

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Par

**Vanessa CHENOUEARD**

**Caractérisation du système CRISPR/Cas9 et amélioration de l'édition de génome pour la génération d'iPS humaines et de rats génétiquement modifiés**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 02 Décembre 2021

Unité de recherche : CRTI-INSERM UMR1064

**Président et rapporteur :**

François MOREAU-GAUDRY

Professeur et Praticien Hospitalier, BMGIC-U1065 (Bordeaux)

**Rapporteur :**

Lydia TEBOUL

Head of Division (band 1 MRC), Medical Research Council (Harwell)

**Membre du Jury :**

Francina LANGA VIVES

Ingénieur de Recherche Expert IP, Institut Pasteur (Paris)

**Directeurs de thèse :**

Ignacio ANEGON

DRCE INSERM, CRTI-U1064 (Nantes)

Yacine CHERIFI

V.P. Technology and Scientific Operations, genOway (Lyon)



# REMERCIEMENTS

Ce manuscrit ainsi que les résultats de mon projet sont issus d'un effort collaboratif impliquant un grand nombre de personnes que j'aimerais remercier avant d'entrer dans le vif du sujet.

Je souhaiterais commencer par remercier Lydia Teboul et François Moreau-Gaudry pour leur temps, leurs commentaires positifs ainsi que leur regard critique sur mon manuscrit et mon projet de thèse. Je remercie également Francina Langa-Vives d'avoir accepté de juger mon travail.

Merci à Jean-Paul Concordet et Tuan Huy Nguyen pour leurs conseils bienveillants et leur expertise lors de mes comités de suivi de thèse ainsi que leur disponibilité pour des échanges tout au long de ma thèse.

Je tiens particulièrement à remercier la société genOway pour avoir accepté de miser sur mon projet, en particulier Yacine Cherifi, co-directeur de ma thèse, Fanny Decarpentrie, Sarah Duponchel et Céline Sallon pour nos discussions scientifiques très enrichissantes.

Merci à tous nos partenaires extérieurs qui m'ont permis l'accès à de nouvelles technologies que j'ai découvertes au fil de mon projet. Merci à Michel de Waard de m'avoir donné accès au Monolith (NanoTemper) pour pouvoir réaliser mes expériences de Thermophorèse MicroScale. Merci également à la plateforme P2R de Nantes d'avoir investi juste à temps dans un Prometheus (NanoTemper) qui m'a permis d'enfin obtenir les résultats que j'espérais et même encore plus. Plus particulièrement, je remercie Karine Bernardeau et Agnès Fortun pour leur expertise et nos discussions très intéressantes.

Je remercie Régis Josien, directeur du Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI), pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans des conditions très favorables. J'en profite également pour remercier l'ensemble des membres du CRTI pour les discussions de couloir ou en salle de pause et pour leur soutien au quotidien. Que ce soit le service support ou tous les scientifiques qui nous facilitent le travail au quotidien, un grand merci à vous. En particulier, je remercie tous ceux qui se sont démenés pendant cette longue crise sanitaire pour que l'on puisse travailler dans de bonnes conditions et que l'on ne manque de rien, malgré les difficultés et les pénuries consécutives. Merci également à tous ceux qui m'ont conseillée ou aidée en réalisant des expériences pour me suppléer, par exemple Jenny Greig, Séverine Bézie, Sonia Salle, Laurence Delbos... Merci à mes anciens et nouveaux collègues de bureau pour l'ambiance, la détente, les M&M's et les gâteaux.

Merci à Malika Gantier et Jean-Marie Heslan de la plateforme GenoCellEdit pour tout le travail réalisé, notamment pour avoir initié le projet de rapprochement du donneur et m'avoir aidé quand j'en avais besoin.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble de la plateforme iPSC de Nantes d'avoir pris soin de nos GB10 tous les jours et même le weekend. En particulier je remercie Laurent David, directeur de la

plateforme, pour son enthousiasme contagieux envers mon projet et ses commentaires francs et pertinents qui me font toujours avancer. Merci d'avoir cru en mon projet. Un grand merci également à Isabelle Leray qui a réalisé toutes les expériences sur les hiPSC. Merci à toi pour ton dynamisme, ta motivation et ton investissement dans mon projet. Promis, bientôt je te laisserai tranquille.

Merci aux membres de la plateforme Transgénèse Rat ImmunoPhénomique qui ont tous, de près ou de loin participé à la génération des résultats de mon projet de thèse : Claire Usal et Séverine Ménoret pour la transgénèse, Laure-Hélène Ouisse et Ghenima Ahmil pour la cytométrie en flux, Aude Guiffès et Dorian Espi-Bastien pour la biologie moléculaire.

Je souhaiterais tout particulièrement remercier Ignacio Anegon, mon directeur de thèse qui me fait confiance depuis plus de 6 ans. J'ai beaucoup grandi depuis mon arrivée dans votre équipe grâce aux responsabilités que vous m'avez données petit à petit, l'autonomie que vous m'avez accordée mais surtout grâce à votre considération.

Un énorme MERCI à Laurent Tesson et Séverine Rémy sans qui ce projet ne serait pas ce qu'il est. Merci à vous deux d'avoir partagé ces galères avec moi et pour ces 6 années à vos côtés. Merci à toi Séverine pour ton soutien permanent, de croire en moi et de m'aider à être toujours meilleure. Merci pour tes conseils francs et pertinents ainsi que pour ta rigueur et ton intelligence. C'est toujours un plaisir de faire un projet avec toi. Laurent, j'ai énormément appris à tes côtés. Ton expérience et ta vision de la biologie moléculaire sont inestimables et certainement pas « old school ». Merci pour ton humour rafraichissant au quotidien, tes idées et ta patience. Merci d'être là pour me rassurer et partager mes idées parfois un peu folles je dois l'avouer.

Finalement, un grand merci à l'ensemble de mes proches : ma belle-famille, mes amis, mes amis de toujours, mes frères et ma sœur et bien sûr mes parents pour leur soutien inconditionnel. Merci d'être là dans les bons moments comme dans les mauvais.

Merci à mes deux petits bonhommes de me rappeler tous les jours l'essentiel dans la vie. Ethan et Brice, merci pour votre joie de vivre et ce regard dans vos yeux.

Mes derniers remerciements vont à Pierre-Olivier, merci de partager ma vie et d'avoir supporté ma fatigue, mes angoisses et mon stress.

# Table des matières

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>14</b>
<b>ETAPES HISTORIQUES DE LA GENERATION DE MODELES GENETIQUEMENT MODIFIES</b> .....	<b>14</b>
MODÈLES BIOLOGIQUES CLASSIQUES ET DÉBUTS DE LA MODIFICATION GÉNÉTIQUE .....	14
CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES : OUTIL POUR LA MODÉLISATION CELLULAIRE ET ANIMALE .....	15
LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES : L'AVENIR DES CELLULES SOUCHES .....	17
A.    IPSC ANIMALES ET HUMAINES .....	17
B.    MODELISATION A PARTIR D'HIPOSC .....	17
C.    REPROGRAMMATION DE CELLULES MATURES EN IPSC .....	18
NOUVEAUX OUTILS D'ÉDITION DE GÉNOME : LES NUCLÉASES SPÉCIFIQUES DE GÈNES .....	19
CONCLUSION ET PERSPECTIVES DES MODÈLES ET LEURS MODIFICATIONS GÉNÉTIQUES .....	23
<b>CRISPR/CAS9 : STRUCTURE, ACTION ET OPTIMISATION</b> .....	<b>24</b>
LE GUIDE ARN .....	24
A.    STRUCTURE : DGARN ET SGARN .....	24
B.    INGENIERIE DU GARN .....	25
LA PROTÉINE CAS9 .....	26
A.    STRUCTURE ET DOMAINES FONCTIONNELS .....	26
B.    CONFORMATIONS .....	27
MÉCANISME D'ACTION DU RNP POUR CRÉER UNE DSB .....	29
VOIES DE RÉPARATION DE DSB .....	31
ASPECTS IMPORTANTS POUR UN PROJET D'ÉDITION DE GÉNOME EFFICACE ET SPÉCIFIQUE .....	34
A.    CAS9 .....	34
B.    GARN .....	36
C.    ADN DONNEUR .....	37
D.    LOCUS CIBLE .....	37
E.    GENOTYPAGE ET DETECTION DES EVENEMENTS INVOLONTAIRES .....	38
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	39
<b>CREATION DE MODELES GENETIQUEMENT MODIFIES PAR CRISPR/CAS9</b> .....	<b>40</b>
A.    MODELES KO .....	41
B.    REARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES .....	41
C.    MODELES DE VARIANTS GENETIQUES .....	41
D.    SUREXPRESSION D'UN GENE D'INTERET .....	42
E.    MODELES CONDITIONNELS .....	42
F.    MODELES RAPPORTEURS .....	43

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	44
<b>ENJEUX ACTUELS DE L'EDITION DE GENOME PAR CRISPR/CAS .....</b>	<b>45</b>
<b>II. OBJECTIFS DE MON PROJET DE THESE.....</b>	<b>47</b>
<b>ETAT DES LIEUX.....</b>	<b>47</b>
<b>MON PROJET DE THESE.....</b>	<b>48</b>
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>50</b>
<b>CARACTERISATION ET OPTIMISATION DE LA FORMATION DE COMPLEXES RNP FONCTIONNELS .....</b>	<b>50</b>
SURFACE PLASMON RESONANCE.....	50
A. PRINCIPE.....	50
B. RESULTATS .....	51
THERMOPHORÈSE MICROSCALE.....	51
A. PRINCIPE.....	51
B. RESULTATS .....	52
DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY (DSF) .....	53
A. PRINCIPE.....	53
B. RESULTATS .....	54
NANODIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY (NANODSF) .....	55
A. PRINCIPE.....	55
B. RESULTATS .....	55
COUPURE IN VITRO SUR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE (CIV-CE).....	58
A. PRINCIPE.....	58
B. RESULTATS .....	58
COUPURE IN VITRO DÉTECTÉE PAR QPCR (QCIV).....	59
A. PRINCIPE.....	59
B. RESULTATS .....	60
BILAN DE CETTE CARACTÉRISATION ET OPTIMISATION.....	60
<b>APPLICATION A L'EDITION DE GENOME <i>IN VIVO</i> SUR IPSC HUMAINES ET EMBRYONS DE RATS.....</b>	<b>61</b>
DONNÉES PUBLIÉES DANS BIO RXIV : <a href="https://doi.org/10.1101/2021.09.03.458921">HTTPS://DOI.ORG/10.1101/2021.09.03.458921</a> .....	61
DONNÉES NON PUBLIÉES : ÉTUDE DES LARGES DÉLÉTIONS AUTOUR DU SITE DE COUPURE .....	80
<b>AMELIORATION DE L'IMPORT NUCLEAIRE DU DONNEUR ADN.....</b>	<b>81</b>

<b>IV. DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>84</b>
<b>CARACTERISATION ET OPTIMISATION DE LA FORMATION DE COMPLEXES RNP FONCTIONNELS .....</b>	<b>84</b>
A. SINGLE-MOLECULE FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (SMFRET) .....	85
B. BEACON .....	86
<b>APPLICATION A L'EDITION DE GENOME <i>IN VIVO</i> SUR IPSC HUMAINES ET EMBRYONS DE RATS.....</b>	<b>86</b>
<b>AMELIORATION DE L'IMPORT NUCLEAIRE DU DONNEUR ADN.....</b>	<b>88</b>
<b>V. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>90</b>
<b>VI. REFERENCES.....</b>	<b>92</b>
<b>ANNEXE 1 : REVUE SUR L'EVOLUTION DE L'EDITION GENOME CHEZ LE RAT ET MODELISATION DE SITUATIONS HUMAINES.....</b>	<b>113</b>
<b>ANNEXE 2 : FIGURES ET TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES « HIGHLY EFFICIENT KNOCKIN IN HUMAN IPS CELLS AND RAT EMBRYOS BY CRISPR/CAS9 MOLECULAR OPTIMIZATION » .....</b>	<b>152</b>
<b>ANNEXE 3 : GENOTYPES DES EMBRYONS DE RATS EDITES SUR LE LOCUS REPHX2 .</b>	<b>157</b>

# Index des figures

FIGURE 1: NOMBRE DE PUBLICATIONS RÉFÉRENCÉES DANS PUBMED JUSQU'AU 31/12/2020 AVEC MOTS CLÉS: "MODELS, ANIMAL" AND "MICE"[MESH] OU AND "RATS"[MESH] OU AND "RABBITS"[MESH] OU AND "SWINE"[MESH] OU AND "DOGS"[MESH] OU AND "CRICETINAE"[MESH] OU AND "GUINEA PIGS"[MESH] OU AND "PRIMATES"[MESH] NOT "HUMANS"[MESH] OU AND "SHEEP"[MESH] OU AND "FISHES"[MESH] OU AND "CATTLE"[MESH] OU AND "HELMINTHS"[MESH] OU AND "DIPTERA"[MESH] OU AND "BIRDS"[MESH] OU AND "CATS"[MESH] OU AND "YEASTS"[MESH] OU AND "AMPHIBIANS"[MESH] OU AND "GOATS"[MESH].	14
FIGURE 2: EVOLUTION DES OUTILS DE CREATION DE MODELES CELLULAIRES ET RONGEURS GENETIQUEMENT MODIFIES. LA TRANSGENESE ALEATOIRE EST INDIQUEE EN GRIS CLAIR ET CIBLEE EN GRIS FONCE, LES ESC EN BLEU CLAIR ET IPS EN BLEU FONCE, LES MEGANUCLEASES EN JAUNE, LES ZFN EN ORANGE CLAIR, TALEN EN ORANGE FONCE, CRISPR/CAS9 EN ROUGE ET SYSTEMES ALTERNATIFS DE CAS9 EN ROSE. ESC, CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES ; iPSC, CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES ; M, SOURIS ; R, RAT ; H, HUMAIN ; HR, RECOMBINAISON HOMOLOGUE	16
FIGURE 3: PROCESSUS DE PRODUCTION D'UNE LIGNEE iPSC. FIGURE CREEE AVEC BIORENDER.	18
FIGURE 4: STRUCTURE DES QUATRE NUCLEASES SPECIFIQUES DE GENES LES PLUS UTILISEES EN EDITION DE GENOME D'APRES ABDALLAH ET AL., 2015. <b>A.</b> MEGANUCLEASE SCE-I. <b>B.</b> « ZINC FINGER FUCLEASE ». <b>C.</b> « TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASE ». <b>D.</b> « CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS ».	20
FIGURE 5: SCHEMA DES DEUX TYPES DE GUIDE ARN UTILISES APRES RECONNAISSANCE DE LEUR CIBLE D'APRES ZHANG ET AL., 2021. <b>A.</b> STRUCTURE DU DGRNA APRES FORMATION DU DUPLEX. <b>B.</b> STRUCTURE DU sgRNA AVEC LA TETRALOOP (EN GRIS CLAIR).	24
FIGURE 6: ARCHITECTURE DU GRNA AU SEIN DU RNP LORSQUE CELUI-CI A DETECTE UN ADN CIBLE D'APRES NISHIMASU ET AL., 2014.	24
FIGURE 7: INGENIERIE DU GARN PAR SUPPRESSION DE SEQUENCE (PANNEAU DU HAUT) OU EXTENSION DES STRUCTURES DE CELUI-CI (PANNEAU DU BAS) D'APRES ZHANG ET AL., 2021.	25
FIGURE 8: SCHEMA DES POSSIBILITES DE REMPLACEMENT DE BASES ARN PAR DES BASES ADN D'APRES ZHANG ET AL., 2021. BASES ARN MODIFIABLES EN ADN NOTEES EN ORANGE.	26
FIGURE 9: SCHEMA DE Cas9 SEULE (PDB 4CMP) ET SES DIFFERENTS DOMAINES FONCTIONNELS.	26
FIGURE 10: CONFORMATIONS DE Cas9 REPERTORIEES ET ASSOCIEES A SON ACTIVITE DE L'ETAT LIBRE A L'APRES COUPURE, INSPIRE DE ZUO ET LIU., 2020.	28
FIGURE 11: SCHEMA DU MECANISME D'ACTION DE Cas9 DEPUIS LA FORMATION DU COMPLEXE RNP JUSQU'A LA COUPURE SIMULTANEE DES DEUX BRINS D'UN ADN D'APRES JIANG ET DOUDNA., 2017. LA FENTE DU DOMAINE PI EST INDIQUEE EN CERCLE POINTILLE. LE BRIN ARN BLANC EN POINTILLE CORRESPOND AUX NUCLEOTIDES NON ORDONNES DU « SPACER » QUI NE FONT PAS PARTIE DE LA SEQUENCE « SEED ».	30
FIGURE 12: MUTANTS ET RESIDUS MUTES DE Cas9 POUR RENDRE LE PAM PLUS FLEXIBLE D'APRES COLLIAS AND BEISEL, 2021.	31
FIGURE 13: MECANISMES GENERAUX DES QUATRE VOIES PRINCIPALES DE REPARATION D'UNE CASSURE DOUBLE BRIN (DSB) D'APRES XUE AND GREENE, 2021. <b>A.</b> LES EXTREMITES NON TRAITEES SONT REPAREES PAR « CLASSIC NON HOMOLOGOUS END JOINING » (CNHEJ) PAR LIGATION DES DEUX EXTREMITES. <b>B.</b> LES EXTREMITES SONT RESEQUEES SUR UNE COURTE DISTANCE PAR LE COMPLEXE MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) ET D'AUTRES FACTEURS POUR CREER DES EXTREMITES 3' DEBORDANTES. <b>C.</b> SANS AUTRE TRAITEMENT, LA REPARATION PAR « MICROHOMOLOGY END JOINING » (MMEJ) SERA REALISEE. <b>D.</b> UNE SECONDE ETAPE DE RESECTION PLUS LARGE MEDIEE PAR EXO1 OU BLM/DN2 A LIEU ET EST SUIVIE D'UN RECOUVREMENT DE CETTE EXTREMITÉ DEBORDANTE SIMPLE BRIN PAR RPA. <b>E.</b> L'ACTION DE RAD52 INDUIT LA VOIE DE REPARATION « SINGLE-STRAND ANNEALING » (SSA). <b>F.</b> L'ASSEMBLAGE D'UN FILAMENT RAD51 SUR CE COMPLEXE ADN SIMPLE BRIN-RPA INDUIT LA REPARATION PAR <b>G.</b> « HOMOLOGOUS RECOMBINATION » (HR). ssDNA, SINGLE-STRANDED DNA; dsDNA, DOUBLE-STRANDED DNA; SDSA, SYNTHESIS-DEPENDANT DNA STRAND ANNEALING; dHJ, DOUBLE HOLLIDAY JUNCTION	33

FIGURE 14: COMPARAISON DE LA COUPURE ET DE LA PRESENCE DE Cas9 AU COURS DU TEMPS LORSQU'ELLE EST APPORTEE SOUS FORME DE PLASMIDE OU DE COMPLEXE RNP PRE-FORME IN VITRO D'APRES KIM ET AL. 2014. <b>A.</b> COUPURE EVALUEE AU COURS DU TEMPS PAR T7E1 APRES EDITION DE CELLULES K562 CIBLANT LE GENE CCR5. <b>B.</b> PRESENCE DE Cas9 DETECTEE PAR WESTERN BLOT AU COURS DU TEMPS. ....	35
FIGURE 15: DETAIL DES MUTATIONS GENEREES SUR Cas9 POUR AMELIORER SA SPECIFICITE D'APRES ZUO ET LIU, 2020. ....	36
FIGURE 16: SEQUENCE OPTIMALE DU CRRNA (36 BASES) ET DU TRACRRNA (67 BASES) D'APRES JACOBI ET AL., 2017. ....	37
FIGURE 17: STRATEGIES POUR CREER DES MODELES GENETIQUEMENT MODIFIES EN FONCTION DES APPLICATIONS. <b>A.</b> LE COMPLEXE RNP PEUT ETRE UTILISE SEUL POUR GENERER DES KO OU PAR PAIRE POUR CREER DES REARRANGEMENTS CHROMOSOMIQUES. <b>B.</b> UN ssODN PERMET D'INSERER DE COURTES SEQUENCES, PAR EXEMPLE UNE MUTATION OU UN TAG DANS LE CADRE DE LECTURE DU GENE D'INTERET. <b>C.</b> UN LONG ADN DONNEUR EST UTILISE LORSQUE L'INSERTION D'UNE LARGE SEQUENCE EST REQUISE, PAR EXEMPLE UNE CASSETTE D'EXPRESSION COMPLETE, UN GENE RAPPORTEUR OU UN SYSTEME CONDITIONNEL. CETTE INSERTION PEUT ETRE REALISEE SUR UN GENE ENDOGENE OU AU SEIN D'UN LOCUS PERMISSIF. FIGURE CREEE AVEC BIORENDER. SNP, SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM; RNP, RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEX; 2A, SELF-CLEAVING PEPTIDE; KO, KNOCKOUT; INDELS, INSERTION OR DELETION; Cre, CRE RECOMBINASE. ....	40
FIGURE 18: STRATEGIES PERMETTANT D'ETUDIER LE ROLE INCONNU D'UN VARIANT GENETIQUE (VUS), EXEMPLE DES MODELES HIPSC CARDIOVASCULAIRES D'APRES GUO ET AL. 2021. <b>A.</b> IDENTIFICATION D'UN VUS DANS LA POPULATION HUMAINE. <b>B.</b> GENERATION DE LIGNEES HIPSC ISOGENIQUES PAR CRISPR/Cas9. <b>C.</b> CAS DES MUTATIONS MONOGENIQUES, OLIGOGENIQUES OU POLYGENIQUES ET STRATEGIES CRISPR ADAPTEES. LE TRIANGLE JAUNE REPRESENT L'IMPACT DE FACTEURS L'ENVIRONNEMENT SUR LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES. CHAQUE CERCLE JAUNE REPRESENT UNE MUTATION ET SA TAILLE INDIQUE SON IMPACT SUR LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES. LA FLECHE VERTE INDIQUE LA DIRECTION FUTURE DES MODELES HIPSC GENETIQUEMENT MODIFIES. VUS, VARIANT OF UNCERTAIN SIGNIFICANCE; CMs, CARDIOMYOCYTES, ECs, ENDOTHELIAL CELLS; CFBS, CARDIAC FIBROBLASTS; VSMCs, VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS.....	42
FIGURE 19: MECANISME D'ACTION DES SYSTEMES CRE/LOX, TET-ON ET TET-OFF D'APRES KIM ET AL. 2018A. <b>A.</b> SCHEMA DU FONCTIONNEMENT GENERAL DU SYSTEME CRE/LOX ET CROISEMENT DES LIGNEES CRE/LOX. <b>B.</b> RESULTAT DU CROISEMENT DES DEUX LIGNEES. <b>C.</b> MECANISME PRECIS D'ACTION DU SYSTEME CREER. FONCTIONNEMENT DU SYSTEME <b>D.</b> TET-ON ET <b>E.</b> TET-OFF. ....	44
FIGURE 20: SCHEMA DU PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE SURFACE PLASMON RESONANCE D'APRES DRESCHER ET AL., 2018. UNE LUMIERE POLARISEE EST APPLIQUEE A TRAVERS UN PRISME SUR UN SUPPORT PLAT RECOUVERT D'UN FILM D'OR. LE LIGAND IMMOBILISE SUR LA SURFACE DU FILM REFLETE LA LUMIERE D'UNE FAÇON PARTICULIERE QUI VA ETRE DIFFERENTE DANS LE CAS OU CELUI-CI SERA LIE A L'ANALYTE. ....	51
FIGURE 21 : PRINCIPE DE LA THERMOPHORESE MICROSCALE D'APRES ASMARI ET AL., 2018. <b>A.</b> L'APPLICATION D'UN LASER SUR DES CAPILLAIRES CONTENANT LES MOLECULES TESTEES PERMET D'INDUIRE UN MOUVEMENT DES MOLECULES MESURABLE VIA LA FLUORESCENCE. <b>B.</b> LA MESURE DE FLUORESCENCE D'UNE GAMME DE CONCENTRATION DE LIGAND PERMET DE VERIFIER LA FIXATION DE CELUI-CI A SA CIBLE ET DEFINIR L'AFFINITE DE CETTE MESURE. ....	51
FIGURE 22: RESULTATS DE THERMOPHORESE OBTENUS AVEC UN TRACRARN ATTO647N SEUL (TARGET) OU EN PRESENCE D'UN CRARN (COMPLEX). <b>A.</b> SCAN DE LA FLUORESCENCE DE CHAQUE CAPILLAIRE AVANT THERMOPHORESE. <b>B.</b> TRACES DE THERMOPHORESE DU TRACRARN ATTO 647N SEUL OU EN PRESENCE D'UN CRARN. LA ZONE SURLIGNEE EN BLEUE CORRESPOND A LA MESURE DE REFERENCE APPELEE « COLD REGION » QUI CORRESPOND A LA FLUORESCENCE AVANT INDUCTION DU LASER. LA ZONE SURLIGNEE EN ROUGE, APPELEE « HOT REGION » CORRESPOND A LA ZONE DE MESURES APRES INDUCTION DE LA THERMOPHORESE PAR LE LASER. ....	53
FIGURE 23: MESURE DE LA THERMOSTABILITE D'UNE PROTEINE PAR DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY D'APRES GAO ET AL., 2020. UN GRADIENT DE TEMPERATURES EST APPLIQUE A LA PROTEINE D'INTERET EN PRESENCE D'UN FLUOROPHORE CAPABLE DE FIXER DES RESIDUS HYDROPHOBES AFIN DE MESURER SA RESISTANCE A LA TEMPERATURE. PROTEINE NATIVE EN VERT ET SPYRO ORANGE EN JAUNE. ....	54
FIGURE 24: COURBE DE DSF DE LA PROTEINE Cas9 EN PRESENCE D'UN sgARN ET DE DIFFERENTES CIBLES ADN D'APRES JIANG ET AL 2016. ....	54
FIGURE 25: DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY DE Cas9 SEULE OU EN PRESENCE DE CONCENTRATIONS CROISSANTES DE gARN rCD45 B4. Cas9 SEULE EST NOTEE EN VERT FONCE. ....	55

FIGURE 26 : COURBES DE NANODSF OBTENUES PAR L'ETUDE D'UNE GAMME DE CONCENTRATIONS DE Cas9. <b>A.</b> MESURE DU RATIO 350 NM / 330 NM DE Cas9. <b>B.</b> DERIVEE PREMIERE DE CE RATIO. <b>C.</b> MESURE DE L'AGREGATION DE Cas9.....	56
FIGURE 27: MESURE DE LA THERMOSTABILITE DE Cas9 EN PRESENCE D'UNE GAMME DE CONCENTRATION DE dgARN. <b>A.</b> COURBE DE NANODSF OBTENUES. <b>B.</b> COMPARAISON DES T <sub>M</sub> EN FONCTION DES CONDITIONS.....	57
FIGURE 28: PHENOTYPAGES PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE CELLULES HIPSC HUMAINES APRES ELECTROPORATION PAR LE RNP SEUL OU AVEC UN ssODN BFP. DOT PLOT OBTENU APRES 7 JOURS POST-ELECTROPORATION AVEC <b>A.</b> 0,4µM DE Cas9 ET UN RATIO Cas9/dgARN 1/1 SEUL OU AVEC <b>B.</b> 2µM DE ssODN BFP POUR INDUIRE UNE CONVERSION DE LA GFP EN BFP.....	58
FIGURE 29: ANALYSE PAR CIV-CE DU CLIVAGE DES COMPLEXES RNP. <b>A.</b> ELECTROPHORESE CAPILLAIRE PERMETTANT DE DETECTER LE CLIVAGE DU PRODUIT DE PCR rEPHX2 EN PRESENCE D'UNE DOSE CONSTANTE DE Cas9 PROTEINE ET D'UN RATIO Cas9/sgARN CROISSANT. <b>B.</b> COMPARAISON DES TAUX DE CLIVAGE A PARTIR DES MEMES CONDITIONS DE TEST.....	59
FIGURE 30: SCHEMA DU PRINCIPE DE qCIV. CE TEST EST REALISE EN DEUX ETAPES, LE CLIVAGE IN VITRO PUIS LA DETECTION PAR qPCR DES ADNG NON CLIVES. ....	60
FIGURE 31: DETAIL DE LA LOCALISATION DES AMORCES UTILISEES POUR LE GENOTYPAGE DES EMBRYONS DE RATS SUR LE LOCUS rEPHX2 POUR DEFINIR LES TAUX DE KI, D'EDITION ET DE LARGES DELETIONS. LES AMORCES SONT NOTEES EN NOIR, LES EXONS ET INTRONS EN VERT, LA CASSURE DOUBLE BRIN (DSB) EN ROUGE. LA TAILLE DES AMPLICONS EST NOTEE EN NOIR, LA TAILLE DES EXONS ET INTRONS EN VERT ET LA DISTANCE DU SITE DE COUPURE JUSQU'A L'AMORCE EN ROUGE. WT, WILD-TYPE, KI, KNOCKIN, HMA-CE.....	62
FIGURE 32: STRUCTURE DU COMPLEXE RNP DETERMINE PAR CRISTALLOGRAPHIE (PDB 4008) D'APRES NISHIMASU ET AL. 2014.....	81
FIGURE 33: RAPPROCHEMENT DU DONNEUR PAR HYBRIDATION DU ssODN SUR LA « STEM LOOP 3 » DU SGRNA APRES ELECTROPORATION DE HEK293T AVEC Cas9 IDT 0,2µM, RNP 1/5 (sgARN hAAVS1 IVT 1µM) ET 1µM ssODN XhoI. <b>A.</b> SCHEMA DE L'HYBRIDATION DE CHAQUE ssODN TESTE (EN ROUGE) SUR LE SGRNA IVT (EN NOIR). <b>B.</b> COMPARAISON DES TAUX DE KI/EDITION EN FONCTION DES ssODN TESTES. TEST STATISTIQUE NON PARAMETRIQUE MANN-WHITNEY (NSP>0,05). ....	82
FIGURE 34: SCHEMA DE L'HYBRIDATION DE L'ADN DONNEUR (EN ROUGE) SUR LE SGRNA IVT TRONQUE (EN NOIR). ....	82
FIGURE 35: COMPARAISON DE LA FONCTIONNALITE DU COMPLEXE RNP NORMAL ET DU COMPLEXE RNP CONTENANT LE GARN TRONQUE PAR CIV-CE. ....	83
FIGURE 36: SINGLE-MOLECULE FRET POUR CARACTERISER LES INTERACTIONS ENTRE LE RNP-Cy5 ET L'ADN D'INTERET BIOTINYLE ET MARQUE A Cy3 D'APRES SINGH ET AL., 2016. <b>A.</b> SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DU SMFRET AVEC INDUCTION D'UN HAUT SIGNAL FRET PAR LA LIAISON D'UN COMPLEXE RNP MARQUE PAR Cy5 SUR UN ADN MARQUE PAR Cy3 IMMOBILISE AU SUPPORT PAR INTERACTION BIOTINE/AVIDINE. <b>B.</b> EXEMPLE DE RESULTAT OBTENU AVEC LA DETECTION DE LA FLUORESCENCE EMISE PAR LE DONNEUR (EN VERT) OU L'ACCEPTEUR (EN ROUGE). L'EFFET FRET, ET DONC LA PROXIMITE DES DEUX MOLECULES D'INTERET, EST DEMONTRE PAR L'EMISSION DE FLUORESCENCE DE L'ACCEPTEUR. ....	85
FIGURE 37: SCHEMA ET EXEMPLE D'EXPERIENCE DE BEACON MOLECULAIRE SUR CRISPR/Cas9 EN UTILISANT UN ADN CIBLE CONTENANT SUR UN BRIN UN FLUOROPHORE ET SUR L'AUTRE UN QUENCHER D'APRES MEKLER ET AL. 2016. ....	86
FIGURE 38: SCHEMA DE LA STRATEGIE DE RAPPROCHEMENT DU DONNEUR PAR tCTS D'APRES NGUYEN ET AL 2020. ....	89
FIGURE 39: REPRESENTATION DE LA COMPLEXITE ET RICHESSE DE LA BOITE A OUTILS CRISPR D'APRES SHELAKI ET AL., 2019. ....	90

## Index des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des nucléases utilisées pour créer des modèles cellulaires et animaux génétiquement modifiés d'après Chenouard et al. 2021.....	21
Tableau 2 : Détails des domaines composant Cas9 avec leur fonctionnalité associée.....	27
Tableau 3 : Enjeux de l'édition de génome par CRISPR/Cas9 selon le type de modèle.....	45
Tableau 4 : Analyse du taux de larges délétions détectées par la PCR de 2,16 Kb et 3,69Kb ainsi que par les différentes qPCR pour les conditions de CRISPR/Cas9 testées ciblant le locus rEphx2.....	80
Tableau 5 : Comparaison des techniques utilisées pour évaluer la formation du complexe RNP.....	84
Tableau 6 : Description des stratégies de rapprochement du donneur décrites dans la littérature avec leurs avantages et inconvénients.....	88

# Abbreviations

**ADNg** : ADN génomique

**Cas** : « CRISPR associated system »

**CIV-CE** : test de coupure *in vitro* analysé par électrophorèse capillaire

**cNHEJ** : « classical non-homologous end joining »

**CRISPR** : « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »

**dgARN** : dual guide ARN

**DNA-PKcs** : « DNA-dependent protein kinase catalytic subunit »

**DSB** : cassure double brin

**ESC** : cellules souches embryonnaires

**gARN** : guide ARN

**dsADN** : ADN double brin

**DSF** : « Differential Scanning Fluorimetry »

**HMA-CE** : test de mobilité des hétéroduplex analysé par électrophorèse capillaire

**HR** : recombinaison homologue

**IDT** : Integrated DNA Technologies

**indels** : insertions ou délétions

**iPSC** : cellules souches pluripotentes induites

**IVT** : transcription *in vitro*

**KI** : knockin

**KO** : knockout

**lsADN** : long ADN simple brin

**MMEJ** : « microhomology-mediated end joining »

**NGS** : « next generation sequencing »

**OKSM** : Oct3/4, Klf4, Sox2 et c-Myc

**PAM** : « protospacer adjacent motif »

**qCIV** : test de coupure *in vitro* analysé par qPCR

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction

**RNP** : complexe ribonucleoprotéine

**sgARN** : single guide ARN

**SSA** : single-strand annealing

**ssODN** : oligodésoxynucléotide

**TALEN** : « Transcription activator-like effector nuclease »

**ZFN** : « zinc finger nucleases »

# I. INTRODUCTION

## Etapes historiques de la génération de modèles génétiquement modifiés

### *Modèles biologiques classiques et débuts de la modification génétique*

Les modèles biologiques permettent de mimer des situations physiologiques ou pathologiques observées chez l'Homme pour mieux en comprendre le fonctionnement. En particulier pour l'étude d'une maladie humaine, l'intérêt est de comprendre l'étiologie ainsi que la physiopathologie de cette maladie afin de faciliter le diagnostic et mettre au point des stratégies thérapeutiques fiables et sécurisées. Les modèles biologiques tentent donc de récapituler ces aspects de la façon la plus fidèle possible (physiologie, pathophysiologie, signes cliniques...). Le choix des modèles est donc primordial et la combinaison de modèles animaux et cellulaires est souvent requise pour leur complémentarité.

L'utilisation de cellules humaines, issues directement de tissus sains (cellules primaires) ou pathologiques (lignées tumorales...), permet une modélisation basée sur un génome humain. Les cellules primaires présentent l'avantage d'être fidèles au contexte physiologique humain mais sont difficiles à maintenir en culture. Au contraire, les cellules tumorales prolifèrent anormalement bien mais par leur nature tumorale ne représentent pas la réalité biologique de nos cellules dans un organisme sain.

Les modèles animaux sont, depuis très longtemps, largement dominés par les modèles rongeurs, en particulier la souris et le rat (**Figure 1**). Ces deux modèles ont l'avantage de présenter un bon compromis entre proximité génétique par rapport à l'Homme et taille adaptée à l'élevage en laboratoire.

La souris étant dix fois plus petite que le rat, son élevage est moins coûteux et a certainement contribué à sa dominance. En contrepartie, le rat facilite certaines applications par sa plus grande taille (microchirurgie,

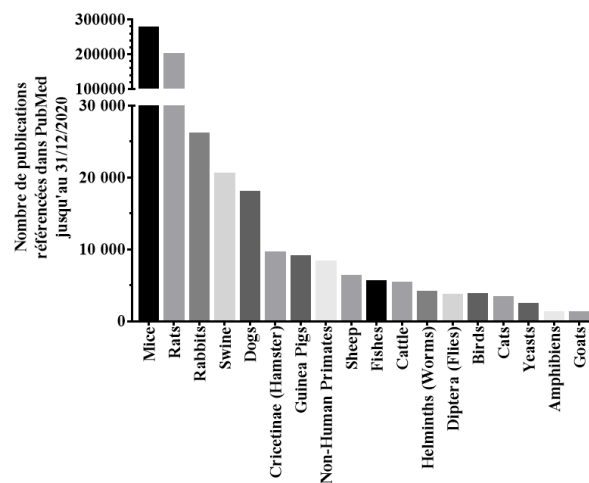


Figure 1: Nombre de publications référencées dans Pubmed jusqu'au 31/12/2020 avec mots clés: "Models, Animal"] AND "Mice"[Mesh] ou AND "Rats"[Mesh] ou AND "Rabbits"[Mesh] ou AND "Swine"[Mesh] ou AND "Dogs"[Mesh] ou AND "Cricetinae"[Mesh] ou AND "Guinea Pigs"[Mesh] ou AND "Primates"[Mesh] NOT "Humans"[Mesh] ou AND "Sheep"[Mesh] ou AND "Fishes"[Mesh] ou AND "Cattle"[Mesh] ou AND "Helminths"[Mesh] ou AND "Diptera"[Mesh] ou AND "Birds"[Mesh] ou AND "Cats"[Mesh] ou AND "Yeasts"[Mesh] ou AND "Amphibians"[Mesh] ou AND "Goats"[Mesh].

volume de sang et tissus prélevables...) et propose une meilleure modélisation des pathologies génétiques humaines dans un certain nombre de cas (Chenouard et al., 2021a; Szpirer, 2020). A ma connaissance, il n'existe pas de modèle de souris qui offre une meilleure représentation que le modèle de rat équivalent.

Les fondements de l'édition de génome ont été posés dans les années 80 avec plusieurs avancées majeures (décrites dans les sections suivantes) qui ont été un tournant pour la génération de modèles animaux et cellulaires (**Figure 2**). En particulier, à cette époque, les premiers succès de modifications génétiques aléatoires sur embryons murins par injection d'ADN exogène dans l'embryon unicellulaire ont été publiés (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982). C'était la première révolution technologique qui a permis la génération des premiers modèles de souris transgéniques qui ont longtemps été les seuls modèles mammifères accessibles. En effet, le premier rat transgénique n'a été développé que 10 ans plus tard ce qui reflète la difficulté de la transgénèse dans ce modèle (Mullins et al., 1990). Néanmoins, la transgénèse aléatoire entraîne des modifications incontrôlées, très faiblement efficaces (Brinster et al., 1985) et présentaient de nombreux problèmes (insertion aléatoire, expression non contrôlée...). C'est pourquoi d'autres stratégies ont été développées.

### ***Cellules souches embryonnaires : outil pour la modélisation cellulaire et animale***

L'établissement des premières lignées de cellules souches embryonnaires murines (mESC) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) et la démonstration de leur potentiel pour modifier un gène de façon ciblée par recombinaison homologue sur cellules humaines (Smithies et al., 1985) ont, dans les années 80, révolutionné la façon de générer des animaux génétiquement modifiés (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987) (**Figure 2**). En effet, ces cellules sont issues de blastocystes et possèdent la capacité de se différencier en un large type de cellule avec l'avantage de pouvoir être maintenues en culture à l'infini grâce à un fort potentiel d'auto-renouvellement. Toutefois, l'efficacité de recombinaison homologue ou l'intégration aléatoire est très faible, c'est pourquoi des marqueurs de sélection ont été développés pour favoriser la survie et sélectionner uniquement des mESC d'intérêt (Mansour et al., 1988). Cette sélection est encore largement utilisée sur mESC et a été améliorée pour pouvoir être excisée une fois la lignée développée. En effet, ces marqueurs de sélection peuvent interférer avec le transgène (Bouhassira et al., 1997) et poser des problèmes de biosécurité (résistance aux antibiotiques...).

L'établissement de lignées d'ESC de rats (rESC) (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008) et la génération de rats génétiquement modifiés de façon ciblée à partir de rESC (Kawamata and Ochiya, 2010; Meek et al., 2010; Tong et al., 2010) a été bien plus tardive et reflète à nouveau la complexité de ce modèle. Ces difficultés ont rendu la souris indispensable pour un grand nombre de modèles pendant presque trente ans (**Figure 2**). Aujourd'hui, les rESC restent moins robustes que les mESC et sont difficiles à maintenir de façon stable en culture, tout comme les embryons de rat.

	Modèles rongeurs		Modèles cellulaires humains		
	Souris	Rat	Cellules humaines	hESC	hiPSC
1980	Transgénique (Gordon et al., 1980)				
1981	Etablissement mESC (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981)				
1982	Transgénique fonctionnel (Palmiter et al., 1982)				
...					
1985			HR (Smithies et al., 1985)		
...					
1987	Mutagenèse programmée mESC (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987)				
...					
1990		Transgénique (Mullins et al., 1990)			
...					
1995			Meganucleases (Chouluka et al., 1995)		
...					
1998				Etablissement hESC (Thomson et al., 1998)	
...					
2001				Transgénique (Eiges et al., 2001)	
...					
2003				HR (Zwaka and Thomson, 2003)	
...					
2005			ZFN (Urnov et al., 2005)		
2006	Etablissement miPSC (Takahashi and Yamanaka, 2006)				
2007				ZFN (Lombardo et al., 2007)	Etablissement hiPSC (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007)
2008		Etablissement rESC (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008)			hiPSC de patients (Park et al., 2008)
2009		ZFN (Geurts et al., 2009)			ZFN (Hockemeyer et al., 2009; Zou et al., 2009)
...					
2010	ZFN (Carbery et al., 2010)	HR (Kawamata and Ochiya, 2010; Meek et al., 2010; Tong et al., 2010)			
2011		TALEN (Tesson et al., 2011)	TALEN (Miller et al., 2011)	TALEN hESC & hiPSC (Hockemeyer et al., 2011)	
...					
2013	Meganucleases (Ménoret et al., 2013)		CRISPR/Cas9 (Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013)		CRISPR/Cas9 (Horii et al., 2013; Mali et al., 2013)
...					
2014	TALEN (Sung et al., 2013; Wefers et al., 2013)	CRISPR/Cas9 (Li et al., 2013a, 2013b)			
...					
2016				CRISPR/Cas9 (Rong et al., 2014)	
...					
2017	Cytosine Base Editor (Liang et al., 2017a)		Cytosine Base Editing (Komor et al., 2016)		
2018	Adenine Base Editing (Yang et al., 2018)		Adenine Base Editing (Gaudelli et al., 2017)		
2019			Prime Editing (Anzalone et al., 2019)		
2020	Prime Editing (Liu et al., 2020b)			Cytosine & Adenine Base Editor (Qi et al., 2020)	Cytosine, Adenine Base Editor & Prime Editing (Sürün et al., 2020)
2021				Prime Editing (Habib et al., 2021)	

Figure 2: Evolution des outils de création de modèles cellulaires et rongeurs génétiquement modifiés. La transgénèse aléatoire est indiquée en gris clair et ciblée en gris foncé, les ESC en bleu clair et iPSC en bleu foncé, les méganucléases en jaune, les ZFN en orange clair, TALEN en orange foncé, CRISPR/Cas9 en rouge et systèmes alternatifs de Cas9 en rose. ESC, cellules souches embryonnaires ; iPSC, cellules souches pluripotentes induites ; m, souris ; r, rat ; h, humain ;HR, recombinaison homologue

En parallèle, l'établissement de lignées d'ESC humaines (hESC) (Thomson et al., 1998) a permis la génération d'hESC transgéniques (Eiges et al., 2001) puis modifiées de façon ciblée (Zwaka and Thomson, 2003) (**Figure 2**). La pluripotence est l'avantage majeur des ESC car elle permet de développer une large variété de types cellulaires par différenciation. Toutefois, celles-ci étant isolées à partir de blastocystes, les hESC présentent de réels problèmes éthiques qui limitent leur développement et donc leur diversité génétique. La loi relative à la bioéthique du 2 août 2021, permettra notamment de mieux cadrer l'accès et l'utilisation des embryons humains. Elle facilitera également le développement de nouvelles lignées d'hESC mais de nouvelles sources de cellules souches sont toutefois requises

## ***Les cellules souches pluripotentes induites : l'avenir des cellules souches***

### **a. iPSC animales et humaines**

La reprogrammation de cellules murines matures en cellules souches pluripotentes induites (miPSC) grâce aux facteurs Oct3/4, Klf4, Sox2 et c-Myc (facteurs OKSM) (Takahashi and Yamanaka, 2006) a été une avancée majeure dans le domaine des cellules souches chez l'animal mais également chez l'Homme (**Figure 2**). En effet, il est possible d'utiliser des iPSC pour générer des souris (Geoghegan and Byrnes, 2008) et rats (Li et al., 2009; Liao et al., 2009) chimériques. Les iPSC de rats (riPSC) semblent nettement plus robustes et faciles à maintenir en culture que les rESC. Elles sont, à mon avis, une alternative intéressante à explorer pour développer des modèles très complexes, leur efficacité de génération par des méthodes plus classiques étant insuffisante.

Grâce à ces études préliminaires en particulier chez la souris, les premières reprogrammations à partir de cellules matures humaines ont été réalisées rapidement et avec succès (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). La reprogrammation de nombreuses cellules de patients en différentes lignées de cellules hiPSC disponibles pour la recherche a ainsi révolutionné le développement de modèles cellulaires humains (Park et al., 2008) (**Figure 2**). C'est pourquoi le prix Nobel de physiologie ou médecine 2012 a été décerné à John B. Gurdon et Shinya Yamanaka.

### **b. Modélisation à partir d'hiPSC**

Ces cellules ont levé un grand nombre de barrières dont l'accès aux hESC, puisque celles-ci sont isolées à partir de simples biopsies de peau, de prélèvements sanguins ou d'urine par exemple. La génération de modèles d'hiPSC issus de patients est longue (6 mois à 1an minimum), coûteuse et revêt des aspects éthiques liés, en particulier, aux autorisations et utilisations de ces cellules. C'est donc un processus fastidieux mais qui mène à un modèle particulièrement flexible (**Figure 3**). En effet, après reprogrammation, elles comportent une large capacité de différenciation (Karagiannis et al., 2019; Oh and Jang, 2019) et sont cultivables en haut débit.

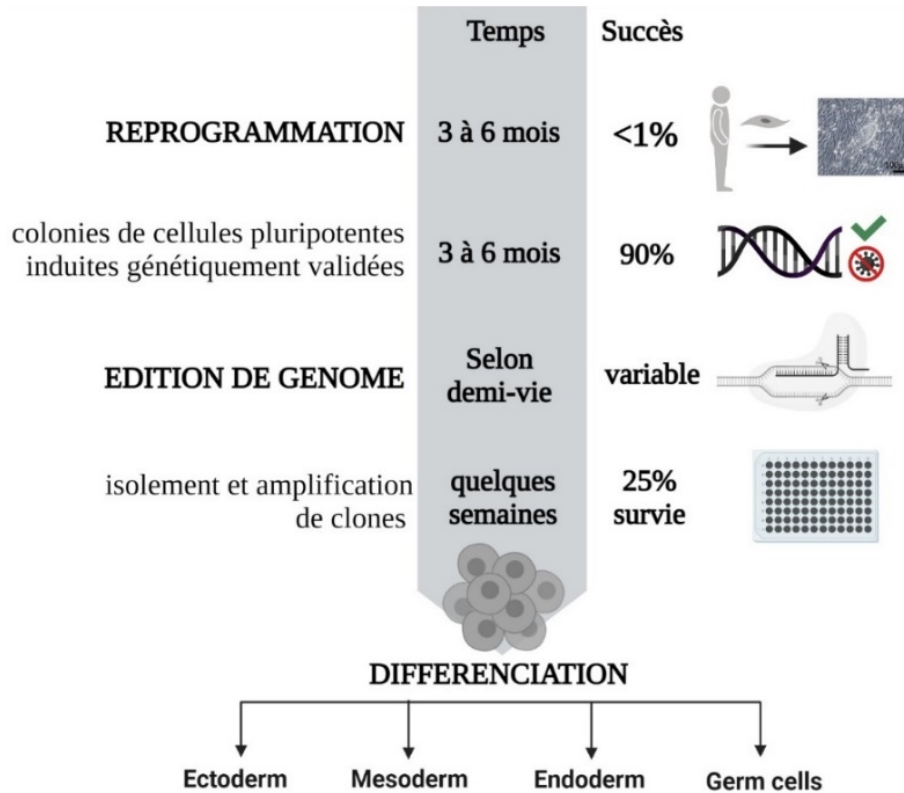


Figure 3: Processus de production d'une lignée iPSC. Figure créée avec BioRender.

### c. Reprogrammation de cellules matures en iPSC

La reprogrammation de cellules somatiques en iPSC nécessite leur induction dans un état de pluripotence. A l'origine, les facteurs OKSM apportés par des vecteurs retro ou lentiviraux (Takahashi and Yamanaka, 2006) ont démontré leur efficacité et restent encore les plus utilisés. L'intégration des transgènes portés par les vecteurs viraux est une limite majeure de ce système. Des techniques alternatives non intégratives ont donc été développées pour fournir ces facteurs :

- transposon PiggyBAC pour transporter la cassette de reprogrammation combinée à des systèmes d'excision (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009) ;
- plasmide simple (Okita et al., 2008) ;
- plasmide épisomal dérivé du virus Epstein-Barr (Yu et al., 2009) ;
- Minicercles ADN (Jia et al., 2010).

Ces techniques sont toutes basées sur de l'ADN qui présente notamment le risque d'insertion aléatoire dans le génome de la cellule receveuse. D'autres approches sans ADN ont par la suite été décrites :

- vecteurs viraux non intégratifs tels que virus Sendai (Fusaki et al., 2009), ou adénovirus (Stadtfeld et al., 2008) ;
- ARN synthétiques (Warren et al., 2010) ;
- protéines recombinantes (Kim et al., 2009).

Il est également possible d'agir directement sur les facteurs endogènes grâce à des activateurs transcriptionnels basés sur CRISPR/Cas9 (Weltner et al., 2018). Ce système permet de facilement cibler un grand nombre de facteurs et à moindre coût, ce qui en fait une technique très intéressante pour l'avenir.

Par ailleurs, des outils de criblage haut débit permettent aujourd'hui une meilleure connaissance des éléments impliqués dans la reprogrammation, particulièrement les voies de signalisation essentielles, les ARN non codants et les modifications épigénétiques. Un grand nombre d'entre eux mais aussi des petites molécules agissant sur différentes voies de signalisation ont été utilisés pour de la reprogrammation avec ou sans facteurs OKSM (Borghain et al., 2019).

Le virus Sendai et les ARN synthétiques sont, à l'heure actuelle, les deux techniques les plus fiables et efficaces (<1% malgré tout) et les plus utilisées en routine.

### ***Nouveaux outils d'édition de génome : les nucléases spécifiques de gènes***

Au cours des années 90, la méganucléase issue de *Saccharomyces cerevisiae* (I-SceI) a été utilisée pour créer une cassure double brin (DSB) sur cellules humaines afin d'induire la recombinaison homologue à partir d'un ADN donneur contenant des bras d'homologie de part et d'autre de la séquence à insérer (Choulika et al., 1995) (**Figure 2**). Cette technique s'est avérée deux fois et cinq fois plus efficace que la recombinaison homologue ou l'intégration aléatoire, respectivement (Choulika et al., 1995). Ces nucléases reconnaissent spécifiquement une séquence de 14 à 40 paires de bases (**Figure 4A**). Toutefois, la génération de ces nucléases est très complexe et leurs sites de coupure peu fréquents puisque basés sur de longues séquences spécifiques. Ces inconvénients ont très fortement limité leur application pour la génération de modèles rongeurs (Ménoret et al., 2013) (**Figure 2**). Même si peu de modèles ont été développés par cet outil, elles ont permis de mettre en évidence la nécessité de développer des nucléases capables de générer des DSB de façon spécifique et ciblée à partir d'outils faciles à développer.

