



Zinc Finger Nucléases (ZFN) Sigma Aldrich : une technologie qui donne enfin accès aux rats KO

Contact : Sigma Life Science - nadia.guettari@sial.com - www.sigma.com

Plus d'information sur la technologie ZFN : <http://www.compozrzn.com>

Plus d'information sur la plateforme SAGE : www.sageresearchmodels.com

En génie génétique, la technique permettant de désactiver un gène en remplaçant son allèle normal par un allèle mutant non fonctionnel se nomme Knock-Out (KO). Les animaux Knock-Out permettent de mieux comprendre l'expression et la fonction des gènes. Ils constituent aussi des modèles de pathologies humaines et peuvent conduire à la découverte de nouvelles cibles et molécules thérapeutiques.

En 2007, le prix Nobel de médecine a été attribué à Martin Evans, Mario Capecchi et Oliver Smithies, pour leurs travaux sur les cellules souches embryonnaires de souris et la recombinaison homologue. Ceux-ci ont abouti à l'invalidation de milliers de gènes chez la souris. L'obtention de ces **souris KO** utilise le principe de la **recombinaison homologue** (pour remplacer dans le génome une portion de gène sauvage par une portion préalablement modifiée) et les **cellules souches embryonnaires de souris** (cellules ES).

Elle se déroule en plusieurs étapes :

- Construction d'un plasmide porteur (i) d'un exon inactivé du gène d'intérêt, (ii) de séquences s'insérant par recombinaison homologue et de manière spécifique au locus précis du gène à supprimer, (iii) de gènes de résistance aux antibiotiques pour le criblage des cellules portant le KO.
- Isolement de cellules ES (entre les stades blastula-morula, de 8 à 64 cellules)
- Transfection de ces cellules avec le plasmide portant l'exon inactivé du gène d'intérêt
- Sélection des cellules souches recombinées
- Injection des cellules souches dans des embryons de souris : on obtient un organisme mosaïque dont certaines cellules portent le gène sauvage et d'autres le gène inactivé.

- Transfert des embryons dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante : obtention de la génération de souris chimères F0 dont une partie des cellules, y compris germinales, est porteuse de la mutation génétique.
- Croisement entre chimères F0 et souris de phénotype «sauvage» : obtention de souris F1 hétérozygotes (KO/Sauvage) lorsque les cellules souches modifiées touchent la lignée germinale des F0.
- Croisement entre eux de ces individus G1 : Génération F2 avec des homozygotes KO/KO dans 25% des cas.

Toutefois, cette méthode présente certaines limites. Elle nécessite des étapes de criblage et de croisements longues et fastidieuses en raison du faible taux de cellules souches recombinées et de souris portant le KO. La génération d'une souris KO peut prendre jusqu'à 12 à 18 mois. De plus, elle est limitée aux espèces pour lesquelles on peut facilement dériver des cellules ES. Or pour certaines pathologies, la souris ne constitue pas forcément le meilleur modèle d'étude. Ainsi, le rat peut être mieux adapté à l'immunologie, à l'étude des maladies cardiovasculaires, du diabète et des pathologies comportementales ainsi qu'aux tests pharmacologiques. Toutefois **chez le rat**, la dérivation de cellules ES n'a été décrite que très récemment et à ce jour **aucun rat KO n'a été obtenu par la technologie décrite ci-dessus.**

Récemment des chercheurs du Medical College of Wisconsin et de la plate-forme « Transgenèse Rat » de l'INSERM U643 ont utilisé des **Zinc Finger Nucléases (ZFN) pour créer les premiers rats avec un KO ciblé (Figure 1)**. Ils ont pu invalider un gène rapporteur et deux gènes natifs sans créer d'effet «off-target» mesurable (<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/325/5939/433>). Cette technologie a été classée en 5ème position du Top 10 des innovations 2009 du magazine

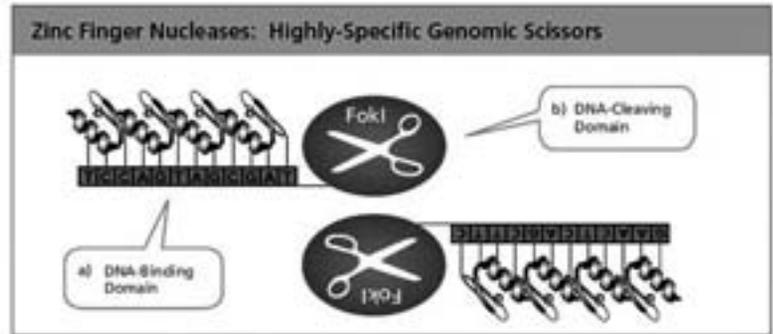


Figure 1 : Principe de la technologie CompoZr « Zinc finger nucleases »

- Reconnaissance d'une séquence d'ADN spécifique de vingt-quatre nucléotides par des protéines en doigts de zinc
- Clivage de l'ADN : les protéines sont couplées au domaine endonucléasique de FokI qui coupe l'ADN au niveau du site de reconnaissance.

- Modifications au niveau du site de coupure :
 - o Délétion, modification ou insertion génétiques lors de la réparation de l'ADN
 - o Insertion d'une séquence d'ADN par recombinaison homologue en présence d'un ADN donneur.

CompoZr, fruit d'un partenariat exclusif entre Sigma life Science et Sangamo BioSciences, permet un ciblage très précis des mutations. La fréquence de modification élevée facilite grandement le criblage et permet de s'abstenir de marqueurs de sélection.

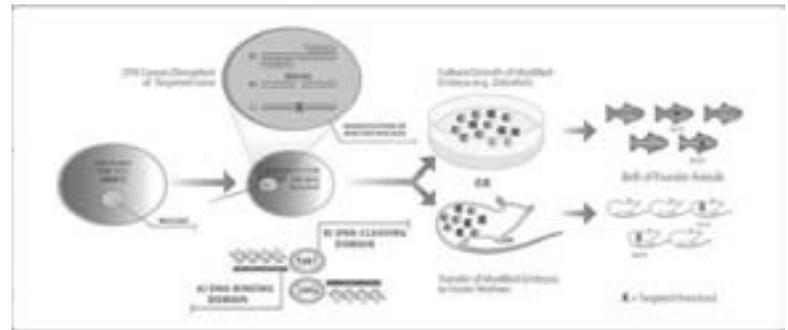


Figure 2 : Creation de KO ciblés avec la technologie CompoZr Les ZFNs (ARNm ou plasmides) sont transfectés dans les cellules ou micro-injectés dans les embryons.

Après clivage de l'ADN double brin, les processus imparfaits de réparation de l'ADN conduiront à la création de mutations qui conduiront à l'extinction de l'expression du gène ciblé.

«The Scientist» (www.the-scientist.com/top10innovations).

Cette publication ouvre de nouvelles perspectives dans l'utilisation des animaux transgéniques. Elle montre que la technologie ZFN :

- Permet d'élargir le panel des espèces que l'on pourra utiliser comme modèle KO
- Réduit considérablement le temps d'obtention des animaux KO : l'injection se fait directement dans l'embryon et le rendement élevé limite fortement les expériences de screening.

L'approche ZFN pour l'obtention de KO transgéniques a également été validée chez le poisson zèbre (Figure 2) et elle est actuellement testée chez de nombreuses espèces. Pour accompagner ce développement, Sigma Aldrich a décidé de créer la plateforme SAGE (Sigma Advanced Genetic Engineering Labs) pour générer des animaux transgéniques en utilisant la technologie ZFN.