délétion du fragment d'ADN situé entre les deux sites, sous une forme circulaire qui sera rapidement dégradée. C. Si les deux sites loxP sont dans des orientations opposées, le traitement par l'enzyme Cre conduit à l'inversion du fragment d'ADN situé entre les deux sites. Dans tous les cas, cette réaction est réversible car indépendante de l'énergie.

recombinaison, d'éliminer le vecteur de sélection tout en laissant, dans le gène étudié, une mutation qui peut n'être que d'une seule paire de base. Il s'agit de la technique dite du *hit and run*. Le principe de cette technique est décrit dans la *figure 1*. Dans une première étape, un vecteur d'insertion portant la mutation souhaitée et deux gènes de sélection, l'un pour une sélection positive et l'autre pour une sélection négative, est introduit par recombinaison homologue dans le gène cible. La deuxième étape est fondée sur la recombinaison intrachromosomique, qui va éliminer, soit les séquences nouvellement introduites, soit les séquences endogènes, laissant alors en place un gène muté mais pas les gènes de sélection [21]. L'obtention de souris par cette technique n'a été décrite qu'une fois [22] et il semble que la deuxième étape soit difficile à obtenir. La dernière technique, appelée stratégie du marquage et de l'échange (*tag and exchange*), est fondée sur deux événements successifs de recombinaison, utilisant deux vecteurs de recombinaison différents.

La première étape, le marquage, qui permet d'introduire les gènes *th* et *neo* dans le gène cible, est sélectionnée positivement grâce au gène *neo*. La deuxième recombinaison est réalisée de façon à introduire la mutation souhaitée et à éliminer les gènes de sélection ; c'est l'échange, les cellules sont alors résistantes au Ganciclovir (*figure 2* [23, 24]). Une expérience similaire utilisant des cellules ES négatives pour *hprt* a permis d'obtenir une lignée de souris mutantes [25]. Il est à noter que cette technique permet d'obtenir des souris mutantes, même si la deuxième étape n'est pas réalisée. De plus, une fois la première étape accomplie, il est possible d'utiliser ces cellules comme base pour créer différentes mutations dans le gène étudié. Cette approche, à la vue des résultats obtenus, semble assez prometteuse, même si elle implique un temps de culture des cellules plus long. Malheureusement, ces différentes techniques sont difficiles à mettre en œuvre, le problème majeur provenant du bruit du fond élevé, rendant l'événement difficile à mettre en évidence.

Les vecteurs de recombinaison homologue de nouvelle génération

Le peu de résultats obtenus avec les vecteurs de deuxième génération et toujours le souci de faire des mutations « propres » ont poussé les investigateurs à inventer un nouveau type de vecteurs. Il s'agit de vecteurs permettant une mutagenèse sans laisser de vecteur de sélection et ouvrant la possibilité de contrôler de façon spatio-temporelle l'apparition de la mutation chez la souris. Ce dernier point est important pour l'étude de gènes qui provoquent, lorsqu'ils sont mutés, une mort précoce des animaux, ce qui empêche l'étude des fonctions tardives du gène. Les vecteurs utilisant le système Cre-loxP dérivent du système de recombinaison du phage P1. Ce phage possède une recombinase du nom de Cre [26] qui reconnaît spécifiquement une séquence nucléotidique de 34 paires de bases appelée site loxP [27, 28]. Cette séquence est composée de deux séquences palindromiques de

RÉFÉRENCES

22. Ramirez SR, Zheng H, Whiting J, Krumlauf R, Bradley A. *Hoxb-4 (Hox-2.6)* mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* 1993; 73: 279-94.
23. Askew GR, Doetschman T, Lingrel JB. Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4115-24.
24. Wu H, Liu X, Jaenisch R. Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine *colla-1* gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2819-23.
25. Stacey A, Schnieke A, McWhir J, Cooper J, Colman A, Melton DW. Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1009-16.
26. Abremski K, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination, purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* 1984; 259: 1509-14.
27. Hoess RH, Abremski K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site *loxP*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1026-9.
28. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the *loxP* spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 2287-300.
29. Abremski K, Hoess R, Sternberg N. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 1983; 32: 1301-11.
30. Kilby NJ, Snaith MR, Murray JAH. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 1993; 9: 413-20.
31. Gu H, Zou YR, Rajewsky K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-*loxP*-mediated gene targeting. *Cell* 1993; 73: 1155-64.

