

Correction d'un déficit enzymatique murin par transfert de gène

C. Cavard, G. Grimber, J.-F. Chasse, N. Dubois, M. Bennoun, P. Kamoun, P. Briand

Summary

Transgenic mice, produced by microinjection of a foreign gene into fertilized mouse eggs and implantation of the microinjected embryos into foster mothers, have proven to be useful tools in the investigation of gene expression. We have used this technology to develop a gene therapy of a mouse enzyme deficiency. A cloned cDNA coding for ornithine transcarbamylase (OTC) has been introduced into embryos of spf-ash mice which exhibit OTC deficiency. These mice have been chosen mainly because of their abnormal phenotype (sparse-fur with abnormal skin and hair) and secondly because they constitute an animal model of human OTC deficiency. The introduction of the normal gene into the mutant embryos has allowed the development of a transgenic mouse whose phenotype has been completely corrected. The level of expression which has been necessary to restore a normal phenotype is now under investigation.

Corriger une anomalie héréditaire de façon stable et transmissible à la descendance est en principe possible, chez l'animal, grâce au développement récent de la technologie des animaux transgéniques. En effet, lorsqu'un gène est introduit dans l'un des pronuclei d'un œuf fécondé, il a une probabilité non négligeable de s'intégrer dans l'ADN de la cellule hôte avant la première division de celle-ci. Lorsque cela se produit, le gène est transmis à toutes les cellules de l'organisme qui se développe à partir de l'embryon microinjecté et, ultérieurement, à sa descendance selon les lois de la génétique mendélienne. Les animaux ainsi obtenus, à l'heure actuelle des souris, sont dits transgéniques. Lorsqu'ils comportent les séquences nécessaires, les « transgènes » sont généralement exprimés [1]. La microinjection d'un gène normal dans un embryon dont la séquence endogène correspondante n'est pas fonctionnelle devrait donc permettre de restaurer, totalement ou partiellement, la fonction perturbée par la mutation. Ainsi, l'introduction du gène $E\alpha$ dans des embryons de souris caractérisées par un déficit immunitaire dû à une délétion du gène $E\alpha$ a permis la création de souris transgéniques qui développent une réaction immunitaire normale [2, 3, 4, 5].

Les souris Spf-ash (*sparse-fur with abnormal skin and hair*) [6, 7, 8] ont une mutation de l'ornithine trans-

carbamylase (OTC:E.C.2.1.3.3), enzyme mitochondriale qui joue un rôle essentiel dans la détoxification de l'ammoniaque des organismes uréotéliques [9]. Cette lignée constitue un modèle de certains déficits humains en OTC [10], affection relativement fréquente (1/75000), transmise selon le mode récessif lié à l'X. Particulièrement sévère chez le garçon, elle évolue dans 75 % des cas vers un coma hyperammonémique mortel quel que soit le traitement entrepris [11]. Chez la souris Spf-ash, le déficit en OTC est partiel (activité résiduelle à 5 % de la normale). Il s'accompagne d'un phénotype caractérisé par une absence de pelage et une hypotrophie très marquée jusqu'au sevrage [8]. La microinjection, dans les embryons de ces souris mutées, de séquences OTC capables de gouverner la synthèse d'une enzyme normale, doit en principe permettre de normaliser leur phénotype. Nous rapportons dans cette note les résultats d'une série de microinjections ayant conduit à l'intégration de l'ADN OTC injecté et à la correction phénotypique attendue du déficit murin.

Matériels et méthodes

Séquence microinjectée. Le vecteur plasmidique pBB3 [12] OTC comportant l'ADNc OTC de rat [13] mis sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40 est linéarisé par l'enzyme de restriction EcoR1. Après extraction au phénol, l'ADN est précipité

ADRESSE

Laboratoire de Biochimie Génétique, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris.

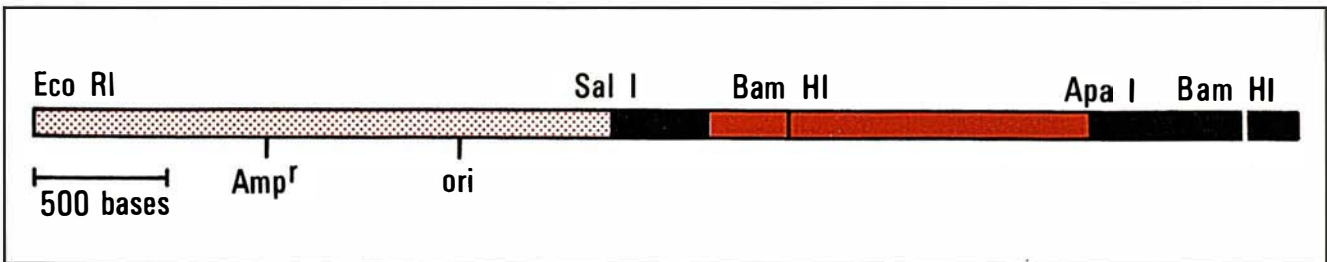


Figure 1. **Séquence microinjectée.** En rose, séquence du plasmide pBR 322 [12]. En noir, séquences dérivées du virus SV40 [12]. En rouge, ADNc de l'OTC de rat [13].

