

## Prix Nobel de médecine 2007

Image non disponible.  
Se reporter à la version  
papier du n° 355  
de la revue *Découverte*

Mario R. Capecchi

Image non disponible.  
Se reporter à la version  
papier du n° 355  
de la revue *Découverte*

Oliver Smithies

Image non disponible.  
Se reporter à la version  
papier du n° 355  
de la revue *Découverte*

Sir Martin J. Evans

# CIBLAGE DE GÈNE

## Une avancée dans la compréhension du vivant

Les animaux génétiquement modifiés ont été mis à l'honneur en 2007 lors de la cérémonie de remise des prix Nobel. Celui de physiologie ou médecine a été attribué à trois chercheurs, Mario R. Capecchi, Martin J. Evans et Oliver Smithies, pour leurs travaux sur l'obtention de souris génétiquement modifiées à partir de cellules souches. La technique est précise, elle permet de cibler un gène pour le modifier ou le supprimer, et révolutionnaire puisqu'elle rend possible l'analyse du rôle des gènes et l'étude des maladies génétiques.

PAR **STÉPHANIE KAPPLER**, MÉDIATEUR SCIENTIFIQUE AU DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE DU PALAIS DE LA DÉCOUVERTE

**Mario R. Capecchi est chercheur à l'Institut Howard-Hughes et professeur de biologie et de génétique humaine à l'université de l'Utah aux États-Unis.**

**Oliver Smithies est professeur et chercheur en pathologie et recherche médicale à l'université de Caroline du Nord aux États-Unis.**

**Martin Evans est directeur de l'Institut de sciences biologiques et professeur de génétique des mammifères à l'université de Cardiff en Grande-Bretagne.**

© The Nobel Foundation 2007.

Photo : U. Montan.

**P**as un mois ne se passe sans que les médias ne s'intéressent aux organismes génétiquement modifiés, plus connus sous le sigle OGM. Mais ce sont souvent les mêmes dont on parle : les plantes de grande culture, comme le maïs résistant à un insecte ravageur, pour ne citer que le plus connu.

## Que cachent les OGM ?

Derrière ces trois lettres se cachent bien d'autres êtres vivants dont l'ADN (fig. 1) a été modifié artificiellement.

Ainsi, bactéries, levures, mouches, souris, lapins, cochons... peuplent les laboratoires de recherche depuis une trentaine d'années et sont devenus indispensables dans de nombreux domaines, comme l'industrie pharmaceutique, la recherche médicale ou fondamentale. Les apports des OGM dans ce dernier domaine ont d'ailleurs fait parler d'eux en octobre 2007, lors de la remise du prix Nobel de physiologie ou médecine à Stockholm.

Trois chercheurs, Mario R. Capecchi (États-Unis), Sir Martin J. Evans (Royaume-Uni) et Oliver Smithies (États-Unis), ont été récompensés pour la mise au point d'une technique qui permet de modifier les gènes

(fig. 1) de souris de manière très précise dans le but d'analyser leur rôle dans la physiologie normale et pathologique.

Cette technique, appelée ciblage de gène, repose sur l'utilisation de cellules souches et du mécanisme de recombinaison homologue. Sans cesse améliorée et perfectionnée par de nombreuses équipes de recherche, elle est aujourd'hui utilisée pour des travaux dont il serait impossible de faire la liste tant elle est considérable.

### LES LIMITES DES PREMIÈRES MODIFICATIONS DU GÉNOME

Les informations génétiques qui permettent le développement et le fonctionnement d'un être vivant sont portées par l'ADN, longue molécule filamenteuse nichée au cœur des cellules. Chaque information, appelée gène, correspond à une portion de ce fil d'ADN. Les gènes sont décryptés par la cellule pour fabriquer des protéines qui joueront leurs rôles dans le fonctionnement de l'organisme (pigmentation de la peau, élasticité des muscles, transport d'oxygène...).

L'ensemble des molécules d'ADN d'une cellule constitue le génome d'un individu. Il est le même dans toutes les cellules d'un être vivant.