Sur ces bases, la révolution de l'édition de génome a eu lieu à partir des années 2000 avec le développement successif de plusieurs nucléases spécifiques de gènes (**Figure 2**) permettant une édition ciblée et efficace. Ces outils sont devenus de plus en plus faciles à concevoir et synthétiser, rendant ainsi l'édition de génome progressivement accessible à tous les laboratoires dans le monde et surtout son application à la plupart des espèces vivantes. Ces nucléases présentent chacune un fonctionnement détaillé ci-dessous (**Figure 4** d'après Abdallah et al., 2015) et des spécificités comparées dans le **Tableau 1** (Chenouard et al., 2021a), article intégral en **Annexe 1**.

Les « zinc finger nucleases » (ZFN) ont été les nucléases qui ont suivi les méganucléases et ont été développées complètement de façon artificielle. Elles fonctionnent en dimères pour induire une DSB et combinent à la fois un domaine endonucléase de l'enzyme de restriction FokI et des domaines à doigts de zinc qui reconnaissent chacun de façon spécifique 3-4 bases ADN (**Tableau 1B**). Ainsi, en combinant plusieurs modules de ZFN, il est possible d'augmenter la spécificité du système. Elles ont été utilisées

d'abord sur cellules humaines (Urnov et al., 2005), hESC (Lombardo et al., 2007), et ont notamment permis de générer les premiers modèles d'hiPSC génétiquement modifiés (Hockemeyer et al., 2009; Zou et al., 2009). Du fait des difficultés à créer des modèles transgéniques de façon efficace, le premier rat génétiquement modifié par ZFN (Geurts et al., 2009) a été développé avant la première souris (Carbery et al., 2010) (**Figure 2**). L'ingénierie de ces nucléases est relativement complexe mais elles toutes sont toutefois capables de cibler le génome de n'importe quelle espèce. Son application pour l'édition de génome a donc particulièrement été une révolution pour les autres espèces que la souris, notamment le rat et les animaux de bétail.

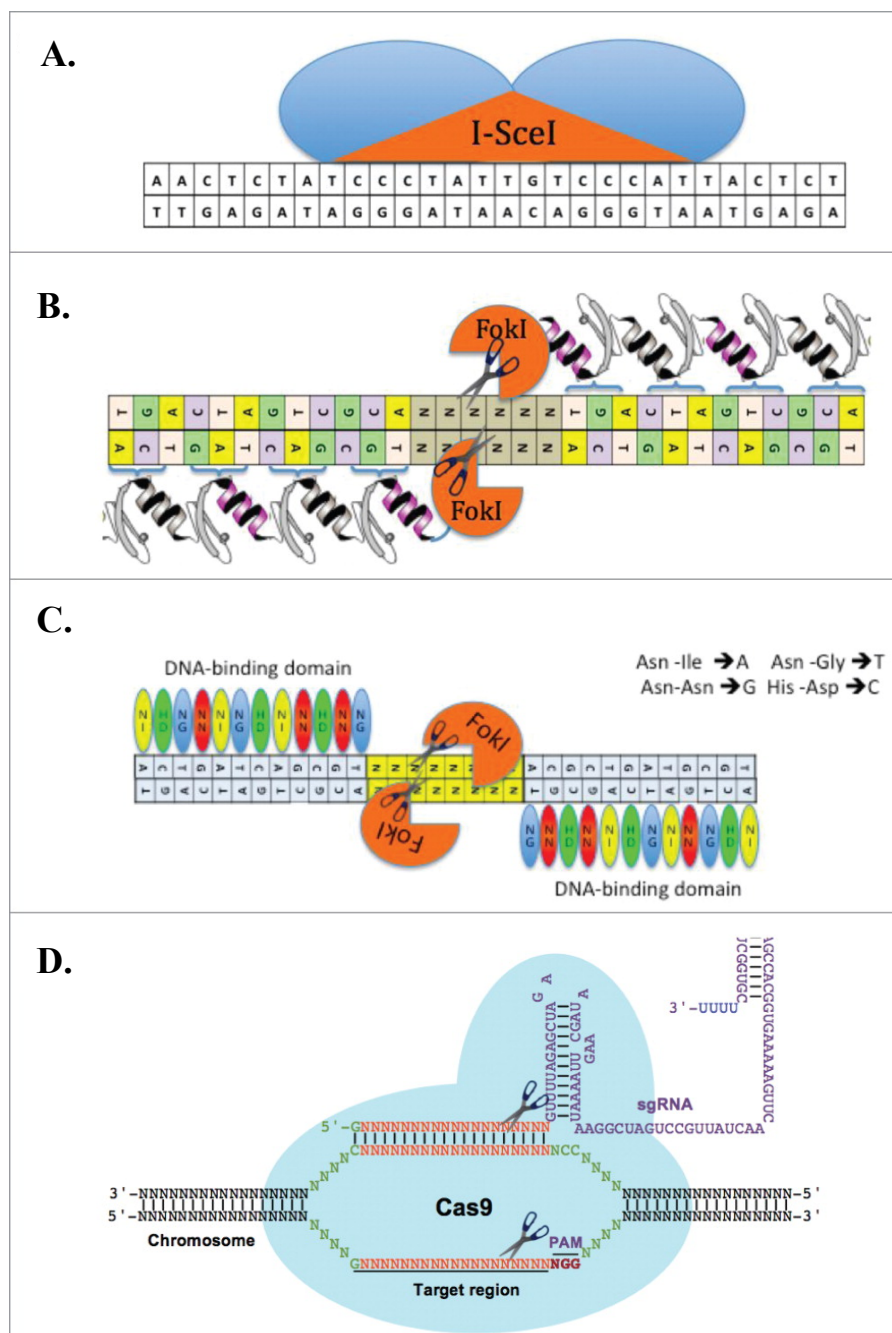


Figure 4: Structure des quatre nucléases spécifiques de gènes les plus utilisées en édition de génome d'après Abdallah et al., 2015. **A.** Méganucléase Sce-I. **B.** « Zinc Finger Nuclease ». **C.** « Transcription Activator-Like Effector Nuclease ». **D.** « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ».

Tableau 1: Comparaison des nucléases utilisées pour créer des modèles cellulaires et animaux génétiquement modifiés d'après Chenouard et al. 2021.

Specificities, advantages, limitations	MEGANUCLEASES	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
DNA binding determinant	protein	ZF protein	TAL protein	crRNA/sgRNA
Binding specificity	Long sequences of nucleotides <sup>a</sup>	3 nucleotides	1 nucleotide <sup>b</sup>	1/1 nucleotide pairing
Endonuclease	- <sup>a</sup>	FokI <sup>c</sup>	FokI <sup>c</sup>	Cas9
Function specificity	monomer	dimer	dimer	monomer
Design/Engineering	very difficult	difficult	simple	very simple
Restriction in target site	Chromatin compaction	G-rich sequence	Start with T and end with A	End with a NGG sequence
Target site length	18-44bp	18-36 bp <sup>d</sup>	24-40 bp	22-25bp
Targeting frequency	low	high (one/ 100bp)	high (one/bp)	high (one/4 or 8bp)
Specificity	high	Low to moderate <sup>e</sup>	moderate	high
Sensitivity to DNA methylation	Yes	Yes	Yes	no <sup>h</sup>
Off-targets	variable	low <sup>e</sup>	very low	variable
Size	Small size	Small size (~ 1kb/monomer)	Large size (~ 3kb/monomer)	Large size (4.2kb Cas9)
Commercially available, Cost	Yes, high	Yes, high	Yes, moderate	Yes, low
Patents concern	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Type of editing</b>				
Gene KO (Indels & frameshift)	Yes	Yes	Yes	Yes
Multiplex KO	No data <sup>j</sup>	Very limited	Limited	Yes (up to 8 alleles) <sup>i</sup>
Gene correction/point mutagenesis (repaired basepairs)	No data <sup>j</sup>	Yes	Yes	Yes
Gene addition/sequence replacement (integrated gene cassette)	No data <sup>j</sup>	Yes	Yes	Yes
Gene deletion (deleted gene fragments)	No data <sup>j</sup>	No data	No data	Yes
Prime and base editing	No data <sup>j</sup>	No data	No data	Yes

<sup>a</sup>DNA-binding specificities and cleavage mechanism combined in the same protein (Galetto et al., 2009)

<sup>b</sup>TALE protein consist of 34 amino acid repeat domains, each one recognizing a single DNA nucleotide; highly conserved, excepting two hypervariable residues at positions 12 and 13, which confer the specificity of TALE.

<sup>c</sup>FokI cleaves only in its dimeric form

<sup>d</sup>association of 3 to 6 ZF DNA binding domains fused to the FokI catalytic domain. Binding of two ZFN-FokI heterodimers to two contiguous DNA sequences and separated by a 5-7bp gap.

<sup>e</sup>specificity depends on number and selected ZF modules

<sup>f</sup>improvements made at the interface level of dimerization of FokI to reduce genotoxicity linked to its homodimerization

<sup>h</sup> no direct effect of methylation on Cas9 binding or effectivity (Verkuijl and Rots, 2019)

<sup>i</sup>difficult on same chromosome. Limitations overcome by Prime and base editing (cf **Table 3**)

<sup>j</sup>The difficulty in designing meganucleases has limited their application in creating new model organisms

Peu de temps après, les « Transcription activator-like effector nuclease » (TALEN) ont été développées. Les premiers modèles sur cellules humaines (Miller et al., 2011), hESC, hiPSC (Hockemeyer et al., 2011) et embryons de rats (Tesson et al., 2011) ont été publiés la même année, puis chez la souris, deux ans plus tard (Sung et al., 2013; Wefers et al., 2013) (**Figure 2**). Elles utilisent également la nucléase FokI en

dimères, comme les ZFN, mais différent par l'utilisation de la TALE protéine issue de la bactérie *Xanthomonas genus*, pour la fixation à l'ADN. Cette protéine a l'avantage de cibler spécifiquement une base ADN à partir de deux de ses résidus (**Figure 4C**). Ainsi, un module TALEN contenant les résidus Asn-Ile (NI), Asn-Gly (NG), Asn-Asn (NN) ou His-Asp (HD), reconnaîtra spécifiquement la base ADN A, T, G ou C, respectivement sur le génome ciblé (Miller et al., 2015).

Finalement, « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » (CRISPR)/ « CRISPR associated system » (Cas) 9 (type II), découvert chez *Streptococcus pyogenes*, a été utilisé pour modifier génétiquement des cellules humaines (Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013), hESC (Rong et al., 2014), hiPS (Horii et al., 2013; Mali et al., 2013) ou embryons de rats et souris (Li et al., 2013a, 2013b; Wang et al., 2013) par DSB avec des efficacités similaires aux autres nucléases (**Figure 2**). Cet outil a apporté une nouvelle révolution grâce à la possibilité d'utiliser la même nucléase pour tous les projets, contrairement aux méganucléases, ZFN et TALEN. Avec CRISPR/Cas9, le locus d'intérêt est ciblé de façon spécifique grâce à la complémentarité à un guide ARN (gARN) d'une centaine de bases qui est très facile à produire en laboratoire (**Figure 4D**). Ses composants et son mécanisme seront détaillés dans la section suivante.

Un grand nombre d'autres systèmes CRISPR ont été découverts et caractérisés depuis (Makarova et al., 2020) dont certains ont été appliqués à l'édition de génome. En particulier, Cpf1, également nommé Cas12a (type V), est le plus intéressant. Contrairement à Cas9 qui cible des régions riches en G et coupe de façon franche, il cible des séquences riches en T et crée des extrémités débordantes. De plus, des systèmes CRISPR associés à des transposases ont été récemment découverts et semblent prometteurs pour appliquer à l'édition de génome (Strecker et al., 2019).

La simplicité du système CRISPR/Cas9 et son efficacité font qu'il reste, encore aujourd'hui, le plus utilisé pour l'édition de génome. Des systèmes d'édition alternatifs (**Figure 2**) ont donc été développés à partir de Cas9 (Anzalone et al., 2020). Le « Cytosine Base Editor » a été mis au point sur cellules humaines pour muter un C en T (Komor et al., 2016) puis amélioré sur plusieurs générations. L'« Adenine Base Editor » transforme un A en G et a démontré, sur cellules humaines, une meilleure efficacité d'édition de génome que la DSB par Cas9 (Gaudelli et al., 2017). Ces systèmes, du fait de la présence de Cas9 nickase ou Cas9 inactivé (dead Cas9), n'induisent pas de DSB et permettent la création de mutations sur différents loci du même chromosome. Ils ont donc l'avantage de s'affranchir des mécanismes de réparation de DSB et ne nécessitent pas l'utilisation d'un ADN donneur. Ils peuvent également être utiles pour muter des types cellulaires où la recombinaison homologue est absente. Néanmoins, il est difficile de cibler une base précise et la mutation se limite à C en T ou A en G en fonction du système, ce qui restreint leur utilisation. Ces deux systèmes ont été testés sur hESC (Qi et al., 2020) et hiPS (Sürün et al., 2020). Des modèles de souris et de rats ont été développés à partir d'« Adenine Base Editor » (Yang et al., 2018) mais seuls des modèles de souris ont été publiés avec « Cytosine Base Editor » (Liang et al., 2017a). Pour s'affranchir de ces

limitations, le « Prime Editing » a été développé sur cellules humaines (Anzalone et al., 2019). Les deux premières versions de ce système ont été créées à partir d'une seule Cas9 nickase fusionnée à une transcriptase et d'un gARN fusionné à une amorce (prime editing gARN). Ainsi, le brin non ciblé est coupé et l'amorce induit la reverse transcription du prime editing gARN. La troisième version du système a intégré une deuxième nickase avec son propre gARN pour couper le brin cible et éditer de façon plus efficace. Le prime editing a été appliqué aux hESC (Habib et al., 2021), hiPS (Sürün et al., 2020) et embryons de souris (Liu et al., 2020b) mais pas encore aux embryons de rats.

### ***Conclusion et perspectives des modèles et leurs modifications génétiques***

Les modèles cellulaires et animaux sont complémentaires et permettent une modélisation biologique de plus en plus précise et pertinente. Les avancées technologiques des dernières décennies offrent un large panel d'outils à la fois sur les modifications génétiques ou transcriptionnelles, les types d'espèces animales ou types cellulaires utilisables, mais aussi sur la possibilité de générer des modèles cellulaires de plus en plus flexibles.

Toutefois, les cultures cellulaires 2D historiques présentent de réelles limites de pertinence de modèle comme le nombre de types cellulaires co-cultivés ou encore l'incapacité des cellules à reproduire le contexte réel des tissus (interactions avec d'autres types cellulaires, hormones, facteurs...). Celles-ci ont été compensées par les modèles *in vivo*, longtemps limités à la souris, mais les dernières avancées en édition de génome ont permis d'élargir le champ des possibles à d'autres espèces, en particulier le rat (Neff, 2021). Néanmoins, les modèles animaux coûtent cher et présentent des problèmes éthiques importants.

Le développement des iPSC permet aujourd'hui d'avoir une plus grande flexibilité sur les modèles cellulaires humains, par exemple, en rendant accessibles des types cellulaires qui ne l'étaient pas auparavant chez l'Homme. Leur capacité de différenciation multiple en fait un support de choix pour des modèles nouvelles générations qui tendent à reproduire la complexité des systèmes entiers *in vitro* (tissus, organes...) tels que les modèles de culture en 3D. Par exemple, les organoïdes permettent de modéliser de plus en plus fidèlement la réalité biologique chez l'Homme (Rossi et al., 2018) avec notamment des progrès sur leur vascularisation (Yu, 2021). Des organoïdes ont été développés dans un grand nombre de domaines, notamment pour la modélisation de tumeurs solides (Xu et al., 2021), du foie (Lam et al., 2021), du cœur (Zhao et al., 2021), des poumons (Lu et al., 2021), du rein (Yousef Yengej et al., 2020), de l'intestin (Almeqdadi et al., 2019), mais aussi pour la modélisation du cerveau (Sidhaye and Knoblich, 2021).

Sur l'ensemble de ces modèles biologiques, animaux, cellulaires 2D ou 3D, l'édition de génome permet de reproduire un contexte génétique physiologique ou physiopathologique essentiel. L'évolution des techniques s'est progressivement accélérée pour tendre vers des outils de plus en plus précis, spécifiques avec un développement facile et à moindre coûts. L'intérêt pour CRISPR/Cas9 a été grandissant et général et a rapidement permis une bonne compréhension du système et des mécanismes de réparation liés.

# CRISPR/Cas9 : structure, action et optimisation

## Le guide ARN

### a. Structure : dgARN et sgARN

Dans la nature, Cas9 est guidée par un dual gARN (dgARN) formé entre le crRNA et le tracrRNA (**Figure 5A**). Le tracrRNA permet les interactions avec Cas9 et les 20 nucléotides du « spacer » (crRNA) et lui confère sa spécificité (Jinek et al., 2012). La région « seed » correspond aux 12 derniers nucléotides du « spacer » et un appariement parfait dans cette région est essentiel à la fonctionnalité du complexe ribonucléoprotéine (RNP) (Pattanayak et al., 2013). Pour simplifier son utilisation, une « tetraloop » a été ajoutée (**Figure 5B**) pour former le « single gARN » (sgRNA) (Jinek et al., 2012). Cette « tetraloop » ainsi que sa longueur n'est donc pas essentielle à l'activité du guide et peut être modulée. Les deux formats sont utilisés pour l'édition de génome (Zhang et al., 2021).

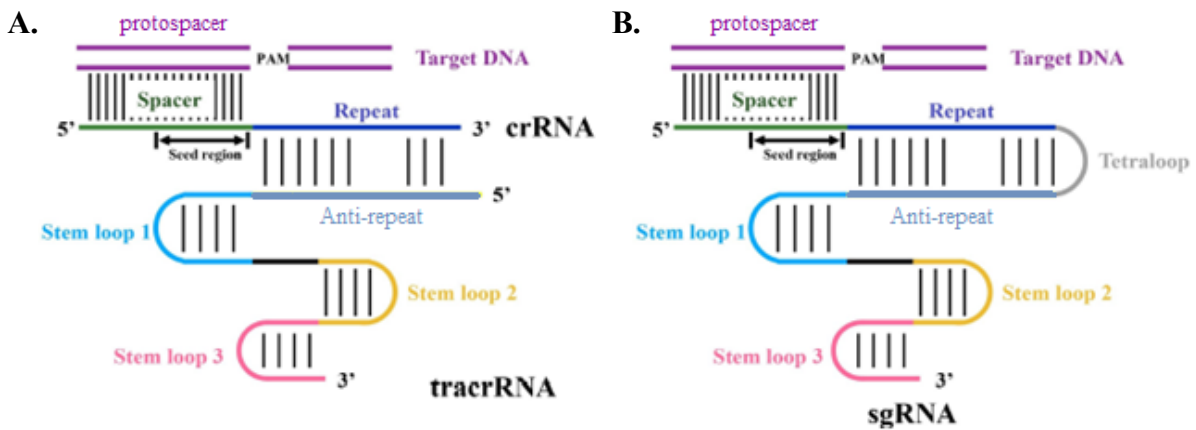


Figure 5: Schéma des deux types de guide ARN utilisés après reconnaissance de leur cible d'après Zhang et al., 2021. A. Structure du dgRNA après formation du duplex. B. Structure du sgRNA avec la tetraloop (en gris clair).

Lorsque le RNP détecte l'ADN cible le gARN prend alors une conformation en T (**Figure 6**) avec la « stem loop1 » comme élément central (Nishimasu et al., 2014).

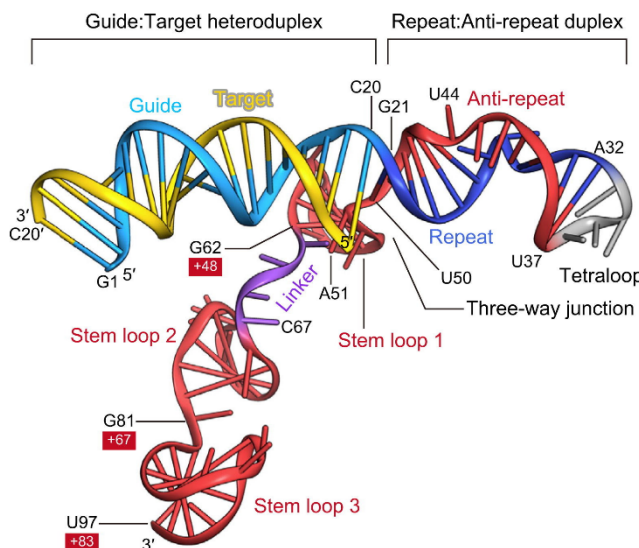


Figure 6: Architecture du gRNA au sein du RNP lorsque celui-ci a détecté un ADN cible d'après Nishimasu et al., 2014.

## b. Ingénierie du gARN

De nombreuses publications en édition de génome, modulation de la transcription ou imagerie ont démontré les multiples possibilités d'ingénierie de ce gRNA (Zhang et al., 2021). Il est donc possible de tronquer, ou étendre la séquence du gARN (**Figure 7**). En effet, le « spacer » peut être réduit à 17 bases par une suppression des bases en 5' pour réduire les « off-target » (Dahlman et al., 2015; Kiani et al., 2015). L'utilisation de « spacer » de 14 ou 16 bases ne permet donc pas la coupure de l'ADN cible mais permet toutefois la reconnaissance de celui-ci et sa fixation (Kiani et al., 2015). Il est également possible de tronquer le 3' du crRNA et le 5' du tracrRNA mais la suppression des « stem loops » 2 et 3 influe sur la stabilité du complexe *in vivo* (Hsu et al., 2013). De plus, les modules « repeat » et « anti-repeat » sont vitaux pour la liaison à Cas9 et ne doivent pas être modifiés (Nishimasu et al., 2014) mais une extension au niveau de la « tetraloop » est possible et induit même une augmentation de l'édition sur cellules (Dang et al., 2015). Tran et al., ont inséré un aptamère MS2 au niveau de cette « tetraloop » et au niveau de la « stem loop 2 » afin d'apporter, via une fusion avec la « MS2 coat protein », des molécules impliquées dans les mécanismes de réparation médiés par homologie avec les séquences endogènes (Tran et al., 2019). De la même façon, Carlson-Stervermer et al., ont introduit un aptamère S1m (capable de fixer la streptavidine et de se lier à un ADN donneur biotinylé) au niveau de la « tetraloop », « stem loop 2 » et en 3' du sgRNA avec une perte d'activité limitée (Carlson-Stervermer et al., 2017).

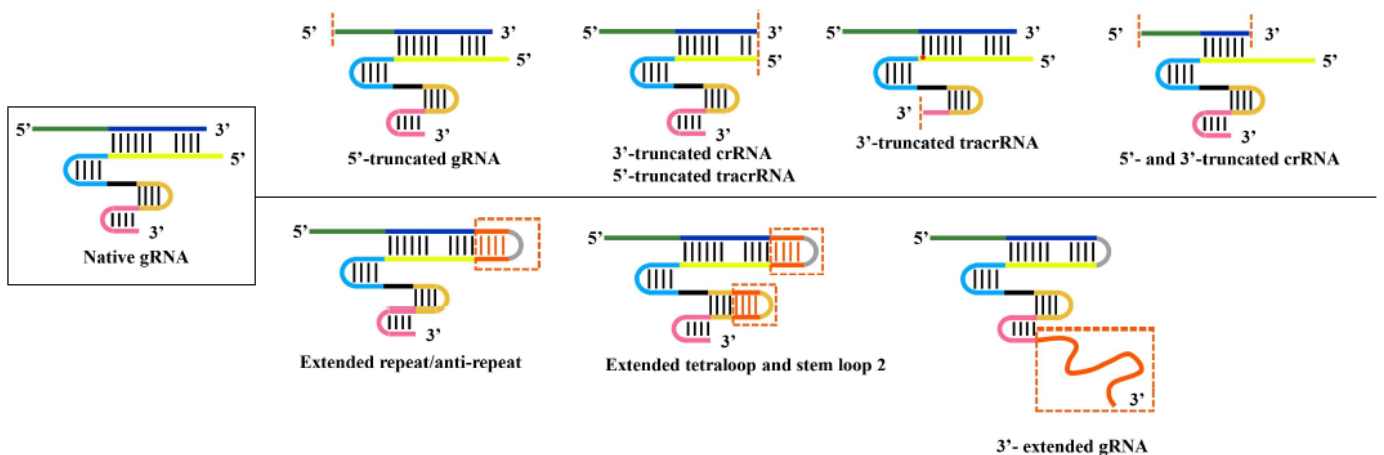


Figure 7: Ingénierie du gARN par suppression de séquence (panneau du haut) ou extension des structures de celui-ci (panneau du bas) d'après Zhang et al., 2021.

La possibilité de remplacer certaines bases par des bases ADN, en particulier les 10 (Yin et al., 2018) ou 19 premières dans le cas d'un haut contenu en GC (Kim et al., 2019) tout en maintenant une fonctionnalité normale confirme bien la flexibilité du guide ARN (**Figure 8**). Le remplacement de 22 bases en 3' du crRNA induit même une augmentation de l'efficacité de coupure du RNP alors que la région « seed » est particulièrement sensible (Kartje et al., 2018). D'autres études ont également montré différentes conversions ARN en ADN avec plus ou moins d'effet sur l'activité du RNP *in vitro* et sur cellules, indiquant que la structure est finalement le point le plus essentiel pour la plupart des interactions avec Cas9 (Rueda et al., 2017; Yin et al., 2018; Kartje et al., 2018; O'Reilly et al., 2019; Kim et al., 2019). Toutefois,

l'intégralité du crRNA et du tracrRNA ne peut pas être modifiée en ADN sous peine de perdre toute l'activité du système.

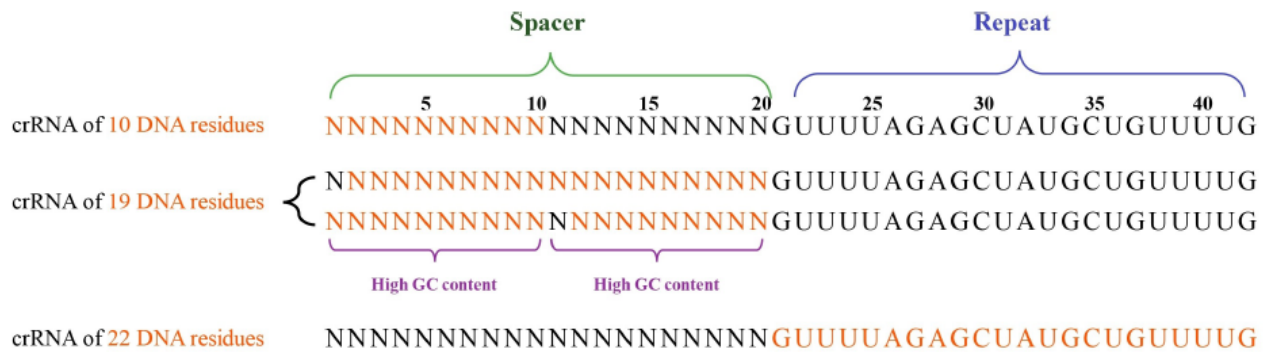


Figure 8: Schéma des possibilités de remplacement de bases ARN par des bases ADN d'après Zhang et al., 2021. Bases ARN modifiables en ADN notées en orange.

## La protéine Cas9

### a. Structure et domaines fonctionnels

Cas9 est une protéine d'environ 160KD (1368 acides aminés) avec une architecture bilobée répartie en sept domaines fonctionnels (Figure 9 d'après Zhu et al., 2019). Le lobe NUC comprend les domaines impliqués dans l'activité nucléase (RuvC, HNH, « protospacer adjacent motif (PAM)-interacting » (PI) ou C-terminal (CTD) domaine) et le lobe α-hélicale REC comprend les domaines (REC1, REC2, REC3 et « bridge helix » (BH) riche en arginine (Arg)) impliqués dans les mécanismes de reconnaissance du gARN et assistent l'activation du domaine HNH. Les fonctions de l'ensemble des domaines de Cas9 sont répertoriées dans le Tableau 1 Tableau 2.

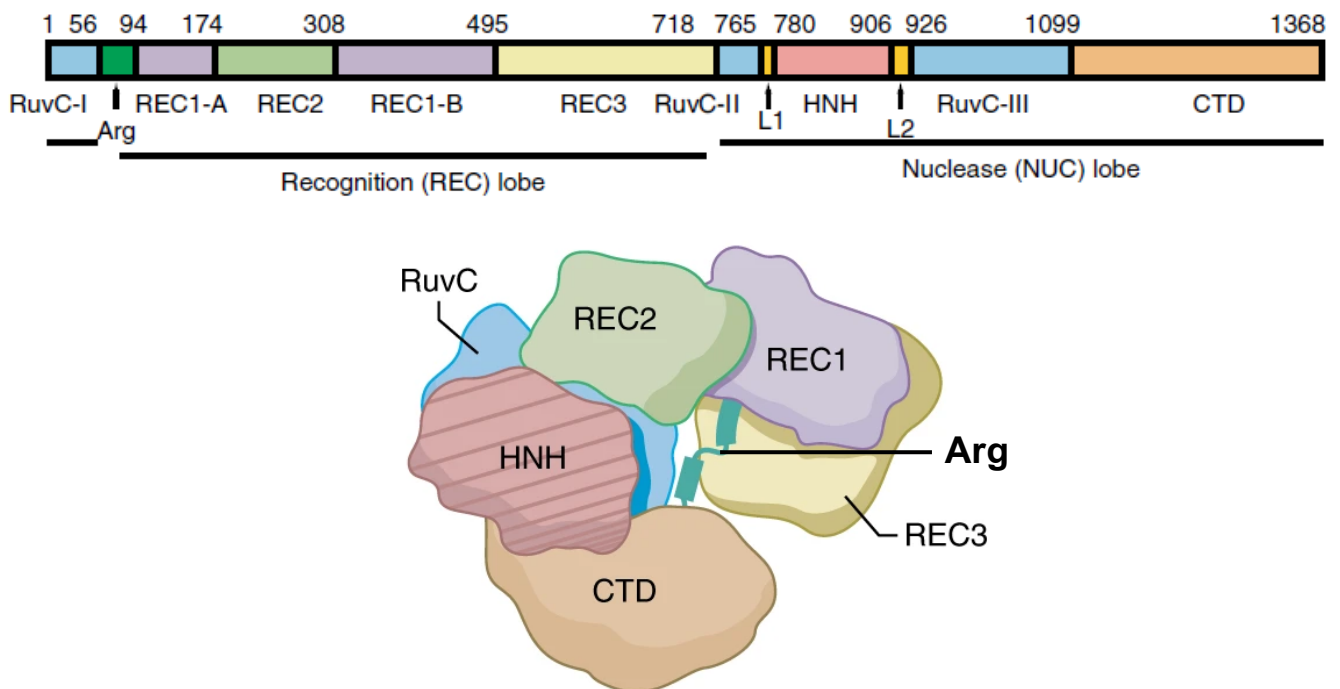


Figure 9: Schéma de Cas9 seule (PDB 4CMP) et ses différents domaines fonctionnels.

Tableau 2: Détails des domaines composant Cas9 avec leur fonctionnalité associée.

Lobe	Domaine	Fonction
NUC	RuvC	coupe le brin non ciblé (Jinek et al., 2012) sous la dépendance de deux $Mg^{2+}$ et interagit en particulier avec l'hétéroduplex gARN:ADN et les « stem loops » 2 et 3 du gARN (Nishimasu et al., 2014).
	HNH	HNH coupe le brin complémentaire au gARN (Jinek et al., 2012) sous la dépendance d'un $Mg^{2+}$ (Nishimasu et al., 2014). L'état de SpCas9 est principalement déterminé par celui de son domaine HNH qui est à l'équilibre entre états actif et inactif (Sternberg et al., 2015).
	CTD PI	ou placé en C terminal, il est fondamental pour l'activité nucléase de Cas9 et permet l'interaction avec le PAM sur le brin ADN non ciblé. Il interagit particulièrement avec le module « repeat » et les trois « stem loops » du gARN (Nishimasu et al., 2014).
REC	BH Arg	ou domaine très conservé et riche en arginines qui sert de pont entre les deux lobes et permet la reconnaissance de la région « seed » du « spacer » du gARN (Nishimasu et al., 2014).
	REC1	critique dans la reconnaissance du module Repeat:anti-repeat du gRNA par Cas9 et pour l'activité de clivage de Cas9 (Nishimasu et al., 2014).
	REC2	non nécessaire à la coupure, il bloque le domaine HNH dans sa forme inactive et doit subir un réarrangement pour permettre l'activation du domaine HNH (Zhu et al., 2019).
	REC3	effecteur allostérique de l'activation du domaine nucléase HNH par reconnaissance de l'hétéroduplex ARN : ADN (Chen et al., 2017b).

### **b. Conformations**

Des conformations de Cas9 et son complexe RNP à différentes étapes de son activité (**Figure 10**) ont été décrites (Zuo and Liu, 2020).

**Apo Cas9** (**Figure 10**, PDB 4CMP) est sous forme libre, désordonnée et inactive (Jinek et al., 2014). Elle peut toutefois se fixer à une cible de façon non-spécifique et être détachée rapidement en présence de compétiteurs tels qu'un gARN ou de l'héparine (Sternberg et al., 2014). Elle subit un changement drastique de conformation après reconnaissance du gRNA (Jiang et al., 2015) pour former le **complexe RNP** (**Figure 10**, PDB 4ZT0). Ce complexe RNP est capable d'interagir avec différentes cibles ADN :

- **brin ADN cible seul** (**Figure 10**, PDB 4OO8) pris en charge par le domaine nucléase HNH (Nishimasu et al., 2014).
- **vérification du PAM** (**Figure 10**, PDB 4UN3) se fait au niveau du domaine PI (Anders et al., 2014)
- ADN double brin conduit à un état de **pré-clivage** (**Figure 10**, 5F9R) par la prise en charge du brin non complémentaire au gARN par le domaine nucléase RuvC (Jiang et al., 2016).

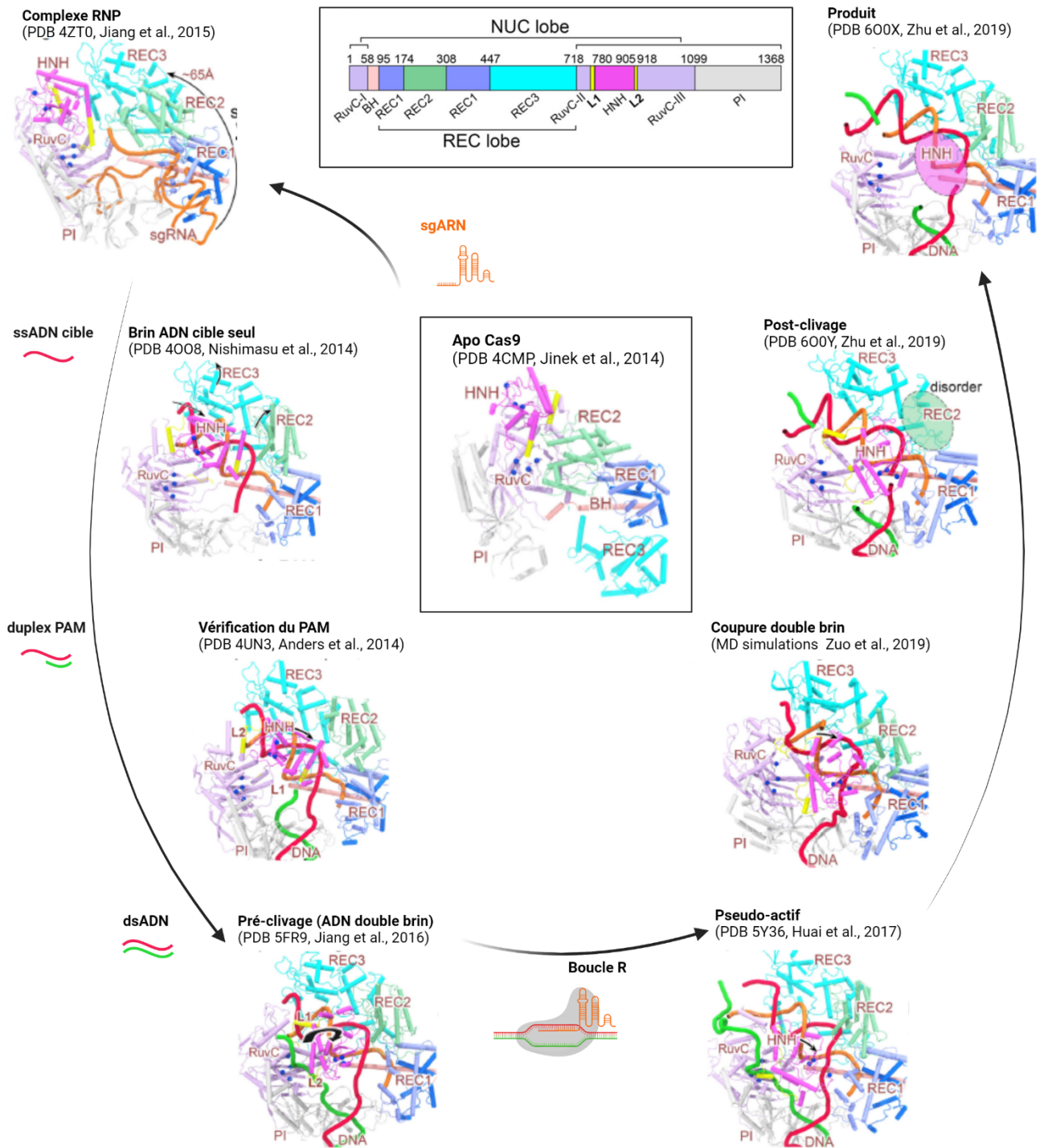


Figure 10: Conformations de Cas9 répertoriées et associées à son activité de l'état libre à l'après coupure, inspiré de Zuo et Liu., 2020. Le gARN est indiqué en orange, le brin ADN cible en rouge, le brin ADN non cible en vert. Seule la partie 5' du gRNA qui reconnaît la cible est montrée pour simplifier la figure, excepté pour le complexe RNP (4ZT0). Les petites sphères bleues représentent les atomes alpha-carbones des résidus actifs des domaines nucléases. Les réarrangements majeurs sont modélisés par de grandes flèches incurvées. Les domaines REC2 et HNH sont désordonnés (illustrés par un ovale transparent) par alternance dans les conformations après clivage (600Y) et produit (600X).  
**Abbreviations:** BH, bridge helix; PI, PAM-interacting domain; sgARN, guide ARN simple; ssADN, ADN simple brin ; dsADN, ADN double brin, MD, Molecular modeling and dynamics simulations.

La formation d'un hétéroduplex ADN génomique (ADNg):gARN appelé boucle R donne un état **pseudo-actif** (**Figure 10**, PDB 5Y36) (Huai et al., 2017). Avant coupure, un équilibre entre l'état pseudo-actif et l'état actif est maintenu (Sternberg et al., 2015; Zuo et al., 2019). La **coupure double brin** (**Figure 10**) est irréversible, l'équilibre entre ces deux états est donc perdu et permet à tous les RNP à l'état pseudo-actif de passer à l'état actif. La conformation prise lors de la coupure est basée sur une simulation mathématique car cet état n'a jamais été capturé et est encore à confirmer (Zuo et al., 2019). Le RNP passe ensuite dans un état **post clivage** (**Figure 10**, PDB 6O0Y) puis dans un état de **produit** (**Figure 10**, PDB 6O0X) après avoir désordonné son domaine REC2 puis HNN respectivement (Zhu et al., 2019).

Les changements de conformation du complexe RNP après liaison à sa cible sont assez légers en comparaison de la formation du complexe RNP, ce qui indique que le gARN est l'élément clé de la fonction du système (Jinek et al., 2014). L'affinité de Cas9 pour le gARN est d'environ 30pM (Ma et al., 2015).

### ***Mécanisme d'action du RNP pour créer une DSB***

L'analyse structurale et dynamique de ces conformations a permis de comprendre le mécanisme d'action complet de Cas9 (Jiang and Doudna, 2017) (**Figure 11**). En particulier, le processus de reconnaissance d'un ADN double brin a été bien décrit ainsi que la formation de la boucle R. Les étapes de coupure double brin et celles qui suivent ont été décrites plus récemment (Zhu et al., 2019; Zuo et al., 2019) et nécessitent encore un approfondissement pour comprendre tous les détails moléculaires impliqués.

En présence d'un gARN, Cas9 forme un complexe RNP capable de reconnaître un ADN de façon spécifique. Pour cela, Cas9 cribble l'ADN double brin à la recherche d'une séquence PAM (5' NGG 3'). En cas d'absence du PAM, Cas9 se dissocie rapidement et continue sa recherche. Lorsqu'elle détecte la présence du PAM, Cas9 teste la complémentarité de la séquence « seed » du gARN puis du reste du « spacer » (Sternberg et al., 2014). Ce criblage induit donc une invasion du gARN par dénaturation locale au sein de l'ADN double brin formant ainsi un hétéroduplex ADN:ARN appelé boucle R. Cette boucle s'étend jusqu'au criblage entier du brin cible complémentaire au gARN. Une complémentarité parfaite est requise avec la séquence « seed » pour conduire à une coupure alors que certaines discordances sont tolérées sur le reste du « spacer » (Wu et al., 2014). Le brin cible (complémentaire du gARN) est coupé par le domaine HNH alors que le brin non ciblé est coupé par le domaine RuvC (Jinek et al., 2012) sous la dépendance du magnésium (Nishimasu et al., 2014). Après coupure, Cas9 reste fixée sur le produit de la coupure de façon temporaire (Sternberg et al., 2014).

Une analyse cinétique détaillée de l'activité du complexe RNP a montré que la coupure sur les deux brins est un processus très rapide (4 à 5 s<sup>-1</sup>) et que l'étape limitante serait finalement la formation de la boucle R (1,6 s<sup>-1</sup>) (Gong et al., 2018). Cette dernière serait un procédé en deux étapes séquentielles avec tout d'abord un alignement du domaine HNH, puis du domaine RuvC qui conduirait à un clivage des deux domaines simultanément (Gong et al., 2018). Le domaine HNH montre une grande flexibilité suite à la coupure alors

que le brin non complémentaire au gARN est libéré du site actif de RuvC exposant ainsi le 3' du brin non ciblé aux acides nucléiques et protéines (Wang et al., 2021).

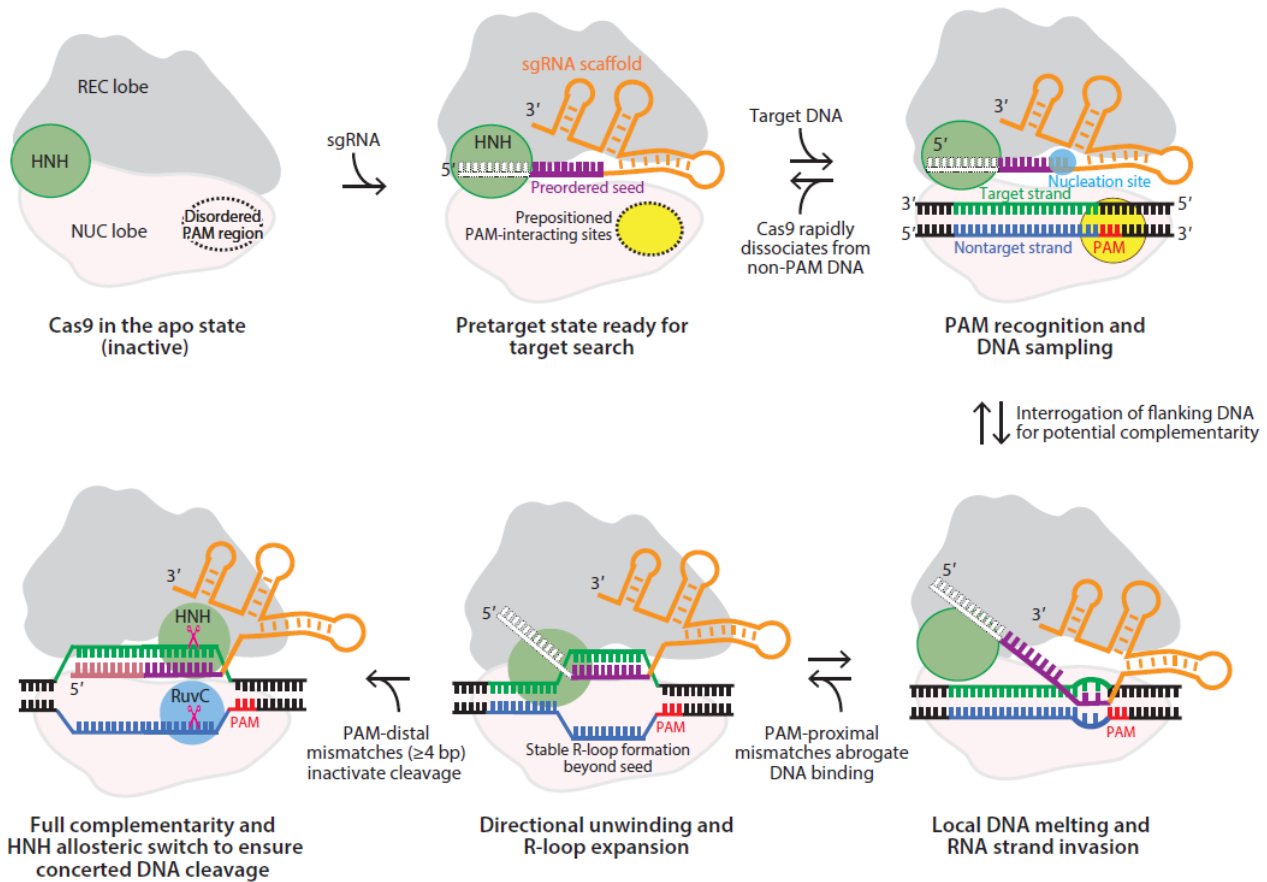


Figure 11: Schéma du mécanisme d'action de Cas9 depuis la formation du complexe RNP jusqu'à la coupure simultanée des deux brins d'un ADN d'après Jiang et Doudna., 2017. La fente du domaine PI est indiquée en cercle pointillé. Le brin ARN blanc en pointillé correspond aux nucléotides non ordonnés du « spacer » qui ne font pas partie de la séquence « seed ». Abréviations : bp, paire de bases ; NUC, lobe nucléase ; PAM, protospacer adjacent motif ; REC, lobe de reconnaissance ; sgARN, guide ARN simple.

Le complexe RNP est capable de cribler et couper des molécules d'ADN double brin très efficacement. Il est capable de faire de même avec un ADN simple brin de façon moins efficace malgré une affinité similaire du complexe RNP pour ces deux types de cibles (10nM pour l'ADN double brin et 10-60nM pour l'ADN simple brin cible) contrairement à un ADN simple brin non ciblé (>1000nM) (Ma et al., 2015; Sternberg et al., 2014). L'utilisation d'un oligodésoxynucléotide simple brin (ssODN) complémentaire contenant le PAM permet d'améliorer cette efficacité en créant une zone double brin autour du PAM (Sternberg et al., 2014) et de fixer et couper des ARN simple brin (O'Connell et al., 2014).

Des variants de Cas9 plus flexibles dans leur motif de reconnaissance à l'ADN ont été développés pour tendre vers une reconnaissance quasi sans PAM (Figure 12 d'après Collias and Beisel, 2021) afin de ne plus se restreindre au NGG. Ces variants incluent VQR, EQR, VRER, D1135E (Kleinstiver et al., 2015), VRQR (Kleinstiver et al., 2016), QQR1 (Anders et al., 2016), xCas9 (3.7) (Hu et al., 2018), SpCas9-NG

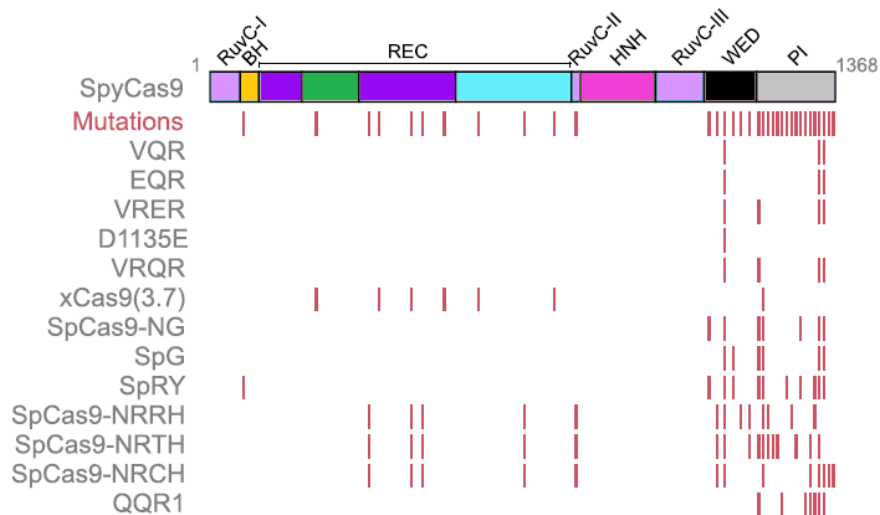


Figure 12: Mutants et résidus mutés de Cas9 pour rendre le PAM plus flexible d'après Collias and Beisel, 2021.

(Nishimasu et al., 2018), SpG, SpRY (Walton et al., 2020), SpCas9-NRRH, SpCas9-NRTH, SpCas9-NCRH (Miller et al., 2020).

### Voies de réparation de DSB

La génération d'une DSB permet d'enclencher et d'utiliser les systèmes de réparation de cassures ADN endogènes afin de réaliser des modifications génétiques ciblées. Les mécanismes de ces voies sont assez bien compris mais ne sont pas encore totalement maîtrisés (**Figure 13** d'après Xue and Greene, 2021), notamment pour réparer une DSB créée par une nucléase spécifique de gènes. Néanmoins, certains leviers ont été identifiés pour orienter la réparation vers des voies choisies. Différentes stratégies d'ingénierie du gARN ou de Cas9 (Chenouard et al., 2021a) ou de traitements par petites molécules (Bischoff et al., 2020) ont été décrites. Sur cellules, notamment des hiPSC, un choc thermique ainsi que des traitements par de petites molécules pour synchroniser la progression dans le cycle cellulaire et moduler les voies de réparation ont permis d'améliorer l'efficacité des KI (Maurissen and Woltjen, 2020).

Le « classical non-homologous end joining » (cNHEJ) est la voie la plus utilisée par la cellule (**Figure 13A**). En effet, elle ne nécessite aucune homologie avec une matrice de réparation, ce qui la rend accessible à toutes les étapes du cycle cellulaire. Après DSB, les extrémités libres franches ne doivent pas ou très peu être réséquées pour permettre la fixation de l'hétérodimère Ku70-Ku80 puis de la « DNA-dependent protein kinase catalytic subunit » (Meek et al., 2008). Ainsi, le complexe ligase IV-XRCC4-XLF4 sera recruté et va pouvoir réparer en fixant les deux extrémités entre elles (Costantini et al., 2007). Souvent, les extrémités générées par la DSB ne sont pas complémentaires ou contiennent des nucléotides modifiés, ce qui entraîne la nécessité de l'intervention de diverses nucléases (Artemis, aprataxin, APLF...) et polymérases ( $\lambda$  et  $\mu$ ) pour créer les extrémités nécessaires à l'action de la ligase 4 (Menon and Povirk, 2016). Ainsi, le cNHEJ génère typiquement des courtes insertions ou délétions de nucléotides (indels). Il est utilisé pour créer des modèles knockout (KO) c'est pourquoi il est considéré comme une voie de réparation mutagène.

