



Etude du carcinome hépatique par ciblage hépato-spécifique de l'outil CRISPR/Cas9 chez la souris

Robin LOESCH – U1016

Equipe Oncogenèse des épithéliums digestifs

Superviseur : Sabine Colnot

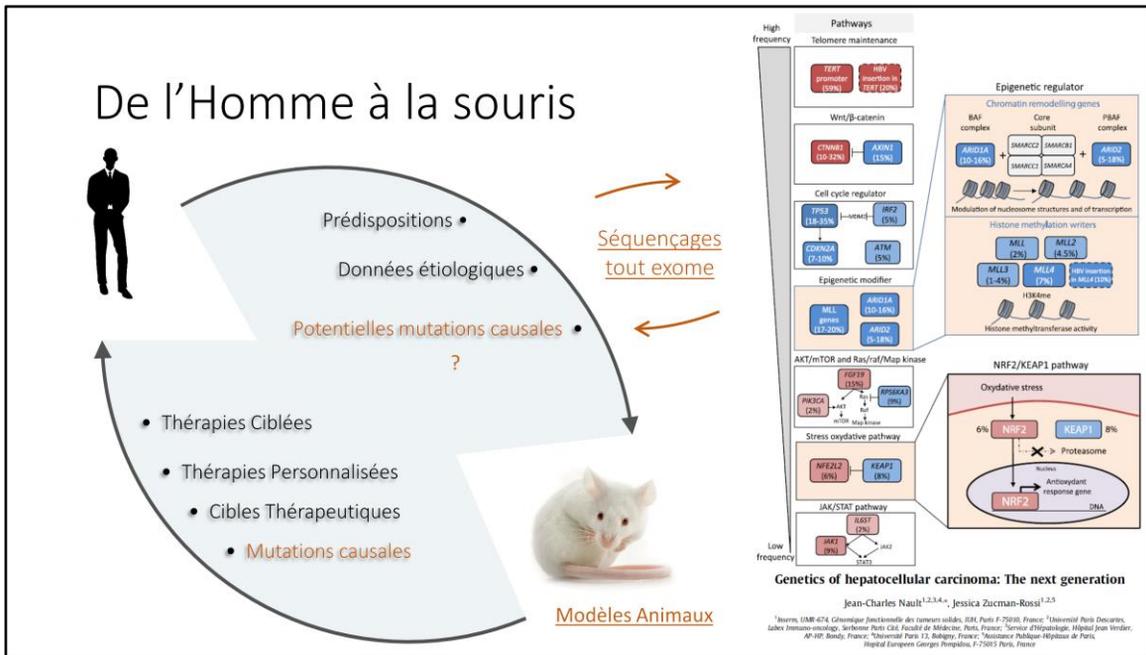
Concours



AFEF
SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'HÉPATOLOGIE

2016

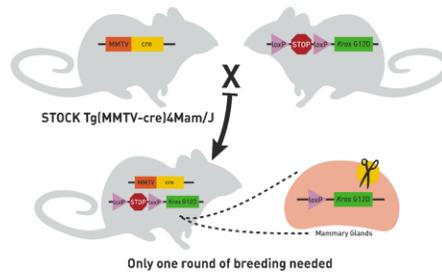
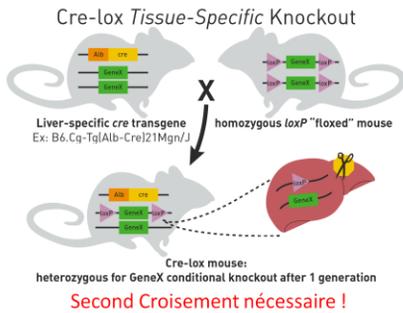




La compréhension des évènements génétiques responsables du processus de carcinogénèse est très important dans la mise en place de traitements personnalisés. Ces dernières années ont vu émerger des techniques basées sur le séquençage haut débit comme le séquençage tout exome. Ceci permet de mettre en évidence des mutations spécifiques de tumeurs humaines. Les cellules cancéreuses sont connues pour accumuler des mutations dont toutes ne sont pas causales. C'est pourquoi le passage par un modèle murin s'impose afin de confirmer et d'étudier les conséquences de ces mutations de manière fonctionnelle dans le but de développer des thérapies spécifiques. Dans le cadre du carcinome hépatocellulaire, de nombreuses mutations touchant différentes voies de signalisations et mécanismes cellulaires (Figure de droite). Les plus récemment identifiées via le séquençage tout exome restent à explorer en modèles murins.