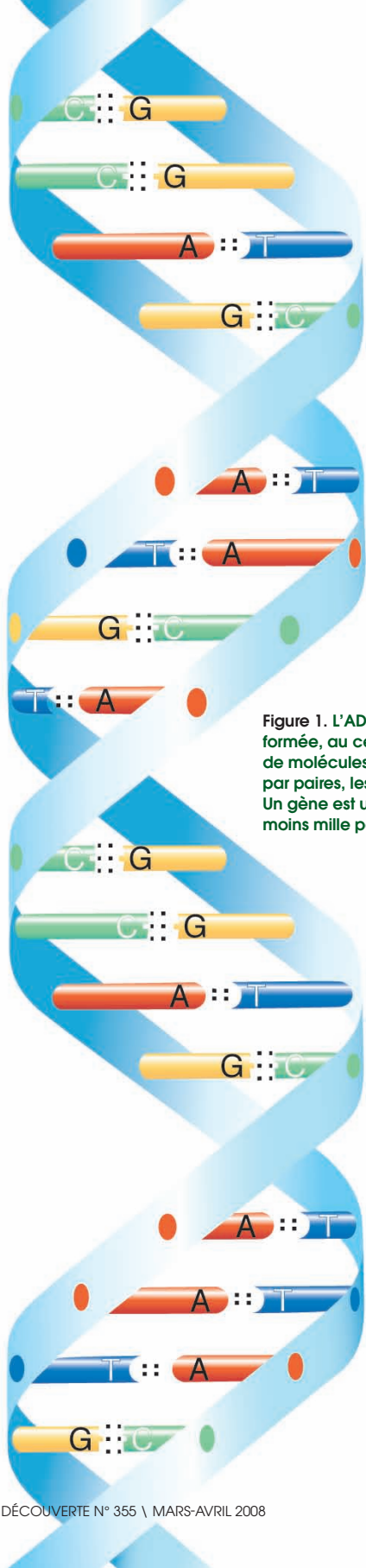


Figure 1. L'ADN est une macromolécule formée, au centre, d'un enchaînement de molécules plus petites, associées par paires, les quatre bases A, T, C et G. Un gène est une séquence précise d'au moins mille paires de bases.



## QU'EST-CE QU'UN OGM?

Un OGM est un organisme dont l'ADN a subi une modification non naturelle. Le plus souvent, cette modification consiste à ajouter un gène, alors appelé transgène, qui va conférer à l'organisme une nouvelle propriété. Plusieurs gènes peuvent être ajoutés en même temps. Depuis les découvertes de Capecchi, Evans et Smithies à la fin des années 1980, il est devenu possible de supprimer un ou plusieurs gènes, ou d'en remplacer un par un autre. Mais cela n'est réalisable pour le moment que chez la souris.

Toutes ces manipulations se font sur une seule cellule, la cellule œuf par exemple, à partir de laquelle se développera un organisme. Ce dernier aura, dans chacune de ses cellules, la ou les modifications génétiques qu'il pourra transmettre à sa descendance. Les recherches sur l'obtention d'OGM ont démarré à la fin des années 1970, après la découverte d'outils pour manipuler le génome: les enzymes de restriction<sup>(1)</sup> et les ligases<sup>(2)</sup> qui permettent respectivement de couper et de coller des fragments d'ADN de manière très précise. Car, pour pouvoir insérer un gène dans une cellule, il faut d'abord l'identifier, puis le couper pour l'isoler du long filament d'ADN auquel il appartient. Il peut ainsi être collé à d'autres fragments d'ADN nécessaires pour l'insertion dans l'organisme cible.

## UNE TECHNIQUE REPOSANT SUR LE HASARD

Une des limites rencontrées lors des premiers essais pour l'obtention d'OGM était que le transgène s'insérait dans le génome de l'hôte au hasard. Or, cela pose plusieurs problèmes. D'une part, si le transgène s'insère dans un gène de l'hôte, ce dernier est interrompu et par conséquent inactivé et, s'il était important, l'animal peut alors ne

(1) Ciseaux moléculaires servant à couper l'ADN en des sites bien précis.

(2) Enzymes qui facilitent la liaison de deux molécules.

plus être viable. D'autre part, si le transgène s'insère dans une zone où l'ADN est très condensé, il reste inactif et donc la modification ne s'exprime pas. La technique manquait donc encore de précision. Depuis les découvertes de Capecchi et Smithies, les expérimentateurs peuvent choisir le site d'intégration de leur transgène. Mieux encore, ils peuvent remplacer un gène par un autre voire par une version incomplète, inutilisable par la cellule, ce qui revient à le supprimer.

