

# CRISPR/CAS9 ET GÉNÈSE D'ANIMAUX TRANSGÉNIQUES

Laurent TESSON

Laurent.Tesson@univ-nantes.fr

*Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064,  
INSERM, Université de Nantes, NANTES, France.  
Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN),  
CHU Nantes, NANTES, France.*

## RESUME

Dans le monde de la transgénèse, depuis moins d'une décennie, une révolution technologique a eu lieu avec l'émergence de plusieurs technologies d'édition de génomes. Il est maintenant possible d'introduire diverses modifications génétiques, non plus uniquement chez la souris (où les cellules souches embryonnaires étaient disponibles depuis de nombreuses années) mais dans un large éventail d'espèces. Les modèles animaux sont des outils utiles à l'étude de maladies humaines permettant aussi de tester et valider des thérapies potentielles.

La technologie CRISPR-Cas9, apparue en 2012, a connu un développement très rapide en raison de sa facilité d'emploi, son efficacité et de son coût modéré. Elle a permis la démocratisation de l'édition de gènes dans un grand nombre d'espèces. Ces outils fonctionnent comme des ciseaux moléculaires extrêmement précis et engendrent une cassure double-brin de l'ADN au niveau de la séquence ciblée. Cette cassure entraîne l'activation de voies de réparation qui facilite l'introduction de modifications génomiques (Knockout, knock-in).

Sur la plateforme Transgénèse Rat ImmunoPhénomique (TRIP) à Nantes, nous générons des rats génétiquement modifiés grâce à ces nouveaux outils par microinjection ou par électroporation dans l'embryon unicellulaire. Nous en caractérisons la modification génétique. Une fois la lignée établie, le phénotype

pourra être analysé, entre autres, par les techniques d'histologie appropriées. Parmi nos projets, nous avons généré, chez le rat, des modèles pour la myopathie de Duchenne, la mucoviscidose ou l'immunodéficience.

Les nouveaux outils d'édition du génome permettent des modifications génétiques précises mais variées, offrant à la communauté scientifique des possibilités immenses de modèles d'études.

## ABSTRACT

In the world of transgenesis, for a decade, a technological revolution has taken place with the emergence of several genome editing technologies. It is now possible to introduce various genetic modifications, not only in mice (where the use of embryonic stem cells has been widespread since years) but in a wide range of species. Animal models are useful tools for the study of human diseases and to test and validate potential therapies. The CRISPR-Cas9 technology, introduced in 2012, has developed very fast due to its ease of use, its efficiency and its moderate cost. It has allowed the democratization of gene editing in a large number of species. These tools work as highly accurate molecular scissors and generate a double-strand break of the DNA at the targeted sequence. This breakage leads to the activation of repair pathways that facilitate the introduction of genomic modifications (Knockout, knock-in). On the Transgenesis Rat ImmunoPhenomics (TRIP) platform in Nantes, we generate genetically modified rats using these new tools by microinjection or electroporation in the unicellular embryo. We characterize the genetic modification. Once the lineage is established, the phenotype can be analyzed by the appropriate histology techniques. Among our projects, we have generated rat models for Duchenne muscular dystrophy, cystic fibrosis and immunodeficiency. These new genome editing tools allow precise but various genetic modifications, offering to the scientific community immense possibilities for the study of new models.

## INTRODUCTION

Depuis les années 1990, de nombreuses espèces bénéficient des techniques de transgénèse additive. Elles consistent en l'intégration au hasard de nouvelles séquences au sein du génome par microinjection ou autres. Seule la souris bénéficiait, grâce aux cellules souches embryonnaires (ESC), de la possibilité d'effectuer de la transgénèse ciblée c'est-à-dire modifier des séquences déjà présentes dans le génome [1]. La révolution technologique est arrivée avec l'apparition des nucléases à façon tels les Zinc Finger Nucleases (ZFN) [2] puis les Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)[3] et plus marginalement les méganucléases. Ces nucléases fonctionnent comme des ciseaux moléculaires extrêmement précis et engendrent une cassure double-brin de l'ADN au niveau de la séquence ciblée par un système de reconnaissance protéine-ADN. Cette cassure entraîne l'activation de voies de réparation qui facilite l'introduction de modifications génomiques (Knockout, knock-in). Ces outils ont été utilisés dans de nombreuses espèces animales comme végétales mais du fait de la difficulté de leur synthèse et de leurs coûts, la propagation des multiples possibilités de modifications génétiques n'était pas rapide. Puis, en 2012, est arrivée la révolution au sein de la révolution avec l'apparition du système CRISPR-Cas9 pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR-associated protein 9 (Cas9) [4]. Cette technologie issue du système immunitaire des bactéries fonctionne comme les ZFN ou les TALEN à la différence qu'il s'agit d'une reconnaissance ARN-ADN. L'énorme avantage de cette technologie sur les 2 précédentes est sa facilité de génération, son efficacité et son coût modéré. De plus, elle permet de générer des modifications multiples dans un même organisme [5, 6]. Elle a permis la démocratisation de l'édition de gènes dans un grand nombre d'espèces. Grâce à ces outils, la plus grande facilité à générer des modèles animaux va permettre l'étude des maladies humaines ainsi que la mise en place de thérapie génique.

