

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX



Hugues Mandavid
Hélène Royer
Aneth Sarmiento

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Introduction

Technologie transgénique  obstacle (présence de marqueur de résistance)

BUT:

Création des plantes transgéniques sans marqueurs de sélection

Plusieurs systèmes de recombinaison ont été bien caractérisés. Chez les plantes, le plus utilisé est le système CRE-Lox qui provient des bactériophages.

Implique

- ◎ Ciblage d'une séquence spécifique d'ADN (lox)
- ◎ Épissage à l'aide d'une enzyme appelée la recombinase CRE.

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

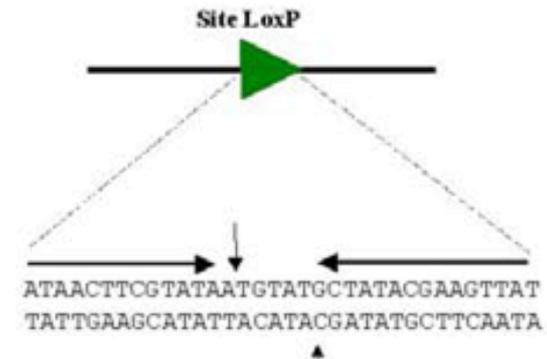
CRE (cyclic recombinase):

- ⊙ Protéine de 38 KDa (bactériophage P1Lox).
- ⊙ Catalyse la recombinaison entre deux site de reconnaissance, les sites Lox.

Lox (locus of X-over P1)

- ⊙ Séquence d'ADN de 34 pb
- ⊙ Extrémités 13 nucléotides palindromiques

➡ Il est donc **impossible de trouver** cette séquence dans un génome **eucaryote**.



SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

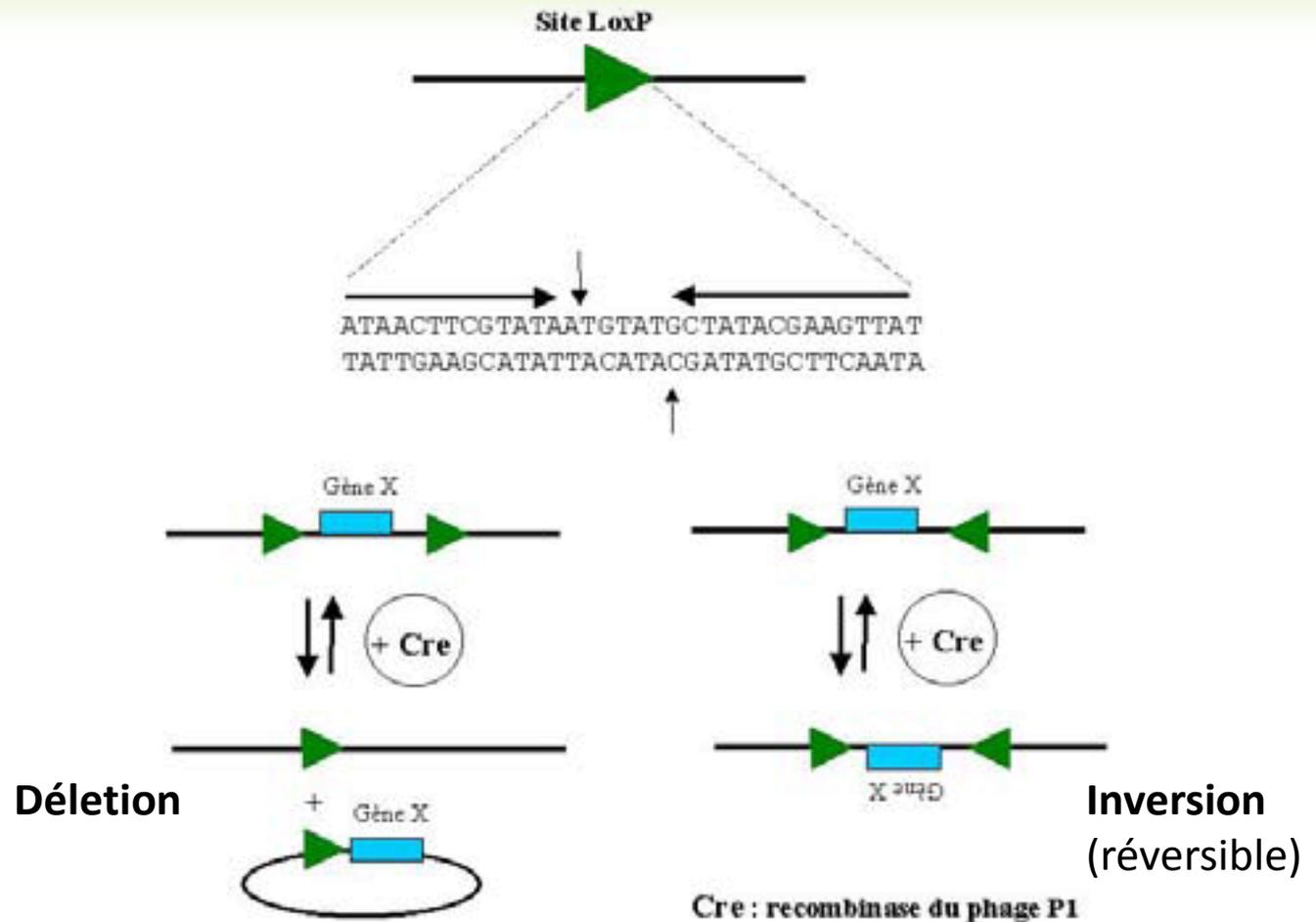
Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Fonctionnement du système CRE-loxP



SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Transformation des plantes pour le fonctionnement du système CRE/lox

1. Construction du fragment contenant CRE ou le gène d'intérêt flanqué par les sites lox
2. Insertion dans *Agrobacterium*
3. Transformation de la plante avec *Agrobacterium*
4. Culture de la descendance

→ **Plante est prête** (transformant).

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Intérêts

Le système de recombinaison CRE a été exploité pour:

- ⊙ Excision sélective des gènes marqueurs chez les plantes transgéniques
- ⊙ Intégration précise des transgènes « *single-copy* » dans le génome des plantes.
- ⊙ Réduction des séquences répétitives en tandem, après le transfert direct de gène vers une unité simple.
- ⊙ Permet l'expression contrôlée et inductible de la transgénèse.

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Test d'efficacité de la technique

Transgenic Res (2008) 17:239–250
DOI 10.1007/s11248-007-9096-9

ORIGINAL PAPER

Evaluation of CRE-mediated excision approaches in *Arabidopsis thaliana*

Gordana Marjanac · Annelies De Paepe ·
Ingrid Peck · Anni Jacobs · Sylvie De Buck ·
Anna Depicker

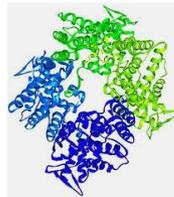
Problème:

Variations de l'expression et de l'efficacité
recombinatrice de CRE

Options à analyser:

Transformations de:

⊙ t-DNA exprimant CRE → Plante «contenant» Lox



⊙ Fragment Lox marqué → Plante «exprimant» CRE

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

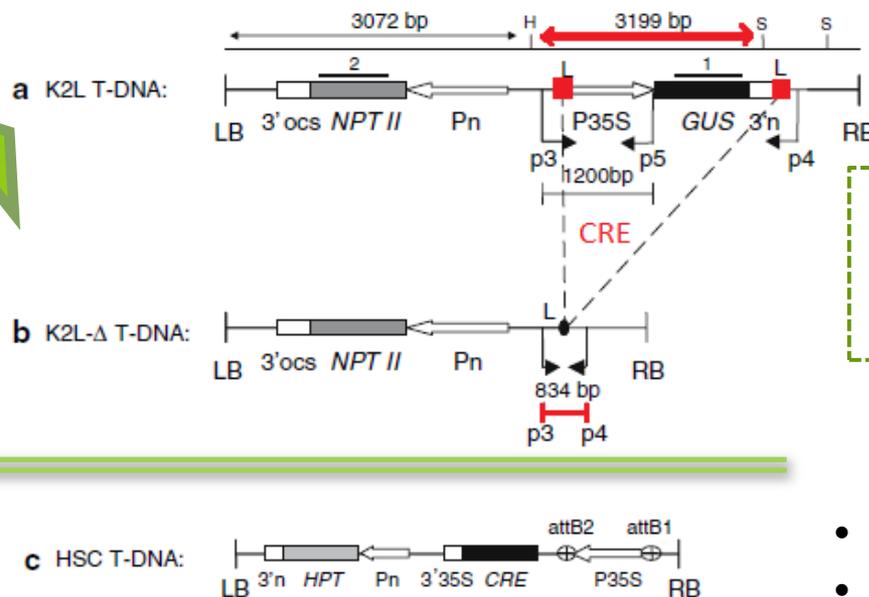
Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