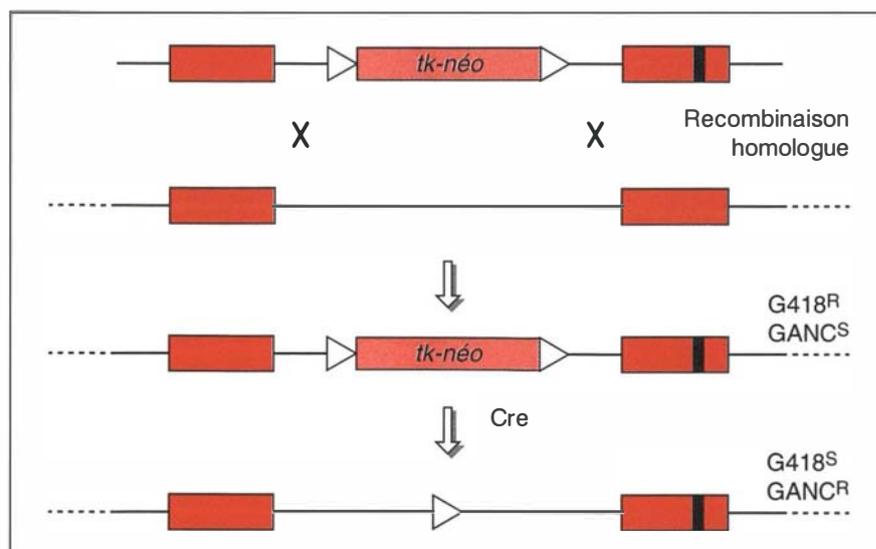


Figure 4. **Introduction d'une mutation ponctuelle par le système cre-loxP.** Un vecteur de recombinaison de remplacement est construit de manière à introduire une cassette de sélection, composée des gènes tk et néo, entourée de deux sites loxP (triangle ouvert), dans une région non codante du gène étudié, ainsi que la mutation souhaitée (indiquée par une barre noire). La recombinaison homologue est sélectionnée sur le phénotype G418^R des cellules ES. Un traitement consécutif des cellules recombinantes par l'enzyme Cre va éliminer les marqueurs de sélection, laissant en place un site loxP et la mutation créée. Cet événement est sélectionné pour le phénotype GANCR^R des cellules recombinantes.

13 pb séparées par une séquence conservée de 8 pb. La recombinaison par l'enzyme Cre entre deux sites *loxP* ayant des orientations opposées conduit à l'inversion du fragment d'ADN compris entre les deux sites *loxP*. En revanche, la recombinaison entre deux sites de même orientation conduit à la délétion du fragment d'ADN. Cette réaction est réversible et une molécule portant un site *loxP* peut s'intégrer dans une autre molécule d'ADN arborant un site *loxP* ([30, 31] et figure 3).

Ce système est maintenant utilisé pour créer de nouveaux vecteurs de recombinaison homologue.

Le système Cre-*loxP* : de multiples utilisations en recombinaison homologue

Le système Cre-*loxP* a récemment été utilisé en recombinaison homologue dans l'étude de la commutation des immunoglobulines [31] et de l'ADN polymérase β [32]. Le succès obtenu

dans ces études laisse entrevoir une multitude d'applications du système Cre-*loxP*, le seul facteur limitant étant l'imagination...

Introduction d'une mutation et élimination du marqueur de sélection. Si le vecteur est réalisé de telle façon que les marqueurs de sélection soient entourés par deux sites *loxP* ayant la même orientation, il est possible, par traitement à l'enzyme Cre, d'éliminer les marqueurs de sélection tout en laissant le gène portant la mutation choisie (figure 4). Là encore, il faut deux marqueurs de sélection : l'un pour sélectionner positivement l'événement de recombinaison, l'autre pour sélectionner l'élimination des gènes de sélection. Toutefois, il faut noter que si les marqueurs de sélection sont éliminés, il reste en place un site *loxP* de 34 paires de bases. Cette approche permet d'introduire des mutations précises telles qu'un codon de terminaison ou de détruire

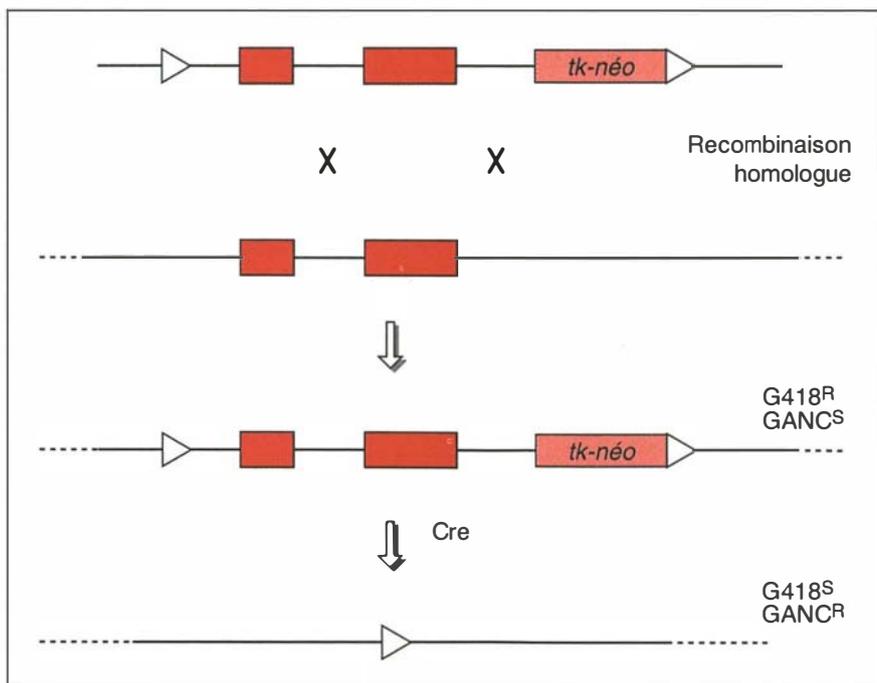


Figure 5. **Contrôle spatio-temporel de l'apparition d'une mutation (d'après [37]).** Afin de pouvoir contrôler l'apparition d'une mutation, un vecteur de recombinaison de remplacement est construit de façon à introduire un site loxP (triangle ouvert) dans le gène étudié et une cassette de sélection (gènes tk et néo) avec à une extrémité un site loxP placé de façon que le traitement par Cre élimine non seulement le gène étudié mais aussi la cassette de sélection. L'événement de recombinaison homologue est sélectionné pour le phénotype G418^R. Lorsque les clones recombinants seront traités par l'enzyme Cre, il en résultera la délétion du gène étudié. Malheureusement, cette approche n'est pas utilisable pour créer un système de mutagenèse conditionnelle car le gène tk rend les souris mâles stériles. Il est toutefois possible de remplacer la cassette tk-neo par le gène hprt et d'utiliser des cellules ES hprt.