Les autres voies de réparation majeures du DSB, c'est-à-dire « microhomology-mediated end joining » (MMEJ), « single-strand annealing » (SSA) et « homologous recombination » (HR) peuvent toutes utiliser une matrice de réparation qui contient des homologies avec la séquence à réparer, c'est pourquoi elles ne sont mises en jeu que lors de la phase S/G2 du cycle cellulaire, lorsque la chromatide sœur est disponible (Arnoult et al., 2017). Elles permettent la génération de modèles knockin (KI) à partir d'un ADN donneur contenant des bras d'homologie avec la séquence ciblée de part et d'autre de l'insert.

La première étape de résection des extrémités 5' générées par cette cassure est commune à ces voies médiées par l'homologie (**Figure 13B**). Cette première étape consiste tout d'abord en le recrutement du complexe MRE11-RAD50-NBS1 sur le site de coupure (Syed and Tainer, 2018). CtIP phosphorylé est ensuite recruté pour activer MRE11 qui va cliver le brin dont l'extrémité 5' est à proximité du DSB afin de passer outre les facteurs fixés aux extrémités du DSB (notamment Ku pour inhiber le cNHEJ). Ce brin coupé sera dégradé par l'activité exonucléase 3' vers 5' de MRE11 créant ainsi une courte extrémité 3' débordante (de quelques bases à quelques centaines de bases) (Myler et al., 2017). La phosphorylation de CtIP est dépendante du cycle cellulaire, c'est donc un mécanisme clé de restriction de ces voies de réparation aux phases S/G2 (Batenburg et al., 2019).

Sans autre traitement de ces extrémités, celles-ci sont réparées par MMEJ (**Figure 13C**) (Seol et al., 2018). Pour cela, ces extrémités sont réalignées sur 1 à 25 bases homologues présentes près du site de coupure qui peuvent provenir de l'autre extrémité ou d'une matrice externe simple brin. Les séquences simple brin volantes sont éliminées, les trous dans la séquence complétés par l'ADN polymérase  $\Theta$  (Kent et al., 2015) et finalement les deux extrémités sont jointes par les ADN ligases I et III (Liang et al., 2008). Ces mécanismes génèrent également des indels ou des KI si un ADN donneur externe est utilisé comme matrice de réparation. Les mécanismes précis du MMEJ ne sont pas encore complètement résolus et nécessitent d'autres études.

La deuxième étape de résection permet une dégradation, cette fois-ci 5' vers 3', qui va élargir les extrémités 3' débordantes (plusieurs kilobases) (**Figure 13D**). EXO1 permet la dégradation d'ADN double brin alors que DNA2 dégrade uniquement de l'ADN simple brin et requiert donc l'aide d'une hélicase (BLM ou WRN) (Nimonkar et al., 2011). Ces longues extrémités débordantes peuvent ainsi être recouvertes par RPA pour éviter leur dégradation et la formation de structures secondaires.

Lorsque cette DSB est réparée par SSA, RAD52 se fixe sur les longues extrémités débordantes générées afin de faciliter l'hybridation avec une séquence homologue endogène ou exogène d'au moins 20 bases (**Figure 13E**) (Bhargava et al., 2016). Ce réalignement génère des extrémités volantes qui sont éliminées par XPF-ERCC1 comme pour le MMEJ et génère cette fois de plus longues indels (Al-Minawi et al., 2008). Les polymérases et ligases impliquées dans ce mécanisme ne sont pas encore bien identifiées.

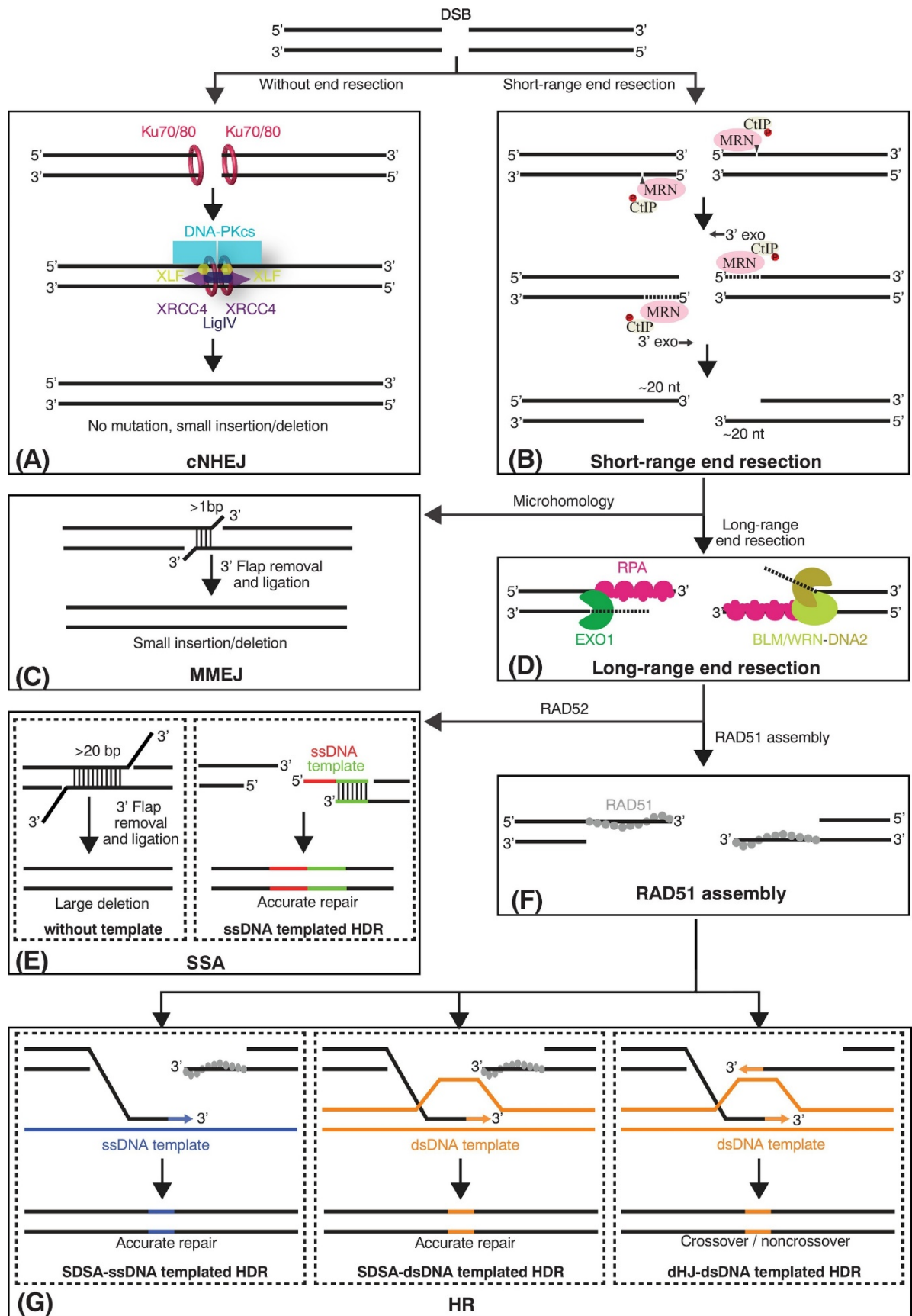


Figure 13: Mécanismes généraux des quatre voies principales de réparation d'une cassure double brin (DSB) d'après Xue and Greene, 2021. A. Les extrémités non traitées sont réparées par « classic non homologous end joining » (cNHEJ) par ligation des deux extrémités. B. Les extrémités sont résequées sur une courte distance par le complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) et d'autres facteurs pour créer des extrémités 3' débordantes. C. Sans autre traitement, la réparation par « microhomology end joining » (MMEJ) sera réalisée. D. Une seconde étape de résection plus large médiée par EXO1 ou BLM/DN2 a lieu et est suivie d'un recouvrement de cette extrémité débordante simple brin par RPA. E. L'action de RAD52 induit la voie de réparation « single-strand annealing » (SSA). F. L'assemblage d'un filament RAD51 sur ce complexe ADN simple brin-RPA induit la réparation par G. « homologous recombination » (HR). ssDNA, single-stranded DNA; dsDNA, double-stranded DNA; SDSA, synthesis-dependant DNA strand annealing; dHJ, double Holliday junction

Pour induire la HR, RPA est remplacé par RAD51 sous forme de longs filaments (**Figure 13F**). RAD51 permet ainsi l'hybridation de cette longue extrémité simple brin avec un ADN comportant une forte homologie (plusieurs centaines de bases), c'est-à-dire la chromatide sœur ou une longue matrice ADN exogène (Godin et al., 2016). L'invasion de cette extrémité 3' débordante marquée par RAD51 permet d'initier la synthèse ADN. Plusieurs mécanismes permettent de résoudre cette structure, le « synthesis-dependant DNA strand annealing » à partir d'une matrice simple ou double brin lorsque l'invasion est sur une seule extrémité et le « double Holliday junction » lorsque l'invasion est réalisée par les deux extrémités (Wright et al., 2018) (**Figure 13G**).

En fonction du type de modèle souhaité, une voie particulière est ciblée, notamment en adaptant la taille des bras d'homologie. La structure de l'ADN donneur qui servira de matrice de réparation est donc très importante pour la génération de modèles KI de façon efficace. La compréhension des mécanismes de réparation est donc essentielle et nécessite encore des études approfondies. Toutefois, notre équipe et d'autres, ont tenté d'orienter la réparation de DSB en apportant au site de coupure des molécules clés de ces voies de réparation, notamment CtIP et Exo1 par ingénierie de Cas9 (Charpentier et al., 2018; Tran et al., 2019) ou du gARN (Nakade et al., 2018; Tran et al., 2019). La présence de Cas9 a également été restreinte à la phase S/G2 du cycle cellulaire par fusion avec Geminin afin d'induire une dégradation lors de la phase M et G1 (Charpentier et al., 2018; Gutschner et al., 2016; Lomova et al., 2019).

### ***Aspects importants pour un projet d'édition de génome efficace et spécifique***

Chacun des composants du système peut être produit de différentes manières et apporté sous différents formats qui vont influencer l'édition de génome. Il est donc important de faire les bons choix pour une édition de génome efficace et à moindre coût.

Des événements non attendus peuvent accompagner une édition efficace, il est donc également important de les minimiser et de les détecter le cas échéant (Burgio and Teboul, 2020). Dans le cas de modèles animaux, les événements involontaires éventuels ayant lieu sur un autre chromosome que celui de la DSB seront ségrégués au cours des croisements et ne poseront donc pas de problèmes à long terme. Dans le cas d'événements sur le même chromosome ou pour le cas des modèles cellulaires, ces événements ne pourront pas être ségrégués, une attention particulière doit donc être portée à ces aspects lors de la conception des outils d'édition de génome pour un modèle particulier. Par exemple, la fréquence des larges délétions serait dépendante du type cellulaire édité et serait particulièrement faible sur les hiPSC (Wen et al., 2021). Il est donc nécessaire de définir des conditions optimales d'utilisation de ce système pour minimiser ces dommages collatéraux tout en maintenant une efficacité suffisante.

#### **a. Cas9**

Cas9 peut être apporté sous forme de plasmide, mRNA ou protéine. Le plasmide permettra une expression de Cas9 plus longue mais une coupure retardée puisque celle-ci devra être exprimée *in vivo* (**Figure 14**

d'après Kim et al., 2014). A l'inverse, Cas9 protéine induira une coupure *in vivo* immédiate et qui sera maximale dès 24h avec une disparition rapide de la protéine. Notre équipe et d'autres ont également montré que la pré-formation du complexe RNP *in vitro*, et donc l'apport de Cas9 sous forme de protéine, était plus efficace que l'apport de Cas9 sous forme mARN *in vivo* sur embryons de souris et de rats (Kim et al., 2014; Ménoret et al., 2015). Une présence courte de Cas9 permet d'éviter les multiples coupures et les éventuelles coupures sur des locus non ciblés (« off-target »). L'utilisation d'un plasmide d'expression de Cas9 ou d'une lignée exprimant Cas9 de façon constitutive n'est donc pas idéale pour une édition maîtrisée.

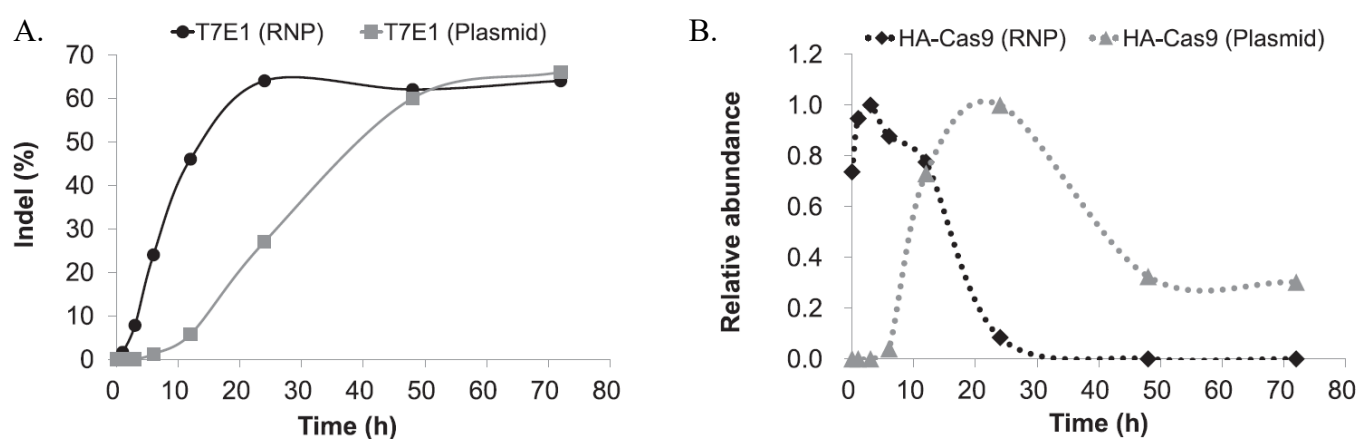


Figure 14: Comparaison de la coupure et de la présence de Cas9 au cours du temps lorsqu'elle est apportée sous forme de plasmide ou de complexe RNP pré-formé *in vitro* d'après Kim et al. 2014. A. Coupure évaluée au cours du temps par T7E1 après édition de cellules K562 ciblant le gène CCR5. B. Présence de Cas9 détectée par western blot au cours du temps.

Des animaux mosaïques, présentant au moins deux génotypes différents au sein du même individu, sont très fréquemment observés après édition de génome par CRISPR/Cas9 (Mehravar et al., 2019). Ce phénomène peut être expliqué par une édition tardive de Cas9 au cours du développement embryonnaire, engendrant des mutations différentes au sein des cellules d'un même embryon (Doi et al., 2021). Il a également été montré que la présence de Cas9 sur l'ADNg d'une cellule pouvait impacter la progression de la fourche de réplication et engendrer des instabilités génomiques. En parallèle, des micronoyaux et ponts entre chromosomes ont été observés sur embryons de souris après édition par CRISPR/Cas9 (Papathanasiou et al., 2021). De plus, lorsque l'édition a lieu sur des cellules somatiques, la transmission de l'allèle d'intérêt à la descendance n'aura pas lieu, la génération d'une lignée génétiquement modifiée est donc impossible dans ce cas. Ces phénomènes sont donc un enjeu important pour la génération de modèles animaux et, du fait de la complexité du génotypage de ces animaux, oblige à des croisements pour choisir le fondateur idéal. Il est donc important que Cas9 agisse dès le stade 1-cellule pour limiter les événements indésirables. Le mosaïsme peut être limité par différentes approches (Mehravar et al., 2019), par exemple une diminution de la demi-vie de Cas9 (Tu et al., 2017) ou, dans le cas d'une fertilisation *in vitro*, par une synchronisation des embryons pour édition au moment opportun (Hashimoto et al., 2016). Toutefois, la génération d'animaux mosaïques peut permettre l'étude de gènes essentiels dont le KO serait létal, ainsi que la comparaison de cellules normales ou mutées au sein d'un même tissu (Zhong et al., 2015).

Les connaissances accumulées sur les domaines fonctionnels de Cas9 ainsi que leurs mécanismes d'action, ont permis son ingénierie afin de limiter les éventuels effets involontaires. En particulier, l'utilisation d'une seule Cas9 nickase (Cullot et al., 2019) ou l'utilisation du « base editing » (Song et al., 2020) semblerait limiter les très grandes délétions. Des variants plus spécifiques ont également été développés pour limiter les « off-target » dont eSpCas9 (Slaymaker et al., 2016), SpCas9-HF1 (Kleinstiver et al., 2016), HypaCas9 (Chen et al., 2017b), evoCas9 (Casini et al., 2018), xCas9 3.7 (Hu et al., 2018), Sniper-Cas9 (Lee et al., 2018), SpCas9<sup>2Pro</sup> (Babu et al., 2019) (**Figure 15** d'après Zuo and Liu, 2020).

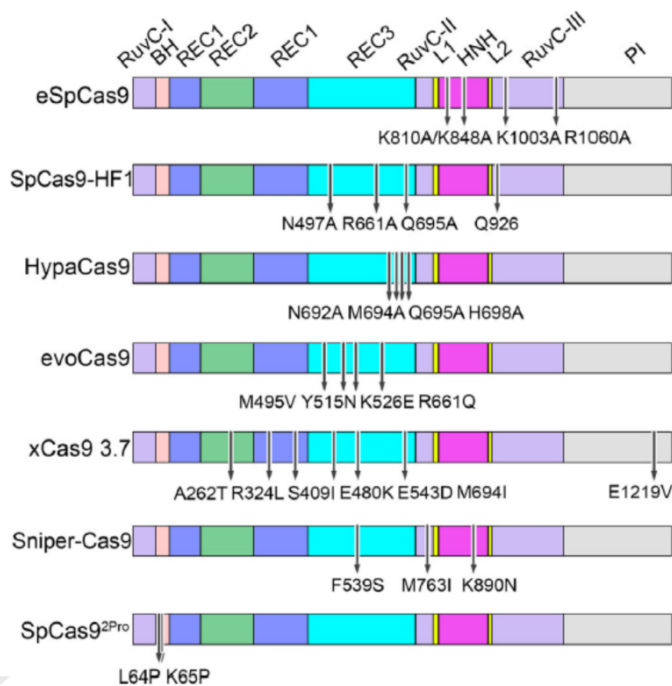


Figure 15: Détail des mutations générées sur Cas9 pour améliorer sa spécificité d'après Zuo et Liu, 2020.

## b. gARN

Les sgARN peuvent être transcrits *in vitro* (IVT) facilement et rapidement, c'est pourquoi ils ont longtemps été produits de cette façon. Toutefois, la démonstration de leur potentiel immunogène (Kim et al., 2018b) ainsi que la possibilité de produire des gARN synthétiques portant différents types de modifications chimiques évitant ce phénomène ainsi que leur dégradation (Allen et al., 2021), a rendu l'utilisation des gARN synthétiques de plus en plus fréquente. Ces gARN sont disponibles commercialement sous forme de sgARN ou dgARN et les études comparatives montrent des efficacités similaires (Shapiro et al., 2020; Terao et al., 2016). Néanmoins, les dgARN sont plus économiques car le tracrARN est utilisable pour l'ensemble des projets et celui-ci peut être marqué par un fluorophore, contrairement au sgrNA qui doit être repensé pour chaque projet et est difficile à produire sous forme marquée du fait de sa longueur. L'utilisation du dgARN permet donc de réduire les coûts. De plus, la société Integrated DNA Technologies (IDT), experte en synthèse d'acides nucléiques et qui commercialise également Cas9 protéine, a optimisé les séquences et modifications chimiques de son dgARN pour une efficacité maximisée. Ces séquences

sont détaillées dans la **Figure 16** et ont été réduites à 36 bases pour le crRNA et 67 bases pour le tracrRNA (Jacobi et al., 2017).



Figure 16: Séquence optimale du crRNA (36 bases) et du tracrRNA (67 bases) d'après Jacobi et al., 2017.

Au début de l'utilisation de CRISPR/Cas9 pour l'édition de génome, des effets « off-target » avaient été mis en évidence (Fu et al., 2013). Depuis, de nombreuses études ont permis de comprendre l'implication de la conception du gARN dans ces effets et de développer des outils informatiques de conception plus performants (Wang et al., 2020a). En utilisant ces outils, il est possible de concevoir des gARN efficaces et spécifiques. Les effets-off sont maintenant considérés comme rares.

### c. ADN donneur

L'ADN donneur peut être apporté sous différents formats. Lorsque l'insertion d'une courte séquence est suffisante, un ssODN est utilisé. Pour des insertions plus longues, il est possible d'utiliser des longs ADN simple brin (lsADN), des ADN double brin linéarisés (dsADN) ou des plasmides. La protection des extrémités de ces ADN donneurs par modifications chimiques a montré une augmentation de l'efficacité de KI (Liang et al., 2017b; Renaud et al., 2016; Yu et al., 2020) et est utilisée en routine par de nombreuses équipes. Les lsADN, actuellement disponibles jusqu'à 8 Kb, ont émergé comme une solution intéressante pour améliorer l'efficacité de KI (Miura et al., 2015; Miyasaka et al., 2018) mais leur production est limitée par des rendements très faibles et par la création de mutations suite aux techniques de purification utilisées (Codner et al., 2018). En parallèle, une étude a également montré que l'utilisation d'un ADN double brin linéarisé avec extrémités 3' sortantes augmenterait également cette efficacité (Hirotsune et al., 2020; Liang et al., 2017b) et est concordante avec le processus de résection qui précède les mécanismes de réparation de DSB médiés par l'homologie. Il est également possible d'utiliser un plasmide et induire la linéarisation de la matrice de réparation en flanquant cette séquence par des sites reconnus par un RNP afin de synchroniser la disponibilité du donneur avec la DSB et créer des extrémités compatibles (Aida et al., 2016; Yao et al., 2017; Zhang et al., 2017).

### d. Locus ciblé

La variabilité génétique des cellules ou embryons à l'origine d'un modèle peut être très riche et mal connue. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier la séquence du locus d'intérêt avant tout projet d'édition de

génomique. En effet, certains variants non référencés peuvent être détectés et empêcher la reconnaissance par le gARN. Certains locus peuvent également présenter de fortes homologies avec d'autres séquences du génome ciblé (famille de gènes, pseudogènes...) et entraîneront des DSB en dehors du locus ciblé et donc des problèmes de spécificité.

L'état de la chromatine au niveau du locus ciblé est également une information importante pour une édition efficace car il définit l'accessibilité du locus pour Cas9. Toutefois, celui-ci peut varier au cours du temps et en fonction des cellules. En effet, une forte compaction au sein des nucléosomes limite la fixation de Cas9 au site de coupure et donc son activité (Horlbeck et al., 2016) alors que le processus de « nucleosome breathing » ou de son remodelage peut restaurer cette activité localement (Isaac et al., 2016). Afin de remédier à ce problème, il est possible d'utiliser des complexes RNP contenant une Cas9 inactive qui va cibler des zones adjacentes au site de DSB souhaité par le RNP actif (Chen et al., 2017a). Il est également possible de fusionner Cas9 à des peptides capables de moduler l'état de la chromatine (Ding et al., 2019). Ces aspects nécessitent encore des études approfondies, notamment *in vivo* pour mieux en comprendre les mécanismes et pouvoir les contourner.

Il a également été montré que certains facteurs endogènes présents sur l'ADN cible peuvent empêcher la coupure et que ces zones peuvent être identifiées pour éviter la sélection d'un gARN ciblant celles-ci (Thyme et al., 2016).

#### **e. Génotypage et détection des évènements involontaires**

Les animaux F0 mis en présence de CRISPR/Cas9 présentent des génotypes variés et complexes. Ils peuvent être homozygotes non édités (aucun allèle muté), hétérozygotes (un allèle non édité et un allèle muté ou KI), trans-hétérozygotes mutants (deux allèles mutants portant des mutations différentes qui peuvent inclure un KI), homozygotes mutants ou KI (deux allèles mutants identiques ou KI) ou mosaïques (plus de deux allèles mutés différentes dans un même individu qui peuvent inclure un allèle KI le cas échéant). Les cellules éditées par CRISPR/Cas9 présentent les mêmes profils que les animaux F0 mais ne peuvent pas être mosaïques, toutefois, des colonies peuvent être mosaïques si issues d'au moins deux clones différents (Mianné et al., 2020). Pour la génération de KO, seuls les individus portant des mutations induisant un décalage du cadre de lecture seront sélectionnés.

Diverses techniques ont été développées pour caractériser ces évènements en fonction du type d'édition réalisé (Mianné et al., 2017, 2020). Par exemple notre équipe a développé une technique basée sur la détection des hétéroduplexes spécifiques d'un génotype sur électrophorèse capillaire (Chenouard et al., 2016a). La plupart de ces techniques requièrent une amplification par PCR du locus ciblé par CRISPR/Cas9. La caractérisation précise est réalisée par séquençage Sanger et des outils tels que TIDER facilitent la lecture des traces complexes (Brinkman et al., 2014). Toutefois, cette analyse ne permet pas toujours de déterminer quels allèles portent les mutations observées. Par exemple, un allèle muté couplé à

un KI ne pourra pas toujours être discriminé d'un individu hétérozygote portant à la fois un allèle muté et un allèle KI. Pour cela, la méthode de référence actuelle est le sous-clonage mais cette technique est longue et fastidieuse. Des techniques de séquençages nouvelle génération (NGS) ciblées ont été développées pour une analyse plus précise mais sont basées sur de courts amplicons qui nécessitent une reconstruction bioinformatique du génotype observé par rapport aux bases de données (Germini et al., 2018). Du fait de la taille de ces amplicons, certains évènements peuvent être difficiles à identifier, c'est pourquoi des techniques de 3<sup>ème</sup> génération basées sur des amplicons plus larges sont en cours de développement (McCabe et al., 2019). Toutefois, ces techniques de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération sont coûteuses et requièrent des analyses bio-informatiques complexes à mettre en place.

La génotoxicité de CRISPR peut induire une dérégulation de l'environnement de la chromatine ou de l'organisation 3D du génome et donc impacter sa stabilité ainsi que l'expression de certains gènes. L'impact sur la génération de modèles génétiquement modifiés peut être important si ces évènements involontaires ne sont pas caractérisés et pris en compte dans l'analyse phénotypique. La détection de ces évènements est donc essentielle au développement de modèles de qualité.

A l'heure actuelle, aucune technique ne permet de vérifier l'ensemble de ces évènements non souhaités, mais différentes approches permettent d'analyser des aspects particuliers (Burgio and Teboul, 2020; Chen et al., 2020). La vérification du nombre de copies du locus ciblé et celui des zones adjacentes par PCR quantitative est facile à mettre en place et devrait être utilisée en routine. Les autres techniques sont plus coûteuses et certaines assez fastidieuses (digital droplet PCR, NGS, Southern blot, FISH), il est donc essentiel à l'avenir de développer de nouveaux outils plus accessibles. La technique de « targeted locus amplification » couplée au NGS est une des techniques les plus complètes à l'heure actuelle car elle permet à la fois de détecter la localisation de l'édition et de vérifier cette édition à la base près (Hottentot et al., 2017). Toutefois, son prix reste prohibitif pour un grand nombre de laboratoires.

Ces dommages collatéraux sont plus fréquemment détectés avec CRISPR/Cas9 que TALENs, c'est pourquoi ces dernières sont plus avantageuses à l'heure actuelle en clinique (Bhardwaj and Nain, 2021). Toutefois, pour la génération de modèles, CRISPR/Cas9 est un outil nettement plus accessible par sa facilité de conception et son faible coût, c'est pourquoi il est rapidement devenu l'outil majoritaire.

### ***Conclusion et perspectives***

La généralisation de CRISPR/Cas9 en moins de 10 ans dans différents domaines et en particulier l'édition de génome a permis de rapidement en comprendre les aspects et mécanismes clés. Son développement a largement été accéléré par les connaissances acquises grâce aux nucléases spécifiques de gènes précédemment développées. Les mécanismes de réparation des DSB sont notamment de plus en plus maîtrisés. Dans l'ensemble, la maîtrise complète de ces voies de réparation et de cet outil permettra un

développement de modèles plus efficace et de meilleure qualité avec des impacts importants dans d'autres domaines d'application, notamment la thérapie génique (Cullot et al., 2019; Teboul et al., 2020).

## Création de modèles génétiquement modifiés par CRISPR/Cas9

Grâce aux outils d'édition de génome il est possible de créer une grande variété de modèles (Figure 17 d'après (Chenouard et al., 2021a) qui sont décrits ci-dessous.

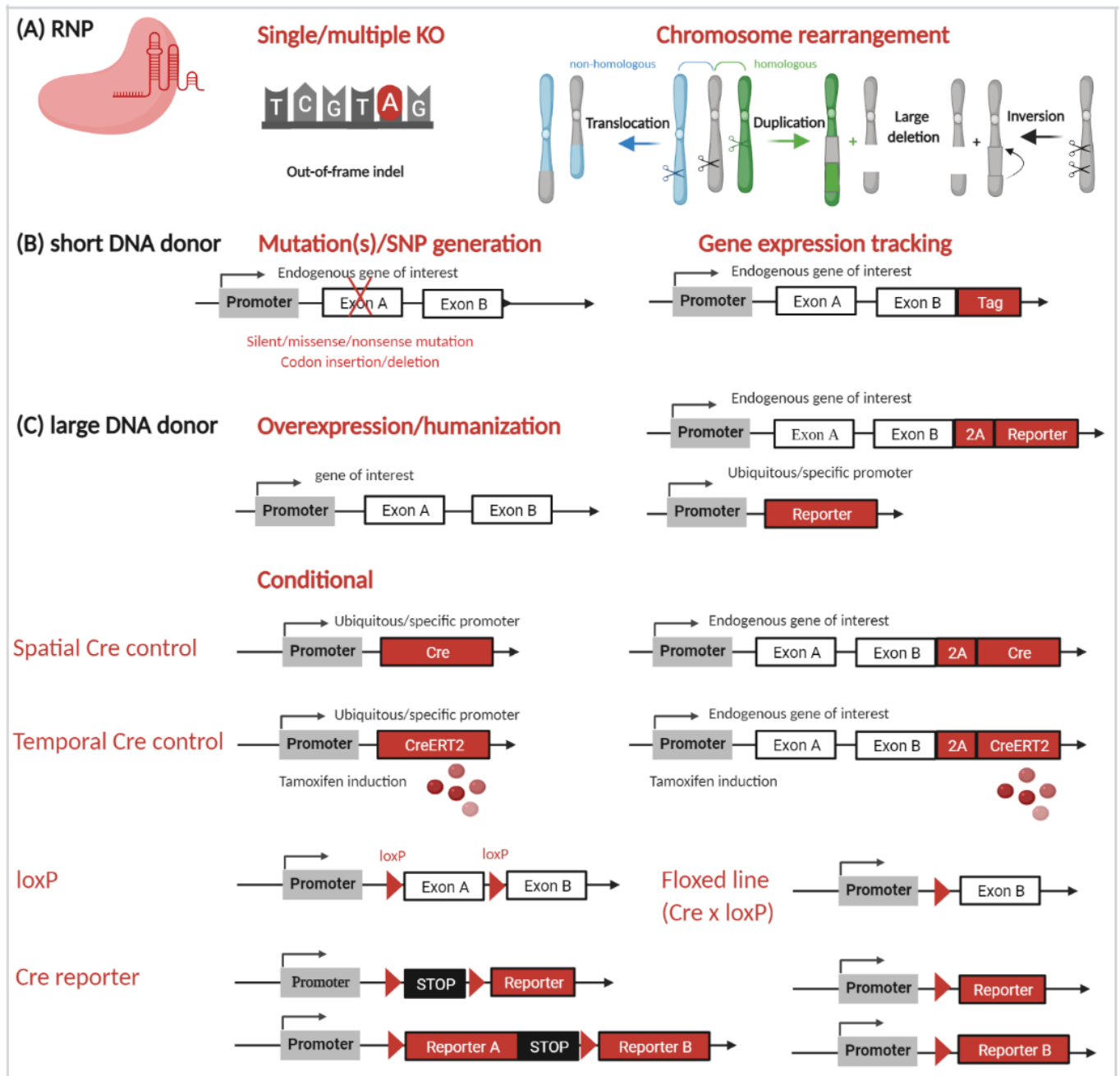


Figure 17: Stratégies pour créer des modèles génétiquement modifiés en fonction des applications. A. Le complexe RNP peut être utilisé seul pour générer des KO ou par paire pour créer des réarrangements chromosomiques. B. Un ssODN permet d'insérer de courtes séquences, par exemple une mutation ou un tag dans le cadre de lecture du gène d'intérêt. C. Un long ADN donneur est utilisé lorsque l'insertion d'une large séquence est requise, par exemple une cassette d'expression complète, un gène rapporteur ou un système conditionnel. Cette insertion peut être réalisée sur un gène endogène ou au sein d'un locus permissif. Figure créée avec BioRender. SNP, single nucleotide

### **a. Modèles KO**

Les modèles KO permettent d'éteindre l'expression d'un gène afin d'étudier sa fonction ou reproduire une maladie pour laquelle ce gène n'est plus exprimé suite à une mutation pathologique. En utilisant le complexe RNP seul, il est possible d'induire des indels qui, lorsqu'ils ne sont pas multiples de trois, génèrent un décalage du cadre de lecture et donc un codon de terminaison prématuré. Si celui-ci intervient suffisamment tôt sur le gène d'intérêt, l'ARN messager sera dégradé et aucune protéine ne sera traduite. Il existe toutefois des mécanismes d'échappement qui ne sont pas encore bien maîtrisés (Dyle et al., 2020). Une alternative peu commune est de cibler le promoteur du gène d'intérêt, ce qui peut mener à un phénotype plus sévère (El-Brolosy et al., 2019). Il est également possible de créer une ou plusieurs mutations induisant un codon de terminaison prématuré par « Base Editing » ou « Prime Editing ».

### **b. Réarrangements chromosomiques**

Des réarrangements chromosomiques tels que des délétions de larges fragments, inversions, duplications, translocations peuvent être à l'origine de certaines maladies humaines. Afin de les modéliser, l'utilisation de deux gARN est nécessaire (Birling et al., 2017). Lorsque les deux DSB ont lieu sur le même chromosome, elles peuvent générer des larges délétions entre celles-ci ou bien des inversions du fragment excisé puis réinséré. Cette coupure peut également avoir lieu sur deux chromosomes homologues et générer une délétion sur l'un et une duplication sur le second. Dans le cas de deux chromosomes non homologues des phénomènes de translocation sont observés.

### **c. Modèles de variants génétiques**

L'utilisation de CRISPR/Cas9 avec un ssODN permet d'introduire une mutation précise au niveau du locus ciblé et ainsi de mieux comprendre le rôle pathologique ou non de variants génétiques ou tout simplement mimer une maladie génétique connue. Le « Prime Editing » peut également être utilisé mais le « Base Editing » est particulièrement approprié pour cette situation, en particulier si la mutation est éloignée du PAM ou si plusieurs mutations sont requises.

Depuis le lancement du projet de séquençage du génome humain dans la fin des années 80 les progrès techniques et fondamentaux en génomique humaine sont phénoménaux (Claussnitzer et al., 2020). Ils ont permis, en particulier, la découverte de nombreux variants génétiques et le développement de nombreuses ressources bio-informatiques qui facilitent aujourd'hui leur modélisation sur animaux ou cellules. Toutefois, la fonction de ces variants génétiques reste encore à déterminer pour un grand nombre d'entre eux. Pour cela, la comparaison des phénotypes entre lignées isogéniques est primordiale pour pouvoir associer la mutation étudiée à la pathologie en s'affranchissant du patrimoine génétique des cellules d'origine. Une édition de génome spécifique et précise est donc requise pour ce type de modélisation qui est particulièrement utilisée sur hiPSC (**Figure 18** d'après Guo et al., 2021). L'amélioration de ces outils est donc essentielle pour faciliter la génération de mutations d'intérêt ou de les corriger.

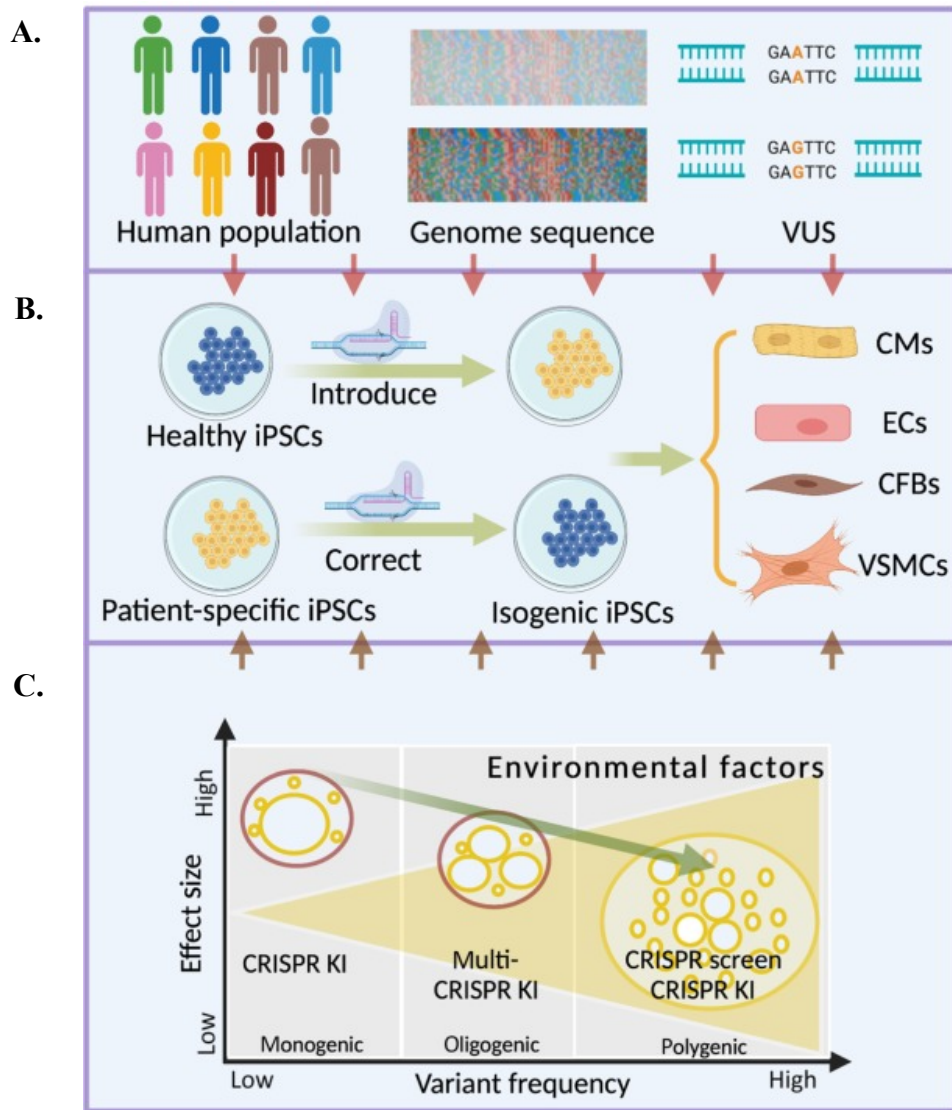


Figure 18: Stratégies permettant d'étudier le rôle inconnu d'un variant génétique (VUS), exemple des modèles hiPSC cardiovasculaires d'après Guo et al. 2021. **A.** Identification d'un VUS dans la population humaine. **B.** Génération de lignées hiPSC isogéniques par CRISPR/Cas9. **C.** Cas des mutations monogéniques, oligogéniques ou polygéniques et stratégies CRISPR adaptées. Le triangle jaune représente l'impact de facteurs l'environnement sur les maladies cardiovasculaires. Chaque cercle jaune représente une mutation et sa taille indique son impact sur les maladies cardiovasculaires. La flèche verte indique la direction future des modèles hiPSC génétiquement modifiés. VUS, variant of uncertain significance; CMs, cardiomyocytes; ECs, endothelial cells; CFBs, cardiac fibroblasts; VSMCs, vascular smooth muscle cells.

#### **d. Surexpression d'un gène d'intérêt**

Pour étudier un gène, il est possible de l'insérer avec son promoteur ou un promoteur ubiquitaire dans un modèle d'intérêt à l'aide d'un long ADN donneur (**Figure 17**). Des zones permissives dans le génome ont été décrites (Rosa26 et Hprt) et permettent l'insertion de ces séquences sans effet de position (Thom Saunders, 2020). Par exemple, l'insertion d'un gène humain permet l'humanisation du modèle animal d'intérêt.

#### **e. Modèles conditionnels**

Les systèmes de recombinaisons site-spécifiques tels que Cre/lox sont très utilisés pour créer des modèles conditionnels. Ils requièrent la génération de deux lignées à l'aide d'un long ADN donneur, l'une exprimant la Cre recombinase et l'autre contenant le locus d'intérêt flanqué de sites loxP (**Figure 19A** d'après Kim et

al., 2018a). Après croisement des deux lignées, la Cre se fixe sur les sites loxP pour exciser la zone flanquée (**Figure 19B** d'après Kim et al., 2018a). Cette excision peut être maîtrisée de façon spatiotemporelle par l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle promoteur tissu ou cellule spécifique et/ou l'utilisation d'un système inductible. Le récepteur aux œstrogènes (ER) ou son amélioration ER2 est le système principalement utilisé et sa translocation au noyau est inductible par l'ajout de tamoxifène (**Figure 19C** d'après Kim et al., 2018a). Il est très utile mais également très sensible, il nécessite donc un maintien de la lignée sous forme hétérozygote et une analyse complète pour limiter les fuites et effets secondaires (Song and Palmiter, 2018).

D'autres systèmes dépendant de la tétracycline (Tet) sont également utilisés et requièrent également deux lignées (**Figure 19D et E** d'après Kim et al., 2018a). La première portera le « tetracycline responsive element » (TRE), afin de réguler l'expression du gène d'intérêt qui peut être une Cre recombinase. L'autre lignée, dépendra du type de système activateur « Tet-on » ou represser « Tet-off ». Dans le cas d'un système Tet-on, cette deuxième lignée exprime le « reverse tetracycline-controlled transactivator » (rtTA) qui ne peut activer le TRE qu'en présence de Tet ou de doxycycline (Dox), un dérivé de Tet moins coûteux et donc plus fréquemment utilisé (**Figure 19D** d'après Kim et al., 2018a). A l'inverse, dans le cas d'un système Tet-off, cette deuxième lignée va exprimer un « tetracycline-controlled transactivator » (tTA) qui va naturellement activer l'expression du gène d'intérêt (**Figure 19E** d'après Kim et al., 2018a). L'inhibition de cette expression pourra être induite par la présence de Tet ou Dox.

#### **f. Modèles rapporteurs**

Les modèles rapporteurs peuvent être créés par l'insertion d'un tag (court ADN donneur) dans le cadre de lecture du gène d'intérêt ou par le remplacement d'un codon stop par un peptide auto-clivant (T2A, P2A...) suivi d'un gène rapporteur (LacZ, EGFP...). Ces modèles permettent une visualisation facilitée de cellules particulières dans un modèle complexe, par exemple pour les localiser dans un organisme entier mais également un traçage d'une lignée cellulaire particulière (Shaikh et al., 2020). Des gènes rapporteurs peuvent être combinés à des systèmes conditionnels pour la création de modèles d'autant plus complexes, par exemple dans le cas de traçage de lignées (Liu et al., 2020a) ou de modèles « brainbow » (Richier and Salecker, 2015).

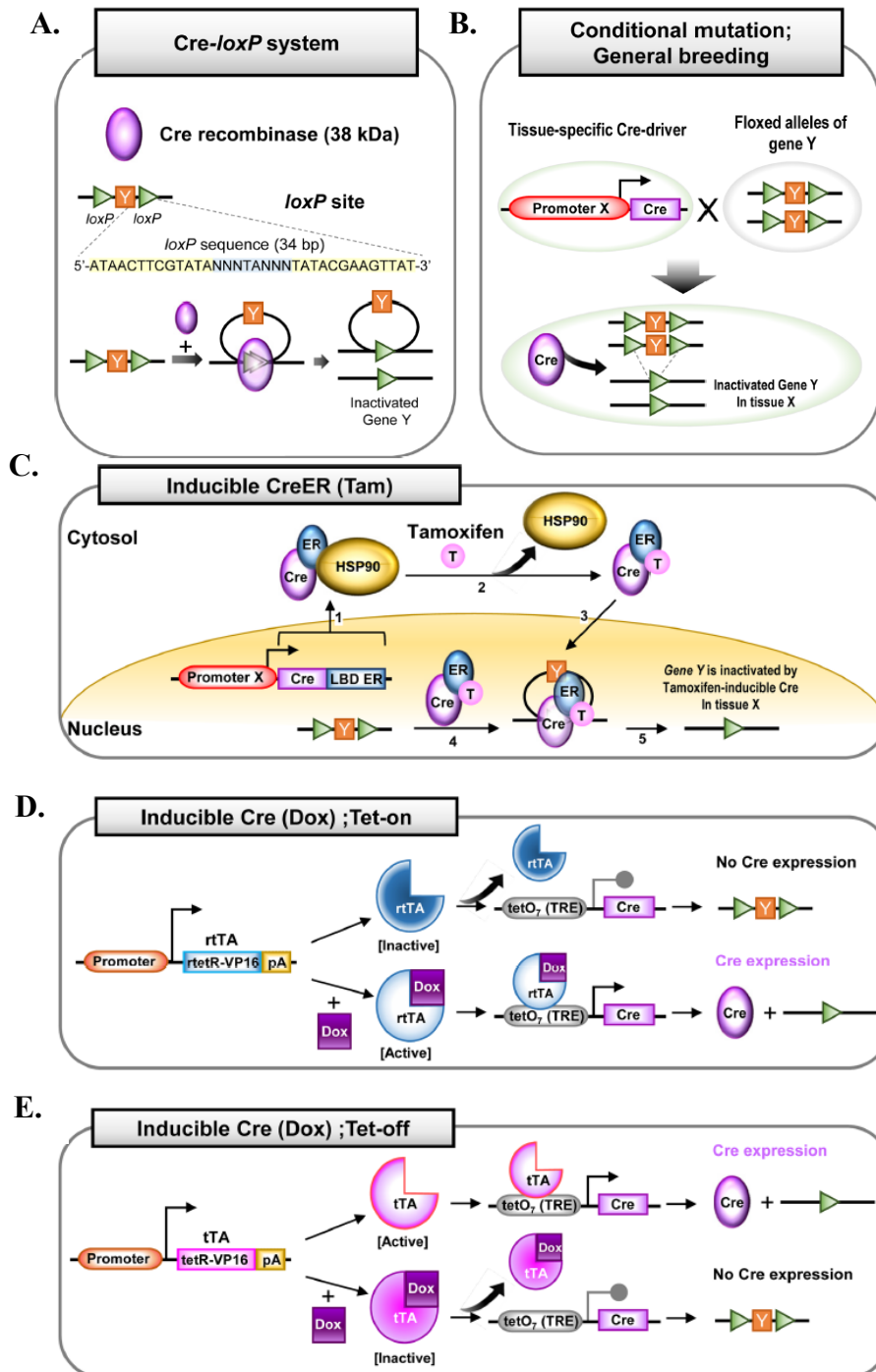


Figure 19: Mécanisme d'action des systèmes Cre/lox, Tet-on et Tet-off d'après Kim et al. 2018a. A. Schéma du fonctionnement général du système Cre/lox et croisement des lignées Cre/lox. B. Résultat du croisement des deux lignées. C. Mécanisme précis d'action du système CreER. Fonctionnement du système D. Tet-on et E. Tet-off.

## Conclusion et perspectives

Le développement d'outils d'édition de génome performants, faciles à concevoir et à faibles coûts facilite grandement le développement de modèles génétiquement modifiés. Aujourd'hui, il est possible théoriquement de modéliser l'ensemble des situations physiologiques ou pathologiques rencontrées. Il est également possible de développer des outils d'étude de gènes et/ou de tissus ou populations cellulaires d'intérêt très performants. Toutefois, l'efficacité de génération de ces modèles tend à décroître avec leur complexité et les résultats d'édition de génome ne sont pas toujours ceux espérés.

## Enjeux actuels de l'édition de génome par CRISPR/Cas

A l'heure actuelle il y a plusieurs enjeux majeurs à l'édition de génome par CRISPR/Cas9. La plupart sont communs aux modélisations cellulaire et animale, mais certains sont plus spécifiques à un modèle que l'autre. Ces enjeux et spécificités sont décrits ci-dessous (**Tableau 3**).

Tableau 3: Enjeux de l'édition de génome par CRISPR/Cas9 selon le type de modèle.

	Cellules	Embryons
<b>Efficacité d'édition</b> En particulier pour les KI complexes	<b>Très important pour limiter la durée et les coûts de génération des modèles</b> <b>Peut mettre en jeu la faisabilité du modèle</b>	
<b>Qualité de l'édition</b> Dommages collatéraux on-target mais aussi off-target	<b>Très important pour dériver une lignée à partir d'un clone</b>	<b>Très important dans le cas de dommages sur le même chromosome que l'édition</b> Moindre importance sur les autres chromosomes (croisements des fondateurs)
<b>Génération de mutations hétérozygotes</b>	<b>Très important pour modéliser une mutation particulière à l'état hétérozygote à partir d'un clone</b>	En général pas important dans la génération de F0 car possibilité d'obtenir des animaux hétérozygotes ou homozygotes (sauf si mutation létale) et de choisir en fonction du modèle

L'enjeu partagé par tous les modèles génétiquement modifiés par CRISPR/Cas9 est l'amélioration de l'efficacité de leur génération afin d'en réduire le temps de développement et les coûts. En particulier chez l'animal, la réduction du nombre d'animaux est un point essentiel. Les modèles complexes qui visent à l'insertion de longues séquences ADN ou multiples séquences (modèles conditionnels, rapporteurs, surexpression...) présentent une efficacité faible qui peut, pour certains projets, en empêcher le développement. De nombreuses améliorations ont été proposées. En particulier, des stratégies de transport du donneur ADN via le complexe RNP par ajout de séquences reconnues par celui-ci ont été utilisées ainsi que des Cas9 ou gARN modifiés pour fixer le gARN (Chenouard et al., 2021a). Toutefois, certains aspects limitent encore leur efficacité. La taille de l'insert et son import au noyau sont notamment critiques pour cette efficacité et les barrières biologiques mises en jeu ne sont pas encore suffisamment bien comprises pour pouvoir les surmonter, en particulier dans les embryons (Remy et al., 2017). L'utilisation d'un marqueur de sélection sur les cellules est un avantage indéniable pour ces types de modèles. De plus,

l'amélioration des rendements et de la qualité de synthèse de longs ADN dans le futur, permettront probablement de faciliter l'utilisation de longs donneurs.

Le deuxième enjeu implique les événements indésirables qui peuvent avoir lieu autour du site de coupure sur des distances plus ou moins longues ainsi qu'à d'autres endroits du génome que ce soit sur le même chromosome ou non. Cet enjeu est majeur pour la génération de modèles cellulaires car il ne sera pas possible d'éliminer ces éditions involontaires sur le clone cellulaire sélectionné pour fonder le modèle. A l'inverse, pour les modèles animaux, le modèle sera utilisé sur des animaux après plusieurs croisements qui permettront de s'affranchir de ces modifications incontrôlées. Par exemple, si un des allèles contient la mutation désirée mais que l'autre allèle contient une modification non souhaitée, le croisement avec un animal non-transgénique permettra de sélectionner dans la descendance les animaux d'intérêt portant à la fois l'allèle souhaité et l'allèle normal. Toutefois, si ces modifications sont présentes sur le même chromosome que l'édition ciblée, elles seront maintenues de génération en génération. Il est donc important pour l'ensemble des modèles de vérifier le chromosome sur lequel a lieu la coupure de Cas9 et pour les cellules l'ensemble du génome. Malgré tout, il est nécessaire de limiter ces risques. Pour cela, de nombreuses approches ont été développées depuis plusieurs années notamment l'ingénierie du gARN (gARN tronqué) ou de la Cas9 (variants haute-fidélité, base-editing, prime-editing, nickase...) et l'amélioration des outils de conception du gARN (Manghwar et al., 2020). Une meilleure compréhension du fonctionnement de cet outil ainsi qu'une utilisation plus raisonnée permettront également, à l'avenir, de limiter ces événements.