⊙ A) Plant «contenant» Lox (transformant) + CRE t-DNA



L'absence de GUS est utilisée comme preuve de recombinaison par CRE

- Analyses histochimiques
- PCR

- Floral dip (1 lignée: CK2L6)
- T2
- Identification par marqueur de sélection

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

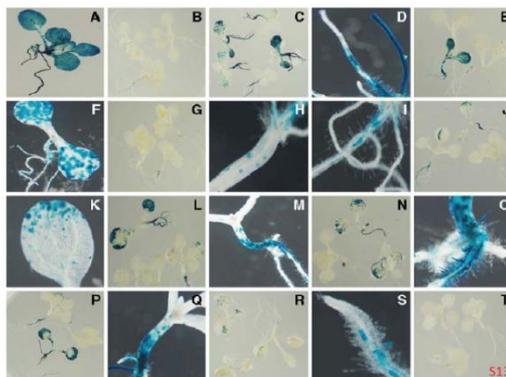
Conclusion

Résultats

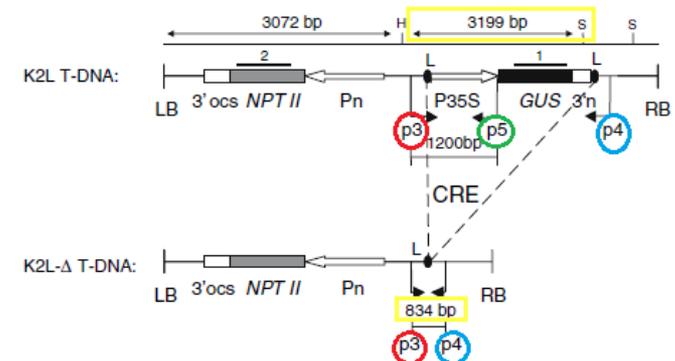
Table 1 GUS staining of T2 progeny of CK2L6 plants re-transformed by the floral dip method with a CRE-expressing T-DNA

Transformant	T2 seedlings	GUS-positive ^a	GUS-negative
CK2L6-SC3	10	3	7
CK2L6-SC4	10	8	2
CK2L6-SC5	10	5	5
CK2L6-SC6	10	2	8
CK2L6-SC7	10	5	5
CK2L6-SC9	10	4	6
CK2L6-SC10	10	6	4
CK2L6-SC11	10	8	2
CK2L6-SC12	10	5	5
CK2L6-SC13	10	0	10

^a Refers to a mosaic staining pattern



Pour confirmer les résultats:



	SC4	SC13	
frag 834 pb	+	+	PCR ADN g
frag 1200 pb	+	non	
mRNA	1X	5X	Real Time PCR

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

⊙ B) Plante «exprimant» CRE (transformant)

+ t-DNA K2L(lox)

2 Méthodes de transformations:

- Floral dip
- Transformation des racines

2 lignées utilisées: Cre1 et Cre13

- Les deux sont homozygotes et ont intégré CRE dans un seul locus.

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Résultats

Table 2 GUS staining and PCRs of T2 progeny of Cre1 and Cre13 plants retransformed by the floral dip method with the K2L T-DNA vector

Transformant	T2 seedlings	GUS-positive ^a	GUS-negative	p3 + p4 ^b 834 bp	p3 + p5 ^b 1200 bp
<i>Cre1 retransformants (FC1K2L)</i>					
FC1K2L-2-3	5	3	2	+	+
FC1K2L-3-1	5	0	5	+	-
FC1K2L-3-5	5	0	5	+	-
FC1K2L-3-3	5	0	5	+	-
FC1K2L-3-7	5	0	5	+	-
FC1K2L-3-4	5	5	0	+	+
<i>Cre13 retransformants (FC13K2L)</i>					
FC13K2L-1-4	5	5	0	+	+
FC13K2L-4-1	5	5	0	+	+
FC13K2L-3-2	5	5	0	+	+
FC13K2L-1-1	5	5	0	+	+
FC13K2L-1-3	5	5	0	+	+
FC13K2L-2-2	5	5	0	+	+
FC13K2L-2-1	5	5	0	+	+
FC13K2L-3-3	5	5	0	+	+
FC13K2L-1-5	5	5	0	+	+
FC13K2L-3-4	5	5	0	+	+

