

Application de la FIV à la production de souris génétiquement modifiées par la technologie CRISPR/Cas9

Jimmy Mancip, Laurence Chancrin, Emmanuelle Lohéac, Benjamin Rabany, Mendy Verrier, Marie Christine Birling, Guillaume Pavlovic, Jean Cozzi

1 INTRODUCTION

En seulement quelques années, la technologie CRISPR (Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) a bouleversé la biologie, et plus particulièrement la génétique. Technique phare d'édition ciblée du génome, elle a été déclarée découverte scientifique de l'année 2015 par la revue Science (1). Le système le plus communément utilisé est CRISPR/Cas9, dans lequel l'endonuclease Cas9 réalise les coupures ciblées de la molécule d'ADN. Plusieurs équipes de recherche dans le monde ont depuis publié de nombreuses applications de CRISPR/Cas9 dans de nombreuses espèces (2). La transgénèse *in vivo* chez la souris est un des domaines majeurs d'utilisation de CRISPR/Cas9 pour l'identification de cibles thérapeutiques et la modélisation de maladies humaines. Le processus requiert l'injection ou l'électroporation (3) des différents éléments du système CRISPR/Cas9 dans des embryons préimplantatoires à un stade très précoce du développement (1-cellule = zygote). Les zygotes nécessaires à ce processus sont généralement obtenus par fécondation *in vivo* à partir de femelles accouplées, préalablement superovulées. Cette approche requiert le maintien d'une colonie de mâles reproducteurs dans le fonds génétique désiré, impliquant des coûts non négligeables. De plus, le rendement (nombre de zygotes collectés vs nombre de femelles superovulées et accouplées) est difficile à maîtriser pour les fonds génétiques consanguins dont la C57BL/6, une des souches les plus utilisées pour la création de modèles. En effet, il est fréquent que le nombre d'embryons produits soit trop faible ou trop élevé pour une session de transgénèse. Afin de pallier à ces inconvénients et de réduire le nombre d'animaux requis, nous avons évalué la faisabilité de la fécondation *in vitro* (FIV) comme moyen de production des embryons pour la transgénèse ciblée *in vivo* via CRISPR/Cas9. Nous reportons ici les résultats obtenus et discutons les avantages opérationnels et éthiques liés à l'utilisation de la FIV dans le cadre des nouvelles technologies d'édition du génome utilisant les nucléases.



Figure 1. Microinjection de CRISPR/Cas9 dans un embryon préimplantatoire 1-cellule (zygote) de souris.

3 RESULTATS-DISCUSSION

Nous rapportons ici les résultats obtenus après micro-injection de CRISPR/Cas9 dans les embryons de souris C57BL/6 produits par FIV.

4 gènes distincts ont été ciblés. L'objectif était d'établir 3 lignées Knock-out (KO) par excision d'un exon à l'aide de couples de sgRNAs flanquant la séquence cible (injection de la Cas9+4 sgRNAs) ainsi que de générer un modèle Knock-in (KI) par insertion d'une mutation ponctuelle après co-injection d'un ssODN (injection de la Cas9+1sgRNA+ssODN). Les données expérimentales sont présentées dans la Table 1.

Nos résultats suggèrent que les zygotes produits par FIV constituent un matériel biologique relevant pour la microinjection de CRISPR/Cas9 dans le fonds génétique C57BL/6. Sur 100 zygotes microinjectés et tous modèles confondus (KO et KI), nous avons obtenu en moyenne 1 à 2 sourceaux vivants porteurs de la mutation d'intérêt. Ce résultat est comparable à celui obtenu après micro-injection de CRISPR/Cas9 dans des zygotes collectés à partir de femelles superovulées et accouplées (données non présentées). Ces données confirment l'intérêt de cette approche pour la production de lignées transgéniques murines par CRISPR/Cas9 (5, 6).

La production des zygotes par FIV revêt plusieurs avantages significatifs dans le cadre de l'édition du génome *in vivo* par CRISPR/Cas9 chez la souris.

1. Respect des 3Rs

Le nombre d'animaux nécessaires à la production des embryons pour une session "standard" de transgénèse par microinjection (environ 100-150 zygotes) est réduit de moitié. La supériorité de la FIV résulte du taux de fécondation supérieur *in vitro* (80% vs 30% en moyenne). Ainsi, le nombre de zygotes disponibles pour la microinjection est significativement augmenté à partir du même pool d'ovocytes.