un site protéique spécifique. De plus, par cette technique, il est possible d'éliminer uniquement: un promoteur si le gène en possède plusieurs; un exon s'il existe un épissage alternatif; un site de démarrage de la traduction si l'ARNm en utilise plusieurs.

Contrôle spatio-temporel de l'apparition d'une mutation. Grâce à un tel système, il est possible de créer des souris chez lesquelles l'apparition de la mutation désirée est contrôlée de façon spatio-temporelle. Pour ce faire, le vecteur de recombinaison est réalisé de façon que le gène étudié, ainsi que les gènes de sélection (placés de façon à ne pas affecter l'expression du gène cible), soient entourés de sites loxP (figure 5).

Après une recombinaison homologue, qui ne devrait pas perturber

l'expression du gène cible, deux possibilités existent, pour produire la mutation: (1) un traitement des cellules ES par l'enzyme Cre qui va déléter le gène cible et les marqueurs de sélection, ce qui revient à peu de choses près à la technique utilisant les vecteurs de remplacement. Cela peut être réalisé, soit par transfection avec un vecteur d'expression de cre [31, 34], soit par lipofection de l'enzyme elle-même [35] dans les cellules ES; (2) il est aussi possible de croiser les souris issues de l'injection dans des blastocystes des cellules ES portant le gène entouré de deux sites loxP avec des souris transgéniques exprimant l'enzyme Cre au moment et à l'emplacement désiré. L'expression du gène Cre pouvant être sous le contrôle d'un promoteur spécifique de tissu ou inducible ou, mieux, les deux à la fois, il est possible de contrôler

l'apparition de la mutation. En effet, par croisements successifs de souris ayant un allèle déjà muté et un allèle entouré de sites loxP avec des souris transgéniques pour le gène cre, il est possible de contrôler l'apparition de la mutation (figure 6B). C'est l'expression du transgène cre qui détermine l'apparition de la mutation. Les inconvénients majeurs d'une telle approche sont le nombre important de croisements nécessaires pour établir les souris souhaitées, le risque de provoquer une translocation chromosomique lors du traitement d'animaux portant des sites loxP sur deux chromosomes – en effet, cette propriété a été utilisée pour créer de telles translocations chez les plantes [36] –, enfin, l'ignorance de la toxicité de Cre chez la souris, bien que les premières expériences de transgénèse suggèrent qu'il n'y en ait pas [37, 38]. Il est à parier que dans un futur très proche une pléthore de souris transgéniques exprimant cre vont être disponibles.

Ce type d'expériences a été réalisé en transgénèse dans le but de contrôler l'expression d'un oncogène dans un tissu donné [37, 38]. Un tel système offre l'avantage de permettre l'étude de gènes dont l'inactivation entraîne un phénotype létal lors de l'embryogenèse. En effet, il suffit alors d'induire la mutation au moment souhaité. La première tentative décrite [39] utilisait comme gènes de sélection les gènes tk et néo. Malheureusement, une telle approche ne permet pas d'établir de lignées de souris. En effet, le gène tk a la fâcheuse propriété d'être exprimé dans le sperme et de rendre les souris mâles stériles [40-42]. En revanche, il est possible d'utiliser une telle technique, avec deux sites loxP, en employant le gène hprt comme marqueur de sélection et des cellules ES hprt. C'est probablement pour cette raison que le groupe de Rajewsky a développé une nouvelle approche, fort élégante, pour arriver à son but, le contrôle spatio-temporel de l'apparition d'une mutation [32].

Les possibilités d'utiliser une activité partielle de l'enzyme Cre. Une alternative, risquée, à l'utilisation du système Cre-loxP vient d'être décrite par Gu et al. [31] Elle consiste à introduire dans le vecteur de recombinaison

RÉFÉRENCES

32. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-6.
33. DiSanto JP, Müller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor γ chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 377-81.
34. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5166-70.
35. Baubonis W, Sauer B. Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2025-9.
36. Qin M, Bayley C, Stockton T, Ow DW. Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1706-10.
37. Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6232-6.
38. Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6861-5.
39. Gu H, Zou YR, Rajewsky K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through *cre-lox* mediated gene targeting. *Cell* 1993; 73: 1155-64.
40. Al-Shawi R, Burke J, Jones C, Simons JP, Bishop JO. A Mup promoter-thymidine kinase reporter gene shows relaxed tissue-specific expression and confers male sterility upon transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4821-8.
41. Braun RE, Lo D, Pinkert CA, Widera G, Flavell RA, Palmiter RD, Brinster RL. Infertility in male transgenic mice: disruption of sperm development by HSV-tk expression in postmeiotic germ cells. *Biol Reprod* 1990; 43: 684-93.
42. Al-Shawi R, Burke J, Wallace H, Jones C, Harrison S, Buxton D, Maley S, Chandley A, Bishop JO. The herpes simplex virus type 1 thymidine kinase is expressed in the testes of transgenic mice under the control of a cryptic promoter. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4207-16.