^a Refers to a mosaic staining pattern

^b Primers used for PCR, see Fig. 1

Table 3 GUS staining and PCRs of T2 progeny of Cre1 and Cre13 plants transformed by the root transformation method with the K2L T-DNA vector

Transformant	T2 seedlings	GUS-positive ^a	GUS-negative	p3 + p4 ^b 834 bp	p3 + p5 ^b 1200 bp
<i>Cre1 retransformants (RC1K2L)</i>					
RC1K2L-51	5	0	5	+	-
RC1K2L-3-51	5	0	5	+	-
RC1K2L-3a	5	0	5	+	-
RC1K2L-18a	5	0	5	+	-
RC1K2L-73	5	0	5	+	-
RC1K2L-5b	5	0	5	+	-
RC1K2L-8a	5	0	5	+	-
RC1K2L-19c	5	0	5	+	-
RC1K2L-26	5	0	5	+	-
<i>Cre13 retransformants (RC13K2L)</i>					
RC13K2L-36	5	0	5	+	-
RC13K2L-35	5	0	5	+	-
RC13K2L-61	5	0	5	+	-
RC13K2L-22	5	0	5	+	-
RC13K2L-2a	5	0	5	+	-
RC13K2L-5b	5	0	5	+	-
RC13K2L-39	5	0	5	+	-
RC13K2L-27a	5	5	0	+	+

^a Refers to a mosaic staining pattern

^b Primers used for PCR, see Fig. 1

- Différents niveaux de recombinaison de CRE dans les 2 lignées étudiées (CRE1 > CRE13) → PCR
→ Relation probable avec la structure du locus dans le transgène
- **Hypothèse:** Moins de t-DNA s'intègrent avec la transformation de racines qu'avec floral dip

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Cre-loxP - induction chimique

Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants

Jianru Zuo[†], Qi-Wen Niu[†], Simon Geir Møller, and Nam-Hai Chua^{*}

Laboratory of Plant Molecular Biology, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021.

^{} Corresponding author (chua@rockvax.rockefeller.edu). [†] These authors contributed equally to this work.*

- ⊙ Expression de la CRE recombinase contrôlée par un site de reconnaissance à un produit chimique
- ⊙ Permet l'excision d'un site spécifique transgénique dans *Arabidopsis*, sous le contrôle d'une substance chimique.

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

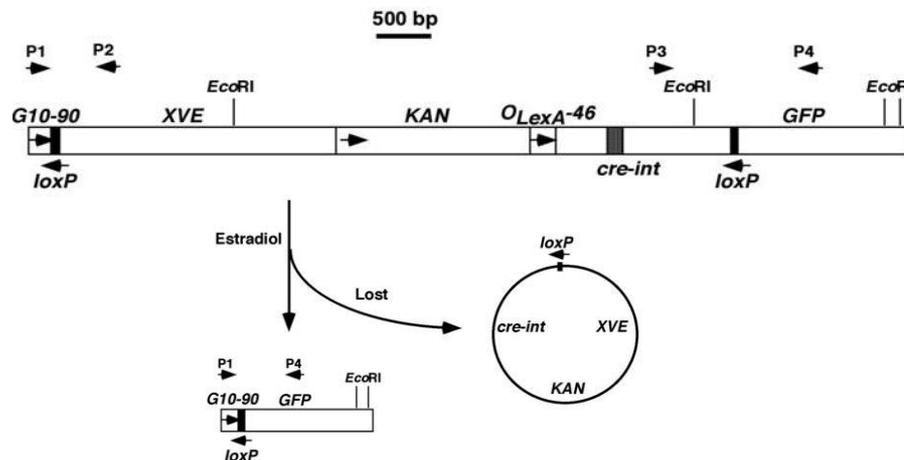
Intérêts

Experimentations

Conclusion

Description du vecteur CLX pX6-GFP

- ⊙ Promoteur G10-90;
- ⊙ Système XVE
- ⊙ *KAN*
- ⊙ Promoteur *O-LexA*⁻⁴⁶
- ⊙ *Cre-int*
- ⊙ *GFP*



- CLX introduit par *Agrobacterium* dans les racines
- Induction par l'oestradiol
- **CRE va exciser**
- Perte du système
- GFP sous le contrôle de G10-90 → exprimée