Finalement, un enjeu très important pour les modèles cellulaires est la génération de modèles hétérozygotes (allèle normal/allèle avec la mutation pathologique) de façon efficace car un grand nombre de maladies génétiques présentent des mutations dominantes. En utilisant CRISPR/Cas9, même avec un ssODN portant la mutation d'intérêt, une forte proportion de cellules sont KO. Inévitablement, un grand nombre de cellules KI vont donc également présenter un allèle KO qui ne permet pas de mimer fidèlement la pathologie d'intérêt. Actuellement, la meilleure façon d'y parvenir est d'utiliser deux ssODN (Brandão et al., 2021). L'un contiendra la mutation d'intérêt et l'autre contiendra seulement des mutations silencieuses qui empêcheront les coupures multiples de l'allèle par Cas9, mais ne généreront pas de KO. Ainsi, la proportion de cellules KI hétérozygotes (allèle normal/allèle avec la mutation pathologique) devrait être augmentée.

## II. Objectifs de mon projet de thèse

### Etat des lieux

L'accessibilité de l'outil CRISPR/Cas9 a grandement accéléré le développement de nouvelles innovations et a créé une quantité phénoménale de publications annuelles qui rend ce domaine difficile à suivre de façon exhaustive. Mon arrivée au sein de la plateforme TRIP en 2015 en tant qu'ingénieur avait pour but de faciliter le développement de l'outil CRISPR/Cas9 en collaboration avec la société genOway pour la génération de modèles animaux en mutualisant les efforts de R&D. Toutefois, du fait de la taille modeste de notre structure, nous avons dû prioriser les projets et favoriser, dans un premier temps, le développement de différents types de modèles. Nous avons donc rapidement généré des modèles rats KO simples, grandes délétions, KI par mutations ponctuelles et KI complexes (surexpression et traçage de lignées) (Ménoret et al., 2015; Renaud et al., 2016; Remy et al., 2017). Nous avons également développé de nouvelles méthodologies pour accélérer ce processus. Pour cela, nous avons mis en place la technique d'électroporation d'embryons intacts de rats (Remy et al., 2017). Contrairement à la microinjection, l'électroporation est une technique simple à utiliser et présente l'avantage majeur d'éditer 30 à 50 embryons simultanément. En parallèle, nous avons amélioré notre technique de génotypage par l'analyse de la formation d'hétéroduplexes particuliers à chaque édition pour augmenter notre débit tout en diminuant nos coûts (Chenouard et al., 2016b).

Nous avons défini des conditions d'électroporation qui nous permettaient de générer des modèles simples avec 3 $\mu$ M de Cas9 fournie par notre partenaire académique TACGENE, un ratio RNP Cas9/sgARN de 1/1,6 soit 4,7 $\mu$ M de sgARN IVT ainsi que l'utilisation de 4,9 $\mu$ M de ssODN (Remy et al., 2017). Ces conditions permettaient une édition intéressante d'environ 50% mais seulement 10% de KI avec ssODN. Ce taux était acceptable pour une technique nouvellement décrite mais demandait à être amélioré. Ces conditions ne permettaient pas non plus de réaliser des KI impliquant de longs donneurs par électroporation car les longs ADN ne sont pas importés naturellement au noyau. Les projets complexes (modèles rapporteurs, surexpression et conditionnels) sont donc réalisés par microinjection dans le zygote mais cette technique est longue et fastidieuse et les taux d'efficacité sont faibles (<5% sur le locus Rosa26 avec donneur ADN CAG-GFP 4,7Kb (Ménoret et al., 2015)).

Les demandes de modélisations chez le rat ont évolué pour devenir de plus en plus complexes et nécessitent donc l'utilisation de grands ADN donneurs de façon efficace. Ces modèles sont plus particulièrement difficiles à développer sur embryons. Nous avons donc dû repenser nos conditions d'édition pour faciliter leur développement et trouver de nouvelles stratégies.

Nous avons commencé, en collaboration avec notre partenaire TACGENE, par tenter de faire basculer la réparation de la coupure double brin induite par Cas9 vers des mécanismes médiés par homologie. Ils sont moins fréquents que le NHEJ mais permettent la génération de KI. Pour cela, nous avons testé une Cas9 fusionnée à CtIP, une molécule clé dans la prise de décision entre ces mécanismes (Charpentier et al., 2018). Cette stratégie n'a montré qu'un succès modéré, en particulier chez le rat. De plus, cette Cas9 était trop difficile à produire sous forme de protéine avec un bon rendement. Nous avons donc testé d'autres approches qui ont fait l'objet de ma thèse.

## Mon projet de thèse

L'objectif de ma thèse était donc d'améliorer l'efficacité de KI pour les projets complexes de rat. La solution qui paraissait la plus évidente était simplement d'augmenter les concentrations en ADN donneur mais celles-ci entraînent de fortes toxicités, en particulier pour les longs donneurs pour lesquels seules des faibles quantités sont tolérées par l'embryon. Les conditions que nous avons définies précédemment pour un ADN donneur double brin CAG-GFP de 4,7Kb étaient de 2ng/μL (0,7nM) en microinjection et 100ng/μL (34,4nM) en électroporation avec une concentration en Cas9 de 3μM (Remy et al., 2017), représentant une proportion molaire d'ADN donneur par RNP bien trop faible (environ 4300 Cas9 par ADN donneur en microinjection et 87 Cas9 par ADN donneur en électroporation) pour avoir une chance que l'ADN donneur soit présent au site de coupure. Ces observations peuvent, en partie, expliquer les faibles taux de KI (3,5%) que nous avons obtenus par microinjection (Remy et al., 2017). Un ratio stœchiométrique n'est probablement pas envisageable avec les longs donneurs mais j'ai tenté de m'en rapprocher par deux stratégies différentes.

Pour faciliter les tests préliminaires sur ces deux approches, nous avons utilisé des modèles de KI par ssODN (mutation en un site de restriction XbaI sur le locus rEphx2 (Remy et al., 2017)), permettant ainsi l'électroporation des embryons et l'utilisation de petits ADN donneurs synthétiques dont les coûts sont moindres. Afin de limiter l'usage d'embryons, nous avons réalisé les preuves de concepts *in vitro* puis sur cellules avec, dans un premier temps, un modèle de HEK293T (insertion d'un site de restriction XhoI sur le locus hAAVS1). Plus récemment, la plateforme iPSC de Nantes a développé un modèle de cellules hiPSC GFP convertible en BFP par KI avec ssODN, ce qui facilite grandement l'analyse de l'édition (indels et KI). Nous avons donc collaboré pour développer le système CRISPR/Cas9 sur hiPSC.

Ma première approche a été de mieux comprendre le système CRISPR/Cas9 et réfléchir à un rationnel moléculaire. En effet, dans les conditions de microinjection décrites précédemment (Remy et al., 2017), 1 picolitre contenant 3μM de Cas9 est microinjecté par embryon soit environ 1 à  $2.10^6$  Cas9 par génome (2 cibles). Pour l'électroporation, 50μL de Cas9 3μM est électroporé dans une quarantaine d'embryons simultanément, ce qui correspond à environ  $2.10^{12}$  Cas9 par génome (2 cibles). Toutefois, la quantité de

réactifs qui entre réellement dans chaque embryon par électroporation n'est pas connu, ce nombre n'est donc que théorique et probablement bien plus élevé que la réalité. Dans tous les cas, il est raisonnable de penser que la quantité de Cas9 présente par embryon est très élevée et peut probablement être considérablement réduite. En parallèle, j'ai mis au point des techniques *in vitro* pour caractériser la formation du complexe RNP. De cette façon j'ai défini des conditions (format du gARN, tampons, ratio Cas9/gARN, incubation...) permettant une efficacité de formation du complexe RNP optimale. Le but de cette approche était de réduire au minimum les concentrations de Cas9 et gARN pour s'approcher d'un nombre de molécules équivalent à celui de l'ADN donneur tout en maintenant une forte efficacité de coupure. Ces conditions optimales ont ensuite été appliquées et validées *in vivo* sur hiPSC et embryons de rats.

Dans une deuxième approche, j'ai tenté d'hybrider l'ADN donneur au gARN par deux stratégies différentes afin de faciliter son import au noyau. Le but de cette approche est d'augmenter les chances que celui-ci soit présent au site de coupure pour induire une recombinaison homologue et favoriser la génération des modèles KI. Cette approche est également intéressante pour pouvoir potentiellement électroporer des longs donneurs et ainsi générer des modèles complexes par cette technique.

## III. RESULTATS

### Caractérisation et optimisation de la formation de complexes RNP fonctionnels

Notre équipe n'avait jamais étudié l'efficacité de formation du complexe RNP et, à ma connaissance, elle est très peu étudiée dans la littérature. C'est pourtant une étape clé pour une édition de génome efficace. J'ai donc cherché à développer des méthodes d'évaluation de la formation de ce complexe pour la rendre plus efficace. J'ai notamment testé des techniques permettant de mesurer l'affinité ( $K_d$ ) de Cas9 avec un gARN (Surface Plasmon Resonance et Thermophorèse MicroScale) pour vérifier l'ordre de grandeur de cette affinité dans nos conditions et donc extrapoler le ratio molaire Cas9/gARN à utiliser pour nos conditions *in vivo*. Ma et al. ont démontré que ce  $K_d$  est de 30pM (Ma et al., 2015), ce qui indiquerait qu'un ratio Cas9/gARN de 1/1 devrait être suffisant pour des concentrations en Cas9 et gARN de l'ordre du nanomolaire. J'ai également testé des méthodes de mesure de la thermostabilité ( $T_m$ ) de Cas9 (Differential Scanning Fluorimetry classique ou Nano). Le gARN étant un effecteur allostérique de Cas9 particulièrement puissant (Jiang et al., 2015), le changement de conformation de Cas9 lors de la formation du complexe RNP doit être observable par un décalage significatif du  $T_m$ .

Le clivage *in vitro* a depuis longtemps été décrit (Jinek et al., 2012) et permet, dans une certaine mesure, d'évaluer l'efficacité de coupure du complexe RNP. J'ai donc mis au point cette technique dans notre laboratoire sur un produit de PCR avec analyse par électrophorèse capillaire (CIV-CE). Pour plus de pertinence par rapport à l'édition de génome que nous réalisons *in vitro*, nous avons également cherché à développer le CIV sur ADNg en utilisant la « quantitative Polymerase Chain Reaction » (qPCR).

L'ensemble de ces techniques n'étant pas utilisé au sein de mon laboratoire et peu appliqué à Cas9, trouver les outils nécessaires et accessibles ainsi que les mettre en place a été long et a nécessité beaucoup de recherche de ma part. Ce processus a donc été réalisé tout au long de ma thèse. Les résultats que j'ai obtenus *in vitro* sont détaillés ci-dessous afin de déterminer la ou les techniques les plus pertinentes et robustes pour vérifier à la fois l'efficacité de formation du complexe RNP et la relier à sa fonctionnalité.

#### *Surface Plasmon Resonance*

##### **a. Principe**

La technique de Surface Plasmon Resonance (SPR) est conçue pour analyser les interactions entre différentes molécules (Drescher et al., 2018) (**Figure 20**). Pour cela, la protéine d'intérêt est immobilisée sur un film d'or reposant sur une lame de verre. Elle est ensuite mise en présence d'un ligand par

microfluidique. La réfraction de la lumière sur ce système à travers un prisme sera sensible aux interactions avec le ligand. Cette technique ne requiert donc pas de marquage fluorescent mais une immobilisation de Cas9.

**b. Résultats**

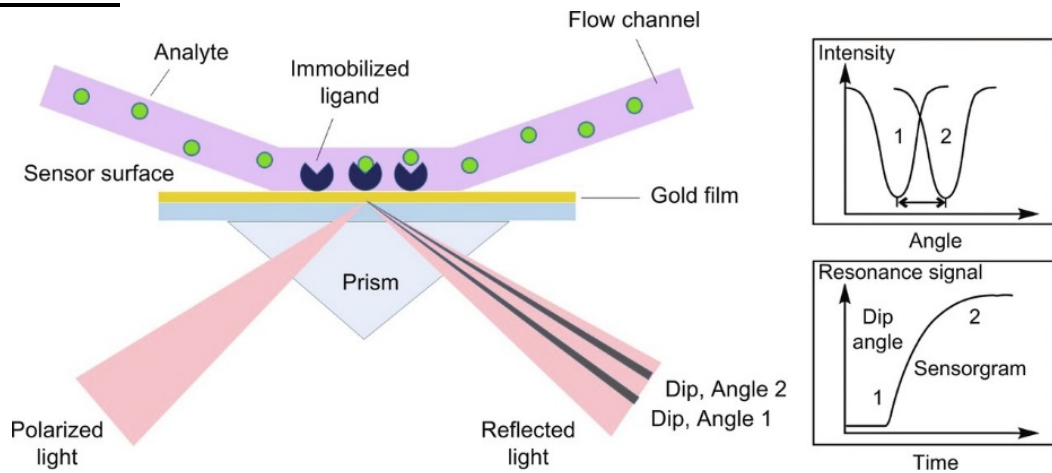


Figure 20: Schéma du principe de la technique de Surface Plasmon Resonance d'après Drescher et al., 2018. Une lumière polarisée est appliquée à travers un prisme sur un support plat recouvert d'un film d'or. Le ligand immobilisé sur la surface du film reflète la lumière d'une façon particulière qui va être différente dans le cas où celui-ci sera lié à l'analyte.

Les essais ont été réalisés par la plateforme IMPACT (Nantes) sur Biacore 3000 (GE Healthcare) avec Puce CM5 avec fibres de dextran. Les traitements nécessaires à l'immobilisation de Cas9 (IDT), notamment le Sodium Acetate pH 5,0 nous a permis de créer des liaisons amines entre Cas9 et le support mais pas de maintenir un système fonctionnel. En effet, les interactions entre Cas9 et le sgARN IVT n'étaient plus détectées (données non montrées). De plus, le coût du matériel était élevé. Nous n'avons donc pas poursuivi les mises au point avec cette technique.

**Thermophorèse MicroScale**

**a. Principe**

La technique de thermophorèse microscale permet de vérifier la fixation entre deux molécules et de caractériser l'affinité de cette fixation. Pour cela, un laser est utilisé pour chauffer localement l'un des partenaires d'intérêt marqué à la Cy5 ou équivalent (Figure 21). Ce laser induit un réchauffement local qui

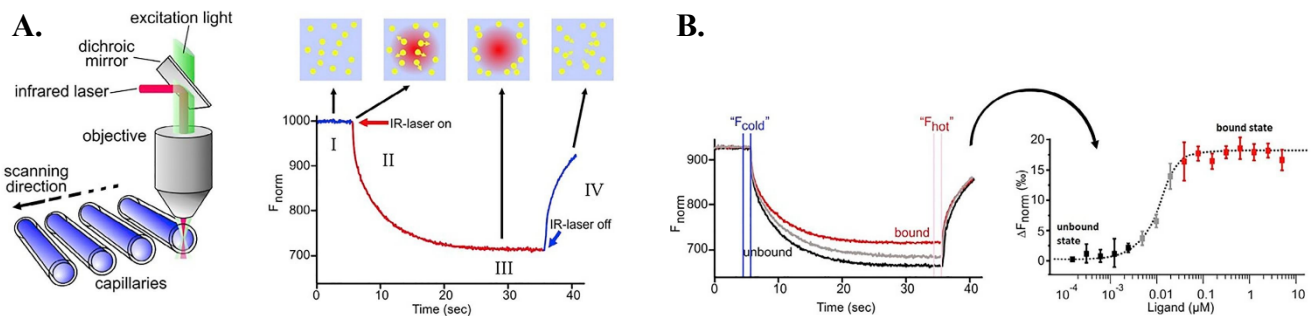


Figure 21 : Principe de la thermophorèse microscale d'après Asmari et al., 2018. A. L'application d'un laser sur des capillaires contenant les molécules testées permet d'induire un mouvement des molécules mesurable via la fluorescence. B. La mesure de fluorescence d'une gamme de concentration de ligand permet de vérifier la fixation de celui-ci à sa cible et définir l'affinité de cette mesure.

va créer une thermophorèse (Asmari et al., 2018). Lorsque la molécule marquée est seule, elle va se déplacer et fluorescer de façon différente à la même molécule fixée à son ligand. L'utilisation d'une gamme de 16 points contenant une concentration constante de la molécule marquée et d'un gradient de concentrations du ligand permet de définir l'affinité ( $K_d$ ) de cette liaison.

## **b. Résultats**

Les tests de thermophorèse microscale ont été réalisés sur Monolith NT.115 pico avec des capillaires en verres (Capillaires Monolith NT.115). L'appareil permet une excitation de 460 à 490nm ou de 600 à 650nm pour une plus grande sensibilité. Le  $K_d$  attendu entre Cas9 et le gRNA étant de l'ordre du picomolaire (Ma et al., 2015), l'utilisation d'une molécule marquée avec Cyanine 5 ou équivalent est donc nécessaire dans mon cas. La thermophorèse induite par le laser permet un réchauffement de quelques degrés en fonction de l'intensité et affecte la fluorescence de la molécule marquée. J'ai commencé par définir la meilleure façon d'utiliser le système d'après les paramétrages conseillés dans la littérature pour d'autres applications (Rainard et al., 2018). En effet, il est possible de marquer soit Cas9 soit le gARN. Dans un premier temps, j'ai tenté d'obtenir un sgARN marqué Cy5 mais très peu de fournisseurs ont accepté de le produire du fait de la complexité de synthétiser un ARN long de 100 bases avec une Cy5. J'ai pu obtenir le réactif par la société IDT qui a eu des difficultés à le produire. Après différents tests, je me suis rendue compte que la proportion marquée Cy5 de gARN n'était pas suffisante pour réaliser ce type d'expériences, probablement du fait des problèmes de synthèse. Dans un deuxième temps, j'ai donc cherché à obtenir une Cas9-Cy5 mais aucun fournisseur n'a pu me proposer ce produit. En utilisant un kit de marquage de protéines (Protein Labeling Kit RED-MALEIMIDE 2nd Generation, NanoTemper), j'ai tenté de la produire moi-même mais le rendement n'était pas satisfaisant. Finalement, la société IDT ayant nouvellement développé des tracrARN marqués ATTO 647N (équivalent Cy5), j'ai pu réaliser des tests avec un dgARN dans un tampon duplex (IDT) supplémenté avec 0,01% Tween20.

La première étape était de vérifier que le crARN et le tracrARN ATTO 647N étaient plus affins que le dgARN et Cas9 pour que le dgARN ne soit pas le facteur limitant de la mesure. Je n'ai pas réussi à définir une mesure de  $K_d$  précise entre le crARN et le tracrARN car ces deux molécules sont trop affines pour la sensibilité de l'appareil (très inférieure au picomolaire). Toutefois, une comparaison de la thermophorèse du tracrRNA ATTO 647N seul (100pM) ou en présence d'un crARN en très faible quantité (0,002pM) induit un net décalage de la trace (**Figure 22**). L'étape d'hybridation du crARN et du tracrARN n'est absolument pas un frein à la formation du complexe RNP et nous a encouragés à utiliser ce dgARN pour l'édition de génome *in vivo*.

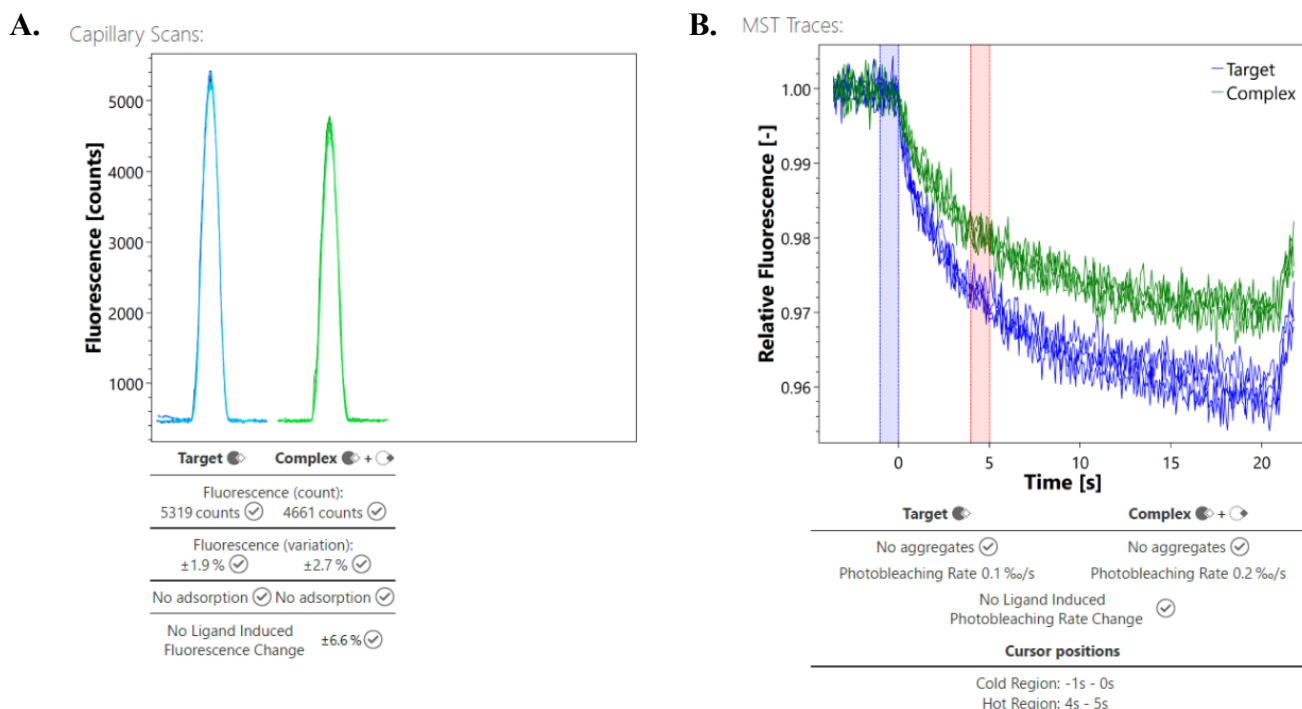


Figure 22: Résultats de thermophorèse obtenus avec un tracrARN ATTO647N seul (Target) ou en présence d'un crARN (Complex). **A.** Scan de la fluorescence de chaque capillaire avant thermophorèse. **B.** Traces de thermophorèse du tracrARN ATTO 647N seul ou en présence d'un crARN. La zone surlignée en bleu correspond à la mesure de référence appelée « cold region » qui correspond à la fluorescence avant induction du laser. La zone surlignée en rouge, appelée « hot region » correspond à la zone de mesures après induction de la thermophorèse par le laser.

J'ai donc, par la suite tenté de mesurer l'affinité de Cas9 avec un dgARN (tracrARN ATTO 647N). Toutefois, l'ajout de protéines Cas9 engendre de forts événements d'agrégation et d'adsorption aux capillaires en verre utilisés pour la mesure. Les mises au point sur le tampon (Tween 20, BSA, TCEP...) que j'ai pu réaliser, ne m'ont pas permis d'utiliser cette technique pour caractériser l'interaction de Cas9 et de son gARN.

Grâce à cette technique, j'ai pu caractériser la formation du duplexe crARN : tracrARN et démontrer que ces deux molécules sont très affines ( $K_d$  très inférieur au pM). Ces résultats m'ont rassurée sur la robustesse du duplex dgARN. De plus, l'immunogénicité des sgARN IVT ainsi que les faibles coûts d'utilisation du dgARN ont motivé notre abandon du sgARN IVT en faveur d'un dgARN synthétique pour éditer nos hiPSC et nos embryons de rats. Les concentrations de gARN utilisées *in vivo* (cellules et embryons) étant de l'ordre du nanomolaire, ce duplex doit se former de façon très efficace même en conditions stœchiométriques comme préconisé par le fournisseur.

## Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

### a. Principe

La technique de Differential Scanning Fluorimetry (DSF) ou Thermal Shift Assay permet de caractériser la thermostabilité d'une protéine (Gao et al., 2020). En effet, la protéine étudiée est soumise à un gradient de température pour déclencher une dénaturation progressive en présence d'un marqueur fluorescent. Celui-ci a la particularité de fluorescer en se fixant aux résidus hydrophobes des protéines qui sont exposés lorsque

celles-ci se dénaturent. Plus la protéine est dénaturée et plus la fluorescence augmente (**Figure 23**). Cette technique présente l'avantage d'être rapide et facile à mettre en place car elle ne nécessite qu'un simple thermocycleur temps réel pour la détection.

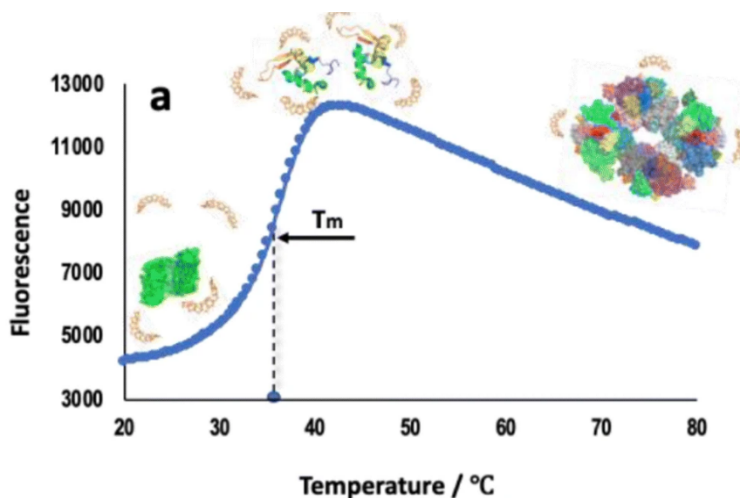


Figure 23: Mesure de la thermostabilité d'une protéine par Differential Scanning Fluorimetry d'après Gao et al., 2020. Un gradient de températures est appliqué à la protéine d'intérêt en présence d'un fluorophore capable de fixer des résidus hydrophobes afin de mesurer sa résistance à la température. Protéine native en vert et SPYRO Orange en jaune.

Cette technique a en particulier déjà été appliquée à Cas9 pour vérifier la liaison au gARN et à différents types de cibles (**Figure 24**) (Jiang et al., 2016). Cette équipe a notamment montré une différence de  $T_m$  lorsque Cas9 est seule ou complexée au sgARN mais également en présence d'ADN simple ou double brin. Il est donc possible de cette façon de vérifier la formation du complexe RNP.

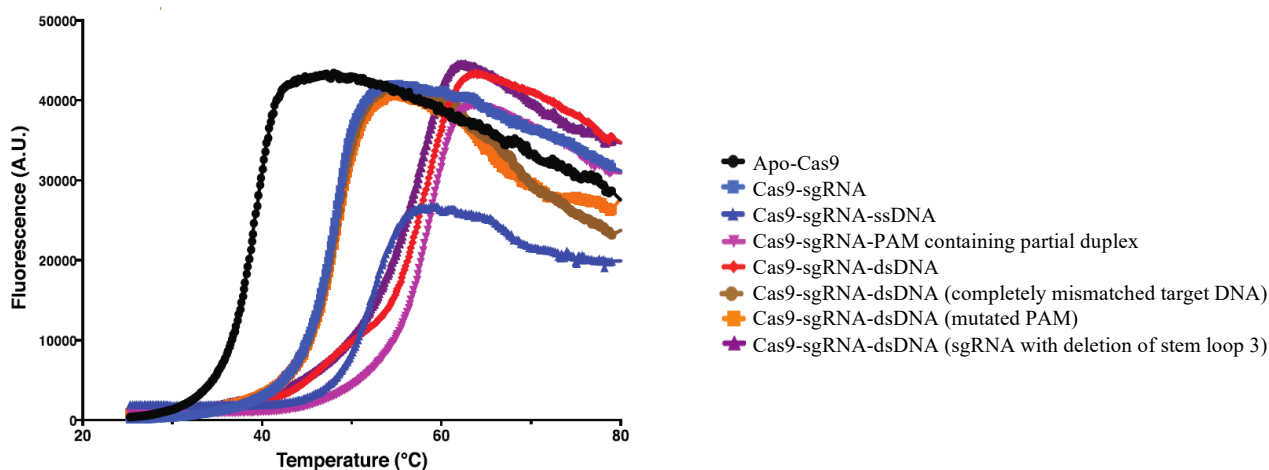


Figure 24: Courbe de DSF de la protéine Cas9 en présence d'un sgARN et de différentes cibles ADN d'après Jiang et al 2016.

## b. Résultats

J'ai utilisé le kit « Proteine Thermal Shift™ Dye kit, #4461146 (ThermoFisher Scientific), qui contient uniquement le fluorophore ainsi que son tampon, en suivant les préconisations du fournisseur. Plus particulièrement, le ROX a été choisi comme rapporteur, sans quencher ni référence passive. Un gradient de température continue de 0,05°C/seconde entre 25°C et 99°C a été défini, les filtres x4(580/10) et

m4(623/14) ont respectivement été utilisés pour l'excitation et l'émission du signal fluorescent sur un simple thermocycleur temps réel (Viia7, Applied Biosystem).

Cette technique m'a tout d'abord permis de confirmer la faisabilité de l'étude de 0,2 $\mu$ M de Cas9 (IDT) par la détermination de son T<sub>m</sub> (environ 48,2°C, **Figure 25**). Après ajout de sgARN IVT, j'ai observé un décalage du T<sub>m</sub> de Cas9 de 3 à 5°C en fonction des conditions, indiquant la formation du complexe RNP. Pour certaines conditions, le pic correspondant à Cas9 seule avait pratiquement disparu et correspond donc à un chargement de l'ensemble des Cas9 présent dans la réaction (**Figure 25**). Dans le cas du sgARN IVT rCD45 B4, l'utilisation d'un ratio RNP Cas/sgARN 1/5 semblait la plus adaptée. Cette tendance a été confirmée avec d'autres sgARN IVT. Toutefois, cette technique présente une faible reproductibilité inhérente à l'utilisation de ce marqueur de fluorescence.

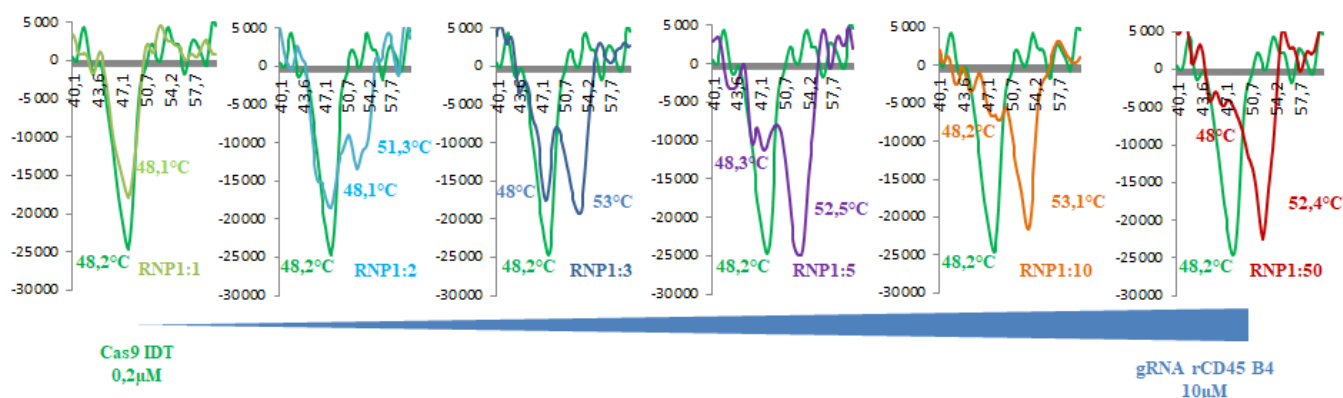


Figure 25: Differential Scanning Fluorimetry de Cas9 seule ou en présence de concentrations croissantes de gARN rCD45 B4. Cas9 seule est notée en vert foncé.

La condition 0,2 $\mu$ M de Cas9 (IDT) et RNP 1/5 a donc par la suite été testée *in vivo* et montrait de bonnes efficacités. Toutefois, d'après les K<sub>d</sub> observés entre Cas9 et gARN (30pM (Ma et al., 2015)) et les concentrations utilisées *in vivo* (0,2 $\mu$ M de Cas9 et 1 $\mu$ M de sgARN IVT) ce ratio RNP 1/5 semblait élevé et démontrait une faible efficacité de formation du complexe RNP. Les résultats précédents nous incitant à utiliser un dgARN, nous avons testé ces derniers sur une technique de DSF plus fiable.

## ***NanoDifferential Scanning Fluorimetry (NanoDSF)***

### **a. Principe**

Le NanoDSF est une technique récente qui permet de réaliser des analyses DSF en utilisant la fluorescence intrinsèque des protéines et en particulier des résidus tyrosines et tryptophanes à 330 et 350nm (Alexander et al., 2014). Cette technique permet donc de s'affranchir d'un marqueur de fluorescence et ainsi avoir une analyse beaucoup plus robuste. Elle nécessite toutefois un appareil particulier auquel je n'ai eu accès que très récemment via la plateforme de protéines recombinantes de Nantes.

### **b. Résultats**

Cette technique étant basée sur la fluorescence intrinsèque aux tyrosines et tryptophanes présents sur la protéine, la limite de détection dépend du nombre de ces résidus et est donc propre à chaque protéine. J'ai

donc dans un premier temps testé une gamme de concentrations de Cas9 (IDT) (**Figure 26**) pour déterminer le seuil de détection de la fluorescence intrinsèque à cette protéine et définir les conditions permettant la suite des mesures. Les mesures ont été réalisées sur le Prometheus NT.48 NanoDSF instrument (NanoTemper Technologies) avec une rampe thermique de 1 °C/min. Une dose de Cas9 de 0,09 ou 0,005µM induisait un signal de fluorescence trop faible pour nos analyses et une dose de 0,38µM présentait une agrégation de Cas9 qui semblait trop à la limite de la détection. Nous avons donc choisi de continuer les tests avec une dose de Cas9 de 0,75µM pour avoir un signal de fluorescence suffisant et pouvoir étudier, en parallèle de sa thermostabilité, son agrégation. Le Tm de Cas9 seule est notamment égal à la température d'agrégation (Tm=Tagg=43°C) dans nos conditions (**Figure 26**).

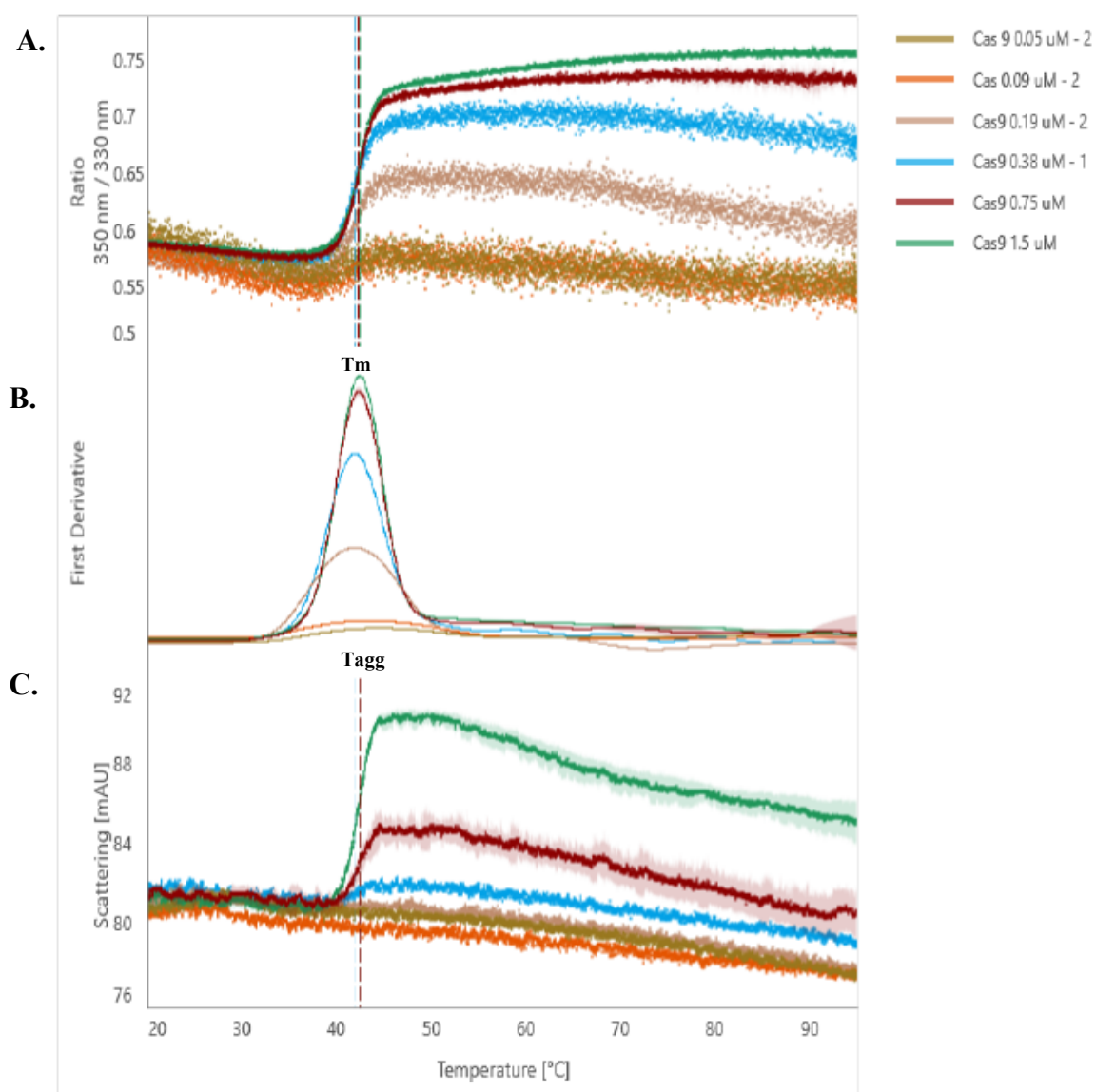


Figure 26 : Courbes de NanoDSF obtenues par l'étude d'une gamme de concentrations de Cas9. A. Mesure du ratio 350 nm / 330 nm de Cas9. B. Dérivée première de ce ratio. C. Mesure de l'agrégation de Cas9.

J'ai ainsi pu analyser la formation du complexe RNP en présence de ratios RNP Cas9/dgARN (IDT) croissants. J'observe un Tm d'environ 43°C pour la Cas9 seule et d'environ 50°C lorsque le complexe RNP est formé (**Figure 27**). Lorsque le ratio RNP est en faveur de Cas9, j'observe toujours la présence de Cas9 seule (RNP 5/1, 2/1) alors qu'à partir du moment où les concentrations du dgARN sont équivalentes ou

supérieures à la concentration en Cas9 (RNP 1/1, RNP 1/2, RNP 1/3, RNP 1/5) il ne reste plus de Cas9 libre. Ces résultats indiquent donc que le ratio RNP 1/1 est suffisant pour une utilisation de Cas9 à  $0,75\mu\text{M}$  dans un tampon HEPES 20mM pH7,5, KCl 150mM. Cette technique est rapide, fiable et particulièrement intéressante pour évaluer la formation du complexe RNP.

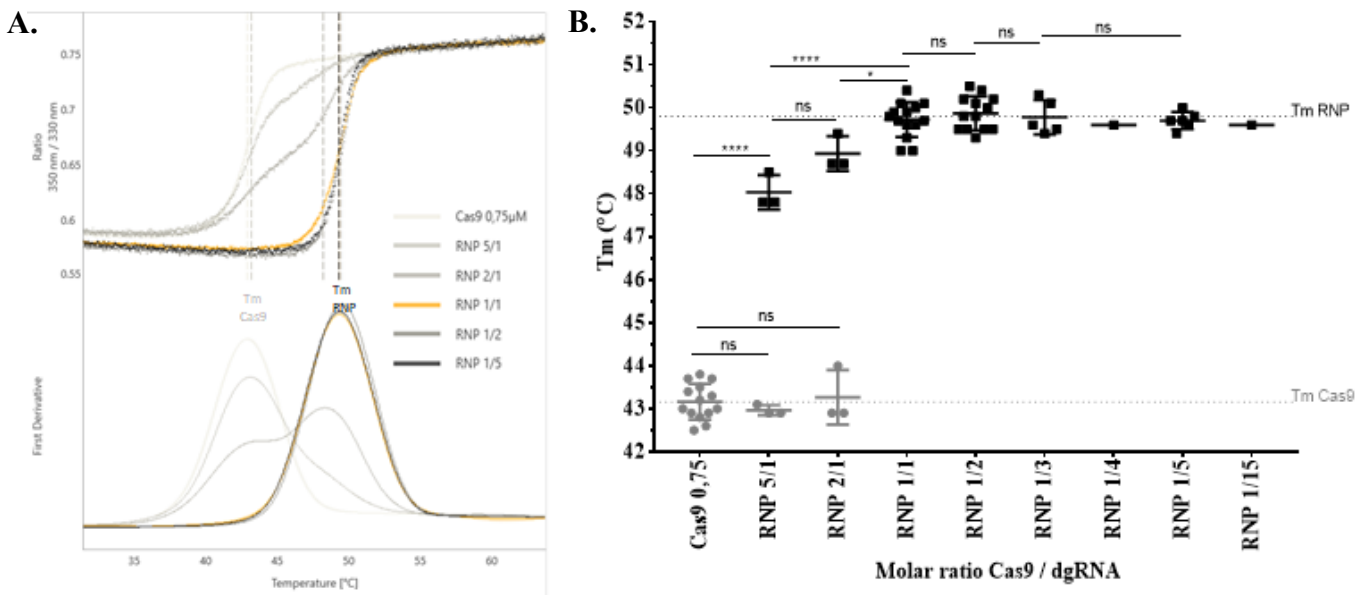


Figure 27: Mesure de la thermostabilité de Cas9 en présence d'une gamme de concentration de dgARN. A. Courbe de NanoDSF obtenues. B. Comparaison des  $T_m$  en fonction des conditions.

D'autres tests sont actuellement en cours pour comparer le même gARN sous forme de sgARN IVT ou synthétique et dgARN pour déterminer si l'un ou l'autre formerait un complexe RNP avec Cas9 (IDT) plus efficacement. L'effet des tampons dans lesquels sont préparés ces réactifs est également à l'étude. Nous avons choisi pour la suite du projet d'utiliser des dgARN synthétiques provenant du même fournisseur que Cas9 pour favoriser leur compatibilité. IDT étant un expert des dgARN et les tests préliminaires semblant indiquer une bonne formation du complexe RNP avec ces derniers, nous avons continué le projet avec ces dgARN.

Je tente également de comprendre, grâce à cette technique, l'effet d'un ssODN ou dsADN ou ADN cible sur le complexe RNP. Cela pourrait peut-être nous permettre d'expliquer l'effet positif de la présence d'un ssODN sur le taux d'édition observé par d'autres laboratoires (Nguyen et al., 2020) et notre équipe (**Figure 28**). En effet, nous observons un taux de KO de 21% sur des hiPSC exprimant la GFP nativement en l'absence de ssODN et de 36,8% en présence d'un ssODN qui converti la GFP en BFP. La présence du ssODN BFP induit, sur cette expérience, une édition totale (KO+KI) de 64,2%. Nguyen a notamment émis l'hypothèse que l'agrégation de Cas9 pourrait jouer un rôle dans ce phénomène et qu'un polymère tel que le PGA pourrait avoir le même effet que la présence d'un ssODN (Nguyen et al., 2020).

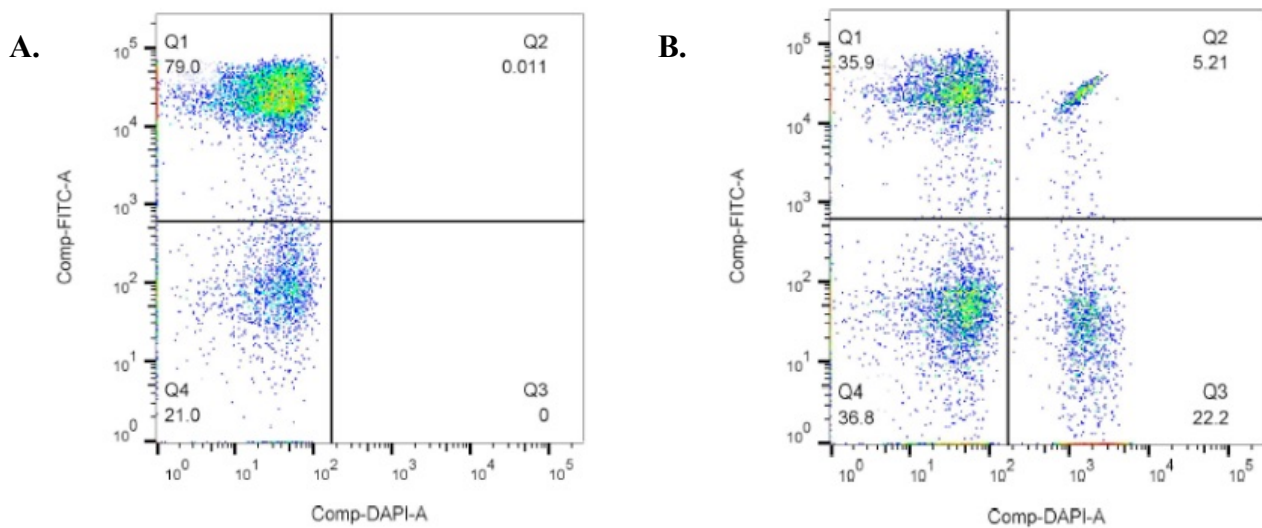


Figure 28: Phénotypes par cytométrie en flux de cellules hiPSC humaines après électroporation par le RNP seul ou avec un ssODN BFP. Dot plot obtenu après 7 jours post-électroporation avec **A.** 0,4μM de Cas9 et un ratio Cas9/dgARN 1/1 seul ou avec **B.** 2μM de ssODN BFP pour induire une conversion de la GFP en BFP.

Le NanoDSF permet de vérifier la conformation que prend Cas9 en réaction à différentes molécules, notamment le gARN ou réactifs mais ne permet en aucun cas d'évaluer la fonctionnalité de celle-ci. Pour cela j'ai donc développé des tests de fonctionnalité *in vitro* (décrits ci-dessous) que je tente de coupler à mes expériences de NanoDSF.

## ***Coupure in vitro sur électrophorèse capillaire (CIV-CE)***

### **a. Principe**

Un produit de PCR contenant la cible du gARN et le PAM est mis en présence d'un RNP formé à partir d'un gARN et incubé à 37°C pour permettre l'activité de coupure de Cas9. Cas9 est décrochée du produit de PCR par dénaturation à 95°C ou traitement à la protéinase K, puis le mélange est finalement ramené à 25°C pour analyse sur électrophorèse capillaire. La concentration mesurée par l'appareil des deux bandes cumulées correspondant à la coupure est quantifiée et rapportée à la quantité totale d'ADN (ADN coupé et non coupé) détectée pour définir le taux de CIV-CE.

### **b. Résultats**

Nous avons développé des tests de coupure *in vitro* sur électrophorèse capillaire réalisées sur LabChip GX (Perkin Elmer) à partir de produits de PCR correspondant à la cible des gARN testés. Ces tests nous ont permis de vérifier la fonctionnalité des complexes RNP formés *in vitro*. En particulier, nous avons mis en évidence qu'un excès de gARN (ratio Cas9/sgARN 1/2 pour les conditions testées) induisait une réduction de l'activité du complexe RNP. Il semble donc exister une dose optimale de gARN par Cas9 à atteindre et à ne pas dépasser (**Figure 29**).

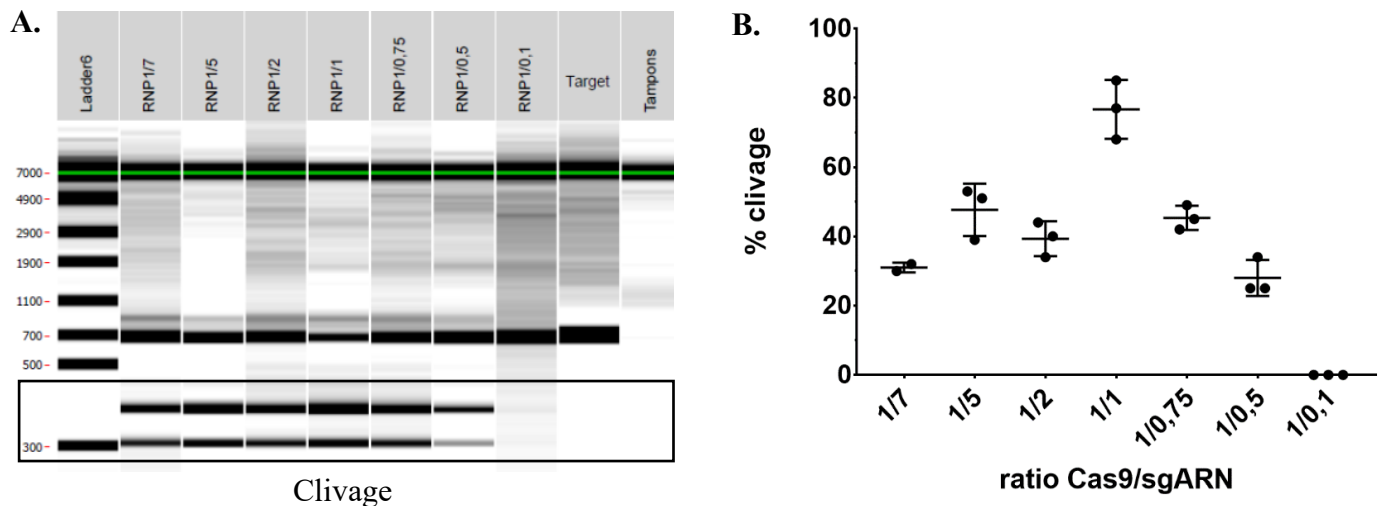


Figure 29: Analyse par CIV-CE du clivage des complexes RNP. A. Electrophorèse capillaire permettant de détecter le clivage du produit de PCR rEphx2 en présence d'une dose constante de Cas9 protéine et d'un ratio Cas9/sgARN croissant. B. Comparaison des taux de clivage à partir des mêmes conditions de test.

Ce résultat amène un questionnement sur l'origine de cette inhibition qui peut être soit liée à Cas9, soit au gARN lui-même ou à la cible ADN. Il est possible que les gARN non chargés par Cas9 interagissent avec le RNP et le rendent inactif tout comme un excès de gARN pourrait créer des dimères. Il est également possible que les gARN non chargés reconnaissent seuls la cible et entrent en compétition avec les RNP. Le CIV-CE ne nous a pas permis de répondre à cette question.

D'autres tests (données non montrées) ont démontré la faible stabilité des sgARN IVT ainsi que la sensibilité de la Cas9 aux décongelations. Nous nous sommes donc posé la question d'utiliser des gARN synthétiques et d'aliquoter Cas9.

L'utilisation d'un produit de PCR comme cible ADN est une modélisation très éloignée de la réalité de la coupure *in vivo* puisque la taille et la structure de l'ADNg est bien plus complexe. Nous avons donc cherché à développer un autre test fonctionnel sur ADNg pour plus de pertinence.

## Coupure *in vitro* détectée par qPCR (qCIV)

### a. Principe

Le complexe RNP préformé est mis en présence d'un ADNg cible et de MgCl<sub>2</sub> puis incubé à 37°C pour permettre la fonctionnalité de Cas9 (**Figure 30**). Une qPCR est ensuite réalisée sur la réaction de clivage avec des amorces flanquant le site de coupure du gARN. Sans coupure, l'ADNg est intact et son amplification est mesurée au cours du temps. Lorsque la coupure a lieu, l'ADNg est coupé au niveau du site de fixation du gARN, empêchant donc l'amplification du locus. En comparant les tubes tests à un tube de référence ne contenant ni Cas9 ni gARN, il est possible de déduire le pourcentage de clivage par la méthode des  $\Delta\Delta C_t$ . Cette méthode est basée sur le fait qu'une qPCR dont l'amplification est efficace à 100% permet de doubler la quantité de chaque amplicon à chaque cycle et est classiquement utilisée pour l'analyse des résultats de qPCR.