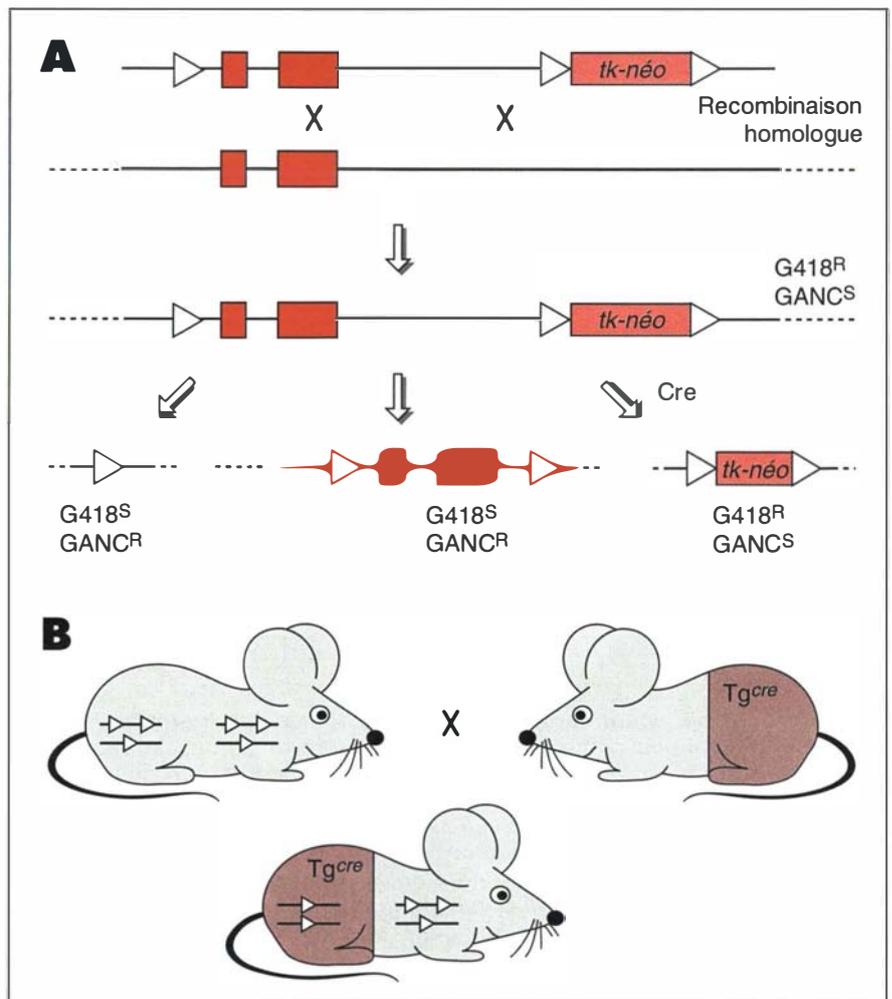


Figure 6. **Utilisation d'une activité partielle de l'enzyme Cre.** A. Un vecteur de recombinaison similaire à celui décrit dans la figure 5 mais comportant une cassette de sélection entourée par deux sites loxP (triangle ouvert), donc ayant en tout trois sites loxP est introduit dans les cellules ES par électroporation. Les cellules ES recombinantes sont ensuite traitées par l'enzyme Cre. Une activité partielle de l'enzyme conduit à la production de trois réarrangements génomiques, dont deux seulement pourront être sélectionnés par le phénotype GANCR. Il s'agit de la délétion complète du gène ainsi que des marqueurs de sélection et de l'élimination de la cassette de sélection. L'élimination du gène étudié ne peut pas être mise en évidence par la sélection au Ganciclovir car les cellules possèdent toujours le gène tk. Le premier événement correspond à la mutation du gène étudié. Le deuxième permet de créer des souris qui peuvent être croisées avec des souris transgéniques pour Cre. B. Ainsi, le croisement des souris obtenues par l'injection des cellules ES recombinantes avec des souris transgéniques exprimant l'enzyme Cre (*Tgcre*) de manière spécifique permet de contrôler l'apparition de la mutation de manière spatio-temporelle.