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Vérification de l'insertion et l'excision:

- ⊙ KAN+/KAN-
- ⊙ GFP+/GFP-
- ⊙ Analyses moléculaires et génétiques

(PCR, northernblot, Southernblot)

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

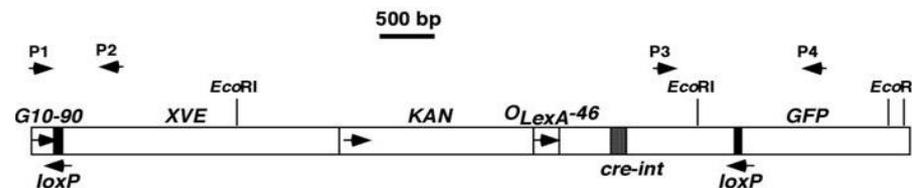
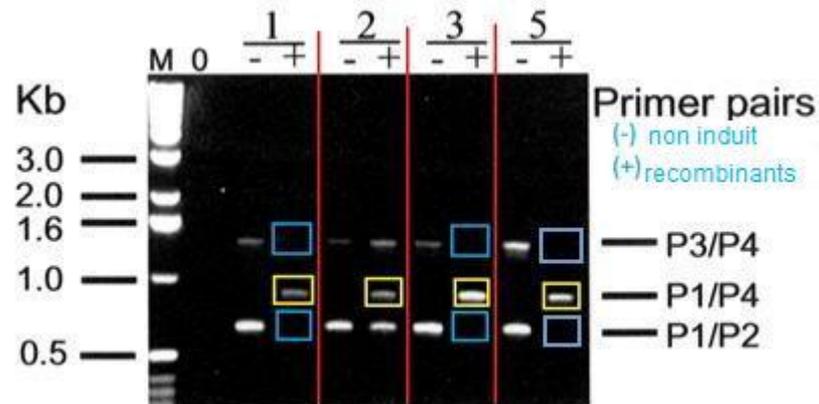
Intérêts

Experimentations

Conclusion

PCR

- 1 – 3 : lignées T0 traitées à l'oestradiol, UN locus transgénique
- 2 : lignée T0 traitée à l'oestradiol, DEUX loci transgéniques
- 5 : Plante transgénique induite en T1



SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

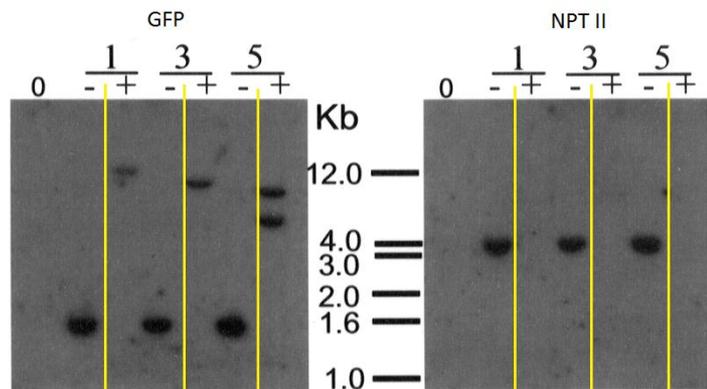
Intérêts

Experimentations

Conclusion

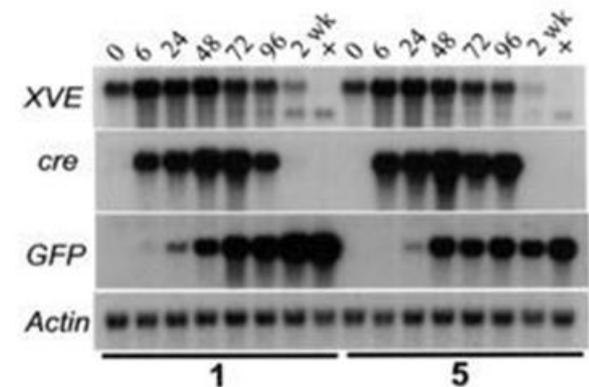
Southern blot

Test pour savoir si ADN excisé est ré-inséré autre part dans la plante du génome



Northern blot

Permet d'observer l'évolution de l'ADN recombinant chez les plantes qui ont été induites.



SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Avantages

- ⊙ Etroitement contrôlé si mauvaise expression
→ non régénération (car perte du marqueur de sélection)
- ⊙ Excision efficace des séquences d'ADN multiples insertions d'ADN-T, liées ou séparées
- ⊙ Possible en organogénèse ou embryogénèse somatique

Inconvénients

- ⊙ Inducteur parfois inaccessible ou instable. Entrée de l'inducteur inégale selon le type cellulaire
- ⊙ Le niveau de stimulation atteint par l'induction (taux d'induction) est souvent assez faible
- ⊙ Souvent des effets secondaires cytotoxiques dû à l'activation d'autres gènes endogènes qui répondent au même stimulus inducteur

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

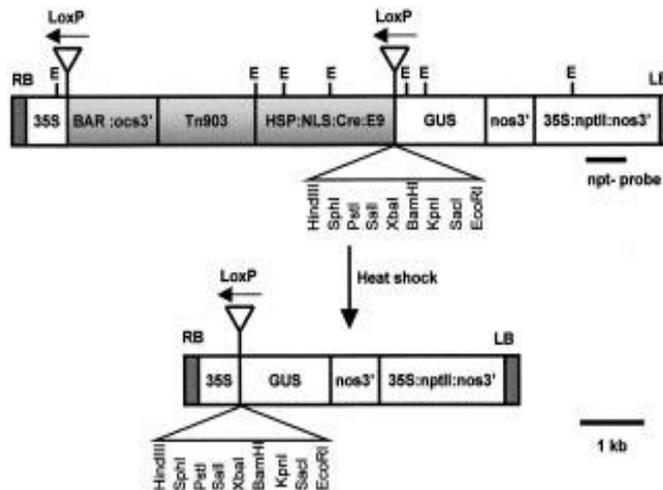
Induction Thermique

A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants

Tine Hoff, Kirk M. Schnorr¹ and John Mundy*

Department of Plant Physiology, University of Copenhagen, Oester Farimagsgade 2A, 1353 Copenhagen K, Denmark (* author for correspondence; e-mail: mundy@biobase.dk); ¹ Present address: Novo Nordisk A/S, 1BM1.05 Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, Denmark

Received 17 February 2000; accepted in revised form 30 July 2000



Stabilisation de l'excision : suppression du gène Cre

- ⊙ Limites du système par induction chimique chez Arabidopsis (en 2000)
- ⊙ Création de pCrox
- ⊙ pHSP81-1 : promoteur induit par choc thermique
- ⊙ Sélection au Basta et Kanamycine
- ⊙ Construction témoin : GUS sous le contrôle de pHSP81-1.

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

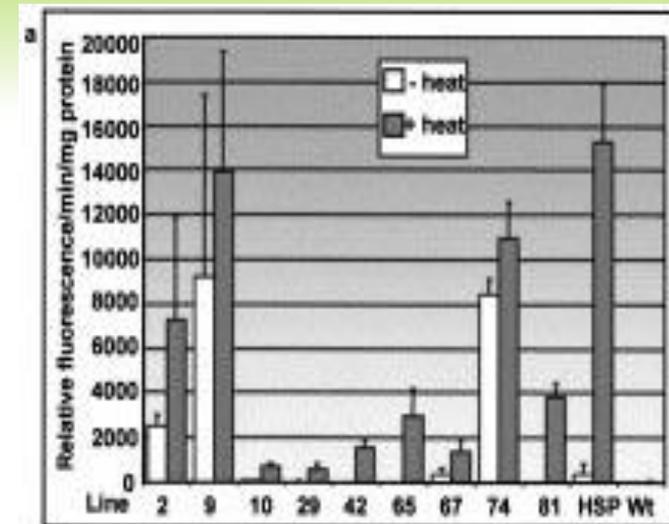
Conclusion

Transformation :

- Introduction dans *Agrobacterium*
- Infiltration *in vivo*
- T1 : Basta (40 lignées)
- T2 : kanamycine (9 lignées)
- T3 : Basta (homozygotes)

Induction thermique : 2 fois 16h à 37° C,
période de récupération de 32h à 21° C.