Un minimum de 20 femelles est requis pour une approche conventionnelle versus 9 animaux (8 femelles et un mâle) quand la FIV est utilisée, sans compter que la colonie de mâles reproducteurs doit être renouvelée tous les 6 mois. Ce ratio favorable à la FIV pourrait encore être améliorée par l'utilisation de sperme cryopréservé afin de diminuer le nombre de mâles requis et/ou la méthode d'hyper-ovulation utilisant la lase (Inhibin Antiserum) (7) afin d'augmenter le nombre d'ovocytes produits par femelle. Le cryostock obtenu à partir d'un seul mâle est en effet suffisant pour réaliser 6 sessions de FIV et l'hyper-ovulation permet l'obtention d'environ 100 ovocytes vs 20-30 par PMSG chez les femelles immatures.

4 CONCLUSION

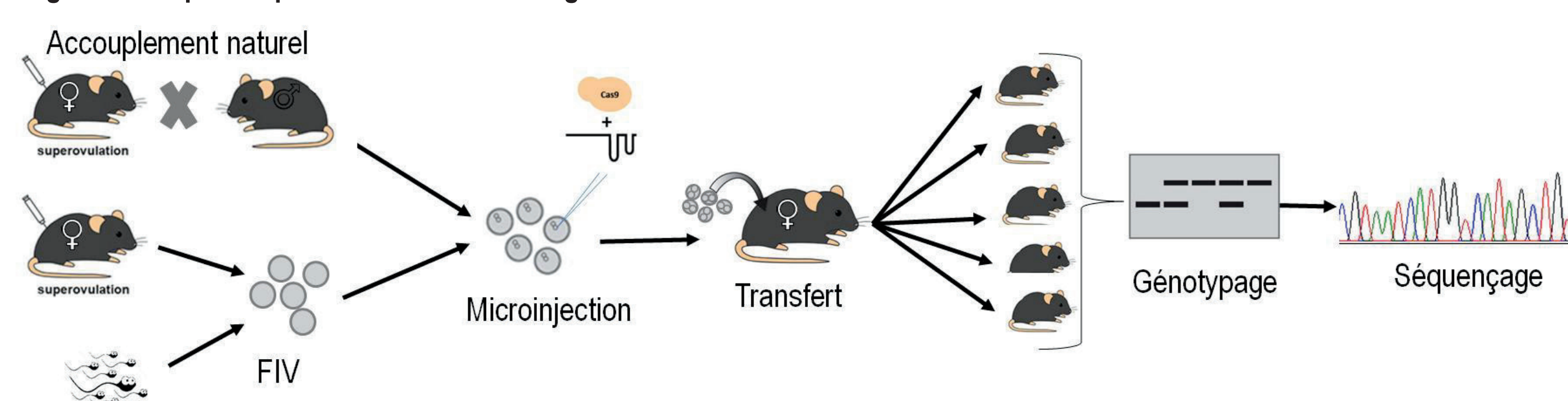
Nos résultats suggèrent que les embryons générés par FIV chez la souris C57BL/6 constituent un matériel biologique adapté à la transgénèse *in vivo* médiée par le système CRISPR/Cas9.

La FIV permet la réduction du nombre des animaux utilisés pour la production des embryons, la réduction significative des coûts, et accroît la flexibilité et la robustesse du processus. D'autre part, la combinaison des 2 technologies FIV et CRISPR/Cas9 ouvre les portes à l'édition du génome dans des fonds génétiques et modèles transgéniques pré-existants pour lesquels l'accès à un nombre suffisant d'embryons préimplantatoires est difficile.

Par conséquent, la FIV associée à la technologie CRISPR constitue un outil puissant pour la génération *in vivo* de modèles transgéniques murins.

2 MATERIELS ET METHODES

Figure 2. Etapes du processus d'édition du génome chez la souris à l'aide de CRISPR/Cas9



- Tous les animaux sont issus de nos productions (AAALAC accredited). Cette étude a été réalisée en respect strict des recommandations éthiques pour le bien être animal
- Superovulation : femelles immatures C57BL/6NCrI de 4 semaines, 2 injections en IP à 48h00 d'intervalle (5UI PMSG puis 5UI hCG)
- CRISPR/Cas9 : le design des guides et leur synthèse ont été réalisés par notre partenaire Phenomin-iCS
- Les zygotes sont collectés 14 à 17h post hCG
- La FIV est réalisée selon le protocole décrit par Nakagata et al. (4)
- La micro-injection est réalisée à l'aide d'un microscope équipé d'un micro-injecteur (Eppendorf Femtojet 4i). La solution d'ARN a été injectée dans le cytoplasme et le pronucleus de chaque zygote en utilisant une pression pneumatique continue. Après l'injection, les embryons ont été cultivés *in vitro* dans le milieu KSOM (Millipore M-7292, 37C, 5% CO2). Le lendemain, tous les embryons ayant atteint le stade 2-cellules sont transférés dans l'oviducte de femelles CD1 pseudo-gestantes