### La génération de rats génétiquement modifiés.

Sur la plateforme TRIP à Nantes, les embryons de rat au stade unicellulaire sont micro-injectés dans le pronucleus ou le cytoplasme avec les composants nécessaires aux modifications voulues sous forme de plasmide, ARNm ou protéine. Récemment, nous avons mis au point l'électroporation des embryons de rat [7]. Ces embryons

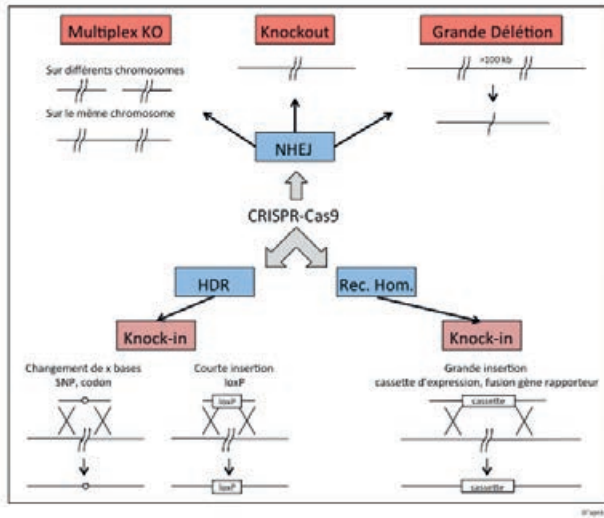
sont ensuite réimplantés dans des femelles receveuses qui suivent leur gestation jusqu'à la mise bas. Les petits nés sont génotypés par des techniques de biologie moléculaire (PCR, électrophorèse, séquençage) afin de définir si la modification souhaitée est obtenue [8]. Celle-ci peut être présente sur 1 ou 2 allèles dans un même organisme. Les rats portant cette modification génétique sont accouplés avec des rats sauvages (WT = Wild-Type) afin de dériver une colonie de rats portant la modification au stade hétérozygote (WT/muté). Ces rats hétérozygotes sont ensuite croisés entre eux afin d'obtenir des rats portant la mutation sur les 2 allèles dits homozygotes (muté/muté) pour l'étude du phénotype.

## La technologie CRISPR-Cas9

Cette technologie a été décrite par E. Charpentier et J. Doudna en 2012 [4]. Elle est constituée de 2 composants : un sgRNA et la Cas9. Le sgRNA est composé de deux parties appelées le crRNA et le tracrRNA. Le crRNA sert à la reconnaissance de la séquence ciblée. Le tracrRNA est nécessaire à la fixation de la Cas9. Cette technologie est basée sur la reconnaissance par un ARN guide (sgRNA) de 20 bases sur la séquence d'ADN ciblée, délimité par une séquence appelée PAM (Protospacer Adjacent Motif) de séquence consensus NGG pour la Cas9 de *S. pyogenes*. Ce sgRNA est complexé à la protéine Cas9 qui, lorsque la cible est reconnue, réalise une coupure double-brin de l'ADN. De nombreuses améliorations sont apportées de jour en jour pour obtenir une plus haute spécificité et rendre négligeable les potentielles coupures sur des sites hors-cible (off-target) dans le génome [9].

## Les modifications possibles

Comme les ZFN et les TALEN, le système CRISPR-Cas9 nous permet donc de réaliser un grand nombre de modifications génétiques [10] (**Figure 1**). Lorsque nous injectons, dans l'embryon au stade unicellulaire, le complexe sgRNA-Cas9, la cassure de l'ADN va entraîner l'activation de voies de réparation par la cellule. La voie de réparation mise en place rapidement est la liaison des extrémités non-homologues (NHEJ = Non-Homologous End Joining). Cette voie est propice aux réparations imparfaites sous la forme d'insertion ou de délétion de quelques bases (indels). Ces insertions ou ces délétions peuvent générer des décalages de cadre de lecture qui vont entraîner l'apparition d'un codon stop précoce. Cela



**Figure 1 :** Représentation schématique des modifications génétiques ciblées réalisables avec le système CRISPR-Cas9.

va aboutir à une dégradation rapide des ARNm produits lors de la transcription du gène, induisant une absence de traduction donc une absence de protéine. Cette extinction ciblée de l'expression des gènes génère un animal knockout (KO). Nous avons réalisé plusieurs rats KO dont un sur le gène de la dystrophine, protéine responsable de la Myopathie de Duchenne [11] et un autre sur un gène responsable de l'immunodéficiences [12]. En utilisant des sgRNA positionnés à distance (de quelques paires de bases à plusieurs kilobases), il est possible de réaliser des délétions plus grandes soit pour augmenter les probabilités d'obtenir un KO (chaque sgRNA ciblant un exon différent) soit pour obtenir la délétion d'un cluster de gènes. Par l'utilisation de sgRNA ciblant plusieurs gènes, de multiples KO peuvent être obtenus dans le même animal.