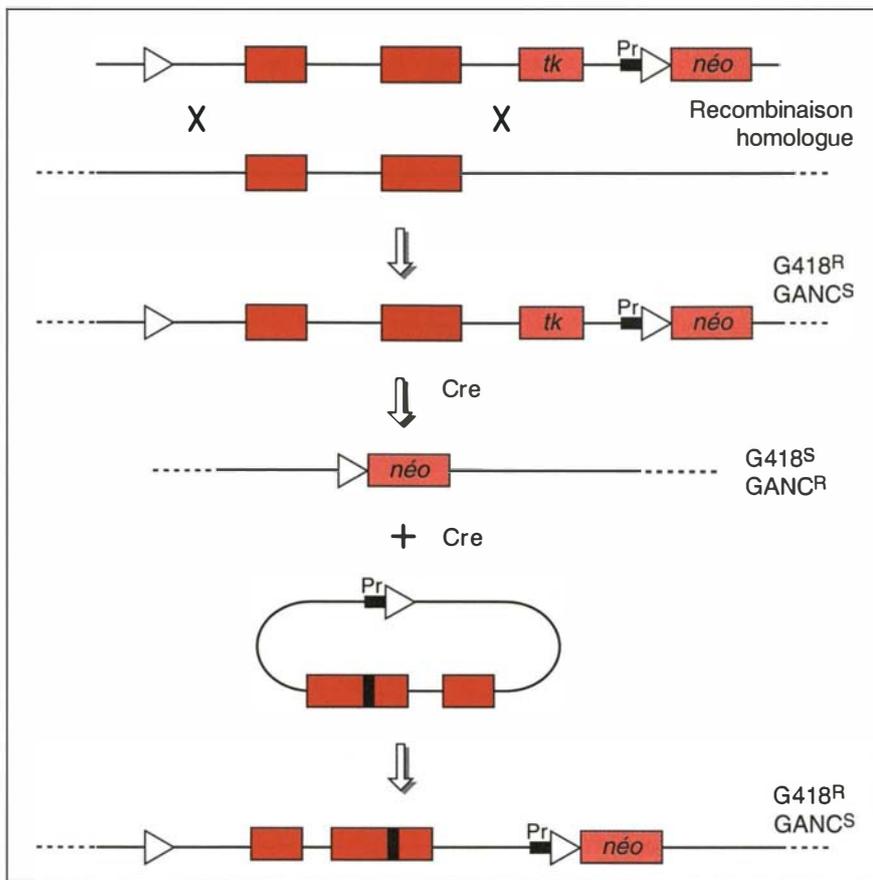


Figure 7. **Tentative de réintroduction d'une séquence d'ADN dans un locus donné.** La modification du vecteur décrit dans la figure 5 permet d'envisager l'utilisation du site loxP restant, après traitement à l'enzyme Cre, pour réintroduire un fragment d'ADN dans le locus étudié. Pour ce faire, un site loxP est placé entre le gène neo et son promoteur. Après un événement de recombinaison homologue, le traitement à l'enzyme Cre élimine le gène étudié, le gène tk et le promoteur du gène neo, laissant en place un site loxP et un gène tronqué de son promoteur (Pr). Les cellules peuvent être sélectionnées selon leur phénotype GANC^r. Dans une deuxième étape, un vecteur de réintégration est créé de façon à ce qu'une recombinaison contrôlée par Cre introduise un fragment d'ADN comprenant le promoteur du gène neo et la mutation souhaitée dans le gène étudié. De telles cellules devraient être G418^R.

non pas deux mais trois sites *loxP* (figure 6) et de contrôler l'activité de l'enzyme Cre de façon à avoir une réaction partielle. Cette réaction est obtenue en utilisant une enzyme dépourvue de signal de translocation nucléaire. Deux des sites *loxP* entourent la cassette de sélection (formée des gènes *tk* et *neo*), le troisième est placé dans le gène étudié sans créer de mutation au niveau protéique. Le traitement par l'enzyme Cre des cellules ES recombinantes permet l'obtention, si l'activité de Cre est partielle, de trois types de délétion. Deux d'entre elles produiront des cellules résistantes au Ganciclovir, la troisième produit des cellules sensibles au Ganciclovir, donc non sélectionnables. Cette technique vient d'être décrite pour le gène de l'ADN polymérase β dont la mutation conduit à un phénotype létal, ce qui empêchait l'étude du rôle de cette protéine dans l'ontogénèse des lymphocytes T [32]. Comparée à celles décrites précédemment, cette approche présente plusieurs avantages. Avant tout, elle élimine le gène *tk* au niveau des

cellules ES, ce qui résout le problème de stérilité des souris mâles. Ensuite, le premier événement de recombinaison homologue crée une mutation du gène étudié. Enfin, elle conduit à l'obtention de deux événements. Il est possible de créer une lignée de cellules portant le gène muté en l'absence de gènes de sélection et une lignée où le gène se retrouve entouré de sites *loxP* sans marqueur de sélection. Cette dernière lignée est utilisée pour établir des souris qui, par croisement avec des souris transgéniques pour l'enzyme Cre, vont permettre le contrôle spatio-temporel de la mutation.

Une telle approche peut aussi être envisagée pour la création de mutations propres, laissant alors non pas un site *loxP* mais deux entourant le gène étudié, sites *loxP* qui peuvent être utilisés ultérieurement pour déléter le gène.

Les deux inconvénients majeurs proviennent de la difficulté de contrôler l'activité de l'enzyme Cre et de la possibilité d'avoir des sites préférentiellement accessibles. Dans les deux cas,

certaines délétions seront impossibles à obtenir. Le système semble fonctionner tellement bien qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une sélection de l'événement de recombinaison induite par Cre [33]. Cela simplifie la construction du vecteur de recombinaison homologue et évite l'utilisation du gène *tk*.

Réintroduction d'un gène dans un locus donné.