par l'éthanol et remis en solution dans un tampon Tris 10 mM/EDTA 0,1 mM, pH 7,5. **Manipulation des œufs et microinjection.** Des embryons issus du croisement de femelles homozygotes Spf-ash superovulantes avec des mâles C57/BL6 X DBA sont microinjectés au stade une cellule, selon la technique de Gordon *et al* [14]. Le trop faible nombre d'œufs fécondés qu'il est possible d'obtenir par croisement entre mâles et femelles Spf-ash a

rendu nécessaire l'utilisation de ce croisement. Une cinquantaine de copies (environ 2 pl de solution) du vecteur pBB3 OTC précédemment décrit sont introduites dans chaque embryon. En l'absence d'expression de l'ADNc OTC injecté, les portées sont constituées de mâles mutés hypotrophiques et sans pelage jusqu'au sevrage et de femelles hétérozygotes au phénotype normal. Les œufs microinjectés sont réimplantés dans des femelles pseudo-gestantes obtenues

par accouplement avec des mâles vasectomisés.

Analyse de l'ADN. L'ADN est extrait à partir d'un prélèvement d'une portion de la queue de chaque souris. Successivement traités à la RNase et à la protéinase K, les échantillons sont extraits au phénol puis dialysés contre du Tris 10 mM/EDTA 1 mM pH 7,5. L'ADN est analysé par *Southern blot* après digestion par l'enzyme de restriction Hind III. La sonde utilisée comporte le fragment de restriction Apa I-Bam HI du virus SV 40. Elle est marquée par déplacement de coupure (*Nick translation*) [15].

Résultats et discussion

La structure de la séquence chimérique introduite dans les embryons de souris est représentée sur la *figure 1*. Une cinquantaine de copies du vecteur pBB3 OTC linéarisé par EcoRI sont microinjectées dans des embryons F1 (Spf-ash × C57 BL DBA). Cent vingt œufs furent ainsi microinjectés et 85 réimplantés dans des femelles pseudo-gestantes, conduisant au développement de 21 souriceaux. L'un des souriceaux mâles se développa tout à fait normalement (*figure 2*) sans aucun des signes phénotypiques liés au déficit en OTC, à savoir l'absence de pelage et l'hypotrophie. L'analyse de son ADN (*figure 3*) montre qu'il comporte à l'état intégré la séquence injectée. De plus, la preuve que la correction phénotypique obtenue



Figure 2. **Correction phénotypique de la mutation Spf-ash.** A gauche, souris *spf-ash* ; à droite, souris transgénique *spf-ash* ayant intégré l'ADNc de l'OTC de rat. Ces deux souris ont été photographiées après 15 jours de vie.

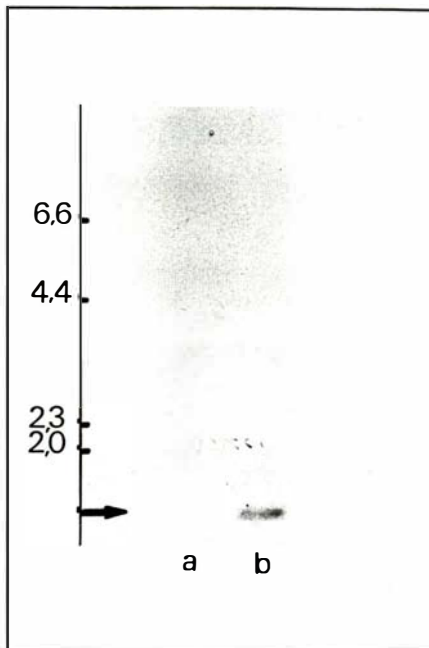


Figure 3. **Analyse par Southern blot de l'ADN des souris spf-ash et transgénique.** a) souris spf-ash ; b) souris transgénique spf-ash. La sonde utilisée pour détecter l'ADN microinjecté est constituée du fragment de restriction *Apa I*-*Bam H I* de la séquence injectée (voir figure 1). La taille des fragments est indiquée en kilobases.