En fonction de la modification précise souhaitée, 2 voies distinctes peuvent être utilisées. Si le but est de changer une base dans le gène ou de modifier un codon ou de le déléter, le complexe sgRNA-Cas9 est co-injecté dans l'embryon unicellulaire avec un oligonucléotide, ADN simple-brin de 60 à 120 bases, portant la modification. En présence de cet ADN donneur simple-brin, la cellule va utiliser la voie de réparation par homologies directes (HDR pour Homology Direct Repair) et cette réparation permettra d'obtenir, par knock-in (KI), la modification souhaitée.

Nous avons réalisé plusieurs projets de ce type avec des taux de mutations élevés (10 à 20%) aussi bien en microinjection qu'en électroporation.

Si le projet est l'intégration d'une cassette d'expression, la voie de la recombinaison homologue (RH) est détournée par l'ajout d'un fragment d'ADN comportant des bras d'homologies. La transgénèse additive permettait déjà l'introduction de cassette d'expression afin de surexprimer un gène dans un organisme. Cette insertion était aléatoire au sein du génome et l'expression de la cassette était dépendante du site d'insertion. Pour remédier à cet effet de position pouvant affecter l'expression du transgène appelé silencing, l'utilisation des nucléases permet de cibler l'endroit du génome où l'on veut introduire la cassette d'expression pour obtenir une expression efficace du transgène, indépendante du site d'intégration. Il existe plusieurs sites d'insertion connus où l'expression d'un transgène sera effective. Les sites AAV-S1, HPRT, ROSA26 sont de bons sites « safe harbor » [13]. La cassette d'expression est construite avec des bras d'homologies (500 à 1000 pb) de chaque côté. Ces bras correspondent à la séquence d'ADN en 5' et en 3' du site de coupure par le système CRISPR-Cas9. Par ce système de RH, l'introduction d'un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente comme la GFP en phase ou en expression concomitante (peptide 2A) avec un gène exprimé par des cellules spécifiques peut s'avérer très utile. L'étude de ces cellules par des techniques d'histotechnologie en sera facilitée car seules les cellules exprimant la molécule ciblée seront détectables. Nous avons réalisé plusieurs projets où des cassettes d'expression ou de marquage d'un gène ont été utilisées.

## CONCLUSION

Les nouveaux outils d'édition du génome permettent des modifications génétiques précises et variées offrant à la communauté scientifique des possibilités immenses de modèles d'études. Le système CRISPR-Cas9 est vraiment facile d'utilisation, très efficace et d'un coût modique. Il a permis l'obtention de modifications génétiques dans un grand nombre d'espèces. Il a notamment permis une renaissance des modèles chez le rat et induit un boom des modèles souris car beaucoup plus rapide que l'utilisation des cellules ES pour les modifications ciblées simples [14]. Cet outil nous a fait entrer dans la transgénèse 2.0 et son utilisation aboutira à l'obtention de nombreux modèles animaux de maladies humaines.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. THOMAS KR : Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*, 1990, **346**(6287),847-50.
2. URNOV FD : Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, **435**(7042),646-51.
3. BOCH J : Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, **326**(5959), 1509-12.
4. JINEK M : A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096),816-21.
5. WANG H : One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013,**153**(4),910-8
6. YANG H : One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013,**154**(6),1370-9
7. REMY S : Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci Rep*, 2017, **7**,16554
8. CHENOUARD V : A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *J Genet Genomics*, 2016, **43**(5),341-8.
9. HAEUSSLER M : Genome Editing with CRISPR-Cas9: Can It Get Any Better?. *J Genet Genomics*, 2016, **43**(5),239-50.
10. MASHIMO T : Gene targeting technologies in rats: zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Dev Growth Differ*, 2014, **56**(1),46-52.
11. LARCHER T : Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*, 2014, **9**(10).
12. MENORET S : Generation of Rag1-knockout immunodeficient rats and mice using engineered meganucleases. *FASEB J.*, 2013, **27**(2),703-11.
13. REMY S : Efficient gene targeting by homology-directed repair in rat zygotes using TALE nucleases. *Genome Res*, 2014, **24**(8),1371-83.
14. LIU ET : Of mice and CRISPR: The post-CRISPR future of the mouse as a model system for the human condition. *EMBO Rep*, 2017, **18**(2),187-193.