### UNE INTUITION COMMUNE POUR DES MODIFICATIONS CIBLÉES DU GÉNOME

C'est à la fin des années 1970, au cours de leurs travaux respectifs, que Capecchi et Smithies ont la même intuition: serait-il possible d'utiliser un mécanisme naturel, la recombinaison homologue (fig. 2), pour obtenir des modifications ciblées du génome? À cette époque, ce mécanisme était connu chez les mammifères où il intervient dans la formation des cellules sexuelles en augmentant le brassage entre les gènes des deux parents.

Capecchi et Smithies ne s'intéressaient pas précisément à ce mécanisme. C'est en analysant les résultats d'autres travaux qu'ils observèrent que, lorsqu'un gène est injecté dans une cellule, son intégration dans le génome de cette cellule se fait parfois par recombinaison homologue.

Le gène ne s'insère pas au hasard mais toujours dans une zone du génome où la séquence d'ADN ressemble très fortement

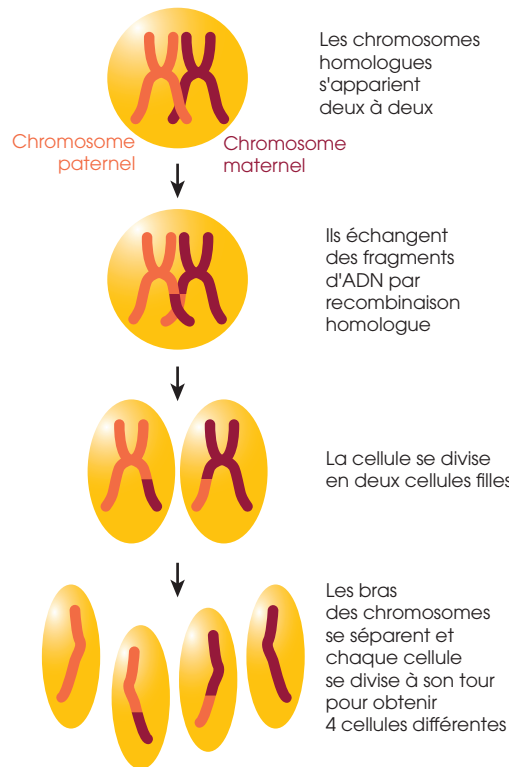


Figure 2  
**La recombinaison homologue entre deux chromosomes**

#### Au moment de la division cellulaire, l'ADN se condense en chromosomes.

Toutes les cellules humaines contiennent 23 paires de chromosomes homologues, sauf les cellules sexuelles, qui ne contiennent que 23 chromosomes. Les chromosomes d'une paire proviennent de chacun des deux parents. Ils portent les mêmes gènes (celui du groupe sanguin, par exemple) mais pas forcément la même version (A et B, par exemple). Lors des divisions qui aboutissent à la formation des cellules sexuelles, ovules et spermatozoïdes, un phénomène particulier se produit: il y a échange de fragments d'ADN entre les chromosomes homologues. Ces derniers se rapprochent sur une ou plusieurs parties, l'ADN est coupé puis recollé différemment. On se retrouve donc avec, sur un même bras de chromosome, des gènes maternels et des gènes paternels. Cela augmente la variété de cellules sexuelles formées.

Depuis les découvertes de Capecchi, Evans et Smithies à la fin des années 1980, il est devenu possible de supprimer un ou plusieurs gènes, ou d'en remplacer un par un autre.