Plantules à 2-3 semaines : analyses GUS
=> différents niveaux d'induction
=> sélection de 4 lignées



Line	- induction	+ induction	fold induction
2	2516 (485)	7301 (4612)	2.9
9	9236 (8147)	13965 (5383)	1.5
10	44 (24)	697 (150)	16
29	23 (25)	574 (257)	25
42	12 (10)	1568 (380)	131
65	13 (10)	2933 (1257)	224
67	381 (282)	1367 (583)	3.6
74	8439 (711)	10913 (1650)	1.3
81	14 (2)	3816 (648)	271
HSP	346 (482)	15258 (2650)	44
Wt	4 (2)	23 (14)	5.6

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Marquage de GUS à différents stades

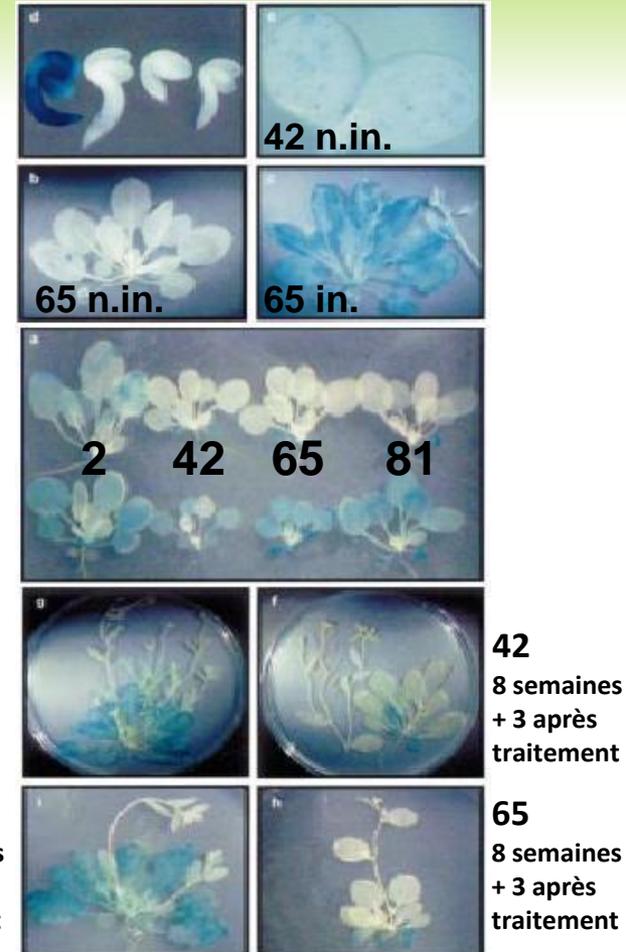
Plantes non-induites :

- Début de la germination (apparition du radicule)
- Cotylédons déployés

Plantes induites :

- 9 semaines
- 11 semaines

Cotylédons : promoteur actif à température plus basse



SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

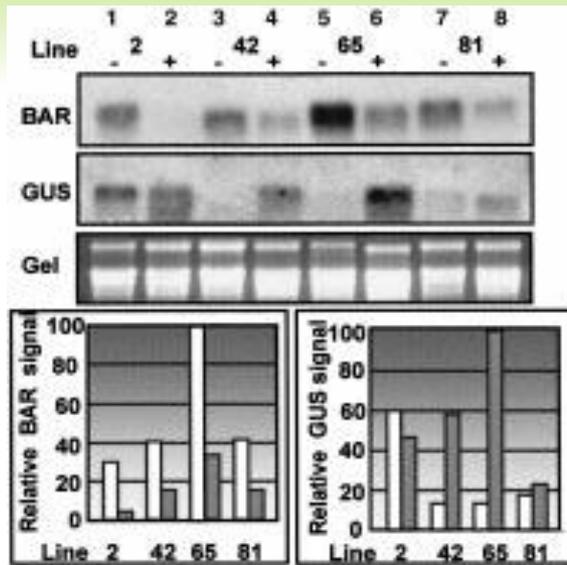
Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