Table 1. Efficacité de la procédure CRISPR/Cas9 après microinjection dans les zygotes générés par FIV

Gène cible	Modèle	# femelles donneuses d'embryons	# cellules collectées Total (# par femelle donneuse)	# zygotes injectables Total (%)	# zygotes microinjectés	# embryons 2C reimplantés (%)	# sourceaux vivants (%)	# mutants (%)
A	KO	15	310 (20,7)	280 (90,3)	167	95 (56,9)	31 (32,6)	4 (12,9)
B	KO	15	213 (14,2)	152 (71,3)	152	89 (58,6)	44 (49,4)	3 (6,8)
C	KO	15	299 (19,9)	274 (91,6)	237	203 (85,7)	73 (36,0)	1 (1,4)
D	KI mutation ponctuelle	30	652 (21,7)	494 (75,8)	396	195 (49,2)	67 (34,4)	9 (13,4)
Total		75	1474 (19,7)	1200 (81,4)	952	582 (61,1)	215 (36,9)	17 (7,9)

2. Réduction des coûts, flexibilité et robustesse opérationnelle

Avec la FIV, l'entretien d'une colonie de mâles reproducteurs n'est plus nécessaire. Si l'on considère une colonie de 20 mâles reproducteurs isolés, l'économie est d'environ 7000 cages/année. Par ailleurs, le nombre de femelles est aussi considérablement réduit. Dans notre environnement, nous avons calculé que la FIV permettait de réduire le coût d'une session de microinjection d'environ 25%.

D'autre part, la FIV apporte une robustesse et une flexibilité accrue au niveau opérationnel. Une colonie de 20 mâles reproducteurs n'autorise que 2 à 3 sessions maximum de micro-injection par semaine alors que la FIV peut assurer une production d'embryons 5 jours/5. En effet, la qualité du sperme, et par conséquent les taux de fécondation, diminuent de façon significative lorsque les mâles sont sollicités trop fréquemment. L'utilisation d'un cryostock préalablement validé évite les fluctuations de qualité du sperme d'un animal à l'autre, les taux de fécondation sont alors stables ce qui permet de sécuriser l'expérimentation et d'ajuster précisément le nombre de zygotes aux besoins.

3. Transgénèse ciblée dans des fonds génétiques d'intérêt

La combinaison des 2 technologies, FIV et CRISPR/Cas9, offre la possibilité d'introduire des mutations *de novo* dans des fonds génétiques spécifiques, mais également d'ajouter de nouvelles mutations dans des lignées transgéniques pré-existantes pour lesquels il est extrêmement difficile d'obtenir par accouplement des embryons préimplantatoires en nombre suffisant. Cette stratégie a été validée avec succès pour des modifications génétiques ciblées dans des modèles murins humanisés sur fonds génétique NOD avec le système CRISPR/cas9 ou les TALE nucléases (5, 8).

1. Staff, S. And Science's Breakthrough of the Year is Science (2015). doi:10.1126/science.aad7554
2. Wright, A. V., Nuñez, J. K. & Doudna, J. A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. Cell 164, (2016).
3. Qin, W. et al. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease. Genetics 200, 423-430 (2015).
4. Guan, M. et al. In vitro fertilization in mice using the MBCD-GSH protocol. Curr. Protoc. mouse Biol. 4, 67-83 (2014).
5. Nakagawa, Y. et al. Application of oocyte cryopreservation technology in TALEN-mediated mouse genome editing. Exp. Anim. 63, 349-355 (2014).
6. Nakagawa, Y. et al. Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. BMC Biotechnol. 15, (2015).
7. Takeo, T. & Nakagata, N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. PLoS one 10, (2015).
8. Li, F. et al. **Efficient genetic manipulation of the NOD-Rag1-/-IL2RgammaC-null mouse by combining in vitro fertilization and CRISPR/Cas9 technology. Sci. reports 4, 5290-5290 (2014).