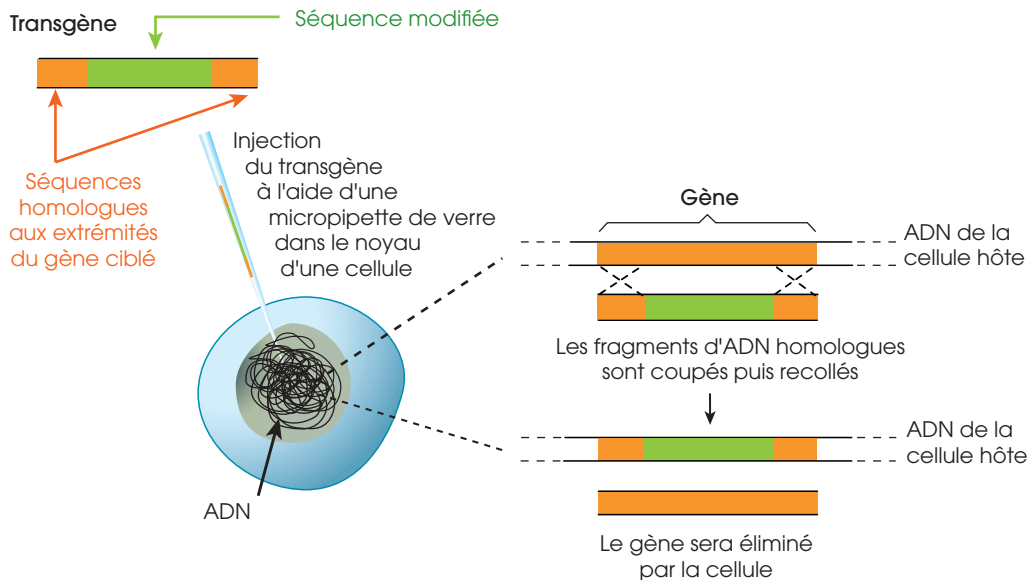


Figure 3. Recombinaison homologue entre deux fragments d'ADN.



à la sienne (fig. 3). Capecchi demande alors une bourse pour pouvoir poursuivre ses expériences. Elle lui est refusée sous le prétexte qu'il paraît peu probable qu'un gène arrivant dans le noyau d'une cellule puisse trouver sa séquence homologue parmi les millions, voir les milliards, de paires de bases qui constituent le génome des animaux.

#### UNE DÉTERMINATION PAYANTE

Capecchi poursuit malgré tout ses recherches et réussit à inactiver un gène bien précis en y insérant une autre séquence d'ADN. Bien que rare, le phénomène de recombinaison homologue se produit dans un nombre de cellules suffi-

samment important pour qu'il soit envisageable d'utiliser cette technique en routine. Smithies, quant à lui, montre que ce phénomène peut avoir lieu que le gène soit activé, c'est-à-dire utilisé par la cellule, ou non. Les deux chercheurs ont donc apporté la preuve, en 1985, qu'il est possible de cibler n'importe quel gène grâce à la recombinaison homologue.

Leurs travaux ont porté, jusque-là, sur des cellules en culture et les deux chercheurs espèrent maintenant développer leur technique sur des organismes entiers. C'est alors qu'ils entendent parler des travaux de Martin Evans, le troisième lauréat du prix Nobel, qui vont leur apporter la solution.

Les cellules isolées par Evans sont connues aujourd'hui sous le nom de cellules souches embryonnaires ou cellules ES.