La réaction de recombinaison induite par l'enzyme Cre entre deux sites *loxP* étant réversible (figure 7), il est imaginable de concevoir des vecteurs de recombinaison permettant non seulement l'élimination d'un gène mais aussi la réintégration, dans le site *loxP* restant, d'une forme mutée du gène étudié. Pour ce faire, un des sites *loxP* est placé entre le gène de sélection et son promoteur. Le traitement par Cre élimine le gène cible ainsi que le promoteur du marqueur de sélection, le rendant silencieux. Un second vecteur d'intégration portant un site *loxP* et un promoteur placé de façon à permettre la réexpression du marqueur de sélection est ensuite co-

RÉFÉRENCES

43. Sauer B, Henderson N. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol* 1990; 2: 441-9.
44. Fukushige S, Sauer B. Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7905-9.
45. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802-5.
46. Sauer B, Whealy M, Robbins A, Enquist L. Site-specific insertion of DNA into a pseudorabies virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9108-12.
47. Gage PJ, Sauer B, Levine M, Glorioso JC. A cell-free recombination system for site-specific integration of multigenic shuttle plasmids into the herpes simplex virus type 1 genome. *J Virol* 1992; 66: 5509-15.
48. Peakman TC, Harris RA, Gewert DR. Highly efficient generation of recombinant baculoviruses by enzymatically mediated site-specific *in vitro* recombination. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 495-500.
49. O'Gorman S, DT Fox, GM Wahl. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 1991; 251: 1351-5.
50. Fiering S, Kim CG, Epner EM, Groudine M. An «in-out» strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: analysis of the β -globin locus region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8469-73.
51. Odell J, Caimi P, Sauer B, Russell S. Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 1990; 223: 369-78.
52. Lloyd AM, Davis RW. Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 1994; 242: 653-7.

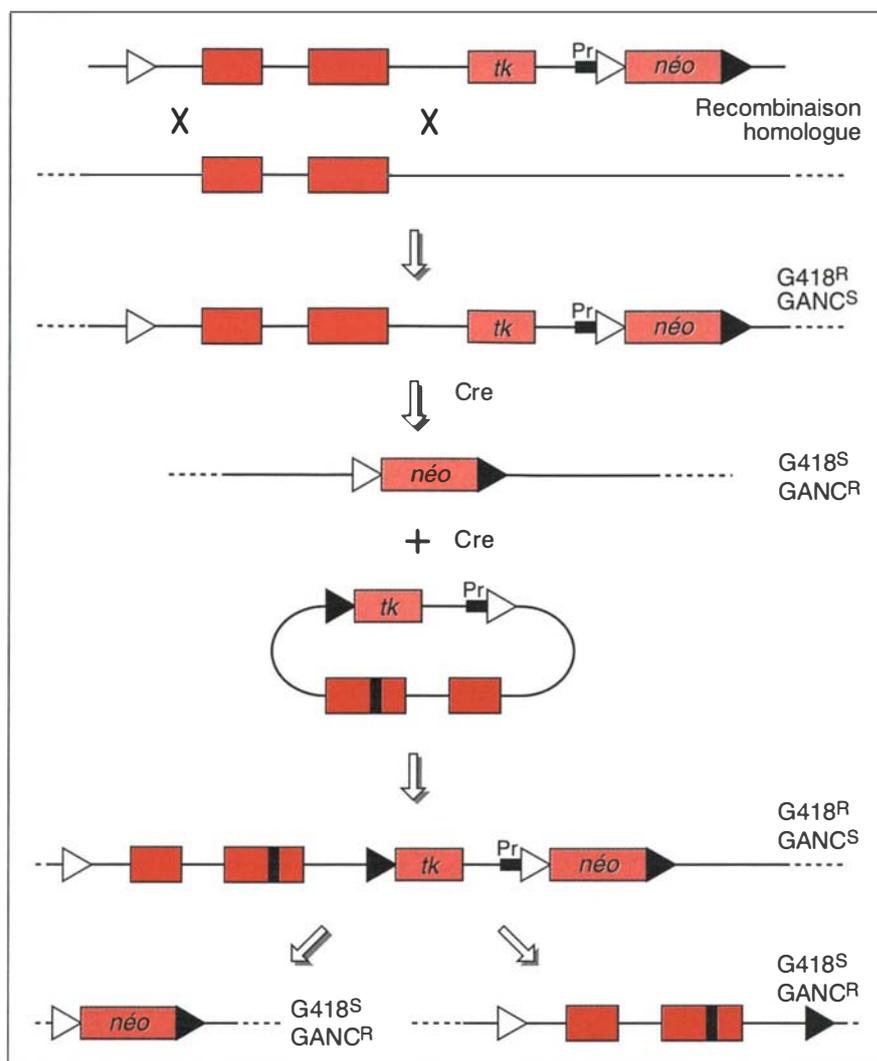


Figure 8. **Réintroduction d'une séquence d'ADN dans un locus donné et élimination des gènes de sélection.** Le ou les gènes de sélection utilisés dans l'expérience décrite dans la figure 7 pouvant interférer avec l'expression du gène étudié, il peut être intéressant d'essayer d'éliminer ceux-ci. Pour ce faire, on peut envisager d'utiliser deux sites loxP mutants, qui ne réagiront qu'avec eux-mêmes en présence de Cre. Un vecteur de recombinaison similaire à celui décrit dans la figure 7 mais comprenant un site loxP muté (triangle noir) à l'extrémité 3' du gène néo est introduit dans les cellules ES par électroporation. Le traitement par Cre des cellules recombinantes va éliminer la région souhaitée du gène laissant en place un gène néo dépourvu de promoteur entouré par, en 5', d'un site loxP de type sauvage et, en 3', d'un site loxP muté. Un vecteur de réinsertion – comprenant un site loxP de type sauvage, devant le promoteur du gène néo, un gène tk, un site loxP mutant en amont du gène tk et la mutation souhaitée – est introduit, en même temps que l'enzyme Cre dans les cellules ES recombinantes. La recombinaison contrôlée par Cre devrait conduire à l'intégration de ce vecteur, soit dans le site loxP mutant, soit dans le site loxP de type sauvage. Seul le deuxième événement confère un phénotype G418^R aux cellules car il apporte un promoteur au gène néo. Un deuxième traitement par Cre va conduire à la recombinaison entre les sites loxP, soit de type sauvage éliminant la mutation réintroduite, soit de type mutant éliminant la cassette de sélection et laissant en place un gène muté à souhait, entouré d'un site loxP de type sauvage et d'un site mutant. Comme pour l'expérience décrite dans la figure 7, la cassette tk-néo peut être remplacée par le gène hprt, à condition d'utiliser des cellules ES hprt.