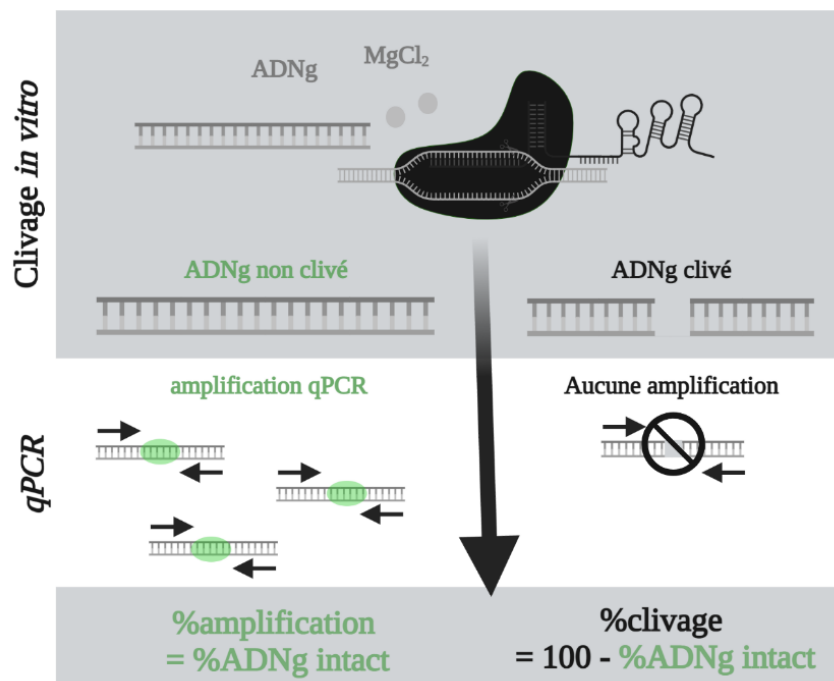


Figure 30: Schéma du principe de qCIV. Ce test est réalisé en deux étapes, le clivage *in vitro* puis la détection par qPCR des ADNg non clivés.

## **b. Résultats**

Cette technique est en cours de mise au point, les conditions expérimentales ne sont donc pas encore clairement établies. Toutefois, un ratio moléculaire ADNg cible/Cas9 de  $1/1.10^6$  correspond à peu près à l'ordre de grandeur utilisé *in vivo* et une incubation 30 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  permet une activité suffisante de Cas9. La qPCR a été réalisée avec Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystem) et analysée sur QuantStudio™3 (Applied Biosystem). Le but de ces tests serait d'utiliser les complexes RNP caractérisés par NanoDSF pour si possible associer le  $T_m$  observé à une fonctionnalité de Cas9. Les conditions de formation du complexe RNP sont donc les mêmes que pour les analyses par NanoDSF.

Des expériences préliminaires (données non montrées) sembleraient indiquer que plusieurs paramètres pourraient fausser les résultats de ce test. Il faudra notamment vérifier si Cas9 et le dgARN se fixent seuls à l'ADNg, empêchant l'amplification du locus sans clivage de celui-ci. Cet aspect sera analysé en détail car il pourrait nous éclairer sur certains phénomènes observés *in vitro* et *in vivo*, en particulier l'effet inhibiteur d'un excès de réactifs. Les conditions de tampons, notamment le  $\text{MgCl}_2$  et le  $\text{KCl}$  présents lors de l'étape de coupure, peuvent également interférer et nuire à l'efficacité d'amplification de la qPCR.

## ***Bilan de cette caractérisation et optimisation***

L'ensemble de la caractérisation du complexe RNP et de l'optimisation de sa formation *in vitro* nous a permis de définir des conditions optimales à appliquer *in vivo*, en partie basées sur un rationnel moléculaire. En effet, une molécule de Cas9 ne peut charger qu'un seul gARN lorsque les conditions de formation du complexe RNP sont optimisées. L'utilisation d'un dgARN synthétique, préparé dans un tampon Duplex commercial (Integrated DNA Technologies) avec une Cas9 commerciale (Integrated DNA Technologies)

et la formation du complexe RNP dans le tampon de dilution de Cas9 (HEPES 20mM pH7,5, KCl 150mM) nous permettent d'atteindre ces conditions optimales. Nous avons donc voulu confirmer que ces conditions optimales *in vitro* le sont *in vivo*.

## **Application à l'édition de génome *in vivo* sur iPSC humaines et embryons de rats**

**Données publiées dans BioRxiv : <https://doi.org/10.1101/2021.09.03.458921>**

Pour cela, nous avons utilisé le système CRISPR/Cas9 et un ssODN pour induire des mutations ponctuelles par KI sur des hiPSC et des embryons de rats (article ci-dessous et figures et tableaux supplémentaires en **Annexe 2**).

Les hiPSC utilisées dans ce projet ont été reprogrammées par la plateforme iPSC de Nantes (Gaignerie et al., 2018) et la EGFP insérée dans le locus AAVS1 grâce à des TALENs. Des lignées EGFP homozygotes et hétérozygotes ont été dérivées à partir d'un clone, leur intégrité génomique et leur ploïdie ont été vérifiées par la société INTEGRAGEN (Evry, France) avec le HumanCore-24-v1 SNP arrays (Gaignerie et al., 2018). Nous avons fait le choix d'utiliser la lignée homozygote pour avoir un modèle comparable au rat ou à l'édition de cellules normales. Les cellules sont cultivées dans un milieu mTesR1, en plaque 6 puits recouverts de Matrigel en conditions « feeder-free ». Pour l'électroporation, ces cellules sont décollées et dissociées en cellules uniques avec TripleE et 200 000 cellules sont resuspendues dans le tampon de nucléofection du kit « P3 Primary Cell ». La protéine Cas9, le dgARN ciblant la GFP et un ssODN permettant la conversion de la GFP en BFP sont préalablement préparés à 10X et ajoutés aux cellules avant transfert de ces 20µl en barrettes de nucléofection. Le programme CA-137 est utilisé sur le 4D-nucleofector (Lonza). Les hiPSC sont ensuite reprises dans du milieu de culture contenant des inhibiteurs ROCK et remises en culture en plaque 24 puits recouverts de Matrigel. Les puits qui atteignent la confluence sont passés au cours de la semaine de culture. Sept jours post-électroporation, les cellules sont décollées et dissociées en cellules uniques avec TripleE pour analyse en cytométrie en flux de l'expression de la GFP et de la BFP.

De 30 à 60 embryons de rat Sprague-Dawley (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) au stade 1-cellule ont été électroporés avec le système NEPA21 (Nepa Gene Co.) dans 50µL de tampon HEPES 20mM pH7,5, KCl 150mM comme décrit par notre équipe précédemment (Remy et al., 2017). La protéine Cas9, le dgARN ciblant l'exon 1 du gène *rEphx2* et un ssODN induisant l'insertion d'un site de restriction XbaI ont été utilisés. Le gène *rEphx2* est porté par le chromosome 15 du rat et code pour une époxide hydrolase particulièrement impliquée dans les maladies cardiovasculaires humaines (Gautheron and Jérù, 2021). Les

embryons ayant survécu sont réimplantés le jour de l'électroporation puis récoltés au jour embryonnaire 14. Ils ont été génotypés par PCR, qPCR, restriction enzymatique et séquençage Sanger (Figure 31). Le site de restriction XbaI porté par le ssODN nous a permis de faciliter la détection des évènements KI. Les génotypes des embryons sont détaillés en **Annexe 3**.

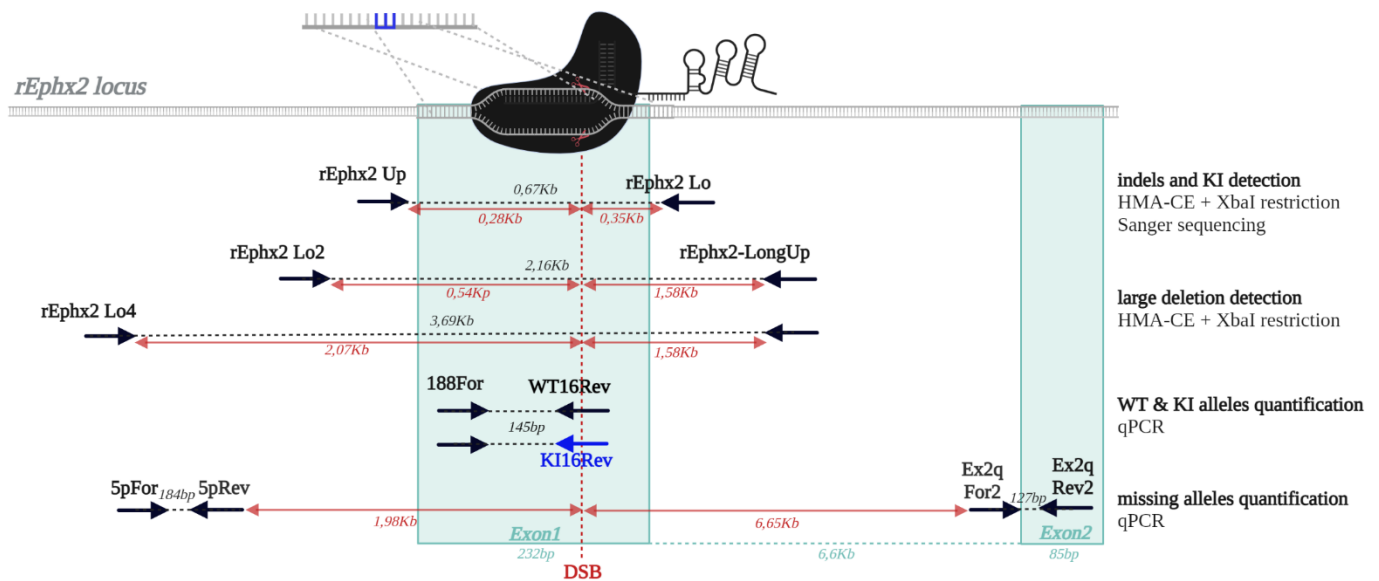


Figure 31: Détail de la localisation des amorces utilisées pour le génotypage des embryons de rats sur le locus *rEphx2* pour définir les taux de KI, d'édition et de larges délétions. Les amorces sont notées en noir, les exons et introns en vert, la cassure double brin (DSB) en rouge. La taille des amplicons est notée en noir, la taille des exons et introns en vert et la distance du site de coupure jusqu'à l'amorce en rouge. WT, wild-type, KI, knockin, HMA-CE

La première étape de cette étude a été de définir la concentration de Cas9 optimale à utiliser pour chaque modèle. Pour cela, nous avons testé une gamme de concentrations de Cas9 à partir des données de la littérature et de notre expérience. Nous avons ainsi démontré que 0,2 $\mu$ M et 0,4 $\mu$ M de Cas9 pour le rat et pour les iPSC respectivement, sont optimales pour une forte efficacité de KI (supérieure à 50% pour nos deux modèles avec une concentration de ssODN de 2 $\mu$ M). Par la suite, nous avons comparé les ratios RNP (Cas9/dgARN) 1/1 et 1/2 et avons confirmé les résultats *in vitro* indiquant que le ratio RNP 1/1 est suffisant pour une édition efficace. De plus, nous avons observé un effet négatif de fortes doses de RNP sur les taux de KI chez le rat et sur la survie des cellules pour les hiPSC.

Sur l'ensemble de cette étude, nous avons démontré que de faibles doses de Cas9 et gARN, couplées à de fortes doses de ssODN permettent la génération de modèles génétiquement modifiés cellulaires et animaux de façon très efficace. Il est donc souhaitable d'utiliser des doses raisonnables de réactifs pour l'édition de génome *in vivo*. De plus, l'expression des concentrations de ces doses en molaires faciliterait l'extrapolation moléculaire des conditions utilisées dans la littérature et permettrait de comparer les différentes études entre elles, même si celles-ci n'utilisent pas exactement les mêmes composants.

# Highly Efficient Knockin in Human iPS Cells and Rat Embryos

## by CRISPR/Cas9 Molecular Optimization

Vanessa Chenouard<sup>1,2</sup>, Isabelle Leray<sup>3</sup>, Laurent Tesson<sup>1</sup>, Séverine Remy<sup>1</sup>, Agnès Fortun<sup>4,5</sup>, Karine Bernardeau<sup>4,6</sup>, Yacine Cherifi<sup>2</sup>, Laurent David<sup>1,3</sup>, Ignacio Anegon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Nantes, [CHU Nantes], Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France

<sup>2</sup>genOway, Lyon, 69007, France

<sup>3</sup>Nantes Université, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS3556, Nantes, France

<sup>4</sup>P2R « Production de protéines recombinantes », CRCINA, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>5</sup>Nantes Université, CHU de Nantes, Cibles et médicaments des infections et du cancer, IICiMed, EA 1155, F-44000 Nantes, France

<sup>6</sup>Université de Nantes, Inserm, CRCINA, F-44000 Nantes, France

### **\*Correspondence:**

ianegon@nantes.inserm.fr

**Abstract:**

The CRISPR/Cas9 system is now the gold standard for the generation of genetically modified cell and animal models but knockin is a bottleneck. One reason could be that there is no consensus regarding the concentrations of its components to be used. Here, we defined optimal Cas9 protein, guide RNA and short donor DNA concentrations on a GFP to BFP conversion model of human induced pluripotent stem cells and point mutations on rat transgenic embryos. With a molecular rational approach of the CRISPR/Cas9 system and study of ribonucleoprotein complex formation by nanodifferential scanning fluorimetry, we defined that Cas9/guide RNA 1/1 molar ratio with 0.2 $\mu$ M and 0.4 $\mu$ M of Cas9, coupled with 2 $\mu$ M of ssODN are sufficient for optimal and high knockin frequencies in rat embryos and human induced pluripotent stem cells, respectively. These optimal conditions use lower concentrations of CRISPR reagents to form the RNP complex than most conditions published while achieving 50% of knockin. This study allowed us to reduce costs and toxicity while improving editing and knockin efficacy on two particularly key models to mimic human diseases.

**Keywords:**

CRISPR/Cas9, RNP complex, electroporation, NanoDSF, hiPS cells, rat, genome editing, knockin

## I. Introduction

Genetically modified models are necessary tools to better understand gene functions and study human diseases. Both animal and cellular models offer pros, cons and hurdles that make them complementary. In particular, for genetically modified animal models, the rat has always been a model of choice to study gene functions or model human diseases but suffered from a lack of accessible tools for decades (Chenouard et al. 2021). In parallel, cell models have been transformed fifteen years ago by the development of human induced pluripotent stem (hiPS) cells (Takahashi and Yamanaka 2006; Yu et al. 2007), which offer the flexibility necessary to mimic most human diseases. Both models have been revolutionized by the conversion of CRISPR/Cas bacterial immune systems into genome editing toolbox (Jinek et al. 2012) to precisely create almost any knockout (KO) or knockin (KI) models (single or multiplex KO, point mutation, conditional KO, reporter...). Nevertheless, efficacy, at least in the most complex KI cases with multiple or large DNA donors DNA, is still too low for an efficient development.

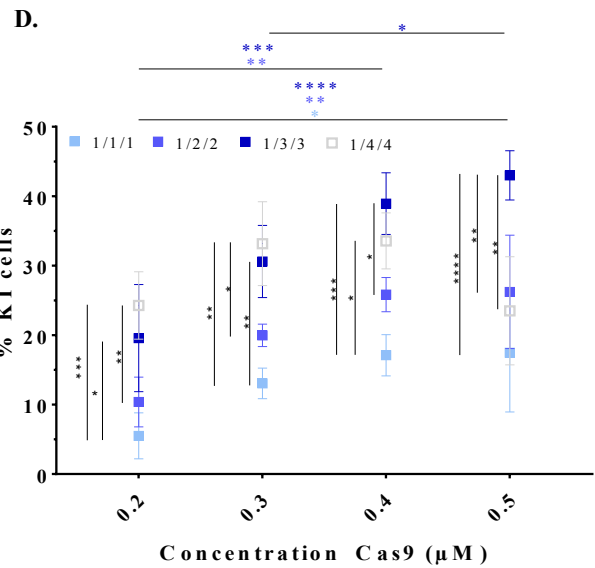
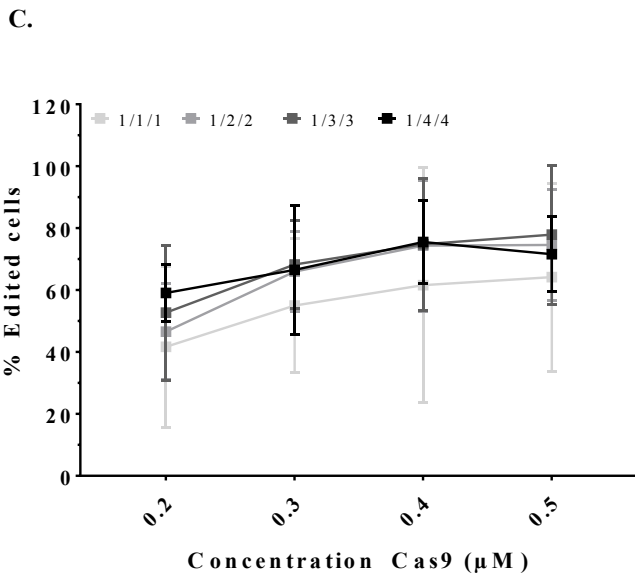
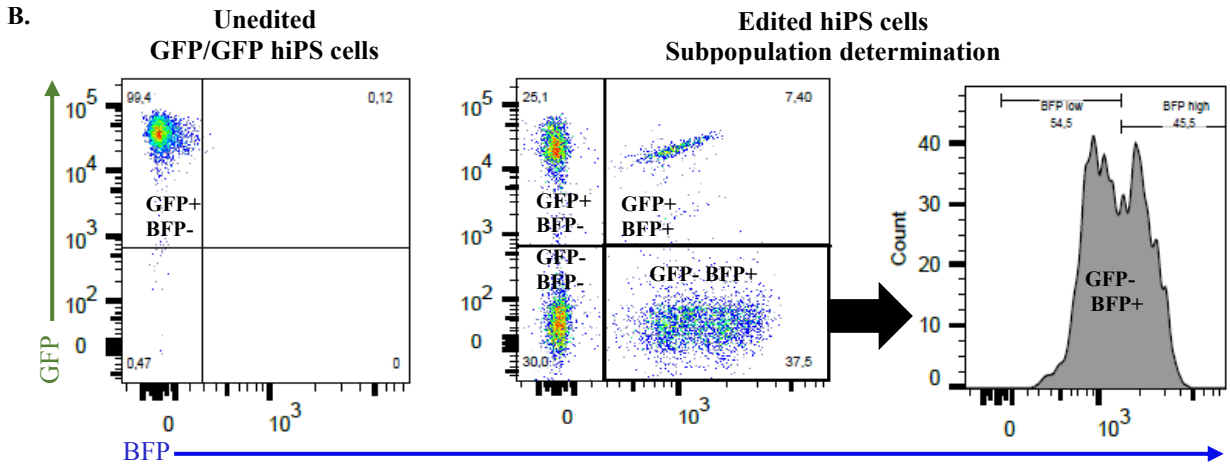
The CRISPR/Cas system is composed of a Cas9 nuclease able to specifically cleave a target DNA sequence by the guidance of an RNA molecule after formation of a ribonucleoprotein (RNP) complex. The concentrations of Cas9 and guide RNA (gRNA) for RNP formation used to deliver into hiPS cells or rodent embryos are quite heterogenous in the literature (Skarnes et al. 2019; Xu et al. 2019; Kaneko and Nakagawa 2020; Remy et al. 2017). For instance, RNP molar ratio (Cas9/gRNA) of 1/5 (Skarnes et al. 2019) have been electroporated to hiPS cells while others used 1/1,3 ratio (Xu et al. 2019). For rat embryos, 1/26 molar ratio (Kaneko and Nakagawa 2020) has been used whereas us and others have used 1/1.6 ratio (Remy et al. 2017). Moreover, conditions were described with mass or massic concentration and required calculations to compare between experiments. The mass of one molecule of DNA depends on its size which complicates comparison of massic conditions except for similar donors. To circumvent this, it would be more appropriate to work in molarity rather than mass to facilitate comparison between studies and repetition of experiments in other laboratories.

In our study, we analyzed the basic molecular aspects of this system to define Cas9 and dual gRNA (dgRNA) lowest but most efficient concentration for optimal RNP (Cas9/dgRNA) formation and the optimal single-stranded oligonucleotide (ssODN) concentration for the electroporation of hiPS cells and rat embryos to generate KI models. We first challenged the system with electroporation of different concentrations of Cas9 and Cas9/dgRNA/ssODN ratios into hiPS cells. They permanently express GFP and KI converted them into BFP to facilitate the readout by flow cytometry. We then checked RNP complex formation efficiency *in vitro* by nano differential scanning fluorimetry (NanoDSF) to define the best RNP (Cas9/dgRNA) ratio. This ratio was finally applied *in vivo* on the hiPS cells GFP to BFP conversion model and rat embryos point mutations model. It improved the generation of KI in these two particularly key models of human diseases. In turn, those optimized conditions reduced the operating costs of such experiments.

## II. Results

### Molecular optimization of GFP to BFP conversion on hiPS cells

Biallelic homozygous GFP iPS cells were converted into BFP expressing cells by CRISPR/Cas9 KI using a BFP ssODN (**Fig. 1A**) and phenotyped by flow cytometry to define different cell populations that lost GFP expression and/or acquired BFP expression as a consequence of NHEJ or KI, respectively (**Fig. 1B**). We could define cell subsets that still expressed GFP (presumably with both or one GFP allele conserved), that had completely lost GFP expression (presumably biallelic KO), that were only BFP expressors but with two different populations of higher and lower levels of expression (presumably with one or two alleles with KI) and that co-expressed GFP and BFP (presumably one allele each) (**Fig. 1B**). Using this phenotyping strategy, the edition rate in the GFP+ BFP- subpopulation is underestimated because GFP/GFP and GFP/KO (frameshift mutation) cells could neither be discriminated from each other nor the generation of indels that do not eliminate the fluorescent activity of the GFP (in frame mutation).



**Figure 1: Molecular optimization of GFP to BFP conversion on hiPS cells.** **A.** Schematic representation of GFP to BFP conversion strategy using CRISPR/Cas9 and a BFP ssODN. PAM is written in bold, KI in blue and DraIII restriction site is underlined. **B.** Discrimination of outcomes after CRISPR/Cas9 edition with BFP ssODN on GFP hiPS cells using flow cytometry phenotyping. GFP/KO cells cannot be discriminated from GFP/GFP cells using this strategy. **C.** Effect of increased concentrations of Cas9 protein on edition rate (include KI) using Cas9/dgRNA/ssODN 1/1/1, 1/2/2, 1/3/3 and 1/4/4 ratios. **D.** Effect of increased concentrations of Cas9 protein on KI rate using the same ratios. Asterisks highlight the statistical differences between conditions using two ways ANOVA (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$  and \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ). Figure created with BioRender.com. GFP, Green Fluorescent Protein; dgRNA, dual guide RNA; ssODN, single-stranded oligonucleotide; BFP, Blue Fluorescent Protein; hiPS, human induced pluripotent stem cells.

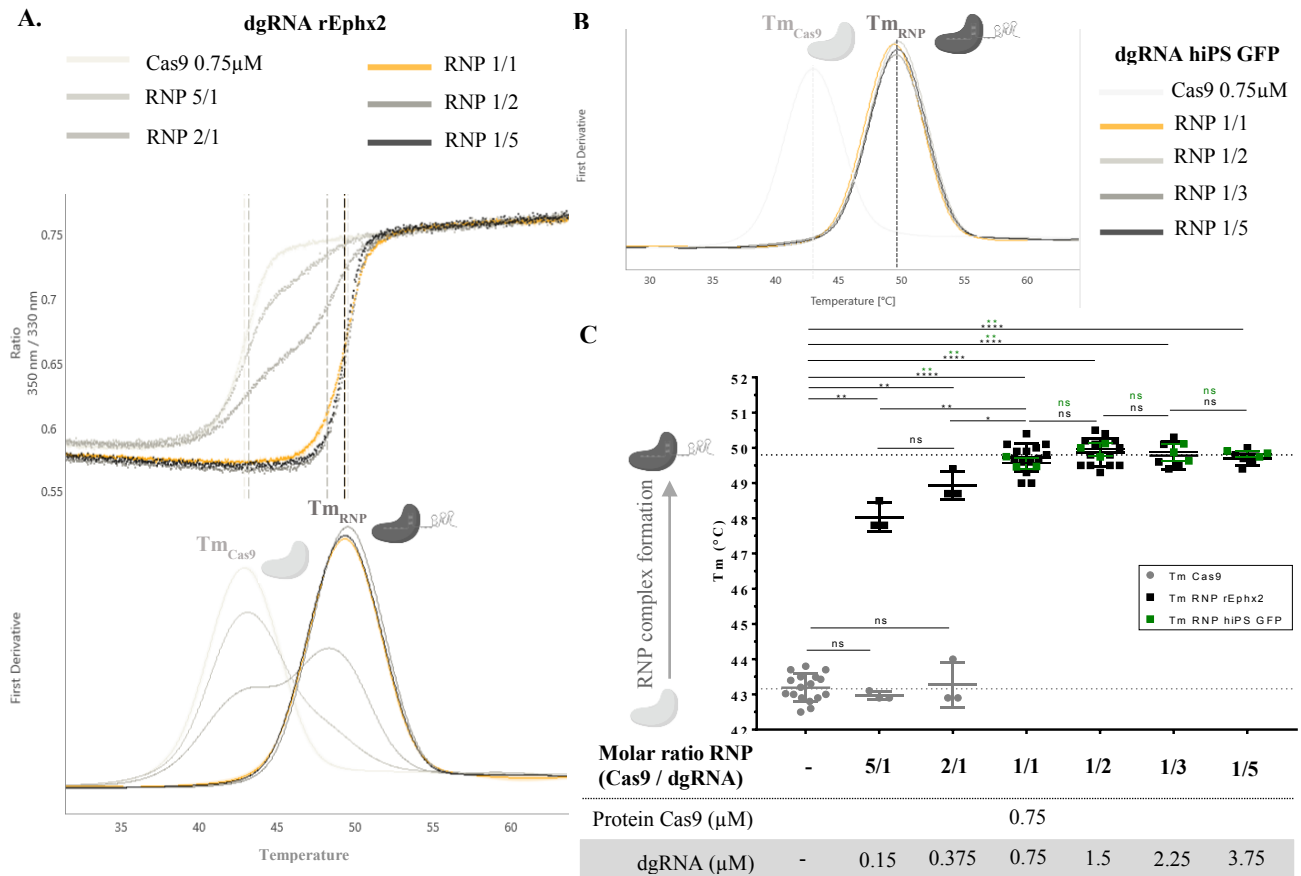
Skarnes et al. electroporated 800,000 hiPS cells in 100 $\mu$ L with 20 $\mu$ g of Cas9 (1.2 $\mu$ M), 16 $\mu$ g (5 $\mu$ M) of gRNA and 200pmol (2 $\mu$ M), Cas9/sgRNA/ssODN 1/5/2 molar ratio using Amaxa 4D nucleofector (Lonza) pulse code CA-137 (Skarnes et al. 2019). For convenience, we decided to also use this electroporator but with 200,000 cells in 20 $\mu$ L. For a starting point, we challenged our GFP expressing hiPS with 0.2 $\mu$ M or 1 $\mu$ M of Cas9 protein with a Cas9/dgRNA/ssODN ratio of 1/1/1 and 0.5 $\mu$ M or with a 1/5/5 ratio. Cells electroporated with 1 $\mu$ M of Cas9 1/1/1 ratio (15% of confluence) display about 2 times more toxicity than those with 0.2 $\mu$ M at the same ratio (35% of confluence), preventing us from ratio increase with this condition (**Fig. S1A**). Moreover, we observed even higher toxicity with cells electroporated with 0.5 $\mu$ M 1/5/5 ratio (5% of confluence) indicating that this ratio is out of the limit that these cells can bear (**Fig. S1A**). That is why we decided not to repeat these conditions and to limit Cas9 concentrations range to 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 $\mu$ M and Cas9/dgRNA/ssODN ratio to 1/1/1, 1/2/2, 1/3/3 and 1/4/4. Edition rates (including KO and KI) with 1/1/1 ratio tend to improve with increased doses of Cas9 protein from 0.2  $\mu$ M to 0.5  $\mu$ M (41.7% and 64.2% respectively) but with no significant differences (**Fig. 1C**). The same trend is observed for all ratios except for 1/4/4 with 0.5 $\mu$ M of Cas9 protein. For this condition and 0.4 $\mu$ M of Cas9 1/4/4 ratio, we observed less than 5% of confluence two days after electroporation while having more than 25% of confluence for 1/1/1 ratio with the same Cas9 concentrations (**Fig. S1B**), which indicates that the higher limits of doses of dgRNA and ssODN we can use have been crossed. The edition rates are similar between ratios for each concentration of Cas9 tested.

For Cas9/dgRNA/ssODN 1/1/1 ratio, KI rates were increased significantly with higher doses of Cas9 from 0.2  $\mu$ M to 0.5  $\mu$ M (5.5% and 17.5% respectively,  $p=0.0471$ ) (**Fig. 1D**). This difference between 0.2 and 0.5 $\mu$ M of Cas9 on KI is also observed with 1/2/2 (10.4% and 26.2% respectively,  $p=0.0012$ ) and 1/3/3 (19.6% and 43.0% respectively,  $p<0.0001$ ) ratios. KI rate with 0.4 $\mu$ M of Cas9 is significantly higher than 0.2 $\mu$ M for 1/2/2 ratio (25.8% and 10.4% respectively,  $p=0.0035$ ) and 1/3/3 (39.0% and 19.6% respectively,  $p=0.0006$ ). These data confirm that 0.2 $\mu$ M of Cas9 is too low for efficient KI and that 0.4 $\mu$ M could be enough. In the same way, increasing Cas9/dgRNA/ssODN ratios

significantly improved KI rates. For 0.4 $\mu$ M of Cas9, 1/1/1 KI rate (17.1%) is significantly lower than 1/3/3 and 1/4/4 (39.0%  $p=0.0005$  and 33.6%  $p=0.0103$  respectively). Nevertheless, for 0.5 $\mu$ M of Cas9, 1/4/4 KI rate is significantly lower than 1/3/3 (23.5% and 43.0% respectively,  $p=0.002$ ) and could be explained by toxicity (**Fig S1B**), as discussed for edition. Thus, 0.4 $\mu$ M Cas9 protein seems a good compromise between efficacy and toxicity. The toxicity observed for 0.5 $\mu$ M of Cas9 1/4/4 ratio may be due to high amount of dgRNA not loaded to Cas9 protein. The fact that one Cas9 can load only one dgRNA suggest that, if RNP complex formation is efficient, RNP (Cas9/dgRNA) ratio may be reduced to use high concentrations of ssODN (2 $\mu$ M tested here) with limited toxicity.

### **Assessment of RNP complex formation efficiency *in vitro* by NanoDSF**

RNP complex formation is characterized by a conformational rearrangement which affect  $T_m$  and could be detected by NanoDSF. To define the efficacy of RNP complex formation and the best ratio of dgRNA per protein of Cas9, we obtained the denaturation curve induced by temperature increase. Using the first derivative, we determined the melting temperature ( $T_m$ ) of Cas9 alone ( $T_{m,Cas9}$ ) or with increased concentrations of dgRNA ( $T_{m,RNP}$ ) matching RNP ratios electroporated into rat embryos and hiPS cells (**Fig. 1A** and **1B**, respectively). In all conditions, addition of dgRNA rEphx2, used for the genome editing of rat embryos (**Fig. 2A**), or dgRNA GFP, used in hiPS genome editing strategy (**Fig. 2B**), induced a drastic  $T_m$  increase compared to Cas9 alone and reflects RNP complex formation. For molar RNP (Cas9/dgRNA) ratios rEphx2 in favor of Cas9 (RNP 5/1 and 2/1 ratios) we observed a denaturation curve with two transitions represented as  $T_{m,Cas9}$  and  $T_{m,RNP}$  (**Fig. 2A**). Compared to Cas9 alone ( $T_{m,Cas9,Cas9}=43.1^\circ\text{C}$ ),  $T_{m,Cas9}$  for those two RNP ratios were not significantly different ( $T_{m,Cas9,RNP\ 5/1}=42.9^\circ\text{C}$ ;  $T_{m,Cas9,RNP\ 2/1}=42.9^\circ\text{C}$ ,  $p=0.4809$  and  $0.9353$ , respectively) while  $T_{m,RNP}$  were ( $T_{m,RNP,RNP\ 5/1}=47.8^\circ\text{C}$  ;  $T_{m,RNP,RNP\ 2/1}=48.7^\circ\text{C}$ ,  $p=0.029$  for both). These results indicate that uncomplexed Cas9 remains in these conditions. With an equal ratio (RNP 1/1) or ratios in favor of dgRNA (RNP 1/2, 1/3 and 1/5), we observed only one transition, ( $T_{m,RNP,RNP\ 1/1}=49.8^\circ\text{C}$  ;  $T_{m,RNP,RNP\ 1/2}=49.8^\circ\text{C}$  ;  $T_{m,RNP,RNP\ 1/3}=49.6^\circ\text{C}$  ;  $T_{m,RNP,RNP\ 1/5}=49.7^\circ\text{C}$ ) which were not significantly different from each others. Moreover,  $T_{m,RNP}$  for RNP 1/1 ratio is significantly



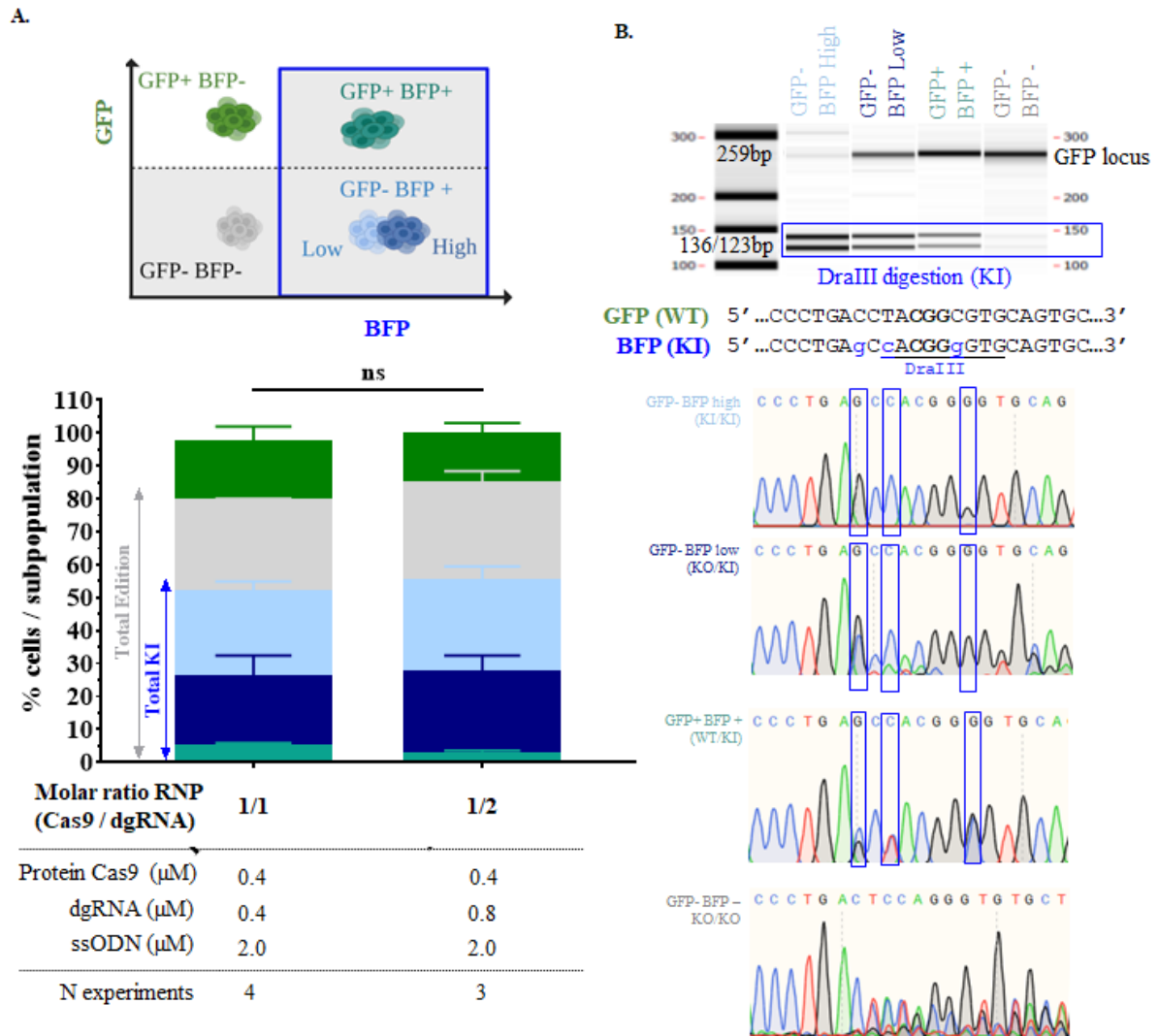
**Figure 2: Assessment of RNP complex formation efficiency *in vitro* by NanoDSF. A.** NanoDSF curves and derivatives used to determine  $T_m$  of Cas9 ( $T_{m_{Cas9}}$ ) and RNP complex ( $T_{m_{RNP}}$ ) for each condition tested with dgRNA rEphx2. **B.** NanoDSF derivatives used to determine  $T_{m_{Cas9}}$  and  $T_{m_{RNP}}$  with dgRNA hiPS GFP. **C.** Comparison of RNP complex formation efficiency by  $T_{m_{Cas9}}$  and  $T_{m_{RNP}}$  analysis with increased concentrations of both dgRNA. Asterisks highlight the statistical differences between conditions using nonparametric Mann-Whitney tests (ns  $P > 0.05$ , \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  and \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ). Figure created with BioRender.com. dgRNA, dual guide RNA; RNP, ribonucleoprotein complex;  $T_m$ , melting temperature; hiPS GFP, human induced pluripotent stem cells expressing the Green Fluorescent Protein.

different from RNP 2/1 ratio ( $T_{m_{RNP}}$  RNP 2/1 = 48.7 $^{\circ}$ C;  $T_{m_{RNP}}$  RNP 1/1=49.8 $^{\circ}$ C,  $p=0.0206$ ) and Cas9 alone ( $T_{m_{Cas9}}$  Cas9=43.1 $^{\circ}$ C;  $T_{m_{RNP}}$  RNP 1/1=49.8 $^{\circ}$ C,  $P < 0.0001$ ). This indicate that all Cas9 have formed an RNP complex with RNP 1/1 and ratios in favor of dgRNA.  $T_{m_{RNP}}$  RNP 1/1 with dgRNA hiPS GFP is also significantly different from Cas9 alone ( $T_{m_{Cas9}}$  Cas9=43.1 $^{\circ}$ C;  $T_{m_{RNP}}$  RNP 1/1=49.5 $^{\circ}$ C,  $P=0.0029$ ) and ratios in favor of gRNA (RNP 1/2, 1/3 and 1/5) are not significantly different from each others either. Thus, RNP complex formation is efficient in the conditions used *in vitro* and RNP 1/1 ratio seems optimal for *in vivo* application.

### **Highly efficient hiPS GFP to BFP conversion and characterization**

By phenotyping, we compared rates of KI and genome edition (KI and KO) but also the proportion of each subpopulation generated by electroporation of hiPS cells with 0.4 $\mu$ M of Cas9, RNP 1/1 or 1/2 ratios and 2 $\mu$ M of ssODN (**Fig. 3A**). Increase of ssODN concentrations to 3 or 4 $\mu$ M lead to higher toxicity (**Fig. S2**). We achieved similarly high KI (RNP 1/1=55.4% ; RNP 1/2=54.9%) and edition (RNP 1/1=83% ; RNP 1/2=84.4%) efficiencies between RNP 1/1 and 1/2 ratios. Moreover, RNP 1/1 and 1/2 ratios generated not significantly different proportions of GFP+ BFP- (RNP 1/1=18.0% ; RNP 1/2=15.0%), GFP+ BFP+ (RNP 1/1=4.9% ; RNP 1/2=2.5%), GFP- BFP high (RNP 1/1=23.3% ; RNP 1/2=24.6%), GFP- BFP low (RNP 1/1=27.2% ; RNP 1/2=27.8%) and GFP- BFP- (RNP 1/1=27.6% ; RNP 1/2=29.5%).

These results indicate that 0.4 $\mu$ M of Cas9, with RNP 1/1 ratio and 2 $\mu$ M of ssODN, is sufficient and optimal to reach high efficiency of KI generation in hiPS cells. Using cell sorting (**Fig. S3**) we genotyped the subpopulations generated by electroporation of this optimal condition by genotyping. DraIII digestion (**Fig. 3B**), which reflects BFP conversion by ssODN mediated KI, was consistent with Sanger sequencing (**Fig. 3B**). GFP- BFP<sup>high</sup> cells profil analysis showed full DraIII digestion and only BFP sequence, demonstrating their expected KI/KI genotype. GFP- BFP<sup>low</sup> cells display partial (67.6%) DraIII digestion with BFP sequence coupled with various indels profiles on sequencing suggesting a KO/KI genotype. GFP+ BFP+ analysis showed also partial (32%) DraIII digestion and both GFP and BFP sequences, confirming the expected WT/KI genotype. Sample with GFP- BFP- cells was digested in an extremely low proportion by DraIII (digested bands under the quantifiable range of the system). This sequence indicated diverse indels profiles and no BFP sequence, confirming the expected KO/KO genotype. The coherence between phenotypes and genotypes of CRISPR/Cas9 outcomes on the GFP to BFP conversion model validate the power of this phenotyping technic.

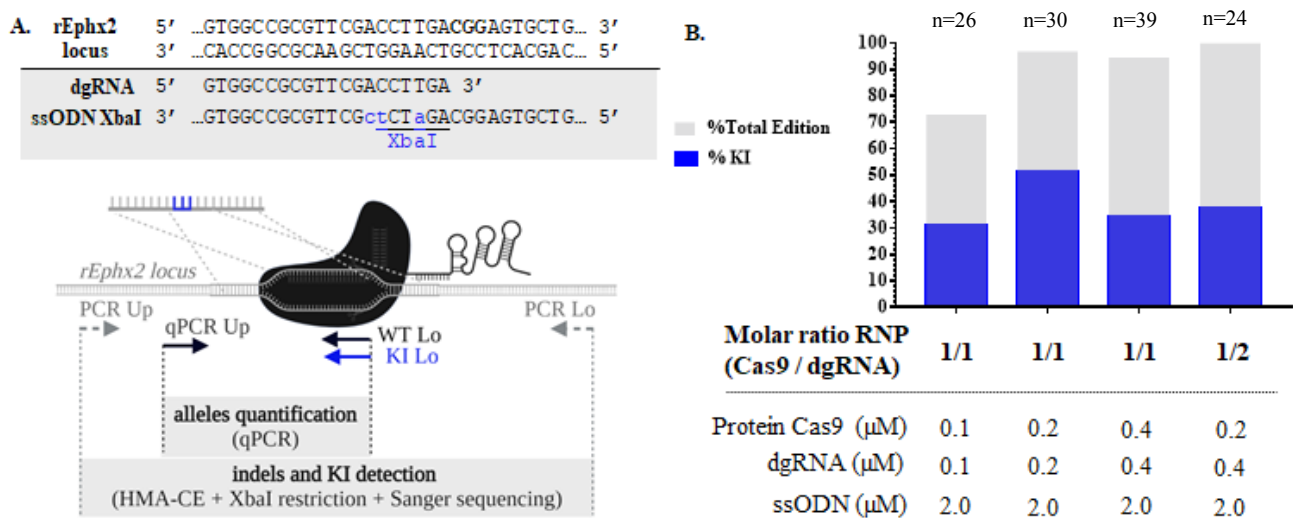


**Figure 3: Highly efficient hiPS GFP to BFP conversion and characterization.** **A.** Comparison of KI, edition rate and proportions of each subpopulation (defined by phenotyping) between RNP (Cas9/dgRNA) 1/1 and 1/2 ratios with  $2\mu\text{M}$  of ssODN BFP. Two ways ANOVA test was used to verify the significance of the difference between the two conditions tested (ns $P>0.05$ ). **B.** Subpopulation genotyping by DraIII digestion and Sanger sequencing of previously sorted subsets. DraIII was performed on GFP amplicon (259bp) which amplified WT, indels and KI alleles. DraIII digestion of KI allele generated two bands (136 and 123bp) on capillary electrophoresis. Sequencing was performed on GFP amplicon and compared to GFP and BFP sequence. BFP mutations are noted in blue, DraIII restriction site is underlined and dgRNA hiPS GFP is written in bold. Figure created with BioRender.com. GFP, Green Fluorescent Protein; BFP, Blue Fluorescent Protein; dgRNA, dual guide RNA; ssODN, single-stranded oligonucleotide; WT, Wild-type; KI, knockin; KO, knockout.

### Highly efficient point mutations on rat embryos

To define optimal conditions of KI in one-cell rat embryos, an XbaI restriction site was generated by point mutation on the *rEphx2* locus using CRISPR/Cas9 and ssODN electroporation (**Fig. 4A**). KI and edition rates were assessed by a heteroduplex mobility assay on microfluidic capillary electrophoresis (HMA-CE) (Chenouard et al. 2016), Xba I digestion, sequencing and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Increasing Cas9 protein concentration from  $0.1\mu\text{M}$  to  $0.2\mu\text{M}$  drastically improved both edition (73.1% and 96.8%, respectively) and KI (30.8% and 51.6%,

respectively) rates with RNP 1/1 ratio and 2 $\mu$ M of ssODN (**Fig. 4B and Table S1**). On the other hand, increasing Cas9 protein concentration to 0.4 $\mu$ M reduced KI efficiency (34.2%). RNP 1/2 ratio with 0.2 $\mu$ M of Cas9 also reduced KI rate (RNP1/1=51.6% ; RNP1/2=37.5). Toxicity for all conditions was comparable to the usual results obtained following microinjection or unmanipulated rat embryos, with more than 25% of birth (table S1). Thus, electroporation of 0.2 $\mu$ M of Cas9 protein with ratio RNP1/1 and ssODN 2 $\mu$ M was the optimal condition to achieve high KI efficiency on rat embryos.



**Figure 4: Highly efficient point mutations on rat embryos.** **A.** Schematic representation of rEphx2 point mutation generation by CRISPR/Cas9 and genotyping strategies. PAM is written in bold, KI in blue and DraIII restriction site is underlined. **B.** Highly efficient KI generation on rEphx2 locus using low doses of CRISPR Cas9. Figure created with BioRender.com. dgRNA, dual guide RNA; ssODN, single-stranded oligonucleotide; WT, Wild-type; KI, knockin; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; HMA-CE, heteroduplex mobility assay by capillary electrophoresis.

### III. Discussion

Methodologies for application of CRISPR/Cas9 to cells or embryos are very diverse between laboratories in particular concentrations of Cas9 protein, gRNA and donor DNA. Those concentrations are usually expressed in mass and not in mole, which makes it harder to compare different works and extrapolate the molecular rationale for each component. In our study, we suggest to apply molecular rationale on CRISPR/Cas9 for genome editing setup. To do so, we developed a technique to verify RNP complex formation efficiency. Indeed, if one Cas9 can only load one gRNA, optimal RNP (Cas9/dgRNA) ratio should then be close to 1/1 for efficient conditions of preparation of RNP complex. Nevertheless, the use of single or dgRNA as well as the donor DNA matching the guide RNA designed for KI may modify this interaction with Cas9 and need to be tested in future

experiments for each specific gene editing experiment. DSF has been previously used by two teams to qualitatively characterize Cas9 thermostability in the presence of truncated or unfolded gRNA (Tillotson 2017) or in the presence of different DNA target binding conditions (Jiang et al. 2016). We have also tested this technique (data not shown) but the requirement of a dye make it poorly reproducible. NanoDSF is a label and immobilization-free technique that allows very high sensibility and reproducibility. With this method we can highlight the modification of thermal stability of the Cas9 protein induced by its complexation with dgRNA. This assay emphasizes the importance of optimal RNP complex formation for efficient edition and KI, even though it is rarely studied in the literature. Further experiments need to be performed to explore other guide RNAs and different formats.

This rational molar optimization of Cas9 and dgRNA prevented excess of free dgRNA to limit toxicity and allowed the use of higher ssODN concentrations *in vivo*. It facilitated KI model generation both on iPS cells and rat embryos by defining optimal conditions as 0.4 $\mu$ M and 0.2 $\mu$ M of Cas9 protein respectively, with RNP 1/1 ratio and 2 $\mu$ M of ssODN. Using these conditions, we reached more than 50% of KI for both models while greatly reducing our costs for reagents. Our study demonstrates that it is not necessary to use neither high amount of Cas9 nor high RNP (Cas9/gRNA) ratio to achieve high KI rate compared to previously published conditions in hiPS cells (Skarnes et al. 2019; Xu et al. 2019) and rats (Kaneko and Nakagawa 2020; Remy et al. 2017) by us and others. This optimization will accelerate the development of KI models using CRISPR/Cas9. In particular for the rat, it will reduce the number of embryos necessary to develop a model and more easily tends toward 3Rs. Moreover, this study may pave the way for more efficient KI with long DNA donor by increasing the chance of DNA donor occurrence at Cas9 cut site with rational molar approach.

## **IV. Material and Methods**

### **CRISPR/Cas9 components and RNP formation**

Cas9 protein, crRNA and tracrRNA were purchased from Integrated DNA Technologies (Alt-R® CRISPR Cas9 system) as well as ultramer ssODN modified on both extremities with phosphorothioate bonds. Sequences are specified in table S2.

Dual gRNA is formed by equimolar incubation of crRNA and tracrRNA in Nuclease Free Duplex Buffer (30 mM HEPES, pH 7.5; 100 mM potassium acetate) from Integrated DNA Technologies. It is denatured 5 minutes at 95°C and incubated 5 min at 25°C to ensure correct folding of dgRNA. RNP complex is formed by incubation of Cas9 protein and dgRNA 10 minutes at 25°C in HEPES 20mM, KCl 150mM, pH7,5 buffer. Concentrations used are specified for each experiment. ssODN is added at concentrations specified for each experiment after RNP formation.

### **NanoDSF**

10 µL of RNP complex prepared with 0.75 µM of Cas9 were loaded into nanoDSF grade high sensitivity capillaries (NanoTemper Technologies) and installed on capillary array on the Prometheus NT.48 NanoDSF instrument (NanoTemper Technologies). The temperature was increased from 20 °C to 95 °C with a linear thermal ramp (at a rate of 1 °C/min). Changes in fluorescence of tryptophan at 330 and 350 nm were recorded at a rate of 10 datapoints per minute. The 350/330 nm ratio of the two wavelengths were plotted against temperature and the first derivative analysis allowed the determination of melting temperatures (T<sub>m</sub>) using the PR.Therm Control Software.

### **hiPS cells**

#### **Culture of hiPSC and generation of GFP iPSC lines**

iPSC were cultured in feeder-free culture conditions: stem cell-qualified Matrigel-coated plates (0.1 mg/mL; BD Bioscience) with mTeSR (Stem Cell Technologies) and passaged using the Passaging Solution XF (StemMACSTM, Miltenyi Biotec). When using single cells suspension, cells were detached with TrypLE™ Express Enzyme (Thermofisher Scientific \_ 12605010) and culture medium was supplemented with 10µM Rock inhibitor Y27632 (Sigma\_ 104M4646V).