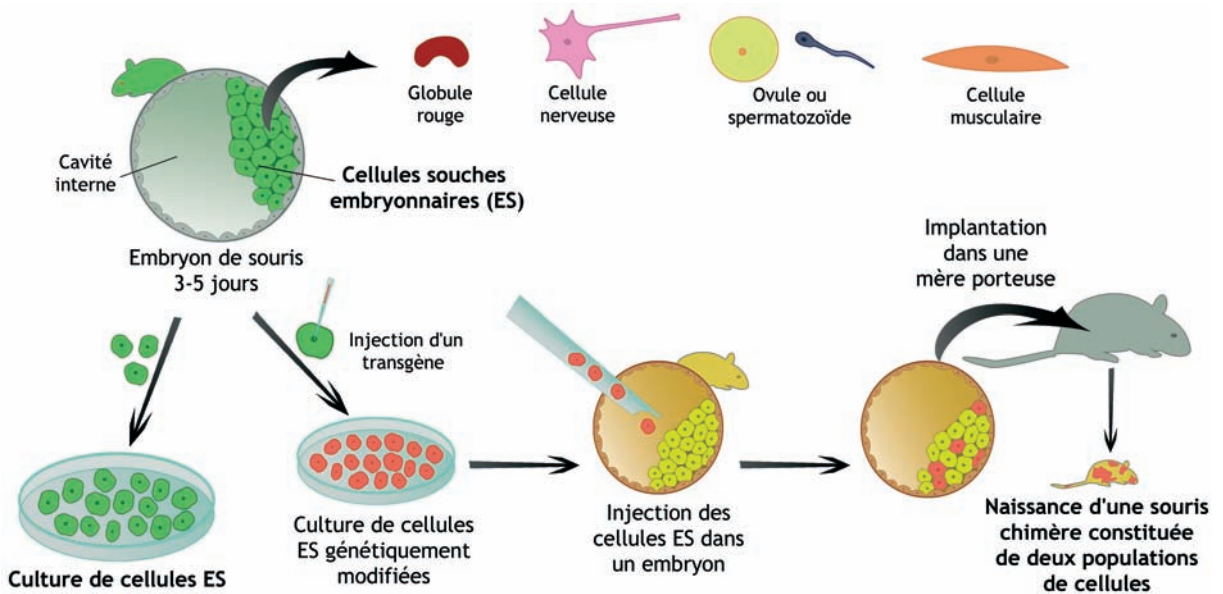


Figure 4. Cellules souches embryonnaires (cellules ES). Les cellules isolées par Evans sont celles de la masse interne de l'embryon de souris âgé de quelques jours (en vert). Ce sont les cellules souches embryonnaires (ES) à l'origine de toutes les cellules de la future souris. Placées en culture, elles sont capables de se diviser quasi indéfiniment. Dessin Stéphanie Kappler.

## Découverte des cellules souches embryonnaires

Martin Evans étudie, depuis plusieurs années, les gènes impliqués dans le développement de la souris. Il essaie de mettre en place une méthode qui lui permettrait de réaliser ses expériences *in vitro*, c'est-à-dire en dehors de l'animal. Après de nombreux essais infructueux, il isole, en 1984, à partir de très jeunes embryons de souris, des cellules qu'il peut facilement maintenir en culture.

Il réimplante ensuite ces cellules dans un autre embryon, lui-même réimplanté dans une mère porteuse. Après la naissance du souriceau, il observe que les cellules modifiées ont participé à la formation de tous ses tissus, y compris ses organes sexuels. Le souriceau n'est pas un OGM mais une chimère, un animal dont les cellules sont issues pour partie de cellules « normales », et pour partie de cellules modifiées. En revanche, lorsqu'il se reproduira, il pourra transmettre la modification et donc donner naissance à des souriceaux géné-

tiquement modifiés. Les cellules isolées par Evans sont connues aujourd'hui sous le nom de cellules souches embryonnaires ou cellules ES. Ce sont des cellules indifférenciées, c'est-à-dire non spécialisées, qui se divisent activement et qui sont capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme (fig. 4).

### UN OUTIL PLUS EFFICACE

Jusqu'à présent, pour obtenir des animaux génétiquement modifiés, on insérait les gènes dans des embryons au stade d'une cellule. Or la recombinaison homologe est un phénomène assez rare, ce qui aurait nécessité d'utiliser un grand nombre d'embryon, longs et difficiles à obtenir. Les cellules ES apportent une solution plus efficace. Placées en culture dans des conditions qui permettent de les maintenir à l'état indifférencié, elles se divisent à l'identique presque indéfiniment. On peut ainsi obtenir facilement des centaines de cellules qui pourront être modifiées, analysées puis utilisées pour obtenir des animaux.





## RENCONTRE DES TECHNIQUES ET PREMIÈRES MODIFICATIONS GÉNÉTIQUES PRÉCISES

Capecchi et Smithies décident de tester la recombinaison homologue sur les cellules ES d'Evans. Ils prennent contact avec lui pour apprendre les techniques de manipulations d'embryon et de culture de cellules souches. Ils choisissent ensuite tous les deux un même gène cible et réussissent à le remplacer par une autre version. Ils montrent ainsi que le ciblage de gène est possible dans les cellules ES. Les scientifiques disposent maintenant d'outils permettant d'étudier, au niveau de l'organisme entier, les effets de modifications génétiques précises.

### LES PREMIERS ESSAIS

Le premier champ d'investigation choisi par de nombreux scientifiques a été l'étude des maladies génétiques. Ainsi, Smithies a étudié la mucoviscidose, maladie dans laquelle un seul gène est touché. Ce gène permet la fabrication d'une protéine essentielle pour le fonctionnement de nombreux organes comme les bronches, le pancréas, le foie ou l'intestin grêle. Chez les malades, le gène est muté, c'est-à-dire que sa séquence est altérée, et il devient illisible pour la cellule qui ne pourra pas fabriquer correctement, voire pas du tout, la protéine correspondante. Smithies réussit à inactiver ce gène chez la souris, il obtient des animaux avec certains des

symptômes observés chez l'Homme. C'est l'un des premiers modèles animaux de maladies génétiques humaines obtenu par recombinaison homologue. Ces souris avec un gène inactivé sont appelées *knock-out* ou KO. Elles permettent de comprendre comment une maladie se déclare et évolue et de tester des traitements potentiels.