Les outils actuels

- Inactivation d'un gène suppresseur de tumeur via LoxP/Cre
- Activation d'un oncogène via LoxP/Cre



- Robuste
- Tissu-spécifique / Inductible

- Couteux en temps et en argent
- Multiplexage compliqué

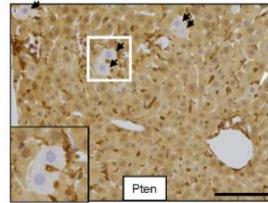
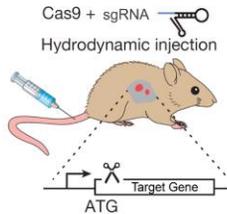
The Jackson Laboratory

L'étude des mécanismes biologiques et des gènes passe en général par l'utilisation d'outils génétiques permettant de moduler spécifiquement l'expression de ces derniers. Le système Cre recombinase / LoxP est largement utilisé depuis une trentaine d'années après que son efficacité ait été prouvée in vivo et in vitro chez la levure et les mammifères. La recombinaison Cre exprimée par le phage P1 catalyse la recombinaison fidèle et site spécifique de l'ADN au niveau de séquences de 34pb appelé LoxP. En fonction de l'orientation des séquences LoxP la Cre recombinase permet de réaliser des délétions ou des inversions. Ce système est maintenant largement utilisé chez la souris pour réaliser des modèles animaux notamment d'activation et d'inactivation de gènes pouvant être tissu spécifique et/ou inductible. La tissu-spécificité est assurée par l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Pour obtenir un contrôle temporel de la recombinaison Cre, l'enzyme est fréquemment fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN muté du récepteur humain aux œstrogènes (ERT2). Suite à l'administration du tamoxifène (un antagoniste aux récepteurs aux estrogènes), la protéine de fusion Cre ERT2 est capable de pénétrer dans le noyau. ERT2 se lie au tamoxifène mais pas aux oestrogènes endogènes ce qui permet à la protéine fusion Cre ERT2 de rester cytoplasmique chez les animaux non traités. Cet outil est robuste mais long à mettre en place dans le cas où aucune souris n'est disponible pour le gène et/ou le tissu

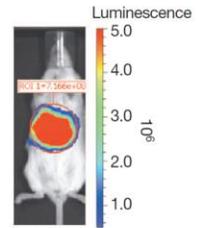
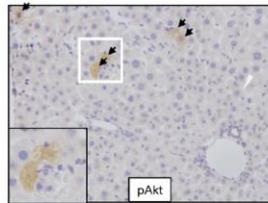
étudié. On peut ajouter qu'il devient très vite compliqué d'induire plusieurs modifications génétiques de manière séquentielle en utilisant uniquement ce système.

Les outils actuels

- Injection hydrodynamique



Immunohistochimie sur coupe en série chez une souris traitée avec un sgPten. Flèches noires : marquage Pten négatif et pAkt positif. Flèches blanches : marquage Pten intermédiaire.



Souris injecté avec un plasmide codant pour la luciférase.

- Hépato-spécifique
- Gene Editing faisable.
- Peut être couplé à d'autres techniques

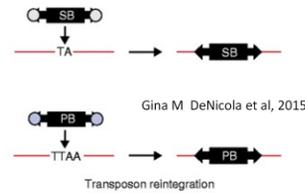
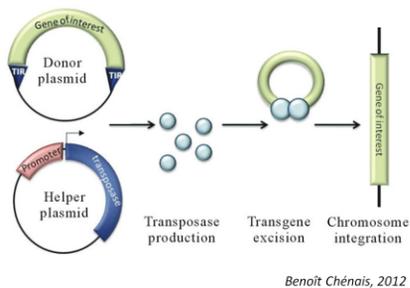
- Stress hépatique
- ~ 20% des hépatocytes transfectés
- < 20% de coupure en utilisant CRISPR

Adapté à partir de Wen Xue et al 2014

Une technique plus tissu restrictive mais très intéressante pour l'étude du foie est l'injection hydrodynamique. Celle-ci, réalisable chez la souris et dans d'autres modèles animaux et même le chien, permet de transférer de l'ADN nu de manière hépato-spécifique par un mécanisme d'hydroporation (Figure de droite). L'injection hydrodynamique peut permettre la transfection de plasmides, de vecteurs d'expressions et peut être couplée à d'autres technologies comme le système CRISPR qui sera décrit plus loin ou des transposons. Couplé à CRISPR ce système permet de réaliser des KO de manière focale, ce que l'on peut voir ici sur les images d'immunomarquage. L'injection hydrodynamique permet de transférer environ 20% des hépatocytes en étant spécifique mais provoque un stress hépatique. En effet l'injection provoque des irrégularités cardiaques passagères, une augmentation aiguë de la pression veineuse, un élargissement des fenestrations endothéliales et une perméabilité accrue des membranes.