For the GFP expressing lines,  $10^6$  human induced pluripotent stem cells “LON71-019” (Gaignerie et al. 2018) were transfected with  $3\mu\text{g}$  TALEN R +  $3\mu\text{g}$  TALEN L +  $4.8\mu\text{g}$  AAV-CAGGS-EGFP (addgene #22212) using Amaxa™ Nucleofector™ II (P3 kit, B-16 program) to obtain KI in the AAV locus. Clones were manually selected and first maintained on matrigel-coated plates with Stemflex, then switched to mTeSR1 medium. Genomic PCR of the AAV locus allowed to select cells that were bi-allelically edited. Genomic integrity of edited lines was performed with Integragen SNP.

### **GFP to BFP edition**

Gentle TrypLE (Gibco) enzymatic digestion was performed to obtain single cells suspension. 200k cells, resuspended in P3 Primary Cell Nucleofector™ Solution (Lonza), were mixed with RNP complex and the ssODN that contains the sequence that will edit GFP to BFP sequences as well as a new DraIII restriction site (Glaser et al. 2016) followed by electroporation in 16-well Nucleocuvette® Strips (Lonza) using CA-137 program. Seven days after transfection, cells were dissociated using TrypLE. Dead cells were stained with Fixable Viability Stain 440UV (BD biosciences). Cells were analyzed using BD FACSCelesta™ (GFP: laser: 488nm, filter: 530/30; BFP: 405nm laser: 450/40, Viability: laser Ultraviolet, filter: 379/28) and sorted with BD FACSAria™ (GFP: laser: 488nm, filter: 530/30; BFP: 405nm laser: 450/40).

### **Animals**

Sprague-Dawley (SD) rats were the only strain used and were sourced from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). All the animal care and procedures performed in this study were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Pays de la Loire region, France, in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit Numbers: CEEA-PdL-2020-26567).

### **Electroporation of rat intact zygotes and embryo transfer**

The electroporation procedure and embryo transfer were performed as previously described (Remy et al. 2017). Briefly, fertilized 1-cell stage embryos were collected from super-ovulated prepubescent

females (30IU PMSG at day-2 before breeding and 20IU HCG the day of breeding; Intervet, France) and kept in M16 medium at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> until electroporation.

Electroporation with dgRNA/Cas9 RNP complex was performed using the NEPA21 system (NEPA GENE Co. Ltd, Sonidel, Ireland) at 300V 0,5ms to limit toxicity. Surviving embryos were implanted the same day in the oviduct of pseudo-pregnant females (0.5dpc) and allowed to develop until embryonic day 14 (E14).

### **Genotyping**

Briefly, hiPS cells and E14 embryos were digested overnight at 56°C in 1mL of tissue digestion buffer (Tris-HCl 0.1 mol/L pH 8.3, EDTA 5 mmol/L, SDS 0.2%, NaCl 0.2 mol/L, PK 100 µg/mL). The CRISPRs nuclease targeted regions were PCR amplified from diluted lysed samples (1/20) with a high-fidelity polymerase (Herculase II fusion polymerase). To detect gene edition, locus specific primers *GFP* and *rEphx2* (Table S2) were used and mutations were analyzed using a heteroduplex mobility microfluidic capillary electrophoresis assay as previously described in detail (Chenouard et al. 2016) followed by PCR amplicon direct digestion by XbaI and sequencing. qPCR was done with primers described in table S2 to quantify both WT and KI alleles.

### **Statistical test**

Graphs and statistical analyses were generated using GraphPad Prism v5.03. Two ways ANOVA tests were performed to compare KI rate, edition rate and subpopulation proportion on hiPS GFP locus. NanoDSF T<sub>m</sub> comparison were performed using nonparametric Mann-Whitney tests.

### **Conflict of interest**

YC and VC are currently genOway employees. The other authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

We thank all our colleagues from genOway, CRTI and the TRIP platform for their support. In particular we thank Claire Usal and Séverine Ménoret for their animal expertise, Laure-Hélène Ouisse, Ghenima Ahmil, Séverine Bézie and Jenny Greig for their flow cytometry and cell sorting

expertise, Aude Guiffes for her work on rat genotyping and Sarah Duponchel for her wise advices. NanoDSF studies was supported by funding from the Biogenouest network and from the “Pays de la Loire” region.

### **Author contributions**

VC participated in all experiments design and analysis. IL and LD designed hiPS cells experiments and IL performed experiments and analysis. SR and IL phenotyped hiPS cells by flow cytometry. VC performed RNP complex formation for rat embryo electroporation and NanoDSF studies. SR handled rat embryos and electroporation of RNP complex. LT set up and performed hiPS cells and rat embryos genotyping. AF and KB performed NanoDSF experiments and analysis. YC and IA secured funding. IA defined experiments and interpreted data. VC wrote this manuscript with all authors intellectual contribution.

### **References**

- Chenouard V, Brusselle L, Heslan J-M, Remy S, Ménoret S, Usal C, Ouisse L-H, NGuyen TH, Anegon I, Tesson L. 2016. A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *J Genet Genomics* **43**: 341–348.
- Chenouard V, Remy S, Tesson L, Ménoret S, Ouisse L-H, Cherifi Y, Anegon I. 2021. Advances in Genome Editing and Application to the Generation of Genetically Modified Rat Models. *Frontiers in Genetics* **12**.
- Gaignerie A, Lefort N, Rousselle M, Forest-Choquet V, Flippe L, Francois–Campion V, Girardeau A, Caillaud A, Chariau C, Francheteau Q, et al. 2018. Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming. *Sci Rep* **8**: 14363. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156222/> (Accessed July 15, 2021).
- Glaser A, McColl B, Vadolas J. 2016. GFP to BFP Conversion: A Versatile Assay for the Quantification of CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing. *Mol Ther Nucleic Acids* **5**: e334.
- Jiang F, Taylor DW, Chen JS, Kornfeld JE, Zhou K, Thompson AJ, Nogales E, Doudna JA. 2016. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science* **351**: 867–871. <http://science.sciencemag.org/content/351/6275/867> (Accessed June 28, 2021).
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.

- Kaneko T, Nakagawa Y. 2020. Genome editing of rodents by electroporation of CRISPR/Cas9 into frozen-warmed pronuclear-stage embryos. *Cryobiology* **92**: 231–234.
- Remy S, Chenouard V, Tesson L, Usal C, Ménoret S, Brusselle L, Heslan J-M, Nguyen TH, Bellien J, Merot J, et al. 2017. Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci Rep* **7**: 16554.
- Skarnes WC, Pellegrino E, McDonough JA. 2019. Improving homology-directed repair efficiency in human stem cells. *Methods* **164–165**: 18–28.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663–676.
- Tillotson E. 2017. Assessing Cas9-gRNA ribonucleoprotein complex formation for development of ex-vivo therapeutics.
- Xu H, Wang B, Ono M, Kagita A, Fujii K, Sasakawa N, Ueda T, Gee P, Nishikawa M, Nomura M, et al. 2019. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell* **24**: 566-578.e7.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, et al. 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **318**: 1917–1920. <http://science.sciencemag.org/content/318/5858/1917> (Accessed July 2, 2021).

### ***Données non publiées : étude des larges délétions autour du site de coupure***

La présence de larges délétions (plusieurs Kb) en 5' et 3' du locus ciblé (Exon1) sur *rEphx2* a été analysée suite aux résultats précédemment décrits (Chenouard et al., 2021b). Les amorces PCR et qPCR utilisés sont détaillés dans la Erreur ! Source du renvoi introuvable. et les résultats de chaque analyse PCR pour chaque embryon est détaillé en **Annexe 3**.

Dans l'étude décrite dans la section précédente (Chenouard et al., 2021b), les animaux ont été génotypés grâce à une analyse PCR sur un fragment de 0,67Kb (*rEphx2 Up / rEphx2 Lo*) analysé par HMA-CE (Chenouard et al., 2016b), puis soumis à une digestion *XbaI* et séquencés (méthode Sanger). En parallèle, l'analyse par qPCR de la présence ou non d'un allèle normal (188For / WT16Rev) ou KI (188For / KI16Rev) a permis de confirmer ces résultats et de détecter des anomalies. En effet, sur certains animaux, le taux d'amplification de ces qPCR était inférieure à 100% et les autres analyses ne semblaient pas indiquer d'évènements particuliers.

Nous avons donc par la suite vérifié la présence de larges délétions autour du DSB par une amplification PCR sur 2,16Kb (*rEphx2 Lo2 / rEphx2-LongUp*) et 3,69Kb (*rEphx2 Lo4 / rEphx2-LongUp*) et une analyse par HMA-CE suivies d'une digestion *XbaI*. Une analyse qPCR sur une zone du promoteur ainsi que sur l'exon2 nous ont permis de mettre en évidence des délétions qui vont au-delà de ces deux zones. De plus, sur plusieurs animaux la corrélation de l'ensemble des données HMA-CE et qPCR nous a permis de déduire des larges délétions non détectées sur la PCR de 3,69Kb. Après analyse, il apparaît que ces délétions de plusieurs kilobases sont très fréquentes mais le seraient légèrement moins avec une dose de 0,2µM de Cas9 (40,0%) comparé à 0,1µM (50,0%) ou 0,4µM (56,4%) sur les embryons de rats **Tableau 4**. De plus, l'ajout d'un excès de dgARN (0,2µM Cas9, RNP1/2, 2µM ssODN) semblerait aggraver très fortement ce phénomène (87,5%). Il sera donc nécessaire par la suite de comparer ces conditions sur un autre locus afin de vérifier si la présence de dgARN en excès pourrait augmenter la génération de larges délétions au DSB. De plus, d'autres techniques devront être utilisées pour vérifier l'ampleur des évènements non contrôlés.

*Tableau 4: Analyse du taux de larges délétions détectées par la PCR de 2,16 Kb et 3,69Kb ainsi que par les différentes qPCR pour les conditions de CRISPR/Cas9 testées ciblant le locus *rEphx2*.*

<b>Condition</b>	<b>Large Del</b>	<b>Missed Large Del 3'</b>	<b>Total Large Del</b>
0,1µM Cas9 1/1 +2µM ssODN	46,2%	3,8%	<b>50,0%</b>
0,2µM Cas9 1/1+2µM ssODN	26,7%	13,3%	<b>40,0%</b>
0,4µM Cas 1/1+2µM ssODN	56,4%	0,0%	<b>56,4%</b>
0,2µM Cas9 1/2+2µM ssODN	87,5%	0,0%	<b>87,5%</b>

La présence de « off-target » sur 6 loci déterminés comme étant les plus risqués (CRISPOR) a été vérifiée par PCR et aucun de ces phénomènes n'a été détecté sur les quelques conditions testées.

## Amélioration de l'import nucléaire du donneur ADN

Un enjeu majeur de l'édition de génome chez le rat est l'efficacité de KI en utilisant un long donneur. En particulier, l'électroporation accélère et facilite grandement la génération de modèles génétiquement modifiés mais ne permet pas, à l'heure actuelle, l'utilisation de longs donneurs. L'ingénierie du système CRISPR/Cas9 pour l'utiliser comme navette de transport au noyau pour l'ADN donneur semble donc une bonne stratégie comme décrit précédemment. La preuve du concept a été obtenue avec un ssODN.

Le premier projet de rapprochement du donneur que nous avons initié au début de ma thèse était basé sur une nouvelle stratégie d'hybridation du donneur sur la « stem loop » 3 du gARN, dont l'accès est libre lorsque le complexe RNP est formé (**Figure 32**) (Nishimasu et al., 2014).

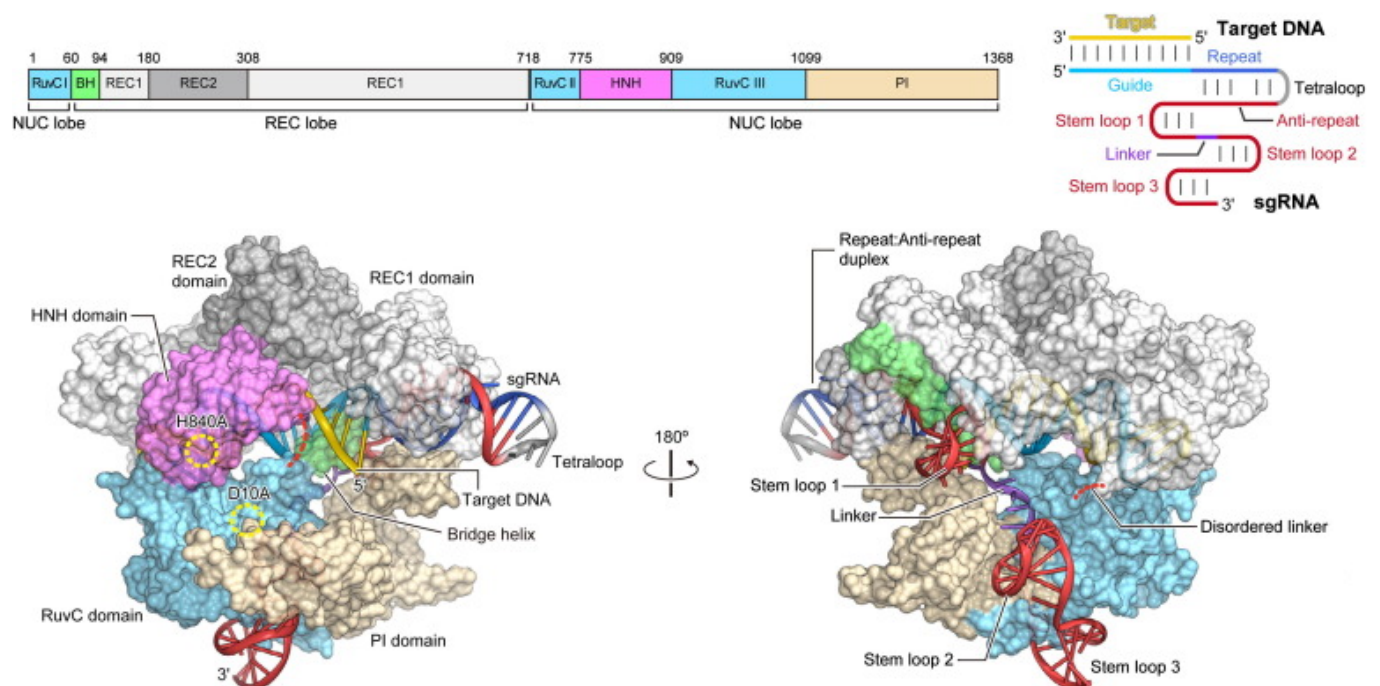


Figure 32: Structure du complexe RNP déterminé par cristallographie (PDB 4008) d'après Nishimasu et al. 2014.

Cette zone nous a donc semblé propice à l'ingénierie. Ce projet a été initié avec les premiers éléments de la caractérisation et optimisation du complexe RNP dont nous disposions à ce moment (données DSF) soit un ratio RNP (Cas9/sgARN) 1/5. Nous avons conçu un ADN donneur contenant une séquence complémentaire à cette boucle pour former une structure double brin hybride ADN/ARN et permettre sa liaison au gARN. Deux versions de cet ADN ont été testées (**Figure 33A**). La première, nommée « V2 » porte cette séquence complémentaire en 3' et l'autre, nommée « V2' » la porte en 5'. Ces différentes conditions ont été électroporées dans des HEK293T avec l'électroporateur NEPA21 (Sonidel), et avec les concentrations suivantes 0,2µM de Cas9 avec 1µM sgARN IVT et 1µM ssODN. Malgré de nombreuses optimisations sur le protocole le plus adapté pour former cet hybride, les résultats ne montrent pas de différences significatives par rapport à la condition contrôle (**Figure 33B**). Ce résultat pourrait être dû au fait que notre stratégie entre en compétition avec la boucle native qui se forme avec beaucoup plus de

chance que notre hybride ADN/ARN. Toutefois, la présence de la séquence complémentaire au sgARN en 3' du ssODN a tendance à être plus délétère (V2) que le fait de l'ajouter en 5' (V2').

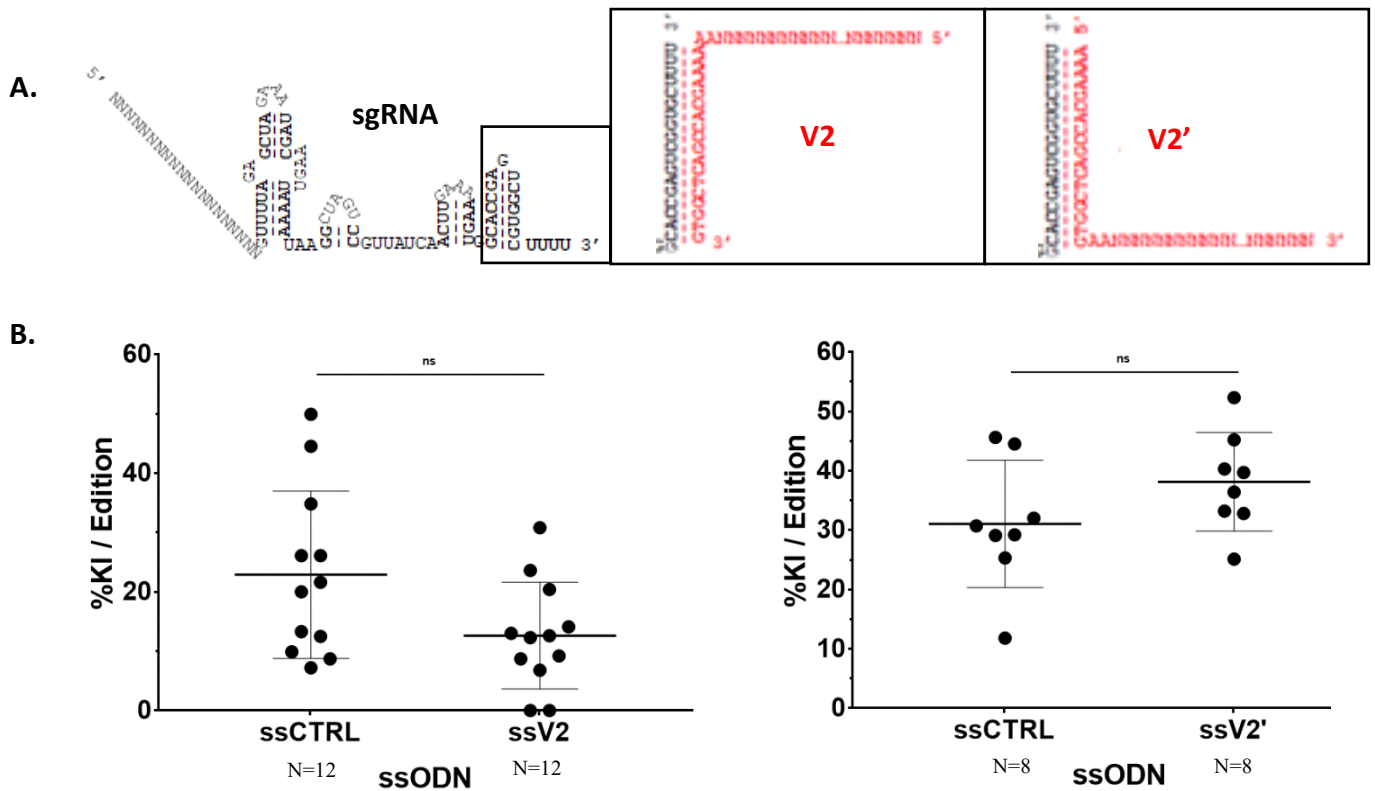


Figure 33: Rapprochement du donneur par hybridation du ssODN sur la « stem loop 3 » du sgRNA après électroporation de HEK293T avec Cas9 IDT 0,2µM, RNP 1/5 (sgARN hAAVSI IVT 1µM) et 1µM ssODN XhoI. **A.** Schéma de l'hybridation de chaque ssODN testé (en rouge) sur le sgRNA IVT (en noir). **B.** Comparaison des taux de KI/Édition en fonction des ssODN testés. Test statistique non paramétrique Mann-Whitney (nsP>0,05).

Suite aux résultats de notre première approche, j'ai développé une deuxième stratégie ciblant à nouveau la « stem loop » 3 du gARN mais en utilisant un gARN tronqué sur la moitié de cette boucle. De cette façon, il n'y a plus de compétition possible avec cette boucle et l'activité du gARN est conditionnée à la présence d'un ADN donneur hybridé sur celle-ci pour rétablir une structure similaire au sgARN normal (**Figure 34**).

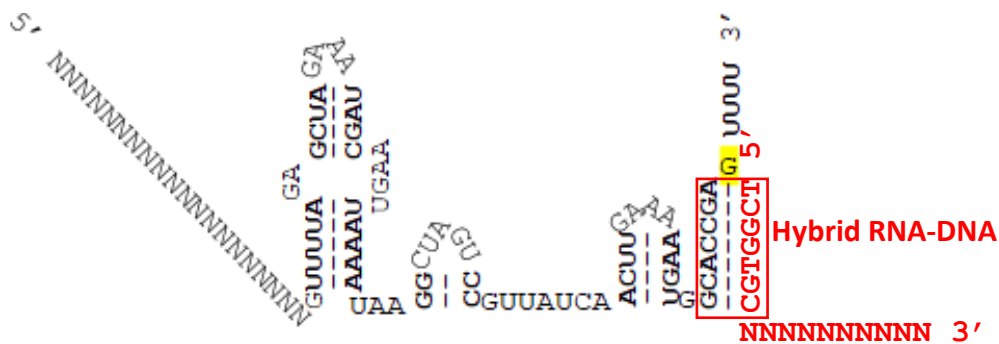


Figure 34: Schéma de l'hybridation de l'ADN donneur (en rouge) sur le sgARN IVT tronqué (en noir).

Toutefois, les résultats préliminaires *in vitro* indiquent que l'hybride ADN/ARN ne permet pas de rétablir la fonctionnalité du sgARN IVT tronqué (**Figure 35**). Cette stratégie a donc été abandonnée.

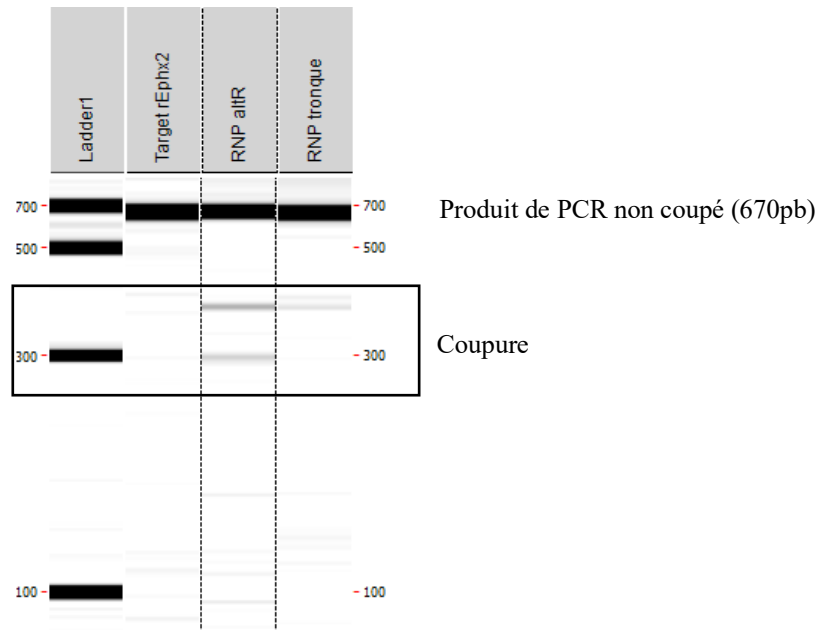


Figure 35: Comparaison de la fonctionnalité du complexe RNP normal et du complexe RNP contenant le gARN tronqué par CIV-CE.

Depuis, quelques stratégies de rapprochement du donneur ont été décrites dans la littérature avec des résultats prometteurs mais qui demandent à être confirmés par d'autres équipes et dans d'autres applications, en particulier sur des hiPSC et en transgénèse. Ces stratégies sont discutées dans la section Discussion.

## IV. DISCUSSION & PERSPECTIVES

### Caractérisation et optimisation de la formation de complexes RNP fonctionnels

Les différentes techniques que j'ai testées ont été comparées ci-dessous (**Tableau 5**). La majorité d'entre elles requiert soit l'immobilisation (SPR) soit le marquage de Cas9, soit du gARN (Thermophorèse, DSF). Ces réactifs ou étapes ne sont déjà pas faciles à obtenir et peuvent, en fonction du site modifié ou des réactifs utilisés, affecter leur activité.

Tableau 5: Comparaison des techniques utilisées pour évaluer la formation du complexe RNP.

Technique / Analyse	Avantages	Inconvénients
<b>SPR</b> Affinité de liaison	Faibles quantités utilisées Pas de marquage	Immobilisation nécessaire Coût et complexité d'utilisation (prestation par une plate-forme)
<b>Thermophorèse MicroScale</b> Affinité de liaison	Faibles quantités utilisées Pas d'immobilisation Facile d'utilisation	Marquage nécessaire Agrégation de Cas9 Coût modéré
<b>DSF</b> Thermostabilité de la protéine	Utilisable sur un thermocycleur temps réel Faible coût	Fluorophore peu reproductible Quantité d'échantillons (quadripliquats)
<b>NanoDSF</b> Thermostabilité de la protéine	Pas de marquage ni immobilisation Facile et rapide Mesure possible de l'agrégation	Coûts (prestation par une plate-forme)

La technique de NanoDSF permet l'utilisation du DSF qui a montré des résultats intéressants tout en s'affranchissant des inconvénients de celui-ci puisque cette technique ne requiert ni marquage, ni fluorophore, ni immobilisation. Elle a permis de définir les conditions optimales de formation du complexe RNP qui vont pouvoir être utilisées *in vivo*. De plus, plusieurs tests sont en cours pour aller plus loin dans l'analyse du système CRISPR/Cas9 et mieux comprendre les interactions entre le RNP, des gARN libres, ssODN, dsADN, cible ADN ou l'activation du RNP par le MgCl<sub>2</sub>. En effet, cette technique permet de détecter tous les changements de conformation de Cas9 induits par ces interactions. Cette technique est peu décrite dans ce cadre et présente un grand intérêt notamment pour vérifier la qualité du système.

Pour l'analyse fonctionnelle *in vitro*, les tests sur produits de PCR ne reflètent pas réellement les conditions *in vivo*. Toutefois, les résultats obtenus nous ont amené à avoir une approche moléculaire plus raisonnée et

à mieux maîtriser nos réactifs. Les tests sur ADNg permettront de mieux caractériser l'activité de Cas9 et de pouvoir extrapoler les résultats aux conditions utilisées *in vivo*. Néanmoins il reste à définir les conditions d'expérimentation qui permettront à ce test d'être fiable.

Les techniques de « single-molecule fluorescence resonance energy transfer » (smFRET) et « Beacon » moléculaire ont été utilisées précédemment par d'autres équipes pour caractériser le système CRISPR/Cas9 et semblent intéressantes à étudier pour de futurs tests. Par exemple, ces techniques pourront être utiles pour optimiser les stratégies de rapprochement du donneur ou également pour mieux comprendre l'effet d'un ADN donneur sur l'augmentation de l'édition par CRISPR/Cas9.

### a. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer (smFRET)

Le smFRET permet une analyse dynamique molécule par molécule. En marquant les deux partenaires d'intérêt avec Cy5 et Cy3 (différents domaines de Cas9, ADN cible...), il est possible de caractériser leurs interactions (**Figure 36**). Cette technique a notamment permis de définir et confirmer le rôle des domaines de Cas9 ainsi que les cinétiques des mouvements observés (Singh et al., 2016; Jiang et al., 2016; Sternberg et al., 2015). Pour cela, un ADN biotinylé d'intérêt est immobilisé sur une lame revêtue de neutravidine. Le transfert de fluorescence entre un donneur (Cy3) et un accepteur (Cy5) permet de mettre en évidence la proximité des deux molécules au cours du temps. En effet, lorsque les deux molécules sont proches l'accepteur émettra grâce à l'excitation du donneur, c'est l'effet FRET. Lorsqu'elles sont trop éloignées, seul le donneur émettra. Cette technique permet donc une analyse dynamique et sensible mais requiert le marquage des deux partenaires ainsi que l'immobilisation de l'ADN cible. Ces contraintes peuvent donc influencer les résultats observés mais permettent toutefois une analyse intéressante du système.

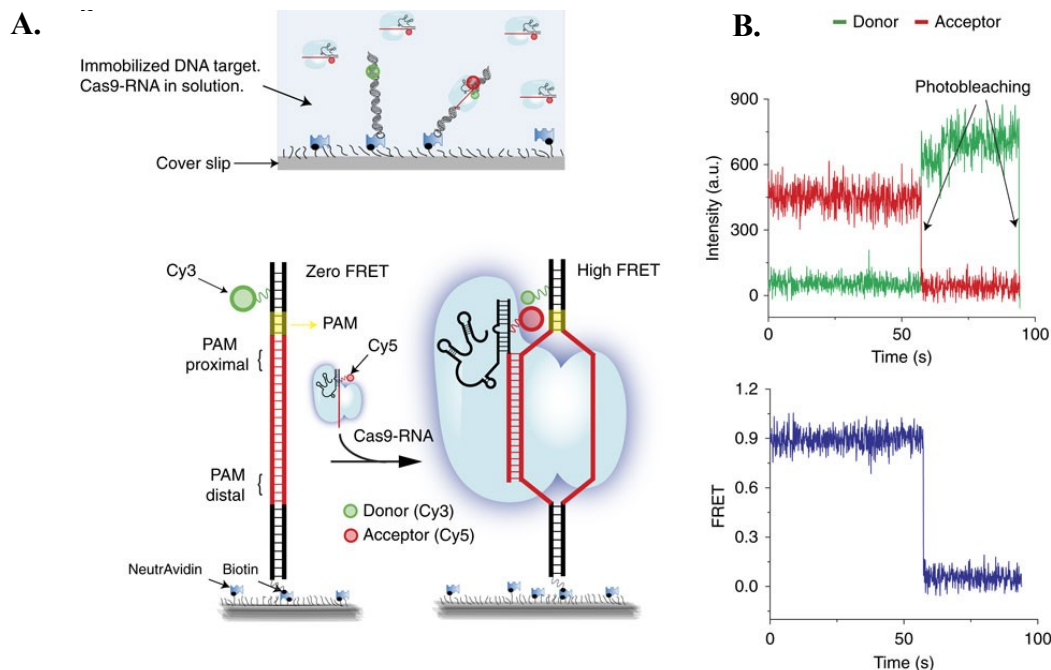


Figure 36: Single-molecule FRET pour caractériser les interactions entre le RNP-Cy5 et l'ADN d'intérêt biotinylé et marqué à Cy3 d'après Singh et al., 2016. **A.** Schéma de fonctionnement du smFRET avec induction d'un haut signal FRET par la liaison d'un complexe RNP marqué par Cy5 sur un ADN marqué par Cy3 immobilisé au support par interaction biotine/avidine. **B.** Exemple de résultat obtenu avec la détection de la fluorescence émise par le donneur (en vert) ou l'accepteur (en rouge). L'effet FRET, et donc la proximité des deux molécules d'intérêt, est démontré par l'émission de fluorescence de l'accepteur.

## b. Beacon

La technique de Beacon moléculaire permet une analyse cinétique de la fixation du complexe RNP à sa cible ADN (Mekler et al., 2016). Pour cela, un ADN beacon contenant un fluorophore sur un brin et un quencher sur l'autre est utilisé (**Figure 37**). En présence du complexe RNP, le brin contenant le quencher est libéré par formation de l'hétéroduplex ADN:ARN et induit la fluorescence qui peut être mesurée au cours du temps. Cette technique a notamment été utilisée pour caractériser la formation de la boucle R du RNP avec un ADN cible.

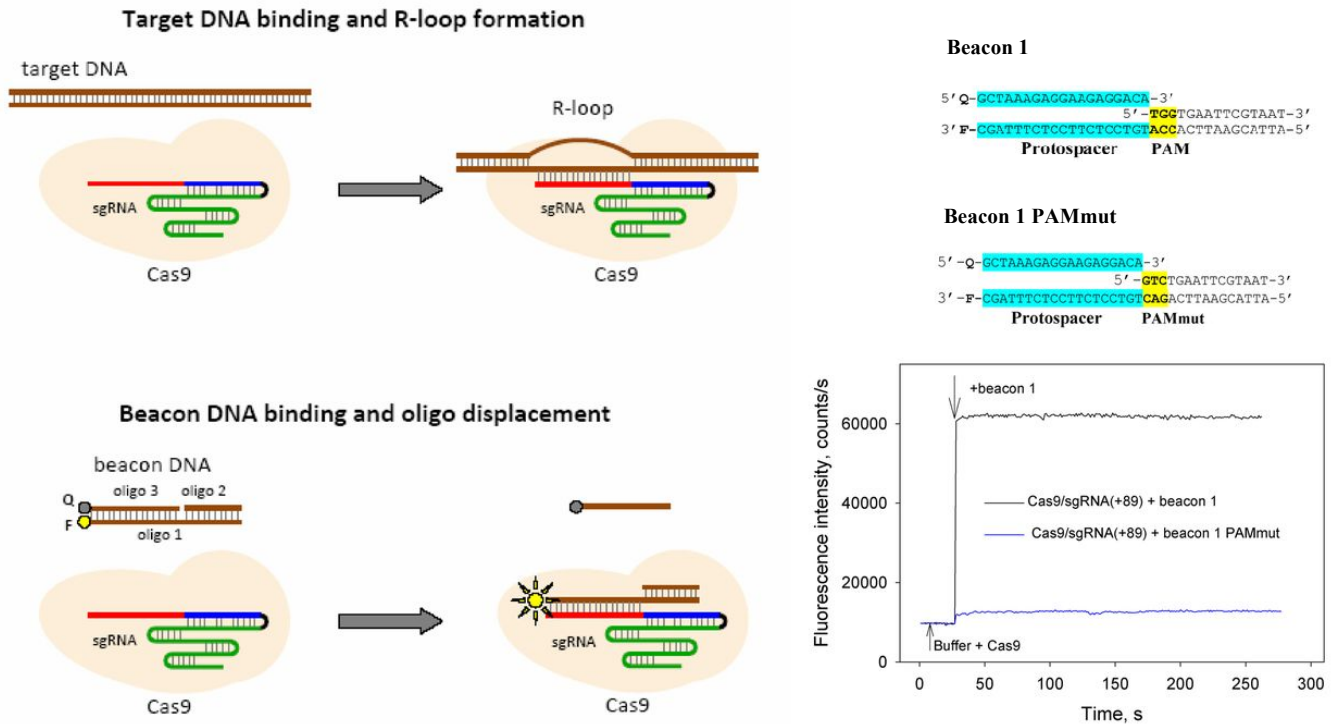


Figure 37: Schéma et exemple d'expérience de Beacon moléculaire sur CRISPR/Cas9 en utilisant un ADN cible contenant sur un brin un fluorophore et sur l'autre un quencher d'après Mekler et al. 2016.

## Application à l'édition de génome *in vivo* sur iPSC humaines et embryons de rats

L'optimisation moléculaire du système CRISPR/Cas9 a notamment permis de déterminer les conditions idéales d'édition de génome. En effet, nous avons atteint plus de 50% de KI sur iPSC humaines et embryons de rat avec 0,4 $\mu$ M ou 0,2 $\mu$ M de Cas9 respectivement avec un ratio Cas9/dgARN 1/1 et une concentration en ssODN de 2 $\mu$ M. Cette étude démontre qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser de fortes doses de CRISPR pour éditer de façon efficace.

Il a été démontré par de nombreuses équipes que l'édition par CRISPR/Cas9 pouvait engendrer des événements incontrôlés (Burgio and Teboul, 2020; Cullot et al., 2019; Rezza et al., 2019; Sledzinski et al., 2021). Nous avons donc vérifié la présence de larges délétions autour du DSB par PCR et qPCR et avons

déte t  une fréquence importante. Cette fréquence pourrait être augmentée en présence d'un excès de dgARN mais la confirmation de cette hypothèse préliminaire nécessite de nouvelles expériences. Ces aspects n'étaient pas l'objet de notre étude et l'ensemble des réarrangements possibles n'a pas été analysé en profondeur. En effet, la technique de qPCR ne nous permet pas d'approfondir ces aspects, c'est pourquoi nous développerons le NGS dans l'avenir par une collaboration entre les plates-formes TRIP et iPS. Il est important de vérifier l'impact de la diminution des doses de Cas9 et de gARN sur ces  v nements beaucoup trop fréquents. De la même façon, nous pourrions imaginer que les concentrations en ADN donneur pourraient également influencer la fréquence et le type de ces  v nements.

Cette étude s'est limitée à des petits donneurs ssODN, par manque de temps dans le cadre de ma thèse et à cause des restrictions liées à la crise sanitaire (fermeture du laboratoire et de l'animalerie plusieurs mois...). L'amélioration de l'efficacité de KI pour des longs donneurs ADN (au moins 500pb, idéalement plusieurs kb) est un point essentiel que nous cherchons à atteindre depuis le début de mon projet de thèse. Toutefois, la taille de ces donneurs ne permet pas d'apporter un grand nombre de molécules. Pour un dsADN de 4,7Kb nous avons précédemment microinject  2ng/ $\mu$ L (0,7nM) et électroporé 100ng/ $\mu$ L (34,4nM) chez le rat pour cibler le locus *rEphx2* (Remy et al., 2017). En diminuant Cas9 de 3 $\mu$ M précédemment à 200nM avec nos conditions optimisées, le nombre de Cas9, et donc de complexe RNP par ADN donneur passe de 4300 à 287 en microinjection et 87 à 6 par électroporation (nombre théorique ne prenant pas en compte l'efficacité d'électroporation). Les longs ADN donneur n'entrent pas naturellement dans le noyau, cette approche ne sera donc pas suffisante mais facilite toutefois l'obtention d'un rapport RNP/ADN donneur plus proche de 1 et devra au moins être couplée à une approche de rapprochement du donneur pour espérer obtenir des KI par électroporation. L'activation de molécules importantes pour les mécanismes de réparation médiés par homologie pourra également être utilisée en complément.

Pour le cas des modèles d'hiPSC, nous avons réussi à induire des KI avec une efficacité élevée (environ 50%), notamment pour les KI homozygotes (environ 20%). La proportion de cellules hétérozygotes portant à la fois l'allèle normal (GFP) et l'allèle KI (BFP) est néanmoins très faible (<10%) dans notre étude. La correction spécifique ou la génération d'une mutation uniquement sur un seul allèle est difficile à réaliser. Une équipe a réussi à corriger une mutation liée à la myopathie centronucléaire (maladie autosomale dominante) par l'utilisation d'un gARN spécifique de la mutation d'intérêt sans sélection par antibiotique (Rabai et al., 2019). Cette stratégie est très intéressante pour corriger spécifiquement un allèle pathologique mais ne peut pas être appliquée à la création de modèles cellulaires génétiquement modifiés. Puisque notre taux général de KI est élevé, nous avons décidé de tester l'utilisation, en plus du ssODN avec la mutation BFP, d'un ssODN contenant la séquence de la GFP et des mutations silencieuses permettant d'empêcher la coupure par le gARN GFP et faciliter le génotypage. Par compétition entre ces deux ssODN GFPmut  et BFP, nous espérons augmenter la proportion de cellules GFP/BFP dans notre population (Brand o et al., 2021).

## Amélioration de l'import nucléaire du donneur ADN

Les deux stratégies de rapprochement du donneur via la « stem loop » 3 du gARN que nous avons testées ne nous ont pas permis d'améliorer significativement le KI sur cellules. Nous n'avons donc pas poursuivi ces approches *in vivo*. Des stratégies de rapprochement du donneur ont été décrites depuis nos tentatives (Chenouard et al., 2021a) et sont détaillées ci-dessous (**Tableau 6**).

Tableau 6: Description des stratégies de rapprochement du donneur décrites dans la littérature avec leurs avantages et inconvénients.

	Nom / type de cellules	Description	Avantages	Inconvénients	Références
<b>Via Cas9 protéine</b>	<b>Cas9-Avidin-Biotin ssDNA (CAB)</b> / HEK293T et embryons de souris	Cas9 fusionné à Avidine en C-ter par un linker de 16 acides aminés ADN donneur biotinylé	Cas9-avidine utilisable pour tous les projets ADN donneur facile à générer Système Avidine /biotine bien étudié	Production de Cas9 modifiée Capacité de Cas9 de se décrocher du donneur inconnue	(Ma et al., 2017)
	<b>Cas9 et Mb3Cas12a-monomeric streptavidin (Cas9-mSA)</b> / embryons de souris	Cas9 fusionné à Avidine en C-ter par un linker de 16 acides aminés ADN donneur biotinylé	Cas9-avidine utilisable pour tous les projets ADN donneur facile à générer Système Avidine /biotine bien étudié	Production de Cas9 modifiée Capacité de Cas9 de se décrocher du donneur inconnue	(Gu et al., 2018; Wang et al., 2020b)
	<b>Cas9-Porcine Circovirus 2 Rep protein (Cas9-PCV)</b> / HEK293T et U2-OS	Cas9 fusionné à Rep protéine ADN contenant la séquence de reconnaissance	Cas9-Rep utilisable pour tous les projets ADN donneur facile à générer	Production de Cas9 modifiée Système peu connu Capacité de Cas9 de se décrocher du donneur inconnue	(Aird et al., 2018)
	<b>Azido-Cas9 protéine</b> / HEK293T et embryons de souris	Cas9 chimiquement modifié pour porter un groupement Azide se conjugue à un ADN donneur dibenzylcyclooctyne	Possibilité d'utiliser un ADN adaptateur	Préparation des réactifs complexe Capacité de Cas9 de se décrocher du donneur inconnue	(Ling et al., 2020)
<b>Via gARN</b>	<b>S1mplex</b> / WA09 hESC et GM04192 hiPSC	sgARN inclut un aptamer S1m qui reconnaît la streptavidin ADN donneur biotinylé	Cas9 non modifiée ADN donneur facile à générer Système Avidine /biotine bien étudié	Guide à préparer pour chaque projet Long guide ARN difficile à préparer Capacité de Cas9 de se décrocher du donneur inconnue	(Carlson-Stevermer et al., 2017)
	<b>gDonor</b> / HEK293T	Conjugaison de guide ARN et de l'ADN donneur	Cas9 non modifiée	Préparation des réactifs complexe Capacité de Cas9 de se décrocher du donneur inconnue	(Lee et al., 2017)
<b>Via complexe RNP</b>	<b>Truncated Cas9 target sequences (tCTSs)</b> / lymphocytes T, T CD4 et CD8, Treg, NK, $\gamma\delta$ T, lymphocytes B, HSC, iPSC-CD34+	Ajout d'une séquence de 39 bases sur chaque extrémité de l'ADN donneur pour que le RNP se fixe dessus mais ne coupe pas	Cas9 et guide ARN non modifiés ADN donneur facile à préparer	Utilise des molécules de RNP qui ne seront pas disponibles pour la coupure	(Nguyen et al., 2020)

La plupart de ces stratégies proposent de modifier Cas9 ; cela peut engendrer des pertes d'efficacité en comparaison à la protéine commerciale que nous utilisons. De plus, la production de Cas9 sous forme de protéine est complexe. Il est également possible d'agir sur le guide ARN mais les modifications chimiques et la production de longs ARN (supérieurs à 100 bases) sont difficiles. La stratégie tCTSs me paraît donc être un bon choix puisque ni Cas9, ni le guide ARN ne sont modifiés. Il sera ainsi possible d'utiliser les réactifs commerciaux que nous avons optimisés et qui ont été améliorés par le fournisseur pour une efficacité maximale. De plus, cette stratégie est très simple puisqu'il suffit d'ajouter 39 bases (**Figure 38**) de part et d'autre des bras d'homologie de l'ADN donneur lors du design (Nguyen et al., 2020). Par déduction, les stratégies utilisant un plasmide linéarisation *in vivo* par coupure CRISPR pourraient probablement permettre l'import nucléaire de l'ADN donneur par le même mécanisme (Aida et al., 2016; Yao et al., 2017; Zhang et al., 2017) et peuvent également, sur le principe, être une alternative.

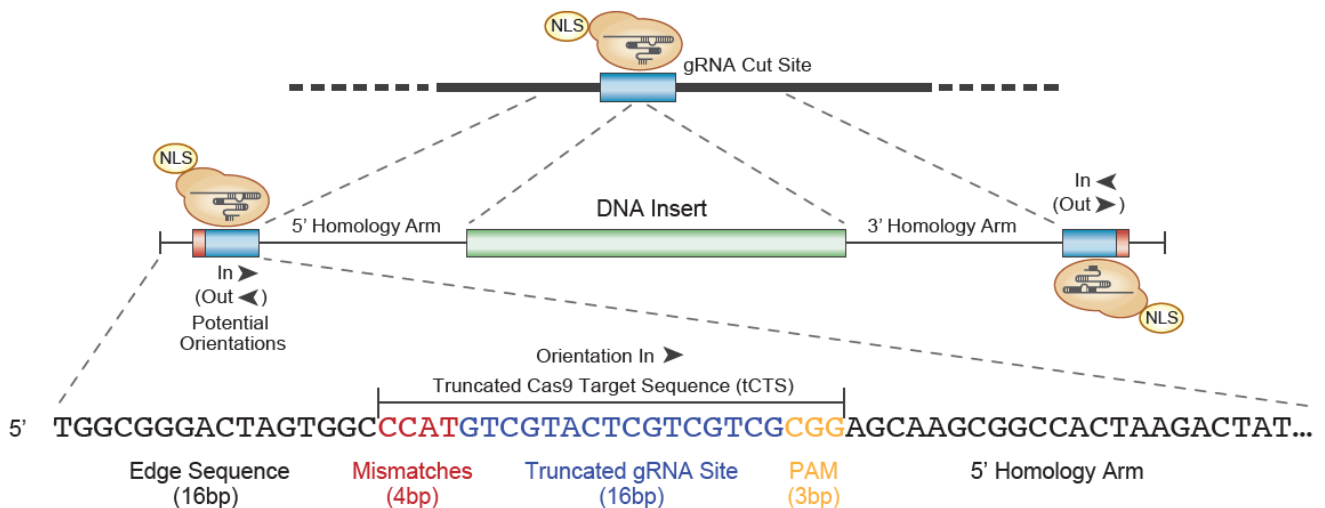


Figure 38: Schéma de la stratégie de rapprochement du donneur par tCTS d'après Nguyen et al 2020.

Les tests ont été réalisés uniquement sur cellules immunitaires et des cellules hématopoïétiques dérivées d'iPS, avec des donneurs double brin allant de 1,3 à 2,1Kb. Cette technique mérite d'être testée sur embryons de rats avec de longs donneurs par électroporation pour vérifier s'il est possible d'importer au noyau le donneur ADN de cette façon. L'application de cette technique à la modélisation de maladies génétiques sur hiPSC est également d'intérêt.

## V. Conclusion générale

Depuis ma première utilisation de CRISPR/Cas9, j'ai parcouru beaucoup de chemin. En particulier, ce projet de thèse m'a beaucoup enrichie scientifiquement mais aussi humainement.

Ces six années à travailler aux développements de modèles de rats et plus récemment aux modèles d'hiPSC m'a permis d'engranger un grand nombre de connaissances, que ce soit sur la réparation des cassures double brin ou les outils d'édition de génome, en particulier, tous les aspects moléculaires du système CRISPR/Cas9 et bien d'autres. J'ai ainsi pu mesurer les enjeux de la modélisation animale et cellulaire mais également la portée que notre travail pourrait avoir à l'avenir en thérapie génique pour les patients. Je suis fière d'apporter ma pierre à l'édifice.

La boîte à outils CRISPR va bien au-delà de Cas9 et est d'une richesse et d'une portée qui n'a de limites que notre imagination (**Figure 39** d'après Shelake et al., 2019). Je pense que c'est l'avenir de la biologie moléculaire. Lorsque j'avais l'âge de lire « Sciences et Vie Junior », j'ai découvert l'édition de génome à travers un article sur la société Collectis et son énorme potentiel m'a fait rêver. Lorsque j'ai décidé de travailler dans la recherche médicale, c'est donc tout naturellement que je me suis dirigée vers ce domaine. Je suis donc particulièrement heureuse d'avoir travaillé sur cet outil de pointe et d'avenir et, en particulier, d'avoir eu l'opportunité d'en étudier les mécanismes moléculaires. J'espère que mon travail sera utile et fera avancer ce domaine.

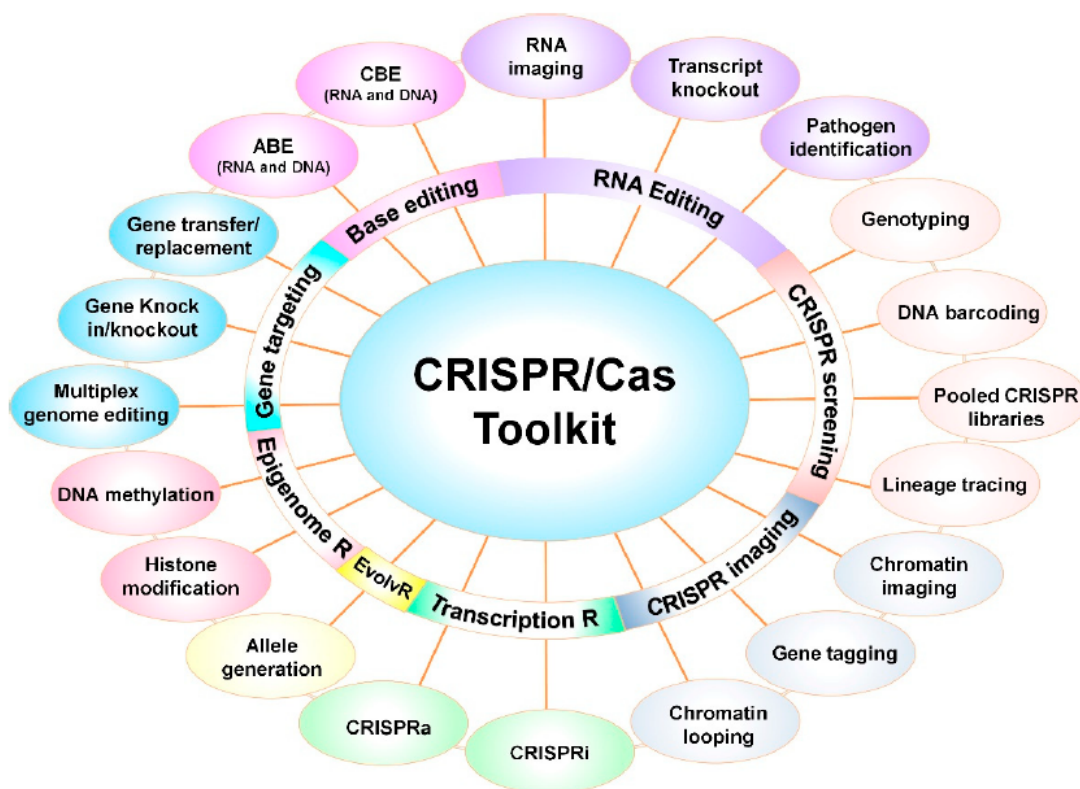


Figure 39: Représentation de la complexité et richesse de la boîte à outils CRISPR d'après Shelake et al., 2019.

D'un point de vue humain, l'aventure de la thèse est un parcours du combattant que je suis contente de voir enfin aboutir. Trouver l'équilibre entre ma vie professionnelle et personnelle avant ma thèse n'avait pas été facile avec l'arrivée de mon premier enfant 1 an avant le début de ma thèse. Cela a été particulièrement un défi pour moi dans ce contexte épidémique avec l'arrivée de mon deuxième enfant quelques mois après le premier confinement. La facilitation du télétravail m'a été d'une aide précieuse pour trouver cet équilibre. La prolongation de mon contrat de 6 mois m'a en partie permis de rattraper le retard accumulé mais les difficultés liées la crise sanitaire (fermeture du laboratoire et de l'animalerie, fermeture des écoles, confinements à répétitions, pénuries de cônes...) m'ont rendu cette dernière année particulièrement difficile. Je n'aurais pas pu aboutir à ce résultat sans le soutien de mes collègues et de mes proches que je remercierai en temps voulu. Le parcours de la thèse est parsemé d'embûches et il ne vaut mieux pas le traverser seul. L'aventure CRISPR continue pour moi encore quelques années et toujours bien entourée au CRTI.