nue est bien le reflet d'une normalisation du métabolisme déficitaire est apportée par l'effondrement de l'acidurie orotique* observée chez cet animal. Nous attendons la production des souris de première génération (F1) issues du croisement entre ce souriceau et une femelle normale pour sacrifier l'animal et rechercher le niveau de l'activité OTC dans les différents tissus de l'organisme, particulièrement dans le foie et l'intestin, lieux de synthèse habituels de l'enzyme. Chez les femelles hétérozygotes, malgré le phénomène de *lyonisation*** qui conduit à l'inactivation au hasard de l'un des X, le phénotype est toujours normal. Ceci laisse supposer que l'obtention d'une expression, même relativement faible, de l'OTC injecté doit per-

mettre la restauration du phénotype normal. Si l'analyse de l'activité OTC hépatique de la souris transgénique confirme cette hypothèse, les embryons Spf-ash pourront être de bons outils pour l'analyse de séquences régulant l'expression de gènes hépatiques. En effet, le développement à partir de ces œufs d'une souris transgénique au phénotype normal obtenue par microinjection de ces séquences couplées à l'ADNc de l'OTC signera la capacité de celles-ci à réguler l'expression du gène placé sous leur contrôle. Disposer d'un tel criblage phénotypique pour la détection des souris transgéniques pourrait être d'une grande utilité.

Enfin, l'ADNc injecté étant mis sous contrôle du promoteur précoce du virus SV40, une expression relativement ubiquitaire devrait être décelée chez la souris transgénique obtenue. Une activité OTC a d'ores et déjà été détectée dans la rate et le poumon d'un souriceau de sa descendance. Le développement jusqu'à présent normal de ce dernier prouve que cette activité ectopique n'est pas toxique pour l'animal.

En conclusion, il semble qu'une thérapie génique du déficit murin en OTC ait été obtenue et que la correction phénotypique qu'elle provoque fait de la microinjection dans les embryons de souris Spf-ash un outil qui pourra faciliter l'étude des séquences régulatrices des gènes hépatiques ■

* Le déficit en OTC entraîne une déviation du carbamylphosphate non métabolisé vers la voie de synthèse des pyrimidines dont l'étape limitante a pour substrat l'acide orotique. Cet acide est éliminé dans les urines, l'oroturie étant, dans les déficits isolés en OTC, le reflet direct de la fonctionnalité résiduelle du cycle de l'urée.

** Mary Lyon a décrit le phénomène de l'inactivation au hasard d'un chromosome X sur 2, très précocement au cours du développement des embryons femelles de souris. Un tel phénomène existe chez tous les animaux supérieurs.

TIRÉS À PART

P. Briand : laboratoire de Biochimie Génétique, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris.

RÉFÉRENCES

- Palmiter RD, Brinster RL. Transgenic mice. *Cell* 1985 ; 41 : 343-5.
- Steinmetz M. Immune response restored by gene therapy in mice. *Nature* 1985 ; 316 : 14-5.
- Le Meur M, Gerlinger P, Benoist C, Mathis D. Correcting an immune-response deficiency by creating *Eα* gene transgenic mice. *Nature* 1985 ; 316 : 38-42.
- Yamamura K, Kikutani H, Folsom V, et al. Functional expression of a microinjected *Eα* gene in C57BL/6 transgenic mice. *Nature* 1985 ; 316 : 67-9.
- Pinkert CA, Widera G, Cowing C, et al. Tissue-specific, inducible and functional expression of the *Eα* MHC class II gene in transgenic mice. *EMBO J* 1985 ; 4 : 3923-30.
- Rosenberg LE, Kalousek F, Orsulak MD. Biogenesis of ornithine transcarbamylase in spf ash mutant mice : two cytoplasmic precursors, one mitochondrial enzyme. *Science* 1983 ; 222 : 426-8.
- Briand P, Miura S, Mori M, Cathelineau L, Kamoun P. Cell-free protein synthesis and transport of mutant ornithine carbamoyltransferases into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1983 ; 760 : 389-97.
- Doolittle DP, Hulbert LL, Cordy C. A new allele of the sparse-fur gene in the mouse. *J Hered* 1974 ; 65 : 194-95.
- Krebs HA, The discovery of the urea cycle. In : Grisolia S, Baguena R, Mayor F, eds, *The Urea Cycle*, New York : Wiley & Sons Interscience, 1976 : 1-12.
- Briand P, François B, Rabier D, Cathelineau L. Ornithine transcarbamylase deficiencies in human males : kinetic and immunochemical classification. *Biochim Biophys Acta* 1982 ; 704 : 100-6.
- Walser M, Urea cycle disorders and other hereditary hyperammonemic syndromes. In : Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York : McGraw Hill, 1983 : 402-38.
- Bourachot B, Jouanneau J, Giri I, Katinka M, Cereghini S, Yaniv M. Both early and late control sequences of SV 40 and polyoma promote transcription of *Escherichia coli* gpt gene in transfected cells. *EMBO J* 1982 ; 1 : 895-900.
- Nguyen M, Argan C, Lusty CJ, Shore GC. Import and processing of hybrid proteins by mammalian mitochondria in vitro. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 800-5.
- Gordon JW, Ruddle FH. Gene transfer into mouse embryos : production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* 1983 ; 101 : 411-33.
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977 ; 113 : 237-42.