Les outils actuels

- Transposons (Sleeping Beauty, Piggybac ...)



- Utilisé pour réaliser des cribles
- Large taille d'insert (11kb pour BiggyBac)
- Faible effet de position
- Intégration peu site-spécifique
- Pas de site d'insertion préférentiel
- Intégration non contrôlée (Ou difficilement)

Les transposons sont peu utilisés mais reviennent sur le devant de la scène notamment dans le cadre de la thérapie génique. Le transposon Piggybac par exemple permet l'intégration dans le génome de séquences d'intérêt pouvant aller jusqu'à 11kb pour PiggyBac. Cette intégration requière une transposase et une séquence particulière (TTAA pour Piggybac, TA pour Sleeping Beauty) donc l'utilisation de deux vecteurs. L'intégration n'est donc pas contrôlée. C'est pourquoi les transposons comme Sleeping Beauty ont été utilisés pour réaliser des cribles à la recherche de gènes suppresseurs de tumeurs (Figure en haut à droite). La manipulation du vecteur Piggybac a montrée la possibilité de coupler la transposase à des protéines à doigt de zinc artificielles permettant l'intégration de manière site-spécifique mais ceci reste peu utilisé depuis la mise en évidence du système.

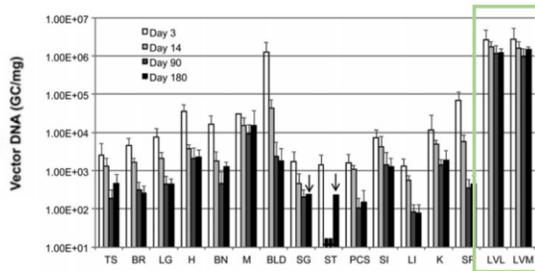
partir de *Streptococcus Pyrogenes* et d'un ARN chimère appelé single-guide RNA (sgRNA) composé de la fusion du crRNA et du tracrRNA. Ce système s'est prouvé très efficace dans bien des domaines que ce soit in vivo, in vitro ou sur des cellules souches afin de réaliser des mutagénèses séquence-spécifique ou de l'ingénierie génomique permettant de réaliser des modifications génétiques très précises. La modification précise de séquences, appelé en anglais Gene Editing, est possible grâce aux mécanismes mise en place par les cellules pour réparer des coupures double-brins. La réparation par non-homologous end joining (NHEJ) va engendrer en général des insertions et des délétions ce qui est recherché pour inactiver un gène en réalisant un décalage du cadre de lecture. Ceci permet notamment de réaliser des inactivation de gènes in vitro, in vivo ou dans des cellules souches embryonnaires (ESC) facilitant la production de modèles animaux. Pour réaliser du gene editing on prend avantage de la réparation par recombinaison homologue. En fournissant une matrice ADN contenant les modifications souhaitées il est possible de réaliser des modifications au nucléotide près. Ceci est maintenant largement utilisé en laboratoire in vitro, in vivo et dans des cellules souches pour les raisons décrites précédemment. Récemment, F. Ann Ran et al [2] ont caractérisé 6 orthologues de la Cas9 de plus petite taille. Ils ont pu montrer que la Cas9 de *Staphylococcus Aureus* était capable de réaliser des coupures avec une efficacité équivalente à la SpCas9 et que sa petite taille (3,15kb) permettait son expression par des AAV (Adeno – Associated Virus).

[1] Jinek M. et al. . A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337, 816–821 (2012)

[2] Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 2015 Apr 9;520(7546):186-91.

Ciblage et Expression hépato-spécifique

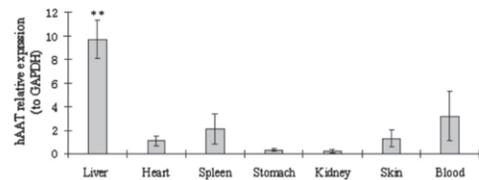
- Adeno-Associated Virus (Serotype 8)



Suivi de la biodistribution de l'ADN d'un AAV8.TBG.hLDLR après injection à haute dose chez la souris. ⁽¹⁾

(1) Shu-Jen Chen et al 2013

- Promoteur Hépato spécifique
 - Human thyroxine binding globulin (TBG) Promoter
 - Régulé par les facteurs HNF (1 α , 3 α / β)