## VI. REFERENCES

- Abdallah, N.A., Prakash, C.S., and McHughen, A.G. (2015). Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops Food* 6, 183–205.
- Aida, T., Nakade, S., Sakuma, T., Izu, Y., Oishi, A., Mochida, K., Ishikubo, H., Usami, T., Aizawa, H., Yamamoto, T., et al. (2016). Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17, 979.
- Aird, E.J., Lovendahl, K.N., St Martin, A., Harris, R.S., and Gordon, W.R. (2018). Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol* 1, 54.
- Alexander, C.G., Wanner, R., Johnson, C.M., Breitsprecher, D., Winter, G., Duhr, S., Baaske, P., and Ferguson, N. (2014). Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1844, 2241–2250.
- Allen, D., Rosenberg, M., and Hendel, A. (2021). Using Synthetically Engineered Guide RNAs to Enhance CRISPR Genome Editing Systems in Mammalian Cells. *Frontiers in Genome Editing* 2, 35.
- Almeqdadi, M., Mana, M.D., Roper, J., and Yilmaz, Ö.H. (2019). Gut organoids: mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 317, C405–C419.
- Al-Minawi, A.Z., Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2008). The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 36, 1–9.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., and Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513, 569–573.
- Anders, C., Bargsten, K., and Jinek, M. (2016). Structural plasticity of PAM recognition by engineered variants of the RNA-guided endonuclease Cas9. *Mol Cell* 61, 895–902.
- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A., et al. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157.
- Anzalone, A.V., Koblan, L.W., and Liu, D.R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.*

- Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., Maric, M., Tognetti, M., Benner, C.W., Boulton, S.J., Saghatelian, A., et al. (2017). Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature* 549, 548–552.
- Asmari, M., Ratih, R., Alhazmi, H.A., and El Deeb, S. (2018). Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction. *Methods* 146, 107–119.
- Babu, K., Amrani, N., Jiang, W., Yogesha, S.D., Nguyen, R., Qin, P.Z., and Rajan, R. (2019). Bridge Helix of Cas9 Modulates Target DNA Cleavage and Mismatch Tolerance. *Biochemistry* 58, 1905–1917.
- Batenburg, N.L., Walker, J.R., Coulombe, Y., Sherker, A., Masson, J.-Y., and Zhu, X.-D. (2019). CSB interacts with BRCA1 in late S/G2 to promote MRN- and CtIP-mediated DNA end resection. *Nucleic Acids Res* 47, 10678–10692.
- Bhardwaj, A., and Nain, V. (2021). TALENs—an indispensable tool in the era of CRISPR: a mini review. *J Genet Eng Biotechnol* 19, 125.
- Bhargava, R., Onyango, D.O., and Stark, J.M. (2016). Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. *Trends in Genetics* 32, 566–575.
- Birling, M.-C., Schaeffer, L., André, P., Lindner, L., Maréchal, D., Ayadi, A., Sorg, T., Pavlovic, G., and Héroult, Y. (2017). Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci Rep* 7.
- Bischoff, N., Wimberger, S., Maresca, M., and Brakebusch, C. (2020). Improving Precise CRISPR Genome Editing by Small Molecules: Is there a Magic Potion? *Cells* 9.
- Borghain, M.P., Haridhasapavalan, K.K., Dey, C., Adhikari, P., and Thummer, R.P. (2019). An Insight into DNA-free Reprogramming Approaches to Generate Integration-free Induced Pluripotent Stem Cells for Prospective Biomedical Applications. *Stem Cell Rev Rep* 15, 286–313.
- Bouhassira, E.E., Westerman, K., and Leboulch, P. (1997). Transcriptional Behavior of LCR Enhancer Elements Integrated at the Same Chromosomal Locus by Recombinase-Mediated Cassette Exchange. *Blood* 90, 3332–3344.
- Brandão, K.O., Grandela, C., Yiangou, L., Mummery, C.L., and Davis, R.P. (2021). CRISPR/Cas9-Mediated Introduction of Specific Heterozygous Mutations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. (New York, NY: Springer US), pp. 1–27.

- Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M., and van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research* 42, e168.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K., and Palmiter, R.D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4438–4442.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.-L., and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135, 1287–1298.
- Burgio, G., and Teboul, L. (2020). Anticipating and Identifying Collateral Damage in Genome Editing. *Trends in Genetics* 36, 905–914.
- Carbery, I.D., Ji, D., Harrington, A., Brown, V., Weinstein, E.J., Liaw, L., and Cui, X. (2010). Targeted Genome Modification in Mice Using Zinc-Finger Nucleases. *Genetics* 186, 451–459.
- Carlson-Stevermer, J., Abdeen, A.A., Kohlenberg, L., Goedland, M., Molugu, K., Lou, M., and Saha, K. (2017). Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat Commun* 8, 1711.
- Casini, A., Olivieri, M., Petris, G., Montagna, C., Reginato, G., Maule, G., Lorenzin, F., Prandi, D., Romanel, A., Demichelis, F., et al. (2018). A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nat. Biotechnol.* 36, 265–271.
- Charpentier, M., Khedher, A.H.Y., Menoret, S., Brion, A., Lamribet, K., Dardillac, E., Boix, C., Perrouault, L., Tesson, L., Geny, S., et al. (2018). CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat Commun* 9, 1133.
- Chen, F., Ding, X., Feng, Y., Seebeck, T., Jiang, Y., and Davis, G.D. (2017a). Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting. *Nat Commun* 8, 14958.
- Chen, J.S., Dagdas, Y.S., Kleinstiver, B.P., Welch, M.M., Sousa, A.A., Harrington, L.B., Sternberg, S.H., Joung, J.K., Yildiz, A., and Doudna, J.A. (2017b). Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy. *Nature* 550, 407–410.
- Chen, S., Yao, Y., Zhang, Y., and Fan, G. (2020). CRISPR system: Discovery, development and off-target detection. *Cell Signal* 70, 109577.

Chenouard, V., Brusselle, L., Heslan, J.-M., Remy, S., Ménoret, S., Usal, C., Ouisse, L.-H., NGuyen, T.H., Anegon, I., and Tesson, L. (2016a). A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *J Genet Genomics* 43, 341–348.

Chenouard, V., Brusselle, L., Heslan, J.-M., Remy, S., Ménoret, S., Usal, C., Ouisse, L.-H., NGuyen, T.H., Anegon, I., and Tesson, L. (2016b). A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *J Genet Genomics* 43, 341–348.

Chenouard, V., Remy, S., Tesson, L., Ménoret, S., Ouisse, L.-H., Cherifi, Y., and Anegon, I. (2021a). Advances in Genome Editing and Application to the Generation of Genetically Modified Rat Models. *Frontiers in Genetics* 12.

Chenouard, V., Leray, I., Tesson, L., Remy, S., Fortun, A., Bernardeau, K., Cherifi, Y., David, L., and Anegon, I. (2021b). Highly Efficient Knockin in Human iPS Cells and Rat Embryos by CRISPR/Cas9 Molecular Optimization.

Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., and Nicolas, J.F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 1968–1973.

Claussnitzer, M., Cho, J.H., Collins, R., Cox, N.J., Dermitzakis, E.T., Hurles, M.E., Kathiresan, S., Kenny, E.E., Lindgren, C.M., MacArthur, D.G., et al. (2020). A brief history of human disease genetics. *Nature* 577, 179–189.

Codner, G.F., Mianné, J., Caulder, A., Loeffler, J., Fell, R., King, R., Allan, A.J., Mackenzie, M., Pike, F.J., McCabe, C.V., et al. (2018). Application of long single-stranded DNA donors in genome editing: generation and validation of mouse mutants. *BMC Biol.* 16, 70.

Collias, D., and Beisel, C.L. (2021). CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nat Commun* 12, 555.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.

Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P.A., and Vindigni, A. (2007). Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair* 6, 712–722.

- Cullot, G., Boutin, J., Toutain, J., Prat, F., Pennamen, P., Rooryck, C., Teichmann, M., Rousseau, E., Lamrissi-Garcia, I., Guyonnet-Duperat, V., et al. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. *Nat Commun* 10, 1136.
- Dahlman, J.E., Abudayyeh, O.O., Joung, J., Gootenberg, J.S., Zhang, F., and Konermann, S. (2015). Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease. *Nat Biotechnol* 33, 1159–1161.
- Dang, Y., Jia, G., Choi, J., Ma, H., Anaya, E., Ye, C., Shankar, P., and Wu, H. (2015). Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol.* 16, 280.
- Ding, X., Seebeck, T., Feng, Y., Jiang, Y., Davis, G.D., and Chen, F. (2019). Improving CRISPR-Cas9 Genome Editing Efficiency by Fusion with Chromatin-Modulating Peptides. *CRISPR J* 2, 51–63.
- Doetschman, T., Gregg, R.G., Maeda, N., Hooper, M.L., Melton, D.W., Thompson, S., and Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576–578.
- Doi, G., Okada, S., Yasukawa, T., Sugiyama, Y., Bala, S., Miyazaki, S., Kang, D., and Ito, T. (2021). Catalytically inactive Cas9 impairs DNA replication fork progression to induce focal genomic instability. *Nucleic Acids Res* 49, 954–968.
- Drescher, D.G., Selvakumar, D., and Drescher, M.J. (2018). Chapter One - Analysis of Protein Interactions by Surface Plasmon Resonance. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, R. Donev, ed. (Academic Press), pp. 1–30.
- Dyle, M.C., Kolakada, D., Cortazar, M.A., and Jagannathan, S. (2020). How to get away with nonsense: Mechanisms and consequences of escape from nonsense-mediated RNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 11, e1560.
- Eiges, R., Schuldiner, M., Drukker, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2001). Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr Biol* 11, 514–518.
- El-Brolosy, M.A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., Kikhi, K., Boezio, G.L.M., Takacs, C.M., Lai, S.-L., et al. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568, 193–197.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31, 822–826.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348–362.
- Gaignerie, A., Lefort, N., Rousselle, M., Forest-Choquet, V., Flippe, L., Francois-Campion, V., Girardeau, A., Caillaud, A., Chariou, C., Francheteau, Q., et al. (2018). Urine-derived cells provide a readily accessible cell type for feeder-free mRNA reprogramming. *Sci Rep* 8, 14363.
- Gao, K., Oerlemans, R., and Groves, M.R. (2020). Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophys Rev* 12, 85–104.
- Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., and Liu, D.R. (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471.
- Gautheron, J., and Jéru, I. (2021). The Multifaceted Role of Epoxide Hydrolases in Human Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 13.
- Geoghegan, E., and Byrnes, L. (2008). Mouse induced pluripotent stem cells. *Int J Dev Biol* 52, 1015–1022.
- Germini, D., Tsfasman, T., Zakharova, V.V., Sjakste, N., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. (2018). A Comparison of Techniques to Evaluate the Effectiveness of Genome Editing. *Trends in Biotechnology* 36, 147–159.
- Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., et al. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325, 433.
- Glaser, A., McColl, B., and Vadolas, J. (2016). GFP to BFP Conversion: A Versatile Assay for the Quantification of CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing. *Mol Ther Nucleic Acids* 5, e334.
- Godin, S.K., Sullivan, M.R., and Bernstein, K.A. (2016). Novel insights into RAD51 activity and regulation during homologous recombination and DNA replication. *Biochem Cell Biol* 94, 407–418.
- Gong, S., Yu, H.H., Johnson, K.A., and Taylor, D.W. (2018). DNA Unwinding Is the Primary Determinant of CRISPR-Cas9 Activity. *Cell Reports* 22, 359–371.

- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7380–7384.
- Gu, B., Posfai, E., and Rossant, J. (2018). Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. *Nature Biotechnology* 36, 632–637.
- Guo, H., Liu, L., Nishiga, M., Cong, L., and Wu, J.C. (2021). Deciphering pathogenicity of variants of uncertain significance with CRISPR-edited iPSCs. *Trends in Genetics*.
- Gutschner, T., Haemmerle, M., Genovese, G., Draetta, G.F., and Chin, L. (2016). Post-translational Regulation of Cas9 during G1 Enhances Homology-Directed Repair. *Cell Rep* 14, 1555–1566.
- Habib, O., Habib, G., Hwang, G.-H., and Bae, S. (2021). Comprehensive analysis of prime editing outcomes in human embryonic stem cells.
- Hashimoto, M., Yamashita, Y., and Takemoto, T. (2016). Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev. Biol.* 418, 1–9.
- Hirotsune, S., Kiyonari, H., Jin, M., Kumamoto, K., Yoshida, K., Shinohara, M., Watanabe, H., Wynshaw-Boris, A., and Matsuzaki, F. (2020). Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends. *Sci Rep* 10, 2518.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R.C., Katibah, G.E., Amora, R., Boydston, E.A., Zeitler, B., et al. (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27, 851–857.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., Cassady, J.P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., et al. (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* 29, 731–734.
- Horii, T., Tamura, D., Morita, S., Kimura, M., and Hatada, I. (2013). Generation of an ICF syndrome model by efficient genome editing of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR system. *Int J Mol Sci* 14, 19774–19781.
- Horlbeck, M.A., Witkowsky, L.B., Guglielmi, B., Replogle, J.M., Gilbert, L.A., Villalta, J.E., Torigoe, S.E., Tjian, R., and Weissman, J.S. (2016). Nucleosomes impede Cas9 access to DNA in vivo and in vitro. *Elife* 5.
- Hottentot, Q.P., van Min, M., Splinter, E., and White, S.J. (2017). Targeted Locus Amplification and Next-Generation Sequencing. *Methods Mol. Biol.* 1492, 185–196.

- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* *31*, 827–832.
- Hu, J.H., Miller, S.M., Geurts, M.H., Tang, W., Chen, L., Sun, N., Zeina, C.M., Gao, X., Rees, H.A., Lin, Z., et al. (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* *556*, 57–63.
- Huai, C., Li, G., Yao, R., Zhang, Y., Cao, M., Kong, L., Jia, C., Yuan, H., Chen, H., Lu, D., et al. (2017). Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun* *8*, 1375.
- Isaac, R.S., Jiang, F., Doudna, J.A., Lim, W.A., Narlikar, G.J., and Almeida, R. (2016). Nucleosome breathing and remodeling constrain CRISPR-Cas9 function. *Elife* *5*.
- Jacobi, A.M., Rettig, G.R., Turk, R., Collingwood, M.A., Zeiner, S.A., Quadros, R.M., Harms, D.W., Bonthuis, P.J., Gregg, C., Ohtsuka, M., et al. (2017). Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes. *Methods* *121–122*, 16–28.
- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M.A., et al. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* *7*, 197–199.
- Jiang, F., and Doudna, J.A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* *46*, 505–529.
- Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S., and Doudna, J.A. (2015). A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science* *348*, 1477–1481.
- Jiang, F., Taylor, D.W., Chen, J.S., Kornfeld, J.E., Zhou, K., Thompson, A.J., Nogales, E., and Doudna, J.A. (2016). Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science* *351*, 867–871.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* *337*, 816–821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., and Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* *2*, e00471.

- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., et al. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 343, 1247997.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771–775.
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J.K., Todani, M., Nakagawa, M., et al. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiological Reviews* 99, 79–114.
- Kartje, Z.J., Barkau, C.L., Rohilla, K.J., Ageely, E.A., and Gagnon, K.T. (2018). Chimeric Guides Probe and Enhance Cas9 Biochemical Activity. *Biochemistry* 57, 3027–3031.
- Kawamata, M., and Ochiya, T. (2010). Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14223–14228.
- Kent, T., Chandramouly, G., McDevitt, S.M., Ozdemir, A.Y., and Pomerantz, R.T. (2015). Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase  $\theta$ . *Nat Struct Mol Biol* 22, 230–237.
- Kiani, S., Chavez, A., Tuttle, M., Hall, R.N., Chari, R., Ter-Ovanesyan, D., Qian, J., Pruitt, B.W., Beal, J., Vora, S., et al. (2015). Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. *Nat Methods* 12, 1051–1054.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., and Fang, S. (2018a). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 34, 147–159.
- Kim, H.Y., Kang, S.J., Jeon, Y., An, J., Park, J., Lee, H.J., Jang, J.-E., Ahn, J., Bang, D., Chung, H.S., et al. (2019). Chimeric crRNAs with 19 DNA residues in the guide region show the retained DNA cleavage activity of Cas9 with potential to improve the specificity. *Chem Commun (Camb)* 55, 3552–3555.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., and Kim, J.-S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24, 1012–1019.

- Kim, S., Koo, T., Jee, H.-G., Cho, H.-Y., Lee, G., Lim, D.-G., Shin, H.S., and Kim, J.-S. (2018b). CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome Res.*
- Kleinstiver, B.P., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Topkar, V.V., Nguyen, N.T., Zheng, Z., Gonzales, A.P.W., Li, Z., Peterson, R.T., Yeh, J.-R.J., et al. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523, 481–485.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529, 490–495.
- Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420–424.
- Lam, D.T.U.H., Dan, Y.Y., Chan, Y.-S., and Ng, H.-H. (2021). Emerging liver organoid platforms and technologies. *Cell Regen* 10, 27.
- Lee, J.K., Jeong, E., Lee, J., Jung, M., Shin, E., Kim, Y.-H., Lee, K., Jung, I., Kim, D., Kim, S., et al. (2018). Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat Commun* 9, 3048.
- Lee, K., Mackley, V.A., Rao, A., Chong, A.T., Dewitt, M.A., Corn, J.E., and Murthy, N. (2017). Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering. *Elife* 6.
- Li, D., Qiu, Z., Shao, Y., Chen, Y., Guan, Y., Liu, M., Li, Y., Gao, N., Wang, L., Lu, X., et al. (2013a). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 681–683.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.-L., et al. (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299–1310.
- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009). Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors. *Cell Stem Cell* 4, 16–19.
- Li, W., Teng, F., Li, T., and Zhou, Q. (2013b). Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 31, 684–686.

- Liang, L., Deng, L., Nguyen, S.C., Zhao, X., Maulion, C.D., Shao, C., and Tischfield, J.A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 36, 3297–3310.
- Liang, P., Sun, H., Sun, Y., Zhang, X., Xie, X., Zhang, J., Zhang, Z., Chen, Y., Ding, C., Xiong, Y., et al. (2017a). Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell* 8, 601–611.
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Ravinder, N., and Chesnut, J.D. (2017b). Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *Journal of Biotechnology* 241, 136–146.
- Liao, J., Cui, C., Chen, S., Ren, J., Chen, J., Gao, Y., Li, H., Jia, N., Cheng, L., Xiao, H., et al. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Adult Rat Cells. *Cell Stem Cell* 4, 11–15.
- Ling, X., Xie, B., Gao, X., Chang, L., Zheng, W., Chen, H., Huang, Y., Tan, L., Li, M., and Liu, T. (2020). Improving the efficiency of precise genome editing with site-specific Cas9-oligonucleotide conjugates. *Sci Adv* 6.
- Liu, K., Jin, H., and Zhou, B. (2020a). Genetic lineage tracing with multiple DNA recombinases: A user's guide for conducting more precise cell fate mapping studies. *J Biol Chem* 295, 6413–6424.
- Liu, Y., Li, X., He, S., Huang, S., Li, C., Chen, Y., Liu, Z., Huang, X., and Wang, X. (2020b). Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discovery* 6, 1–4.
- Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C.M., Colleoni, S., Lee, Y.-L., Kim, K.A., Ando, D., Urnov, F.D., Galli, C., Gregory, P.D., et al. (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat. Biotechnol.* 25, 1298–1306.
- Lomova, A., Clark, D.N., Campo-Fernandez, B., Flores-Bjurström, C., Kaufman, M.L., Fitz-Gibbon, S., Wang, X., Miyahira, E.Y., Brown, D., DeWitt, M.A., et al. (2019). Improving Gene Editing Outcomes in Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Temporal Control of DNA Repair. *Stem Cells* 37, 284–294.
- Lu, T., Cao, Y., Zhao, P., Shen, S., and Xi, Y. (2021). Organoid: a powerful tool to study lung regeneration and disease. *Cell Regen* 10, 21.
- Ma, E., Harrington, L.B., O'Connell, M.R., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2015). Single-Stranded DNA Cleavage by Divergent CRISPR-Cas9 Enzymes. *Molecular Cell* 60, 398–407.

- Ma, M., Zhuang, F., Hu, X., Wang, B., Wen, X.-Z., Ji, J.-F., and Xi, J.J. (2017). Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxp alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system. *Cell Res.* 27, 578–581.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 67–83.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.
- Manghwar, H., Li, B., Ding, X., Hussain, A., Lindsey, K., Zhang, X., and Jin, S. (2020). CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Adv Sci (Weinh)* 7, 1902312.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348–352.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7634–7638.
- Maurissen, T.L., and Woltjen, K. (2020). Synergistic gene editing in human iPS cells via cell cycle and DNA repair modulation. *Nat Commun* 11, 2876.
- McCabe, C.V., Codner, G.F., Allan, A.J., Caulder, A., Christou, S., Loeffler, J., Mackenzie, M., Malzer, E., Mianné, J., Pike, F.J., et al. (2019). Application of long-read sequencing for robust identification of correct alleles in genome edited animals.
- Meek, K., Dang, V., and Lees-Miller, S.P. (2008). Chapter 2 DNA-PK: The Means to Justify the Ends? In *Advances in Immunology*, (Academic Press), pp. 33–58.
- Meek, S., Buehr, M., Sutherland, L., Thomson, A., Mullins, J.J., Smith, A.J., and Burdon, T. (2010). Efficient gene targeting by homologous recombination in rat embryonic stem cells. *PLoS ONE* 5, e14225.
- Mehravar, M., Shirazi, A., Nazari, M., and Banan, M. (2019). Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Dev. Biol.* 445, 156–162.

- Mekler, V., Minakhin, L., Semenova, E., Kuznedelov, K., and Severinov, K. (2016). Kinetics of the CRISPR-Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA. *Nucleic Acids Research* 44, 2837–2845.
- Menon, V., and Povirk, L.F. (2016). End-processing nucleases and phosphodiesterases: An elite supporting cast for the non-homologous end joining pathway of DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 43, 57–68.
- Ménoret, S., Fontanière, S., Jantz, D., Tesson, L., Thinard, R., Rémy, S., Usal, C., Ouisse, L.-H., Fraichard, A., and Anegon, I. (2013). Generation of Rag1-knockout immunodeficient rats and mice using engineered meganucleases. *FASEB J.* 27, 703–711.
- Ménoret, S., De Cian, A., Tesson, L., Remy, S., Usal, C., Boulé, J.-B., Boix, C., Fontanière, S., Crénéguy, A., Nguyen, T.H., et al. (2015). Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci Rep* 5, 14410.
- Mianné, J., Codner, G.F., Caulder, A., Fell, R., Hutchison, M., King, R., Stewart, M.E., Wells, S., and Teboul, L. (2017). Analysing the outcome of CRISPR-aided genome editing in embryos: Screening, genotyping and quality control. *Methods* 121–122, 68–76.
- Mianné, J., Bourguignon, C., Nguyen Van, C., Fieldès, M., Nasri, A., Assou, S., and De Vos, J. (2020). Pipeline for the Generation and Characterization of Transgenic Human Pluripotent Stem Cells Using the CRISPR/Cas9 Technology. *Cells* 9, 1312.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., et al. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29, 143–148.
- Miller, J.C., Zhang, L., Xia, D.F., Campo, J.J., Ankoudinova, I.V., Guschin, D.Y., Babiarz, J.E., Meng, X., Hinkley, S.J., Lam, S.C., et al. (2015). Improved specificity of TALE-based genome editing using an expanded RVD repertoire. *Nat Methods* 12, 465–471.
- Miller, S.M., Wang, T., Randolph, P.B., Arbab, M., Shen, M.W., Huang, T.P., Matuszek, Z., Newby, G.A., Rees, H.A., and Liu, D.R. (2020). Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nat. Biotechnol.* 38, 471–481.
- Miura, H., Gurumurthy, C.B., Sato, T., Sato, M., and Ohtsuka, M. (2015). CRISPR/Cas9-based generation of knockdown mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. *Sci Rep* 5, 12799.

- Miyasaka, Y., Uno, Y., Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Yoshimura, T., Tanaka, T., Ishikubo, H., Hiraoka, Y., Takemoto, N., Tanaka, T., et al. (2018). CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics* *19*, 318.
- Mullins, J.J., Peters, J., and Ganten, D. (1990). Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* *344*, 541–544.
- Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., and Finkelstein, I.J. (2017). Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Mol Cell* *67*, 891-898.e4.
- Nakade, S., Mochida, K., Kunii, A., Nakamae, K., Aida, T., Tanaka, K., Sakamoto, N., Sakuma, T., and Yamamoto, T. (2018). Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system. *Nat Commun* *9*, 3270.
- Neff, E.P. (2021). Rats on the rise. *Lab Anim* 1–4.
- Nguyen, D.N., Roth, T.L., Li, P.J., Chen, P.A., Apathy, R., Mamedov, M.R., Vo, L.T., Tobin, V.R., Goodman, D., Shifrut, E., et al. (2020). Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* *38*, 44–49.
- Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* *25*, 350–362.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., and Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* *156*, 935–949.
- Nishimasu, H., Shi, X., Ishiguro, S., Gao, L., Hirano, S., Okazaki, S., Noda, T., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Mori, H., et al. (2018). Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* *361*, 1259–1262.
- O’Connell, M.R., Oakes, B.L., Sternberg, S.H., East-Seletsky, A., Kaplan, M., and Doudna, J.A. (2014). Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature* *516*, 263–266.
- Oh, Y., and Jang, J. (2019). Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells by Transcription Factors. *Mol Cells* *42*, 200–209.

- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.
- O'Reilly, D., Kartje, Z.J., Ageely, E.A., Malek-Adamian, E., Habibian, M., Schofield, A., Barkau, C.L., Rohilla, K.J., DeRossett, L.B., Weigle, A.T., et al. (2019). Extensive CRISPR RNA modification reveals chemical compatibility and structure-activity relationships for Cas9 biochemical activity. *Nucleic Acids Research* 47, 546–558.
- Palmiter, R.D., Chen, H.Y., and Brinster, R.L. (1982). Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29, 701–710.
- Papathanasiou, S., Markoulaki, S., Blaine, L.J., Leibowitz, M.L., Zhang, C.-Z., Jaenisch, R., and Pellman, D. (2021). Whole chromosome loss and genomic instability in mouse embryos after CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Commun* 12, 5855.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell* 134, 877–886.
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., and Liu, D.R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* 31, 839–843.
- Qi, T., Wu, F., Xie, Y., Gao, S., Li, M., Pu, J., Li, D., Lan, F., and Wang, Y. (2020). Base Editing Mediated Generation of Point Mutations Into Human Pluripotent Stem Cells for Modeling Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 1029.
- Rabai, A., Reisser, L., Reina-San-Martin, B., Mamchaoui, K., Cowling, B.S., Nicot, A.-S., and Laporte, J. (2019). Allele-Specific CRISPR/Cas9 Correction of a Heterozygous DNMT3A Mutation Rescues Centronuclear Myopathy Cell Phenotypes. *Mol Ther Nucleic Acids* 16, 246–256.
- Rainard, J.M., Pandarakalam, G.C., and McElroy, S.P. (2018). Using Microscale Thermophoresis to Characterize Hits from High-Throughput Screening: A European Lead Factory Perspective. *SLAS Discov* 23, 225–241.
- Remy, S., Chenouard, V., Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Brusselle, L., Heslan, J.-M., Nguyen, T.H., Bellien, J., Merot, J., et al. (2017). Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci Rep* 7, 16554.

- Renaud, J.-B., Boix, C., Charpentier, M., De Cian, A., Cochennec, J., Duvernois-Berthet, E., Perrouault, L., Tesson, L., Edouard, J., Thinard, R., et al. (2016). Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Rep* 14, 2263–2272.
- Rezza, A., Jacquet, C., Le Pillouer, A., Lafarguette, F., Ruptier, C., Billandon, M., Isnard Petit, P., Trouttet, S., Thiam, K., Fraichard, A., et al. (2019). Unexpected genomic rearrangements at targeted loci associated with CRISPR/Cas9-mediated knock-in. *Sci Rep* 9, 3486.
- Richier, B., and Salecker, I. (2015). Versatile genetic paintbrushes: Brainbow technologies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 161–180.
- Rong, Z., Zhu, S., Xu, Y., and Fu, X. (2014). Homologous recombination in human embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 nickase and a long DNA donor template. *Protein Cell* 5, 258–260.
- Rossi, G., Manfrin, A., and Lutolf, M.P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* 19, 671–687.
- Rueda, F.O., Bista, M., Newton, M.D., Goeppert, A.U., Cuomo, M.E., Gordon, E., Kröner, F., Read, J.A., Wrigley, J.D., Rueda, D., et al. (2017). Mapping the sugar dependency for rational generation of a DNA-RNA hybrid-guided Cas9 endonuclease. *Nat Commun* 8, 1610.
- Seol, J.-H., Shim, E.Y., and Lee, S.E. (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat. Res.* 809, 81–87.
- Shaikh, F.A., Kurtys, E., Kubassova, O., and Roettger, D. (2020). Reporter gene imaging and its role in imaging-based drug development. *Drug Discovery Today* 25, 582–592.
- Shapiro, J., Iancu, O., Jacobi, A.M., McNeill, M.S., Turk, R., Rettig, G.R., Amit, I., Tovin-Recht, A., Yakhini, Z., Behlke, M.A., et al. (2020). Increasing CRISPR Efficiency and Measuring Its Specificity in HSPCs Using a Clinically Relevant System. *Mol Ther Methods Clin Dev* 17, 1097–1107.
- Shelake, R.M., Pramanik, D., and Kim, J.-Y. (2019). Exploration of Plant-Microbe Interactions for Sustainable Agriculture in CRISPR Era. *Microorganisms* 7, 269.
- Sidhaye, J., and Knoblich, J.A. (2021). Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death Differ* 28, 52–67.
- Singh, D., Sternberg, S.H., Fei, J., Doudna, J.A., and Ha, T. (2016). Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9. *Nat Commun* 7, 12778.

- Slymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., and Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351, 84–88.
- Sledzinski, P., Dabrowska, M., Nowaczyk, M., and Olejniczak, M. (2021). Paving the way towards precise and safe CRISPR genome editing. *Biotechnol Adv* 49, 107737.
- Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., and Kucherlapati, R.S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230–234.
- Song, A.J., and Palmiter, R.D. (2018). Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends Genet.* 34, 333–340.
- Song, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Chen, M., Sui, T., Lai, L., and Li, Z. (2020). Large-Fragment Deletions Induced by Cas9 Cleavage while Not in the BEs System. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 21, 523–526.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., and Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67.
- Sternberg, S.H., LaFrance, B., Kaplan, M., and Doudna, J.A. (2015). Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR–Cas9. *Nature* 527, 110–113.
- Strecker, J., Ladha, A., Gardner, Z., Schmid-Burgk, J.L., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and Zhang, F. (2019). RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases. *Science* 365, 48–53.
- Sung, Y.H., Baek, I.-J., Kim, D.H., Jeon, J., Lee, J., Lee, K., Jeong, D., Kim, J.-S., and Lee, H.-W. (2013). Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat. Biotechnol.* 31, 23–24.
- Sürün, D., Schneider, A., Mircetic, J., Neumann, K., Lansing, F., Paszkowski-Rogacz, M., Hänchen, V., Lee-Kirsch, M.A., and Buchholz, F. (2020). Efficient Generation and Correction of Mutations in Human iPS Cells Utilizing mRNAs of CRISPR Base Editors and Prime Editors. *Genes* 11, 511.
- Syed, A., and Tainer, J.A. (2018). The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annu Rev Biochem* 87, 263–294.

- Szpirer, C. (2020). Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes. *Journal of Biomedical Science* 27, 84.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Teboul, L., Herault, Y., Wells, S., Qasim, W., and Pavlovic, G. (2020). Variability in Genome Editing Outcomes: Challenges for Research Reproducibility and Clinical Safety. *Molecular Therapy* 28, 1422–1431.
- Terao, M., Tamano, M., Hara, S., Kato, T., Kinoshita, M., and Takada, S. (2016). Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9. *Exp. Anim.* 65, 275–283.
- Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., et al. (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29, 695–696.
- Thom Saunders (2020). Single Copy Transgene Integration in ROSA26 Safe Harbor.
- Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503–512.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Thyme, S.B., Akhmetova, L., Montague, T.G., Valen, E., and Schier, A.F. (2016). Internal guide RNA interactions interfere with Cas9-mediated cleavage. *Nat Commun* 7, 11750.
- Tong, C., Li, P., Wu, N.L., Yan, Y., and Ying, Q.-L. (2010). Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 467, 211–213.
- Tran, N.-T., Bashir, S., Li, X., Rossius, J., Chu, V.T., Rajewsky, K., and Kühn, R. (2019). Enhancement of Precise Gene Editing by the Association of Cas9 With Homologous Recombination Factors. *Front Genet* 10, 365.

- Tu, Z., Yang, W., Yan, S., Yin, A., Gao, J., Liu, X., Zheng, Y., Zheng, J., Li, Z., Yang, S., et al. (2017). Promoting Cas9 degradation reduces mosaic mutations in non-human primate embryos. *Sci Rep* 7, 42081.
- Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.-L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., Jamieson, A.C., Porteus, M.H., Gregory, P.D., and Holmes, M.C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435, 646–651.
- Walton, R.T., Christie, K.A., Whittaker, M.N., and Kleinstiver, B.P. (2020). Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science* 368, 290–296.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910–918.
- Wang, J., Zhang, X., Cheng, L., and Luo, Y. (2020a). An overview and metanalysis of machine and deep learning-based CRISPR gRNA design tools. *RNA Biol* 17, 13–22.
- Wang, Y., Mallon, J., Wang, H., Singh, D., Jo, M.H., Hua, B., Bailey, S., and Ha, T. (2021). Real-time observation of Cas9 postcatalytic domain motions. *PNAS* 118.
- Wang, Z., Wang, Y., Wang, S., Gorzalski, A.J., McSwiggin, H., Yu, T., Castaneda-Garcia, K., Prince, B., Wang, H., Zheng, H., et al. (2020b). Efficient genome editing by CRISPR-Mb3Cas12a in mice. *J. Cell. Sci.* 133.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Wefers, B., Meyer, M., Ortiz, O., Hrabé de Angelis, M., Hansen, J., Wurst, W., and Kühn, R. (2013). Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3782–3787.
- Weltner, J., Balboa, D., Katayama, S., Bespalov, M., Krjutškov, K., Jouhilahti, E.-M., Trokovic, R., Kere, J., and Otonkoski, T. (2018). Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nat Commun* 9, 2643.
- Wen, W., Quan, Z.-J., Li, S.-A., Yang, Z.-X., Fu, Y.-W., Zhang, F., Li, G.-H., Zhao, M., Yin, M.-D., Xu, J., et al. (2021). Effective control of large deletions after double-strand breaks by homology-directed repair and dsODN insertion. *Genome Biology* 22, 236.

- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.
- Wright, W.D., Shah, S.S., and Heyer, W.-D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 293, 10524–10535.
- Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., Cheng, A.W., Trevino, A.E., Konermann, S., Chen, S., et al. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 32, 670–676.
- Xu, R., Zhou, X., Wang, S., and Trinkle, C. (2021). Tumor organoid models in precision medicine and investigating cancer-stromal interactions. *Pharmacology & Therapeutics* 218, 107668.
- Xue, C., and Greene, E.C. (2021). DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends Genet* 37, 639–656.
- Yang, L., Zhang, X., Wang, L., Yin, S., Zhu, B., Xie, L., Duan, Q., Hu, H., Zheng, R., Wei, Y., et al. (2018). Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadaA deaminase with Cas9 variants. *Protein Cell* 9, 814–819.
- Yao, X., Wang, X., Hu, X., Liu, Z., Liu, J., Zhou, H., Shen, X., Wei, Y., Huang, Z., Ying, W., et al. (2017). Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res.* 27, 801–814.
- Yin, H., Song, C.-Q., Suresh, S., Kwan, S.-Y., Wu, Q., Walsh, S., Ding, J., Bogorad, R.L., Zhu, L.J., Wolfe, S.A., et al. (2018). Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity. *Nat Chem Biol* 14, 311–316.
- Yousef Yengej, F.A., Jansen, J., Rookmaaker, M.B., Verhaar, M.C., and Clevers, H. (2020). Kidney Organoids and Tubuloids. *Cells* 9, 1326.
- Yu, J. (2021). Vascularized Organoids: A More Complete Model. *International Journal of Stem Cells* 14, 127–137.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.

- Yu, Y., Guo, Y., Tian, Q., Lan, Y., Yeh, H., Zhang, M., Tasan, I., Jain, S., and Zhao, H. (2020). An efficient gene knock-in strategy using 5'-modified double-stranded DNA donors with short homology arms. *Nat. Chem. Biol.* *16*, 387–390.
- Zhang, J.-P., Li, X.-L., Li, G.-H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G.D., Baylink, D., Zhang, L., Wen, W., Fu, Y.-W., et al. (2017). Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol* *18*.
- Zhang, Y., Wang, Q., Wang, J., and Tang, X. (2021). Chemical Modification and Transformation Strategies of Guide RNAs in CRISPR-Cas9 Gene Editing Systems. *Chempluschem* *86*, 587–600.
- Zhao, D., Lei, W., and Hu, S. (2021). Cardiac organoid — a promising perspective of preclinical model. *Stem Cell Res Ther* *12*, 1–10.
- Zhong, H., Chen, Y., Li, Y., Chen, R., and Mardon, G. (2015). CRISPR-engineered mosaicism rapidly reveals that loss of *Kcnj13* function in mice mimics human disease phenotypes. *Sci Rep* *5*, 8366.
- Zhu, X., Clarke, R., Puppala, A.K., Chittori, S., Merk, A., Merrill, B.J., Simonović, M., and Subramaniam, S. (2019). Cryo-EM structures reveal coordinated domain motions that govern DNA cleavage by Cas9. *Nat Struct Mol Biol* *26*, 679–685.
- Zou, J., Maeder, M.L., Mali, P., Pruett-Miller, S.M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B.-K., Chen, G., Ye, Z., Park, I.-H., Daley, G.Q., et al. (2009). Gene Targeting of a Disease-Related Gene in Human Induced Pluripotent Stem and Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *5*, 97–110.
- Zuo, Z., and Liu, J. (2020). Allosteric regulation of CRISPR-Cas9 for DNA-targeting and cleavage. *Current Opinion in Structural Biology* *62*, 166–174.
- Zuo, Z., Zolekar, A., Babu, K., Lin, V.J., Hayatshahi, H.S., Rajan, R., Wang, Y.-C., and Liu, J. (2019). Structural and functional insights into the bona fide catalytic state of *Streptococcus pyogenes* Cas9 HNH nuclease domain. *ELife* *8*, e46500.
- Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2003). Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *21*, 319–321.

# Annexe 1 : Revue sur l'évolution de l'édition génome chez le rat et modélisation de situations humaines



# Advances in Genome Editing and Application to the Generation of Genetically Modified Rat Models

Vanessa Chenouard<sup>1,2</sup>, Séverine Remy<sup>1</sup>, Laurent Tesson<sup>1</sup>, Séverine Ménoret<sup>1,3</sup>, Laure-Hélène Ouisse<sup>1</sup>, Yacine Cherifi<sup>2</sup> and Ignacio Anegon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>2</sup> genOway, Lyon, France, <sup>3</sup> CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS 3556, Nantes Université, Nantes, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Huaqiang Yang,  
South China Agricultural University,  
China

### Reviewed by:

Rui Chen,  
Baylor College of Medicine,  
United States  
Yuanwu Ma,  
Chinese Academy of Medical  
Sciences and Peking Union Medical  
College, China  
Daniel Davis,  
University of Missouri, United States

### \*Correspondence:

Ignacio Anegon  
ianegon@nantes.inserm.fr;  
Ignacio.Anegon@univ-nantes.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Genomic Assay Technology,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

**Received:** 09 October 2020

**Accepted:** 22 February 2021

**Published:** 20 April 2021

### Citation:

Chenouard V, Remy S, Tesson L,  
Ménoret S, Ouisse L-H, Cherifi Y and  
Anegon I (2021) Advances in Genome  
Editing and Application to the  
Generation of Genetically Modified  
Rat Models.  
Front. Genet. 12:615491.  
doi: 10.3389/fgene.2021.615491

The rat has been extensively used as a small animal model. Many genetically engineered rat models have emerged in the last two decades, and the advent of gene-specific nucleases has accelerated their generation in recent years. This review covers the techniques and advances used to generate genetically engineered rat lines and their application to the development of rat models more broadly, such as conditional knockouts and reporter gene strains. In addition, genome-editing techniques that remain to be explored in the rat are discussed. The review also focuses more particularly on two areas in which extensive work has been done: human genetic diseases and immune system analysis. Models are thoroughly described in these two areas and highlight the competitive advantages of rat models over available corresponding mouse versions. The objective of this review is to provide a comprehensive description of the advantages and potential of rat models for addressing specific scientific questions and to characterize the best genome-engineering tools for developing new projects.

**Keywords:** CRISPR-Cas9, rat, knockout, knockin, transgenesis, genetic diseases, immune genes

## INTRODUCTION

Genetically modified animal models are essential to answering questions in biology, modeling human and non-human animal diseases, and generating therapeutic recombinant proteins. Among animal models, small laboratory mammals are often used because they share many biological features with humans, housing them is easy and relatively inexpensive compared to maintenance of large animals, and ethical issues are less prominent than with species such as non-human primates. Among the small laboratory animal models, the rat has been used since at least 1856 (Philippeaux, 1856) and still is an important experimental model (between 9 and 18% of all laboratory models in the EU, The Commission to the European Parliament and the Council, 2015-2017).

Certain intrinsic characteristics of the rat, such as its larger size (10 fold) compared to the mouse, allow easier and more rapid microsurgery, multiple sampling of larger blood and tissue volumes, precise injection of substances into the brain, and *in vivo* and *ex vivo* organ function analysis. Additionally, mice and rats differ in their physiology and more sophisticated traits in the rat have made it a model of choice for toxicology, complex human diseases and neurobehavioral as well as cardiovascular studies among several others (Jacob, 2010).

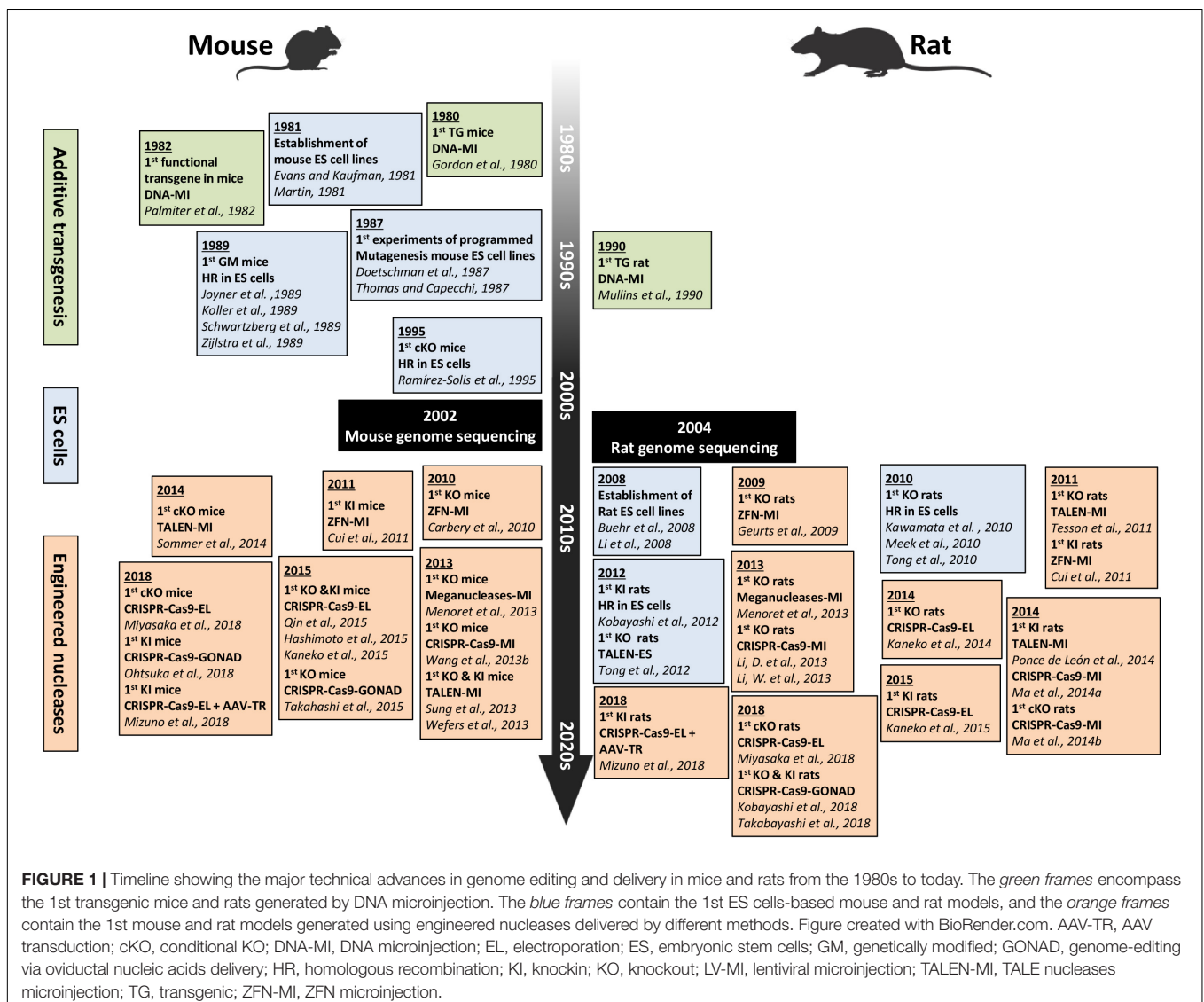
Such differences have been supported by comparative analyses of the rat and mouse genomes. The rat genome is 2.75 gigabases (Gb), smaller than the human genome (2.9 Gb) but larger than the mouse genome (2.6 Gb) (Gibbs et al., 2004). Overall, rats show enrichment of genes involved

in immunity, metabolic detoxification and chemosensation, as well as conservation of many genes involved in human diseases (Dewey et al., 2004; Gibbs et al., 2004).

Despite these advantages, the use of rats has lagged behind the use of mice in research, mainly because genetically modified mice were generated earlier than genetically modified rats (Figure 1). In mice, DNA microinjection was used in the early 1980s and embryonic stem (ES) cells in the late 1980s (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982; Doetschman et al., 1987). In contrast, in rats, DNA microinjection and ES cells began in the early 1990s and 2010, respectively (Mullins et al., 1990; Kawamata and Ochiya, 2010). In the meantime, researchers used classical breeding approaches to develop a variety of rat strains that model human diseases (Szpirer, 2020). The need for genetic engineering tools for the rat and the continuous use of zygote pronuclei microinjection of DNA in the rat, explain why gene-specific nucleases were applied in rats in 2009, earlier than in mice (2010) (Geurts et al., 2009; Carbery et al., 2010).

These gene-specific nucleases quickly facilitated the exponential generation of knockout (KO) rats for many genes. In synergy with these technological advances, sequencing of the rat genome (Dewey et al., 2004; Gibbs et al., 2004) and characterization of genetic quantitative trait loci (QTLs) linked to diseases (Aitman et al., 2010, 2016) further accelerated the use of models of genetically modified rats.

In this regard, different rat strains are prone to different diseases present in humans and reproduce better than mice some of these diseases. These rat strains have been used to introduce genetic modifications to analyze the role of genes (Aitman et al., 2010, 2016). For example, Wistar Kyoto, Dahl/SS, and spontaneously hypertensive strains develop hypertension and have extensively used to analyze the role of many genes (Moreno et al., 2011; Rudemiller et al., 2014; Nayak et al., 2015; Aitman et al., 2016; Lerman et al., 2019; Szpirer, 2020). The diabetes-prone biobreeding rat strain is another model that has been used to genetically modify genes involved in diabetes



(Michalkiewicz et al., 2004; Pandey and Dvorakova, 2020). Lewis rats are more susceptible than mice to the induction of Th1-mediated autoimmune diseases, whereas Brown Norway rats are highly susceptible to Th2-mediated immune diseases. Genomic linkage analysis allowed identification of a region on chromosome 9 that controls these phenotypes (Bernard et al., 2010). Additionally, the rat has been extensively used to analyze autoimmune diseases involving multiple genes (Aitman et al., 2010; Bernard et al., 2010).

In this review, we first describe the evolution and advances in genome editing and in delivery optimization of CRISPRs for producing genetically modified models. Further details are given on the rat to highlight needs and future research paths. The second part of the review focuses on the advantages of genetically modified rat models compared to mouse to mimic human situation, in particular in genetic diseases and immunology studies. Rats differ from mice in several characteristics, manifesting different phenotypes for the same genetic alteration. Rats also can sometimes better reproduce clinical features observed in humans who carry these gene variants (Hammer et al., 1990; Larcher et al., 2014). Our final aim is thus to inform researchers about major progresses in rat genome editing and advantages of rats as model organisms, to give researchers the choice of the best experimental system to answer their scientific questions. To facilitate rat models access and development, major rat resources for finding existing models or designing new ones with the latest gene editing tools, are described in **Table 1**.

## GENE-EDITING ADVANCES AND DELIVERY SYSTEM OPTIMIZATION

The last four decades have brought major advances in genome editing allowing for generation of animal models that harbor targeted genetic modifications. Efforts have focused on increasing the precision of these modifications, production efficiency and on simplifying procedures to make them easier and cheaper. The evolution of genome editing approaches and tools is discussed in this section, illustrated in **Figure 1** and nucleases compared in **Table 2**. Clustered, regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated (Cas) systems applied to rodents are detailed in **Table 3**, with details of specifics regarding rats given in this section. More particularly, *Streptococcus pyogenes* (SpCas) system components are described in **Figure 2** and compared in **Table 4**. Published advances for enhancing knockin (KI) generation rate are also detailed here and illustrated in **Figure 3**. Finally, delivery systems and the evolution of their practice are detailed and compared in **Table 5**.

### Historical Overview of Major Gene-Editing Techniques Developed in Mice and Rats

#### Random Additive Transgenesis and Mutagenesis

The first transgenic rodents were successfully generated in the early 1980s and 1990s (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982;

Mullins et al., 1990), by microinjection of exogenous donor DNA into the pronucleus of one-cell embryos. The reported efficiencies are quite low in rodents, ranging from 0.5 to 10% of injected embryos in mice and 0.5–5% of injected embryos in rats (Brinster et al., 1985; Charreau et al., 1996b; Hirabayashi et al., 2001). Other problems include random integration, a high copy number of integrated DNA sequences in *cis* and uncontrollable transgene expression. These challenges make this approach labor intensive and time-consuming and require considerable expertise.

*N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) is a highly potent mutagen that was first administered into adult male mice (Bode, 1984) and later into rats (Zan et al., 2003). Several ENU-induced mutant rat (van Boxtel et al., 2010) (for a review see Huang et al., 2011) and mouse models (for a review see Justice et al., 1999) have been described. This method presents some advantages: it requires no embryos or ES handling and the sperm of mutant offspring can be cryopreserved. Disadvantages include uncontrolled and random mutations in multiple loci throughout the genome, which must be identified and localized using high-throughput and time-consuming screening methods.

Transposon-mediated insertional transgenesis is an alternative tool developed to increase the integration frequency of the transgene into the host genome. Transposons are simple and mobile elements, consisting of a DNA sequence encoding transposase and a transgene flanked by binding sites (inverted terminal repeats, ITR) for the transposase, promoting integration into the genome. Transposon systems, such as *Sleeping Beauty* (SB), piggyBac (PB) or Tol2, have demonstrated their efficiency in rapidly producing stable lines of transgenic mice (Carlson et al., 2003; Horie et al., 2003) and rats (Kitada et al., 2007; Lu et al., 2007). The number of transgene insertions is, however, difficult to control.