introduit avec Cre. Une intégration correcte pourra être sélectionnée car le marqueur de sélection retrouve un promoteur dirigeant son expression (figure 7). De telles expériences ont été réalisées dans des cellules de mammifères [43, 44]. Dans un premier temps, un marqueur de sélection sans promoteur précédé d'un site *loxP* a été introduit dans les cellules. La deuxième étape consiste à introduire un promoteur par recombinaison dans le site *loxP* du marqueur de sélection [44].

La sophistication des vecteurs utilisés permet d'imaginer, après réintroduction du gène, l'élimination des gènes de sélection. En effet, il est possible de muter le site *loxP* de façon à créer un nouveau site qui ne réagira qu'avec lui-même [28]. Ainsi, si deux types de sites *loxP* sont utilisés pour la construction des vecteurs utilisés lors des différents événements de recombinaison, homologue ou relayée par Cre, il est non seulement possible de réintroduire un fragment d'ADN dans le locus étudié, mais aussi d'éliminer les marqueurs utilisés pour détecter un tel événement (figure 8). Cela demande encore à être sérieusement testé avant d'être utilisable.

Autres utilisations du système Cre-*loxP*

Utilisation en transgénèse. Un tel système permet non seulement de concevoir un grand nombre d'expériences en recombinaison homologue, mais il offre aussi de multiples applications en transgénèse. En voici deux exemples: il permet de réduire le nombre de copies du transgène intégré à une seule copie; en effet, si un site *loxP* est placé dans le transgène, l'intégration en tandem de plusieurs copies du transgène peut être réduite par traitement à l'enzyme Cre, qui ne laisse qu'un seul transgène [37, 38]; un tel système permet aussi une meilleure étude des gènes dont la sur-expression est létale et assure un meilleur contrôle de l'expression spécifique de tissu. Le transgène est alors séparé de son promoteur par une séquence d'ADN, interrompant la transcription, entourée de sites *loxP* [37, 38]. Cette séquence peut être éliminée par croisement avec les souris transgéniques préalablement citées exprimant Cre. La séquence d'ADN introduite peut elle-même

contenir un gène permettant la visualisation de l'expression du promoteur étudié [37]. A partir du même transgène, deux questions peuvent alors être posées: quelles sont les séquences qui règlent l'expression du transgène et quelle est la fonction du transgène? Les gènes marqueurs utilisables sont classiquement le gène de la β -galactosidase (*lac Z*) ou de la carboxyl acétyl transférase (CAT) ou, plus nouveau et qui présente l'intérêt de pouvoir réaliser le marquage *in vivo*, est le gène récemment décrit de la protéine fluorescente verte (GFP pour *green fluorescent protein* [45]), mais qui demande encore à être testé sur des cellules de mammifères. Dans ce type d'expérience, il y a aussi réduction du nombre de copies du transgène [37, 38].

Utilisation en thérapie génique. Il est aisé d'imaginer des utilisations de ce système en thérapie génique. Citons quelques exemples:

– Il peut être là aussi intéressant, comme pour les expériences décrites précédemment, de pouvoir éliminer le ou les vecteurs de sélection utilisés, qui sont susceptibles de perturber l'expression du gène thérapeutique.

– Un tel système peut permettre une simplification de la construction des vecteurs de thérapie génique. En effet, on peut imaginer un vecteur, basé par exemple sur l'adénovirus, possédant un site *loxP* dans lequel pourrait s'intégrer n'importe quel gène thérapeutique. Une telle approche permet déjà de manipuler *in vitro* des virus de la famille du virus de l'herpès, tel que le virus Pseudorabies [46] ou le virus Herpes simplex 1 [47] mais aussi un virus tel que Baculovirus [48]. Cela présente l'avantage de se faire *in vitro* et non plus *in vivo* comme l'impose la nécessité d'utiliser la recombinaison homologue pour la manipulation de tels virus.

– Il pourrait être intéressant d'avoir intégré, par exemple, dans une lignée de cellules souches hématopoïétiques humaines, un site *loxP* dans un locus neutre (par neutre, il faut entendre sans effet phénotypique sur les cellules traitées, ni sur l'expression du gène néo-introduit) et d'utiliser celui-ci pour intégrer le gène thérapeutique. Cela pourrait permettre de s'assurer l'innocuité du ou des transgènes.