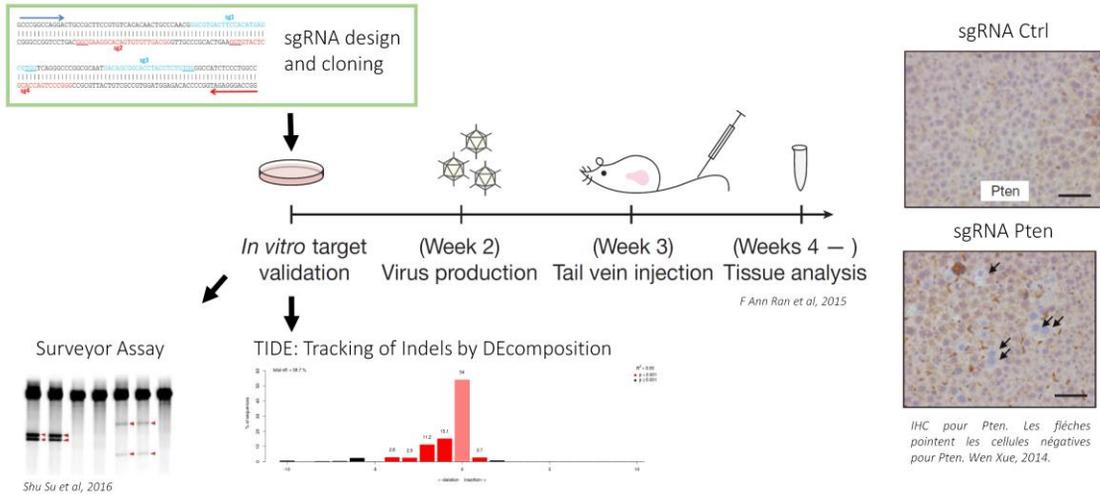


Expression d'un transgène sous contrôle du promoteur TBG après injection chez la souris d'un vecteur lentiviral. ⁽²⁾

(2) Zhonghai Yan, Hao Yan & Hailong Ou 2012

L'expression hépato-spécifique d'un transgène peut être réalisé en jouant sur le mode d'inoculation, comme pour l'injection hydrodynamique, et en utilisant un promoteur hépato-spécifique. Les virus ont largement été étudiés en tant que vecteurs dans le cadre de la thérapie génie. Les adeno-associated virus ou AAV se présente comme une alternative au adénovirus et lentivirus car ils se sont révélés peu intégratifs et peuvent induire l'expression d'un transgène pendant plusieurs années en restant sous forme épisomale. De plus, la caractérisation de plusieurs sérotypes a pointé du doigt des différences de bio-distribution. L'exemple qui nous intéresse ici est celui du sérotype 8 qui montre une affinité particulière pour les hépatocytes (Figure de gauche ; LVL : Left Liver Lobe ; LVM : Median Liver Lobe). Le promoteur TBG est un promoteur régulant l'expression de la Thyroxine Binding Globulin spécifiquement exprimé dans le foie (Figure de droite). Sa spécificité est due au fait qu'il est régulé entre autres par les facteurs nucléaires hépatiques HNF 1 α et 3 α / β . Ces deux outils vont permettre l'expression hépato-spécifique de l'outil CRISPR.

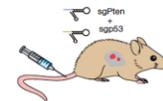
Déroulement de l'expérience



La mise en place du système et donc le déroulement de l'expérience peut être rapide comparé au système Cre/LoxP. Le laboratoire de Mr Feng Zhang décrit une expérience type comme réalisable sur 4 semaines. Ce délai n'est cependant possible qu'en travaillant dans des conditions optimales et dans le cas où les virions sont produits sur place. La partie la plus rapide est le design et le clonage des sgRNAs pouvant être réalisés sur quelques jours. Il faut ensuite tester les sgRNAs in vitro, après transfection du plasmide AAV dans des cellules murines. Pour ceci plusieurs techniques existent, la plus utilisée est sans doute la digestion à la nucléase S (Surveyor assay) révélant les délétions intragéniques « indels » générées à la suite de la coupure par la Cas9. Une technique plus récente et rapide est basée sur le séquençage (TIDE). D'autres techniques plus sophistiquées sont actuellement testées afin de réduire le temps nécessaire pour tester des sgRNAs. Une fois les sgRNAs sélectionnés la production d'AAV peut commencer et les souris peuvent être injectées dans la foulée.