### UN OUTIL DE LABORATOIRE INDISPENSABLE MAIS AVEC SES LIMITES

Depuis les résultats des travaux de Smithies obtenus il y a une vingtaine d'années, des centaines de souris KO ont été mises au point pour l'étude de maladies telles que l'hypertension artérielle, la maladie d'Alzheimer, le diabète ou certains cancers. Le ciblage de gène n'a pas seulement révolutionné la recherche médicale mais aussi la recherche fondamentale. Pour comprendre quel gène contrôle un mécanisme, on peut commencer par observer ce qui se passe lorsque le gène est absent. Le génome de la souris compte environ 22 400 gènes ; plus de mille ont déjà fait l'objet d'une inactivation ciblée offrant ainsi aux chercheurs une mine d'informations sur leurs rôles dans le développement ou le fonctionnement normal de l'organisme. Mais la technique a ses limites, même si elle est sans cesse affinée pour se rapprocher le plus possible de la réalité. Les premières modifications ciblées du génome de la souris étaient

---

## Les OGM en quelques dates

**1972:** Obtention du premier OGM, une bactérie modifiée avec un gène de virus.

**1982:** Mise sur le marché d'insuline humaine produite à partir de bactéries génétiquement modifiées.

Premier animal génétiquement modifié, une souris rendue géante avec le gène de l'hormone de croissance de rat.

**1983:** Première plante génétiquement modifiée,

un tabac résistant à un antibiotique.

**1986:** Premières plantes résistant à un herbicide (OGM les plus cultivés à l'heure actuelle).

La souris de laboratoire apporte une aide inespérée pour la compréhension des maladies humaines

© CNRS Photothèque / A. Duchon.

Image non disponible.  
Se reporter à la version papier du n° 355  
de la revue *Découverte*

## Stéphanie Kappler

**est depuis cinq ans médiateur scientifique** au sein du département des sciences de la vie du Palais de la découverte. Après avoir obtenu un DEA de neurosciences, elle s'est orientée vers un DESS de communication scientifique. Actuellement responsable des ateliers du génome, elle conçoit et anime des exposés, des ateliers et des formations en biologie moléculaire.

présentes dans tous les tissus, et ce, dès la conception de l'animal. Or, dans l'organisme, les gènes dépendent les uns des autres et parfois les effets de l'inactivation d'un seul gène sont trop nombreux et complexes pour permettre une analyse claire. Des scientifiques ont mis au point différents protocoles permettant de moduler l'expression de la modification. Bien qu'elle soit présente dans tout l'organisme, on peut choisir où et quand elle s'exprimera. Les techniques sont complexes, plusieurs modifications du génome sont en fait nécessaires. Pour le contrôle dans le temps c'est au final une injection de produit au niveau du tissu concerné qui activera ces modifications. De plus, la souris est un excellent modèle animal pour définir les fonctions des gènes car elle présente de grandes similitudes génétiques, physiologiques et pathologiques avec l'Homme. Mais une souris reste une souris. D'autres espèces seraient plus adaptées pour l'étude de certaines maladies or, pour le moment, elle seule permet d'obtenir des cultures de cellules ES. Récemment, des chercheurs ont réussi à combiner la technique de ciblage de gène à celle du clonage et ont obtenu des brebis génétiquement modifiées sans utiliser ces

fameuses cellules ES. Cette nouvelle méthode est prometteuse; elle pourrait être appliquée à d'autres espèces comme le porc qui est, par exemple, un meilleur modèle pour l'étude de l'athérosclérose <sup>(3)</sup>.

## Conclusion

Les outils mis au point par les trois lauréats sont très puissants, ils sont aujourd'hui devenus indispensables pour de nombreux chercheurs qui les utilisent tous les jours. Il existe même, depuis quelques années, des entreprises spécialisées qui proposent aux chercheurs de créer des souris sur mesure en fonction d'une thématique de recherche. Mais il ne faut pas oublier que ces rongeurs sont des OGM et même s'ils restent, pour le moment, confinés dans des laboratoires, ils doivent être produits et utilisés dans le respect de la réglementation mise en place par la Commission du génie génétique qui dépend du ministère de la Recherche. **S. K.**

(3) Maladie au cours de laquelle les artères s'obstruent, empêchant le sang de circuler correctement.