Le système FLP/FRT

Un second système de recombinaison commence à être utilisé pour la manipulation de génomes. Il s'agit de la recombinaison FLP, reconnaissant spécifiquement les sites FRT, codée par le plasmide 2 μ de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [30]. La plupart des expériences réalisées avec le système Cre-*loxP* ont été répétées avec le système FLP/FRT. Ainsi, O'Gorman *et al.* ont montré qu'il est possible d'exciser ou d'introduire un fragment d'ADN par l'intermédiaire de l'enzyme FLP dans des cellules de mammifères [49]. Afin d'étudier la régulation de l'expression du gène de la β -globine, Fiering *et al.* ont élaboré un vecteur de recombinaison homologue qui leur permet l'élimination du marqueur de sélection après traitement par l'enzyme FLP [50]. Tout comme le système Cre-*loxP* [36, 51], le système FLP/FRT peut être utilisé pour manipuler les chromosomes de plantes [52].

Conclusion

Nous avons essayé dans cet article de passer en revue et d'imaginer l'ensemble des applications qu'offre le système de recombinaison Cre-*loxP* du phage P1 en nous concentrant surtout sur les expériences de recombinaison homologue. En effet, la nouvelle génération de vecteurs de recombinaison homologue basée sur un tel système devrait permettre une étude plus fine des gènes mutés. Dans un premier temps, ils permettent de créer des mutations « propres » où les gènes de sélection sont éliminés du locus étudié. Cela permet d'envisager des mutations introduisant un codon de terminaison, ou supprimant un site actif d'une protéine, ou éliminant spécifiquement un promoteur ou un exon ou, enfin, réduisant le nombre de sites d'initiation de traduction s'il en existe plusieurs.

Deux approches réalistes pour créer des mutations ponctuelles dans un gène sont donc envisageables. Cela peut être réalisé en utilisant, soit le système Cre-*loxP*, ce qui laissera toujours un site *loxP* dans le locus étudié, soit la technique dite du « marquage et de l'échange ». L'avantage du système Cre-*loxP* est qu'il ne fait appel qu'à un événement de recombinaison homologue et que le traitement à l'enzyme

Cre semble très efficace. De plus, la plupart des constructions utilisées avec le système Cre-*loxP* permettent aussi de réaliser une étape de recombinaison homologue « d'échange ».

De tels vecteurs, basés sur l'utilisation du système Cre-*loxP*, laissent aussi envisager la possibilité d'un contrôle spatio-temporel de l'apparition d'une mutation. Cette dernière propriété a une importance fondamentale dans l'étude des gènes impliqués dans le développement embryonnaire. En effet, la mutation de tels gènes a souvent pour conséquence une létalité embryonnaire qui interdit l'étude de ces gènes chez l'animal adulte ou dans certains types cellulaires embryonnaires. Un autre avantage non négligeable d'une telle approche est la possibilité de réutiliser les mêmes marqueurs de sélection pour créer, soit une autre mutation, soit la mutation du deuxième allèle de façon à obtenir des cellules ES homozygotes mutantes pour le gène étudié.

Il est nécessaire de rappeler ici que la technique décrite en premier lieu par Gu *et al.* avec deux sites *loxP* et les gènes *tk* et *neo* comme marqueurs de sélection [39] n'est pas utilisable pour établir un système de mutagenèse conditionnelle. En effet, le gène *tk* rendant les mâles stériles [40-42], il est impossible d'établir des lignées de souris avec une telle construction ! Cela, néanmoins, reste réalisable en utilisant le gène *hprt* comme marqueur de sélection dans des cellules ES *hprt*.

L'approche consistant à introduire trois sites *loxP* dans le vecteur de recombinaison homologue n'est pas à négliger car elle permet, en peu de manipulations, l'élimination du gène *tk* et la création de deux types de souris mutantes. C'est actuellement l'approche la plus élégante. L'utilisation d'un tel système devrait permettre, en plus des expériences décrites ici, de créer des translocations chromosomiques mimant des maladies humaines ou la création de très larges délétions dans des *loci* donnés.

De plus, la combinaison des deux systèmes, Cre-*loxP* et FLP/FRT, ou l'utilisation de sites *loxP* mutés permettent d'envisager des manipulations encore plus sophistiquées du génome murin. En plus des applications décrites dans cet article, de nombreuses autres expériences sont réalisables. Ainsi, seule l'utilisation de ce système chez les mammifères a été abordée dans cet article alors qu'il y a certainement moyen d'exploiter ce système dans d'autres modèles animaux, parasitaires ou végétaux ■

Remerciements

L'auteur tient à remercier les Docteurs Brigitte Viville, Patrick Lemaire, Sophie Vaulont, Louis Lefebvre, Didier Trouche et Gilles Carnac pour leur lecture critique de ce manuscrit. S. Viville bénéficie d'une bourse post-doctorale de l'European Molecular Biology Organisation.

Summary

Homologous recombination: new strategies with new vectors

The use of new vectors based on the Cre-*loxP* recombinase system of bacteriophage P1 will greatly improve gene knock out techniques. Two main criticisms can be made against the classical knock out approaches. A major disadvantage is to leave at least one selectable gene in the studied locus. This can influence the phenotype or the expression of neighbouring genes. Secondly, the mutation has an immediate effect, which, if the mutation is lethal, will prevent any study of the gene at the adult stage. By using the Cre-*loxP* system, it is now possible to create « clean » mutations (leaving the mutated locus free of selectable marker) and to control the appearance of the mutation in a spatio-temporal manner. The possible use of such a system to manipulate the genome is described, focusing on its applications in homologous recombination experiments in mammals.

TIRÉS À PART

S. Viville.