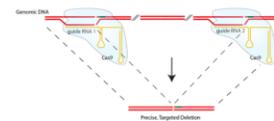
Les avantages de cette technologie

- Plus rapide que de produire une souris LoxP/Cre.
 - Pas de transgénèses
 - Pas de croisements



- Permet de générer des KO multiples et décalés dans le temps

- Permet de réaliser des délétions et des mutations.



- Possibilité de coupler à des modèles murins préexistants (LoxP/Cre).

Cette méthode se révèle avantageuse à plusieurs niveaux. L'absence de transgénèses et/ou de croisements est un gain de temps et d'argent considérable. De plus, cette technologie se révèle propice au multiplexing qui reste difficile voire impossible avec la méthode Cre/LoxP. Ceci permet aussi de réaliser des délétions pouvant être assez conséquentes. Comme nous allons voir il est aussi possible de coupler CRISPR avec des modèles murins préexistants.

Les inconvénients

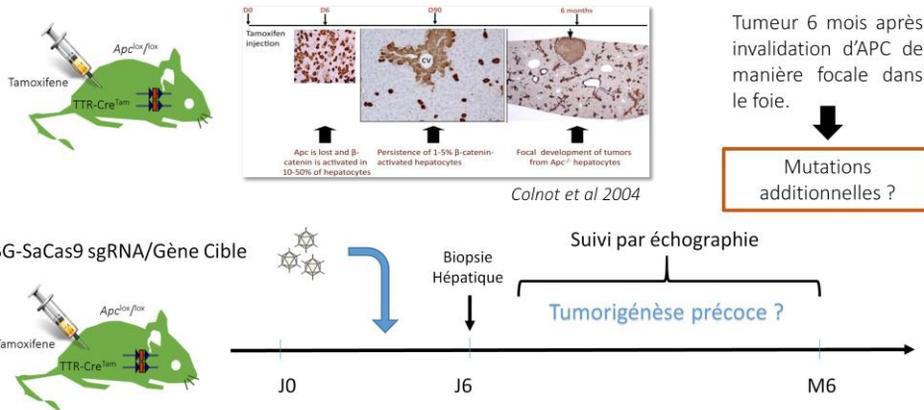
- Manipulation de virus potentiellement à risque pour l'homme
- Mettre en place la production des virus
- Coupures non spécifiques de Cas9 wild type
- Taux d'efficacité de l'infection/coupure au niveau du foie total à évaluer



Outre le maniement de virus au laboratoire, les principaux inconvénients sont les problèmes de spécificité relatifs à la Cas9 et l'efficacité. Il reste en effet à définir l'efficacité pouvant être obtenue avec cette technique. Les problèmes de spécificité peuvent être résolus par le multiplexing. Il a en effet été décrit que l'utilisation d'une Cas9 dite « nickase » réalisant des coupures simple brin et de deux sgRNA permettait un résultat équivalent en s'affranchissant des problèmes de spécificité. Il ne reste plus qu'à attendre le développement d'une *Staphylococcus aureus* Cas9 nickase.

Retracer les étapes de la carcinogénèse

- Exemple du modèle de carcinome hépatocellulaire muté β -Caténine :



L'utilisation d'un vecteur AAV8 exprimant la SaCas9 et un ARN guide peut se révéler efficace pour retracer les étapes de la carcinogénèse hépatique. Mon stage de M2 consiste en l'utilisation de ce système dans le cadre du modèle de carcinome hépatocellulaire (CHC) muté bêta-Caténine. Le laboratoire a précédemment montré que des mutations activatrices de la bêta caténine menait au développement de CHC. Leur modèle de souris $APC^{lox/lox}$ inductible au tamoxifène révèle l'apparition de tumeur 6 mois après activation de la voie Wnt/Bêta-Caténine laissant apparaître une période de latence. Des études génomiques suggèrent l'apparition de mutations additionnelles, nécessaires à l'apparition de CHC. Je mets actuellement en place la méthode AAV-CRISPR/Cas9 afin de tester l'implication de gènes dont des mutations sont corrélées aux CHC mutés Bêta-Caténine. L'AAV sera injecté dans des souris $APC^{lox/lox}$ induites au tamoxifène, et il sera recherché si et comment la mutation additionnelle apportée par l'AAV coopère avec la cancerogénèse dépendant de la beta-caténine.



Remerciements :

- L'équipe de Christine Perret

- Groupe de Sabine Colnot

- Angélique Gougelet
- Cécile Godard
- Rozenn Riou
- Anais Defontaine



Concours  **AFEF** 2016
SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'HÉPATOLOGIE


institut **cochin**
CENTRE DE RECHERCHE