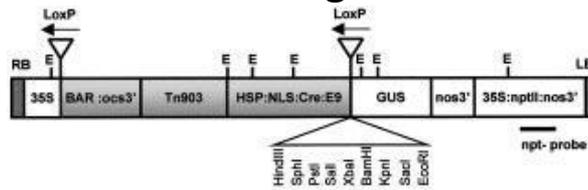


(-) : avant induction (+) : après induction

Northern blot

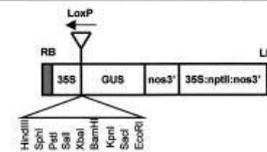
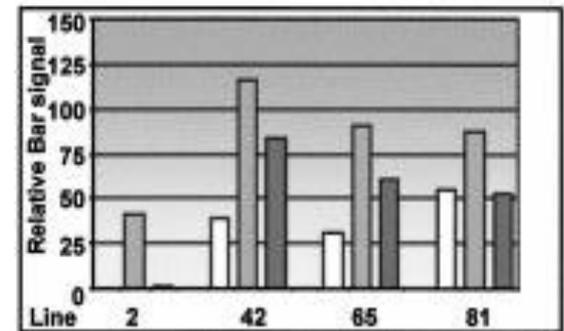
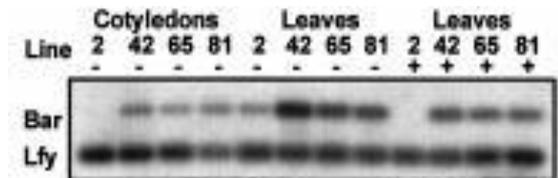
BAR mRNA : OK

GUS mRNA : lignée 2 !



PCR semi-quantitative et southern blot (ADN BAR)

=> mystère de la lignée 2 : excision prématurée



SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Avantages

- ⊙ Amélioration du système avec des promoteurs chimio-inductibles
- ⊙ Durée et puissance du traitement : différents niveaux d'expression
- ⊙ Changement génétique permanent
- ⊙ Tous les éléments sur le même vecteur
- ⊙ Certainement utilisable avec d'autres plantes

Inconvénients

- ⊙ Problèmes avec les insertions multiples (repérées par southern blot) :
 - ⊙ Mesure de la fréquence d'excision
 - ⊙ Excision des blocks : maintien du gène BAR
- ⊙ Interférence potentielle avec les gènes endogènes thermo-inductibles

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Conclusion

- ⊙ Le système Cre / lox est un outil précieux pour la biologie moléculaire. En établissant une expression tissu spécifique, il permet l'isolement de gènes et leurs fonctions. Le chercheur peut contrôler la zone où le gène sera exprimé (direction) et le niveau (la vitesse) à laquelle le gène sera exprimé.
- ⊙ Est contrôlable de façon spatiotemporelle puisque le défloxxage n'a lieu qu'en présence du gène floxxé et de la recombinaase Cre.

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Avantages

- ⊙ Système permanent → transmissible aux lignées germinales
- ⊙ Fonctionne chez les eucaryotes
- ⊙ Permet d'étudier un gène précis au moment voulu
- ⊙ KO inducible: Recombinase CRE induite par:
 - ⊙ Induction chimique
 - ⊙ Induction thermique
- ⊙ Absence d'étapes supplémentaires pour activer la recombinase
- ⊙ Possibilité d'enlever le marqueur de résistance après la sélection

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Inconvénients:

- ⊙ Différence de l'activité de la CRE-recombinase
 - ⊙ Différents niveaux d'expression selon la plante transformée
- ⊙ Variations de l'efficacité d'excision
 - ⊙ Position des loci transgéniques dans le chromosome
 - ⊙ Insertion de plusieurs T-DNA (en voie d'amélioration)
 - ⊙ Locus exprimant CRE et cible de lox
- ⊙ Bruits de fonds par le promoteur.
- ⊙ Expression de gènes inattendus (promoteurs pas assez spécifiques)

SYSTÈME DE RECOMBINAISON CRE-LOX

Introduction

Fonctionnement

Intérêts

Experimentations

Conclusion

Références

- « **Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants.** » *Nature Biotechnology* vol 19 February 2001. Jianru Zuo et al.
- « **Non-autonomy of Agamous function in flower development: use of a Cre/loxP method for mosaic analysis in *Arabidopsis*** » *Development* 125, 4303-4312 (1998), Leslie E. Sieburth et al.
- « **Generation of Single-Copy T-DNA Transformants in *Arabidopsis* by the CRE/loxP Recombination-Mediated Resolution System** » *Plant Physiology*, December 2007, Vol. 145, pp. 1171–1182. Sylvie De Buck et al.
- « **Evaluation of CRE-mediated excision approaches in *Arabidopsis thaliana*** » *Transgenic Res (2008) 17:239–250*, 31 May 2007. Gordana Marjanac et al.
- « **A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic Plants** » *Plant Molecular Biology* 45: 41–49, 2001. Tine Hoff et al.
- « **Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures** » *The Plant Journal* (2004) 37, 889-896 . Jérôme Joubès et al.