#### Targeted Mutagenesis

The derivation of germline-competent mouse ES cells in the early 1980s (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) and the first experiments of targeted mutagenesis (Doetschman et al., 1987; Thomas and Capecchi, 1987), allowed introducing mutations into the host genome with a high precision (Joyner et al., 1989; Koller et al., 1989; Schwartzberg et al., 1989; Zijlstra et al., 1989) making mice a privileged model for genetic studies for two decades. Rat ES cells were described in 2008 (Buehr et al., 2008; Li et al., 2008) allowing generation of KO (Kawamata and Ochiya, 2010; Meek et al., 2010; Tong et al., 2010) and KI rats (Kobayashi et al., 2012; Yamamoto et al., 2015) with similar homologous recombination (HR) efficiencies to those observed in mice. Nevertheless, rat ES cells are less robust than mouse ES cells and maintaining their stability in culture and germline competence continues to be challenging.

The development of meganucleases, engineered zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and more recently the CRISPR-Cas system, has unquestionably revolutionized genome editing, opening new possibilities especially in the rat and other species in which ES cells were not available (Fernández et al., 2017). Each of these nucleases have their own properties of DNA-binding, recognition type/site specificities, their own advantages and limitations,

**TABLE 1** | Resources on rat genomics and genome edited animals.

Resources	Name	Website and references	Proposed resources
<b>Genomic databases</b>	National Center for Biotechnology Information (NCBI) including Gene, Protein, Nucleotide, Blast, and others	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> (Sayers et al., 2019)	Comprehensive suite for molecular analysis from rat genome to protein expression and functionality
	The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) including Ensembl, UniProt, Clustal Omega and others	<a href="https://www.ebi.ac.uk/services">https://www.ebi.ac.uk/services</a> (Madeira et al., 2019)	From rat genome to protein databases a full suite with analysis tools and multiple sequence alignments
	The University of California, Santa Cruz Genome Browser	<a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a> (Lee et al., 2020)	Genome browser, multiple sequence alignments and others
	Model organism Aggregated Resources for Rare Variant exploration (MARRVEL)	<a href="http://marrvel.org/">http://marrvel.org/</a> (Wang et al., 2019b)	Comparison of human genes with model organisms' genes such as the rat in a physiologic or pathologic context
<b>Genomic databases and strains repository</b>	Rat Genome Database (RGD) in the United States	<a href="https://rgd.mcw.edu">https://rgd.mcw.edu</a> (Smith et al., 2020)	Repository of hundreds of rat strains and genome edited rats, mostly for genes involved in hypertension and cardiovascular function. Genetic, phenotype and disease data, sequences, QTLs, mapping data, software tools.
<b>Rat strains repository</b>	Rat Resource and Research Center (RRRC) in the United States	<a href="http://www.rrrc.us/">http://www.rrrc.us/</a>	Repository of hundreds of rat strains, genome edited lines, cryopreserved embryos, sperm, and ES cells.
	National Bioresource Project for the rat (NBPR) in Japan	<a href="http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/">http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/</a>	Repository of hundreds of rat strains, ENU and genome edited lines, cryopreserved embryos and sperm, BAC libraries
	Rat Resource Database in China	<a href="http://www.ratresource.com">http://www.ratresource.com</a>	Repository of rat strains and genomic data.
	Rodent Model Research in Taiwan	<a href="https://www.nlac.narl.org.tw/">https://www.nlac.narl.org.tw/</a>	Strain depository of lines or rats including genome edited ones.
<b>Academic platforms producing genome-edited rat models</b>	Wisconsin Gene Editing Rat Resource Center and The Michigan University Transgenic Animal Core facility in the United States	<a href="https://rgd.mcw.edu/wg/gerc/">https://rgd.mcw.edu/wg/gerc/</a> <a href="https://brcf.medicine.umich.edu/cores/transgenic-animal-model/">https://brcf.medicine.umich.edu/cores/transgenic-animal-model/</a>	Distribution of already available models and generation of new ones on demand
	Transgenic Rat ImmunoPhenomic (TRIP) facility in France	<a href="http://www.itun.nantes.inserm.fr/Core-facilities/TRIP-Transgenic-Rats-ImmunoPhenomic">http://www.itun.nantes.inserm.fr/Core-facilities/TRIP-Transgenic-Rats-ImmunoPhenomic</a>	
<b>Commercial vendors for rat models</b>	Charles River laboratories	<a href="https://www.criver.com/">https://www.criver.com/</a>	Distribution of already available models and generation of new ones on demand
	Janvier Labs	<a href="https://www.janvier-labs.com/">https://www.janvier-labs.com/</a>	
	Envigo (include Horizon discovery models)	<a href="https://www.envigo.com/research-models">https://www.envigo.com/research-models</a>	
	Taconic Biosciences	<a href="https://www.taconic.com">https://www.taconic.com</a>	
	genOway (include Axenis models)	<a href="https://www.genoway.com/">https://www.genoway.com/</a>	
	Cyagen	<a href="https://www.cyagen.com/us/en/">https://www.cyagen.com/us/en/</a>	Custom rat model generation
	Hera Biolabs	<a href="https://www.herabiolabs.com/">https://www.herabiolabs.com/</a> SRG OncoRats (Noto et al., 2020)	Proprietary gene editing technologies and SRG OncoRats for oncology studies
	Ligand pharmaceuticals	<a href="https://www.ligand.com/technologies/omniab-OmniRat">https://www.ligand.com/technologies/omniab-OmniRat</a> (Joyce et al., 2020) OmniFlic (Harris et al., 2018)	OmniRat and OmniFlic for human antibodies generation
<b>Software for the use of CRISPR</b>	CRISPOR	<a href="http://crispor.tefor.net/">http://crispor.tefor.net/</a> (Concordet and Haeussler, 2018)	On and off target scores
	CHOPCHOP	<a href="https://chopchop.cbu.uib.no/">https://chopchop.cbu.uib.no/</a> (Labun et al., 2019)	
	E-CRISPR	<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/</a> (Heigwer et al., 2014)	
	CCTOP	<a href="https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/index.html">https://cctop.cos.uni-heidelberg.de:8043/index.html</a> (Stemmer et al., 2015; Labuhn et al., 2018)	
	CRISPRscan	<a href="https://www.crisprscan.org/">https://www.crisprscan.org/</a> (Moreno-Mateos et al., 2015)	
	CRISPRdirect	<a href="http://crispr.dbcls.jp/">http://crispr.dbcls.jp/</a> (Naito et al., 2015)	Off-target prediction only
	CRISPR RGEN tools	<a href="http://www.rgenome.net/">http://www.rgenome.net/</a>	Cas-OFFinder, Microhomology, Cas-designer, base-editing, prime-editing...
<b>Private company webtool for design of gRNA targeting rat genome</b>	Integrated DNA Technologies	<a href="https://eu.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing">https://eu.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing</a>	Include on and off target scores
	Synthego	<a href="https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool">https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool</a>	
	Horizon Discovery	<a href="https://horizondiscovery.com/en/ordering-and-calculation-tools/crispr-design-tool">https://horizondiscovery.com/en/ordering-and-calculation-tools/crispr-design-tool</a>	
	Benchling	<a href="https://www.benchling.com/crispr/">https://www.benchling.com/crispr/</a>	

**TABLE 2** | Comparison of engineered endonucleases.

Specificities, advantages, limitations	Meganucleases	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas
DNA binding determinant	Protein	ZF protein	TAL protein	crRNA/sgRNA
Binding specificity	Long sequences of nucleotides <sup>a</sup>	3 nucleotides	1 nucleotide <sup>b</sup>	1/1 nucleotide pairing
Endonuclease	I-CreI and I-SceI <sup>a</sup>	FokI <sup>c</sup>	FokI <sup>c</sup>	Cas9
Function specificity	Monomer	Dimer	Dimer	Monomer
Design/Engineering	Very difficult	Difficult	Simple	Very simple
Restriction in target site	Chromatin compaction	G-rich sequence	Start with T and end with A	End with a NGG sequence
Target site length	18–44 bp	18–36 bp <sup>d</sup>	24–40 bp	22–25 bp
Targeting frequency	Low	High (one/100 bp)	High (one/bp)	High (one/4 or 8 bp)
Specificity	High	Moderate <sup>e</sup>	High	High
Sensitivity to DNA methylation	Yes	Yes	Yes	No <sup>f</sup>
Off-targets	Variable	Low <sup>e</sup>	Very low	Variable
Size	Small size	Small size (~1 kb/monomer)	Large size (~3 kb/monomer)	Large size (4.2 kb Cas9)
Commercially available, Cost	Yes, high	Yes, high	Yes, moderate	Yes, low
Patents concern	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Type of editing</b>				
Gene KO (Indels and frameshift)	Yes	Yes	Yes	Yes
Multiplex KO	No data <sup>h</sup>	Very limited	Limited	Yes (up to eight alleles) <sup>g</sup>
Gene correction/point mutagenesis (repaired basepairs)	No data <sup>h</sup>	Yes	Yes	Yes
Gene addition/sequence replacement (integrated gene cassette)	No data <sup>h</sup>	Yes	Yes	Yes
Gene deletion (deleted gene fragments)	No data <sup>h</sup>	No data	No data	Yes
Prime and base editing	No data <sup>h</sup>	No data	No data	Yes

<sup>a</sup>DNA-binding specificities and cleavage mechanism combined in the same protein (Galletto et al., 2009). I-CreI and I-SceI are the main endonucleases used but a few others have been applied to genome editing.

<sup>b</sup>TALE protein consist of 34 amino acid repeat domains, each one recognizing a single DNA nucleotide; highly conserved, excepting two hypervariable residues at positions 12 and 13, which confer the specificity of TALE.

<sup>c</sup>FokI cleaves only in its dimeric form

<sup>d</sup>Association of 3–6 ZF DNA binding domains fused to the FokI catalytic domain. Binding of two ZFN-FokI heterodimers to two contiguous DNA sequences and separated by a 5–7 bp gap.

<sup>e</sup>Specificity depends on number and selected ZF modules.

<sup>f</sup>No direct effect of methylation on Cas9 binding or effectivity (Verkuijl and Rots, 2019).

<sup>g</sup>Difficult on same chromosome. Limitations overcome by Prime and base editing (cf Table 3).

<sup>h</sup>The difficulty in designing meganucleases has limited their application in creating new model organisms.

which are listed in **Table 2**. Injection of these nucleases directly into rat or mouse zygotes allows creation of a double-strand break (DSB) at a targeted locus, repaired thereafter mainly by non-homologous end-joining (NHEJ) or HR (these mechanisms are reviewed in detail in a later section). Careful design of the associated tools makes it possible to better control repair outcome at any targeted locus of the genome with high efficiency and much faster than with ES cells. Several reports demonstrated the high efficiency of ZFN and TALEN in quickly generating different types of modifications in mice and rats, ranging from KO (Geurts et al., 2009; Carbery et al., 2010; Mashimo et al., 2010, 2013; Tesson et al., 2011; Tong et al., 2012; Sung et al., 2013; Sommer et al., 2014), simple point mutations, to large KI by homology-directed repair (HDR) (Sung et al., 2013; Wang

et al., 2013a; Wefers et al., 2013; Ponce de León et al., 2014; Remy et al., 2014). Meganucleases, although less used than the other nucleases, were also applied to generate KO mouse and rats (Ménoiret et al., 2013). Nevertheless, the design complexity and associated costs made these techniques accessible to only few laboratories, leading to a search for alternative approaches.

The simplicity and rapidity of guided RNA design, compared to complex protein engineering needed for ZFNs and TALENs, made the CRISPR-Cas system largely accessible at low cost, without sacrificing the specificity and reproducibility already observed with ZFNs and TALENs. Nevertheless, the success of CRISPR-Cas, especially in the generation of the first CRISPR mouse (Wang et al., 2013b) and rat (Li D. et al., 2013; Li W. et al., 2013), depended on knowledge gathered using the previous

**TABLE 3** | CRISPR variants applied to genetically modified mouse and rat models.

Application	Type – Variant - Name	PAM 5' -3'	Cleavage	GM mice	GM rats
<b>Classical GE</b>	II- SpCas9	NGG	Blunt DSB	Wang et al., 2013b	Li D. et al., 2013; Li W. et al., 2013
<b>Specificity enhancement</b>	II- E -Hypa SpCas9	NGG	Blunt DSB	Ikeda et al., 2019	–
	II- E -SpCas9 nickase	NGG	Nick	Ran et al., 2013	–
<b>Enlarge targeting possibilities</b>	II- E -SpCas9 VQR	NGA	Blunt DSB	Robertson et al., 2018	–
	II- E -SpCas9 VRER	NGCG	Blunt DSB	Robertson et al., 2018	–
	II- E -SpCas9-NG	NGN	Blunt DSB	Fujii et al., 2019	–
	II- SaCas9	NNGRRT	Blunt DSB	Zhang X. et al., 2016	Zheng et al., 2020
	II- E -SaCas9 KKH	NNNRRT	Blunt DSB	Robertson et al., 2018	–
	II- St1Cas9	NNAGAAW	Blunt DSB	Fujii et al., 2016	–
	II- CjCas9	NNNVRYM	Blunt DSB	Kim et al., 2017	–
	II- NmCas9	NNNNGATT	Blunt DSB	Xia et al., 2018	–
	II- FnCas9	NGG	5' staggered	Hirano et al., 2016	–
	V-A- AsCpf1 (Cas12a)	TTTV	5' staggered	Hur et al., 2016; Kim et al., 2016	Lee J. G. et al., 2019; Yeo et al., 2019
	V-A- LbCpf1 (Cas12a)	TTTV	5' staggered	Kim et al., 2016	Lee J. G. et al., 2019
	V-A- ErCas12a CRISPR-Mad7	TTTN, CTTN	5' staggered	Liu Z. et al., 2020	Liu Z. et al., 2020
	V-A- CRISPR-Mb3Cas12a	TTV	5' staggered	Wang Z. et al., 2020	–
V-B- AaCas12b (C2c1)	TTN	5' staggered	Teng et al., 2018	–	
<b>Alternative editing</b>	<b>Cytosine base editing</b>				
	II- E -SpBE2	NGG	None	Lee et al., 2018	–
	II- E -HF2-SpBE2	from NGG/A to NGG	None	Liang P. et al., 2017	–
	II- E -SpBE3	NGG	Nick	Zhang H. et al., 2018	–
	II- E -Sp-BE4	NGG	Nick	Lee et al., 2018	–
	II- E -Sp-VQR-BE3	NGA	Nick	Lee et al., 2018	–
	II- E -SaBE3	NNGRRT	Nick	Liu et al., 2018	–
	<b>Adenosine base editing</b>				
	II- E -SpABE7.10	NGG	Nick	Liu et al., 2018	Yang L. et al., 2018
	II- E -SpVQR-ABE	NGA	Nick	Yang L. et al., 2018	–
	II- E -SaKKH-ABE	NNNRRT	Nick	Yang L. et al., 2018	–
	<b>Prime editing</b>				
	PE3	NGG	2 Nicks	Liu Y. et al., 2020	–

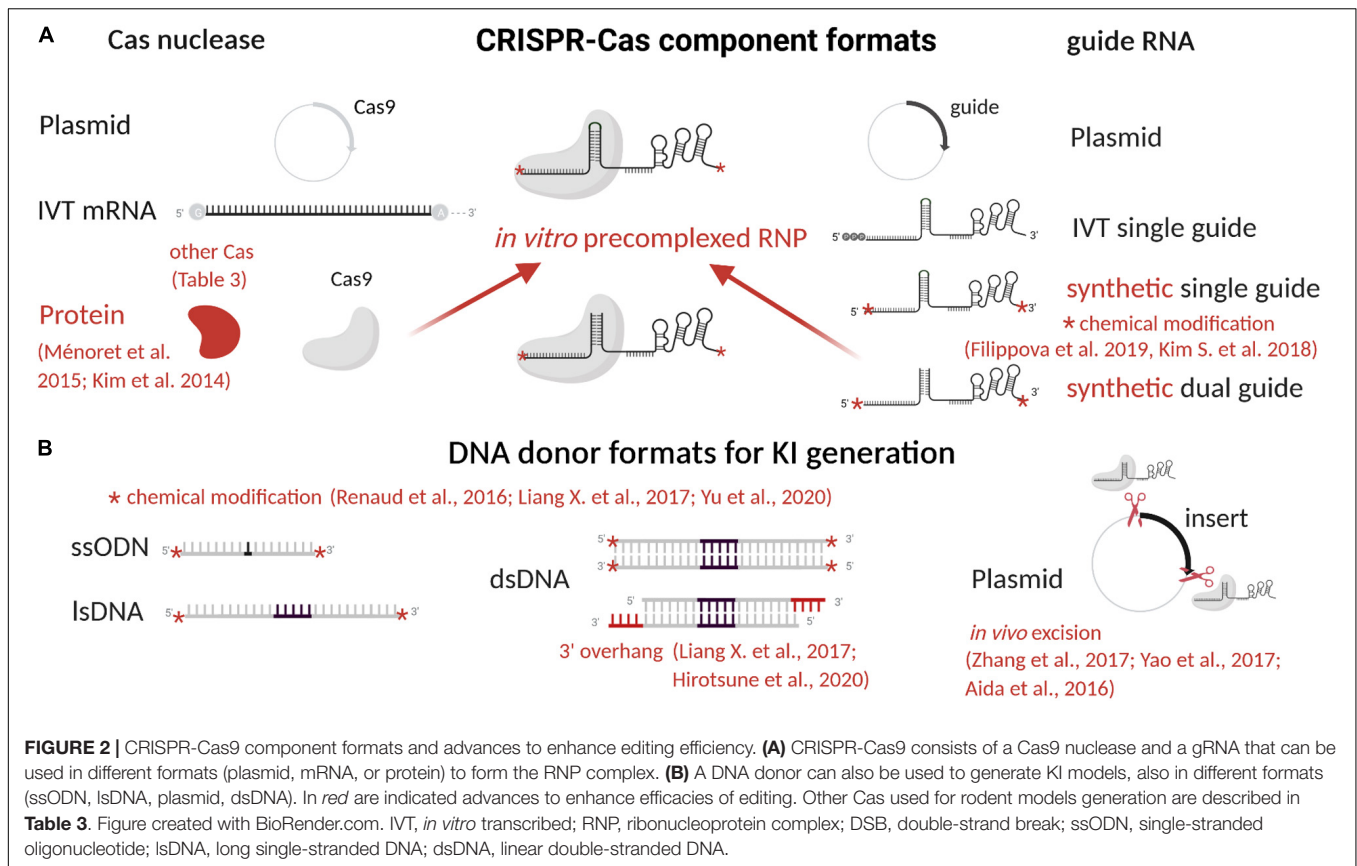
GE, genome editing; E, engineered Cas; GM, genetically modified model; DSB, double strand break; St1Cas9, *Streptococcus thermophilus* Cas9; CjCas9, *Campylobacter jejuni* Cas9; NmCas9, *Neisseria meningitidis* Cas9; FnCas9, *Francisella novicida* Cas9.

gene-specific nucleases in terms of DNA cleavage outcomes, repair pathways mechanisms (molecules involved and forms of DNA donors) and genotyping techniques.

## CRISPR-Cas Systems

The CRISPR-Cas9 system is originally based on a ribonucleoprotein (RNP) complex composed of a nuclease (Cas9) driven by a dual-guide RNA (dgRNA) duplex (Jiang and Doudna, 2017). Cas9 cleavage capacity relies on its two nuclease domains, each cleaving one strand of the genomic DNA. Inactivation of either nuclease domain (nickase) generates a nick on the corresponding strand (Jinek et al., 2012), whereas inactivation of both domains (dead Cas9 or dCas9) completely abolishes its cleavage capacity. The native dgRNA (Deltcheva et al., 2011) is formed from a trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) harboring a complex secondary structure to interact with Cas9 and a CRISPR RNA (crRNA), that mostly encodes the 20 nucleotides that give the system its specificity. When formed, this RNP complex quickly interrogates genomic DNA

for its specific protospacer adjacent motif (PAM). The PAM is a key factor because it defines the possibilities of DNA targeting sequences. For SpCas9, the targets are limited to a G-rich genomic region with a 5'-NGG-3' PAM (Jinek et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). PAM recognition is followed by specific gRNA (guide RNA) spacer (20 nucleotides) matching. A perfect match creates a targeted blunt DSB three nucleotides away from the PAM. A few mismatches between the gRNA and the targeted genomic DNA are tolerated at certain positions and may lead to off-target editing (Peng et al., 2018). Design of gRNA with the highest homology specificity possible for the targeted DNA sequence is essential to limit off-target edits (Ayabe et al., 2019). Available tools for rat genome editing with CRISPRs are described in **Table 1**. Off-target is less of an issue for animal model generation when compared to the use of gene editing as a therapeutic tool. Indeed, animals require multiple breeding, clearing lines from off-targets on chromosomes different from the one harboring the mutation of interest.



To expand the CRISPR toolbox, many variants of SpCas9 have been engineered and bacterial strains screened to either enhance specificity or broaden PAM opportunities. Variants (Pickar-Oliver and Gersbach, 2019) and SpCas9 ortholog classification (Makarova et al., 2020) have been recently reviewed. Many of these options have been used at least once to edit mouse embryos, but only a few have been applied to the rat. Those already applied to rodent genome editing are summarized in **Table 3**. Type V Cas have T-rich PAMs and other interesting features, such as staggered DSB generation, that make them complementary to SpCas9. For this reason, some orthologs of Cpf1 (Cas12a) are the most used after SpCas9, including *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1) (Lee J. G. et al., 2019; Yeo et al., 2019) and *Lachnospiraceae bacterium ND2006* (LbCpf1) (Lee J. G. et al., 2019).

Classical genome editing, alternatives and their context of application have been recently reviewed in detail (Anzalone et al., 2020). Two of these, namely base editing and prime editing, have been used for rodent genome editing and are summarized in **Table 3**. Cytosine base editor has been engineered using either dCas9 or nickase to transform cytosine into a thymine (Komor et al., 2016; Nishida et al., 2016) and was further improved (Rees and Liu, 2018; Schatoff et al., 2019). Adenine base editor was engineered to mutate adenine into guanine more efficiently than Cas9 genome editing in human cells (Gaudelli et al., 2017). Several base editor variants have been applied to mouse embryos for single (Liang P. et al.,

2017) or multiple (Liu et al., 2018; Zhang H. et al., 2018) base editing, whereas only the SpABE7.10 system has been applied in rats (Ma Y. et al., 2018; Yang L. et al., 2018). The main advantage of base editing is its capacity to generate targeted indels or a particular mutation without a DNA donor, enhancing its efficiency compared to classical genome editing. By avoiding DSBs, this system also allows multiplex editing on the same region of a chromosome (Lee H.K. et al., 2019). Its major limitations are bystander effect on non-targeted bases, cytosine and adenine limitations, targeted precision that restrict possibilities, and off-target effects as with classical genome editing. Prime editing is overcoming some of these limitations (Anzalone et al., 2019). This system allows mutation, short insertion and short deletion editing with limited indels generation in contrast to classical Cas genome editing. The first two versions of this system relied on a Cas9 nickase fused to a reverse transcriptase and a prime editing gRNA (pegRNA). This system induces nicking on the non-target strand and reverse transcription of the template encoded in the pegRNA to specifically modify the targeted locus. Prime editing 3 and 3b have been enhanced by the use of a second nickase with its own guide RNA, to target the strand that was not nicked by the pegRNA. Very recently, prime editing 3 has been successfully applied to genetically modify mouse embryos for the first time (Liu Y. et al., 2020). This particularly interesting approach will be applied eventually to generate genetically modified rat models.

**TABLE 4** | CRISPR-Cas9 component format advantages, limits and advances.

Format	Advantages	Limitations	Advances demonstrated in any species (rat in bold)
<b>Cas9</b>			
<b>Plasmid</b>	No limit on insert size Easy engineering High expression	Delayed activity Mosaicism Increased off-targets Delayed activity	<b>Cas9 protein allowing rapid and more efficient editing</b> (Kim et al., 2014; Ménoret et al., 2015) Large editing toolbox variants ( <b>Table 3</b> ) Improved chromatin accessibility (Chen F. et al., 2017; Ding et al., 2019)
<b>mRNA</b>	Expression faster than plasmid Limit mosaicism and off-targets	Delayed activity <i>In vitro</i> transcription efficiency/toxicity	<b>Cas9 engineered to activate repair pathways</b> (Charpentier et al., 2018; Tran et al., 2019)
<b>Protein</b>	Ready to cut Limit mosaicism and off-targets Affordable and high quality	Crystallization at high dose <i>In vivo</i> stability potentially immunogenic	Cas9 engineering to be degraded in G1 (Gutschner et al., 2016; Charpentier et al., 2018; Lomova et al., 2019)
<b>gRNA</b>			
<b>Plasmid</b>	No limit on insert size Easy to engineer	Delayed activity	Chemical modification (Kim S. et al., 2018; Filippova et al., 2019)
<b>IVT sgRNA</b>	Easy to produce and use Flexible in sequence and length Efficient	Time-consuming production Induced immune responses Limited in chemical modification	Essential sequence, secondary structures and functional modules of gRNA (Briner et al., 2014; Kartje et al., 2018)
<b>Synthetic sgRNA</b>	Affordable and high quality Chemical modifications Ready to use Efficient	Order full sgRNA for each project Long RNA synthesis Difficulties in adding fluorophore for tracking	Overlapping gRNA (Jang et al., 2018) gRNA engineering to activate repair pathways (Nakade et al., 2018; Tran et al., 2019)
<b>Synthetic dgRNA</b>	Short RNA synthesis Low cost and high quality Same tracrRNA for all project Chemical modifications Fluorophores added for tracking Efficient	crRNA & tracrRNA hybridization <i>in vitro</i>	
<b>DNA donor</b>			
<b>ssODN</b>	Low cost synthesis High efficacy for mutation or short KI	Limited in length to 200nt	DNA synthesis progresses (Hao et al., 2020) <b>Chemical modification</b> (Renaud et al., 2016; Liang X. et al., 2017; Yu et al., 2020) Insertion close to cut site (Inui et al., 2014; Liang X. et al., 2017)
<b>IsDNA</b>	Usable for long KI	Limited in length Difficult to produce Mutated KI Expensive to synthesize	3' overhang DNA donor (Liang X. et al., 2017; Hirotsune et al., 2020) Carry to cut site by Cas9 (Ma et al., 2017; Aird et al., 2018; Gu et al., 2018; Ling et al., 2020; Wang Z. et al., 2020)
<b>dsDNA</b>	Usable for long KI Easy to produce and engineer No limit on insert size	Few random insertions	Carry to cut site by gRNA (Carlson-Stevermer et al., 2017; Lee et al., 2017) Carry to cut site by DNA donor engineering (Nguyen et al., 2020)
<b>Plasmid</b>	Usable for long KI Easy to produce and engineer No limit on insert size	Few random insertions	DNA donor <i>in vivo</i> excision from plasmid (Aida et al., 2016; Yao et al., 2017; Zhang et al., 2017)

IVT, *in vitro*-transcribed; gRNA, guide RNA; sgRNA, single gRNA; dgRNA, dual gRNA; ssODN, single-stranded oligonucleotides; IsDNA, long single-stranded DNA; dsDNA, linear double-stranded DNA.

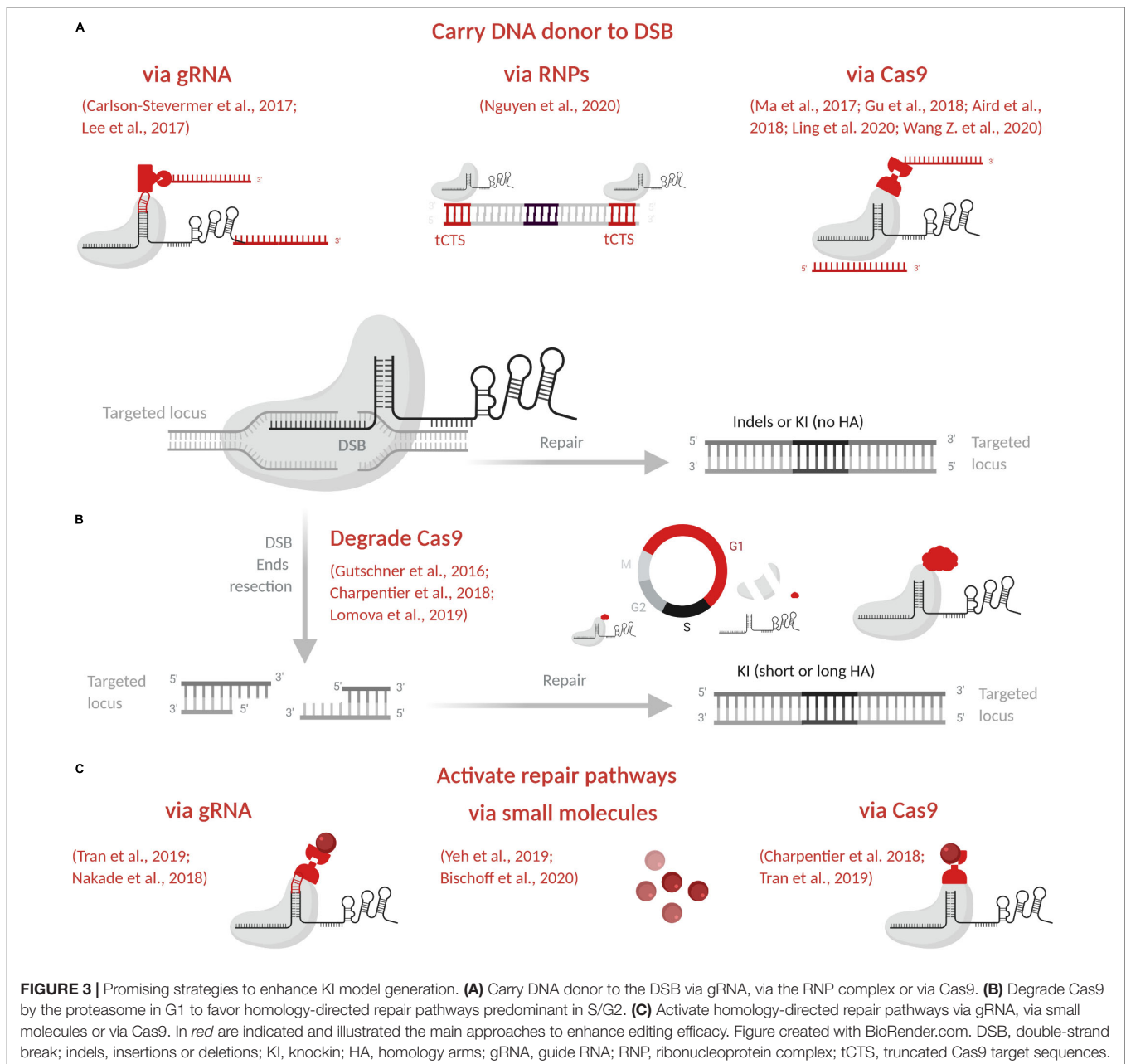
## Advances in CRISPR-Cas Production and Design for Rodent Genome Editing

The components of the CRISPR-Cas system, both for KO or KI, have been closely studied and enhanced to increase efficiency, decrease side effects, and offer better control over repair outcomes, as reviewed below. In particular, we summarized CRISPR-Cas9 component formats and their evolution in **Table 4**

and **Figure 2**, and advances to increase KI efficiency are illustrated in **Figure 3**.

### RNP Complex

KO and KI model's generation mainly depends on RNP complex cleavage efficiency. Many studies have been done to find RNP complex best settings. It has been clearly demonstrated



that the use of Cas9 protein allows transient and faster editing (Kim et al., 2014) necessary for proper animal model generation and increases efficiency of the RNP complex in mouse and rat zygotes (Figure 2A and Table 4) (Ménoiret et al., 2015). Guide RNAs sequence has been extensively studied to better understand its flexibility and structure (Table 4) (Briner et al., 2014; Kartje et al., 2018) for improved efficacy. In cells, the 5' triphosphate group on *in vitro*-transcribed gRNA induces the cell immune system and reduces editing efficacy. This reaction can be limited by phosphatase treatment or prevented by chemical modification of synthetic gRNA (Kim S. et al., 2018). Chemical modifications and gRNA optimization have been recently reviewed (Filippova et al., 2019) and offer a clear advantage for synthetic gRNA

(Figure 2A and Table 4). Regarding their format, both dgRNA and single gRNA (sgRNA) display similar efficiency (Terao et al., 2016; Shapiro et al., 2020). Chromatin state can influence editing efficiency (Janssen et al., 2019; Verkuijl and Rots, 2019) and even prevent editing of gRNA with predicted high on target score. Two main strategies have been developed in cells only to open chromatin locally and increase editing efficiency with SpCas9 and other orthologs (Table 4). The first approach uses one or multiple dCas molecules to open chromatin in close proximity to the targeted locus (Chen F. et al., 2017). The second approach relies on fused chromatin-modulating peptides on SpCas9 and other Cas proteins (*Streptococcus pasteurianus* Cas9, *Campylobacter jejuni* Cas9, and others) (Ding et al., 2019). This field is still

TABLE 5 | Delivery methods.

Delivery methods	Cargo	Species /cell target	Location	Advantages	Limitations	References
<b>Physical delivery</b>						
<b>Microinjection</b>	DNA donor - dsDNA (linear/plasmid) - dsDNA encoding gene-specific nucleases - lsDNA (>200nt) - ssODN (~100nt)	Mouse and rat zygote	Pronucleus or cytoplasm	- Delivery of large DNA fragments - Stable DNA in cell	- Time-consuming method - Expertise required (less for Cyt-MI) - Poor visualization pronucleus, flexibility of the oolemma and nuclear membranes in rat - Variability in efficiency depending on size, DNA quality or purity - Persistent expression and depending on host transcriptional/transductional machinery	1st description (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982; Mullins et al., 1990) dsDNA-ZFN (Geurts et al., 2009) dsDNA-TALEN (Tesson et al., 2011) dsDNA-Meganuclease (Ménoret et al., 2013) Efficiency (Charreau et al., 1996b; Hirabayashi et al., 2001) Complex/invasive method (Brinster et al., 1985; Charreau et al., 1996b)
	mRNA encoding gene specific nucleases	Mouse and rat zygote	Pronucleus or cytoplasm	- Moderate efficiency - Transient expression - Cyt-MI more efficient than PN-MI - Off-target reduced - Independent expression dependency of host transcriptional/transductional machinery (mRNA)	- Time-consuming - Expertise required (less for Cyt-MI) - Variation among batches of IVT mRNA - mRNA liable to degradation	mRNA-ZFN (Geurts et al., 2009) mRNA-TALEN (Tesson et al., 2011; Remy et al., 2014) mRNA-CRISPR (Ménoret et al., 2015) Meganucleases (Wang et al., 2014)
	Protein (RNP)	Mouse and rat zygote Mouse/ES	Pronucleus or cytoplasm	- Higher efficiency than using DNA or mRNA encoding gene specific nucleases - Short half-life within cells - Less mosaicism - Off-target cleavage reduced	- <i>In vivo</i> stability - Potentially immunogenic	(Ménoret et al., 2015; Wang et al., 2015; Jung C. J. et al., 2017)
<b>Electroporation</b>	DNA donor - dsDNA (linear/plasmid) - ssODN - lssDNA (600–1.5 kb)	Mouse and rat zygote	Uncontrolled cytoplasm (long DNA) Pronucleus (short lsDNA/ssODN)	- Easier delivery than DNA-MI - Processing simultaneously 50–60 zygotes in a short time - Efficient to deliver ssODN or lsDNA (<1 kb)	- Inefficient nuclear transport - Transient nuclear envelop breaking or cell-division required - Inefficient to deliver DNA > 1 kb	ssODN (Hashimoto and Takemoto, 2015; Kaneko and Mashimo, 2015; Qin et al., 2015; Chen et al., 2016; Wang et al., 2016; Remy et al., 2017) lsDNA (Miyasaka et al., 2018) Inefficient delivery dsDNA (Takabayashi et al., 2018)
	mRNA encoding Cas9 + sgRNA	Mouse and rat zygote	Uncontrolled	- Easier delivery than mRNA-MI	- Embryos are quite sensitive to pulse and toxicity is observed	Rat/mRNA encoding Cas9+sgRNA (Remy et al., 2017) CRISPR/mice/KO/HDR-KI (Qin et al., 2015) Mice/CRISPR/KO (Hashimoto and Takemoto, 2015; Hashimoto et al., 2016) Rat/ZFN/TALEN/Crispr/KO (Kaneko et al., 2014; Kaneko and Nakagawa, 2020) Rat/mice/Crispr/KO/KI (Kaneko and Nakagawa, 2020)
	Protein (RNP)	Mouse and rat zygote	Uncontrolled	- Easier delivery than RNP-MI	- High amount of cargo - Uncontrolled delivery amount	Cas9-RNP/mice/indels/large KO/HDR-KI/ssODN-KI (Wang et al., 2016) Cas9-RNP/mice/KO (Hashimoto et al., 2016)

(Continued)

TABLE 5 | Continued

Delivery methods	Cargo	Species /cell target	Location	Advantages	Limitations	References
<b>GONAD</b>	DNA - ssODN - lsDNA (<1 kb/ Cas9 mRNA/sgRNA RNP	Mouse and rat	Oviduct	- Ex vivo embryo handling steps not required - Fewer animals used (e.g., recycling females possible)	- Not yet applicable to deliver long donor DNA (db or long ss DNA)	Cas9mRNA + sgRNA/mice/KO (Takahashi et al., 2015) RNP/lsDNA/mice/KO/ssODN and lsDNA-based KI (Ohtsuka et al., 2018) Rat/ssODN based KI (Kobayashi et al., 2018; Takabayashi et al., 2018)
<b>Viral delivery methods</b>						
<b>AAV vectors (Non-enveloped, lsDNA)</b>	DNA encoding Cas9/sgRNA (separate AAV or all-in-one AAV) – KI DNA cassette	Mouse and rat zygote (transduction)	Uncontrolled	- minimal immunogenicity - low toxicity - wide-range serotypes - No incorporation into the host genome	Low capacity (<5 Kb)	KO/Mice/separate AAV (Yoon et al., 2018) KO/KI/Mice/Rat/RNP Electroporation/AAV/transduction (Mizuno et al., 2018; Chen et al., 2019) (Edraki et al., 2019) (Yu et al., 2015)
	DNA (expression cassette)	Mouse zygote microinjection	Cytoplasmic injection			

*Mi, microinjection; Cyt-Mi, cytoplasmic microinjection; PN-Mi, pronuclear microinjection; DNA-Mi, DNA microinjection; KI, Knockin; ssODN, single-stranded oligonucleotides; lsDNA, long single-stranded DNA; dsDNA, linear double-stranded DNA; HDR-KI, homology directed repair knockin; RNP, ribonucleoprotein complex.*

emerging and requires further studies. There is a need for better understanding of genome editing hurdles to allow edits at any locus with high efficiency.

## DNA Donor

DNA donors have been used in different formats to generate KI models: plasmids, single-stranded oligonucleotides (ssODNs), long single-stranded (ls)DNA, and linear double-stranded (ds)DNA (Figure 2B and Table 4). These formats and their design are important to direct repair toward KI. Because efficient KI generation is the most important issue currently, here we review the main aspects and advances regarding the DNA repair template and pathways.

Historically, transgenesis (Gordon and Ruddle, 1982; Palmiter et al., 1982; Mullins et al., 1990; Charreau et al., 1996b) and targeted mutagenesis using nucleases have been achieved using circular plasmids or an excised dsDNA, to introduce a complete expression cassette in rat and mouse genome (Cui et al., 2011; Brown et al., 2013). DNA synthesis advances in recent decades (Hao et al., 2020) have supported progress in genome editing (Table 4), allowing efficient synthesis of dsDNA, ssODNs and lsDNA, with increasing size and purity from commercial vendors. Nevertheless, yield issues persist with synthesis of long DNA fragments. Today, short sequence insertion and precise mutations are mostly generated using ssODNs. Its current synthesis limit is 200 nucleotides or fewer for most providers. A few years ago, lsDNA emerged as a new and efficient way to generate complex KI mouse (Miura et al., 2015; Miyasaka et al., 2018) and rat (Yoshimi et al., 2016; Miyasaka et al., 2018) models. Different production strategies have been developed, including *in vitro* transcription and reverse transcription (Miura et al., 2015), plasmid excision by nicking endonucleases (Yoshimi et al., 2016) and synthesis. High yield and purity are difficult to achieve for lsDNA production, leading to unexpected mutations in addition to the desired KI genotypes (Codner et al., 2018). Synthesis is quite expensive and limited to some kilobases depending on vendors (Figure 2B and Table 4). Chemically modified ssODNs, in cells and rodents, generally lead to higher editing efficiency (Renaud et al., 2016; Liang X. et al., 2017). A study on human cells showed increased KI efficacy using 5'-end-modified dsDNA (Yu et al., 2020). The proof of concept of this protection has clearly been demonstrated and will probably be tested for all DNA donor formats.

Several approaches have been developed to optimize DNA donor design, but no clear consensus has emerged regarding impact on KI efficiency. In human cells, some donors have shown better KI efficiency with ssODN complementary to the non-target strand (Richardson et al., 2016), but others have shown similar efficacy for both designs (Liang X. et al., 2017). In the same way, studies on human cells suggest better efficiency with asymmetric ssODNs (Richardson et al., 2016), whereas others report similar KI efficiency with both asymmetric and symmetric donors in mouse embryos (Lanza et al., 2018). Furthermore, in human cells (Liang X. et al., 2017) and mouse embryos (Hirotsume et al., 2020), dsDNA with 3' overhangs displays better KI efficiency (Figure 2B and Table 4). This improvement could be explained by necessary genomic DNA end resection for KI generation

during repair pathways, as discussed later. The only consensus regarding DNA donor design is that the inserted sequence should be as close as possible to the Cas9 cut site (**Table 4**) to yield efficient KI (Inui et al., 2014; Liang X. et al., 2017). To avoid multiple cleavages on the KI inserted sequences, silent mutations are introduced in the DNA donor close to the PAM.

Major hurdles remain for large (long donor) or complex KI (several ssODNs with complex sequence). One clear way to increase KI efficiency is to use the RNP complex to carry the DNA donor to the DSB (**Figure 3A** and **Table 4**). In this way, all KI components will be present at the same time and concentrate at the cut site. The stable and high affinity between biotin and streptavidin (Le et al., 2019) and the easy production of biotinylated DNA donor have inspired several approaches. Cas fused with avidin and a biotinylated DNA donor has been tested to generate modified mice (Ma et al., 2017; Gu et al., 2018; Wang Z. et al., 2020). The sgRNA has also been engineered to insert a specific SIM aptamer of streptavidin and improve KI generation in human cells (Carlson-Stevermer et al., 2017). To ensure tight linkage, guide RNA and the ssODN donor have also been chemically linked to crRNA (Lee et al., 2017). Covalent attachment of the DNA donor to a Cas9 fused to porcine circovirus 2 Rep protein has been also described (Aird et al., 2018). Recently, Cas9-ssODN conjugates generated chemically or via an adaptor complementary to part of the ssODN, have been used to enhance HDR-mediated genome editing in mouse zygotes (Ling et al., 2020). Another team has used the RNP complex itself in human cells, without modifying it, but by inserting 16-nucleotide truncated Cas9 target sequences (tCTSs) in the linear dsDNA donor (Nguyen et al., 2020). This tCTSs allows RNP recognition without cleavage or use of a dCas9.

## Repair Pathways

NHEJ is the most used pathway for DSB repair which produces indels alleles by ligase IV direct ends ligation through well-described mechanisms (Frit et al., 2019). When a DNA repair template is available at the DSB, other pathways may be induced, based on homology recognition. In contrast to NHEJ, other repair pathways, i.e., HR, microhomology-mediated end joining (MMEJ), and single-strand annealing (SSA), depend on a DNA template and are predominant in S/G2 phases. To favor KI, different strategies with small molecules have been used to arrest cells at different phase of the cycle (Yeh et al., 2019; Bischoff et al., 2020) but these strategies are difficult to apply to embryos. To favor HDR pathways predominant in S/G2, Cas9 can be degraded by the proteasome in G1 phase (**Figure 3B** and **Table 4**) by fusion to geminin degnon (Gutschner et al., 2016; Charpentier et al., 2018; Lomova et al., 2019). Mouse two-cell embryos have a long G2 phase (Palmer and Kaldis, 2016) and open chromatin state that is favorable for KI model generation. Gu et al. (2018) have taken advantage of these features to develop the two-cell homologous recombination (2C-HR)-CRISPR in mouse, to increase large KI efficiency with WT Cas9 or Cas9 fused to monomeric streptavidin coupled with a biotinylated donor. This approach has been reproduced in mouse using Mb3Cas12a (Wang Z. et al., 2020).

All of these repair mechanisms except NHEJ have a key first step in common: DSB end resection (for a review, see Ranjha et al., 2018). The MRE11-RAD50-NBS1 complex must first be recruited to DSB ends, where it drives CtIP and other resection molecules (Ranjha et al., 2018). Exo1 can further resect DSB ends to produce 3' overhangs that will be coated by replication protein A (RPA). For HR, RPA will later be replaced by Rad51 to promote strand exchange, whereas for SSA, RPA-coated resected ends are recognized by Rad52 for processing by end annealing. Factors unique for MMEJ are still unclear, but it requires short resection, necessitating the inhibition by RPA end coating. The size of this resection is linked to the repair pathway that is active. Short resection will leave a short sequence for homology-driven repair, as with MMEJ (5–25 bp) and SSA (> 20 bp), whereas long resection will allow for long homology recognition, as with HR (> 500 bp), and no resection will trigger NHEJ. These features drive the design of DNA donor homology arms (Yao et al., 2017).

To favor KI, small inhibitors of NHEJ or essential molecules carried to the DSB via gRNA, via Cas9 (**Figure 3C** and **Table 4**) have been used. NHEJ inhibitors have mainly been tested on cells (for reviews, see Yeh et al., 2019; Bischoff et al., 2020) and SCR7, an inhibitor of ligase IV, has led to KI increase in mouse (Maruyama et al., 2015; Singh et al., 2015) and rat embryos (Ma et al., 2016). Cas9 in fusion with a domain of CtIP has shown increased KI efficiency in human cells and rats (Charpentier et al., 2018; Tran et al., 2019). In the same way, the use of a MS2 aptamer on the gRNA to carry CtIP showed better KI efficiency in cells than other molecules (Nakade et al., 2018; Tran et al., 2019). Small molecules treatments to increase KI efficiency have been reviewed (Yeh et al., 2019; Bischoff et al., 2020). No data was reported to date in rats or mice, and only two studies showed that RS-1 enhances KI efficiency in rabbit (Song et al., 2016) and bovine embryos (Lamas-Toranzo et al., 2020). Finally, tests on cells and mouse embryos have shown that ExoI overexpression enhances KI activity (Aida et al., 2016).

CRISPR-Cas9 has a repair profile closer to the environmental DSB's one compared to other nucleases with a high frequency of insertions of one nucleotide (Trimidal et al., 2019) and mainly repairs using out-of-frame indels (> 70%) and microhomologies (Guo et al., 2018; Taheri-Ghahfarokhi et al., 2018).

One study on mouse embryos showed that multiple overlapping (at least > 5 bases) sgrRNAs with ssODNs increase KI efficiency, probably by inducing shorter deletions (Jang et al., 2018) (**Table 4**). Several studies have designed plasmid donors with inserts flanked by gRNA recognition sites to excise it within a cell or zygote (**Figure 2B** and **Table 4**). This strategy may coordinate DSB and DNA donor availability at the cut site but can also create the same ends on both the DNA donor and the genomic DNA. It has led to increased KI in cells with various lengths of the homologous arms (Zhang et al., 2017), in mouse and monkeys embryos with HMEJ arms of 800 bp (Yao et al., 2017) or in cells and mouse embryos MMEJ homology arms of 40 bp (Aida et al., 2016). The results of these studies suggest that repair outcomes can be influenced or used to favor KI. Further experiments should be done in the rat to confirm these results.

## Delivery Strategy Overview and System Optimization

Gene-editing efficiency by targeted-mutagenesis approaches, unquestionably depends on the delivery system used. In the following section, we describe the commonly used methods and recently developed strategies, which are summarized in **Table 5**. Latest methods are reported in **Figure 1**.

### Microinjection

Since its development in mice in the early 1980s (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982), microinjection has become the most commonly used method to introduce different cargos into mouse and rat zygotes. Pronuclear injection, is a well-established method and allows the delivery of purified nucleic acid in any form (plasmid or dsDNA, LsDNA or ssODN, mRNA, gRNA, RNP) and any size (for review, see Giraldo and Montoliu, 2001). Nevertheless, the efficiency of the method is variable, depending in particular on the quality and size of DNA sources, and also the skill of the manipulator (Charreau et al., 1996b; Hirabayashi et al., 2001). In some cases, the pronucleus is hard to visualize and the flexibility of the oolemma and nuclear membranes, as in the rat, make delivery of DNA constructs more complex and invasive (Brinster et al., 1985; Charreau et al., 1996b). Cytoplasmic injection (CI) is an alternative to overcome these technical problems and has been described to deliver linearized DNA (Brinster et al., 1985), mRNA-encoding nucleases or sgRNA (Geurts et al., 2009; Tesson et al., 2011; Remy et al., 2014; Wang et al., 2014; Ménoret et al., 2015; Doe et al., 2018), allowing for a transient expression of nucleases and thus reducing off-target events. TALEN and CRISPR-Cas in the form of proteins can also be directly injected into the zygote pronucleus, cytoplasm, or both sequentially to achieve gene modifications (KO and/or KI). For proteins, efficiencies are higher for CRISPR and lower for TALEN than those observed with delivery in their DNA or mRNA forms (**Table 5**; Ménoret et al., 2015; Wang et al., 2015; Jung C. J. et al., 2017).

### Electroporation

Delivery of ZFN, TALEN, or CRISPR-Cas9 nucleic acids or protein components using zygote electroporation enables generation of mice (Hashimoto and Takemoto, 2015; Qin et al., 2015; Hashimoto et al., 2016; Wang et al., 2016) or rats (Kaneko et al., 2014; Kaneko and Mashimo, 2015; Remy et al., 2017) carrying various genetic modifications (**Table 5**). These modifications include NHEJ-mediated indels (Kaneko et al., 2014; Hashimoto and Takemoto, 2015; Kaneko and Mashimo, 2015; Qin et al., 2015; Hashimoto et al., 2016; Wang et al., 2016; Remy et al., 2017), large segment deletions (Hashimoto et al., 2016; Wang et al., 2016), conditional KO (Miyasaka et al., 2018), double-KO (Teixeira et al., 2018), HDR-mediated precise nucleotide substitutions (Kaneko and Mashimo, 2015; Qin et al., 2015; Wang et al., 2016) or short sequence insertions using ssODNs (typically < 200 bp) (Hashimoto and Takemoto, 2015; Chen et al., 2016; Wang et al., 2016; Remy et al., 2017) and LsDNA (from 600 bp to 1.5 kb) (Miyasaka et al., 2018). In some studies, electroporation was done in mouse zygotes that were denuded of the zona pellucida (ZP) by a Tyrod's acid treatment (Qin et al.,

2015; Chen et al., 2016; Wang et al., 2016), without affecting the early development unlike data reported in rats (Okuyama and Funahashi, 2012). Electroporation also can be applied to mouse and rat frozen zygotes for efficient introduction of CRISPR RNP complexes, without affecting embryo viability or development (Nakagawa et al., 2018; Kaneko and Nakagawa, 2020).

Electroporation is thus an excellent alternative to microinjection for genome editing in mice and rats, with similar or sometimes higher success rates. It also allows the simultaneous processing of many zygotes in a short time (e.g., a batch of 50 zygotes in few seconds) without requiring expensive equipment and operators with extensive training and expertise. Nevertheless, a major limitation is the low efficiency or even absence of efficacy of this method for introducing a large DNA fragment (> 500 bp) using dsDNA; even if entry into the zygote cytoplasm is achieved, the migration into the nucleus is blocked (Remy et al., 2017). LsDNA (up to 1.5 kb) has been described as an alternative (Miyasaka et al., 2018) but with lower KI yields than those observed using short ssODNs. These results have not always been reproducible, probably because of an inefficient migration into the zygote pronucleus (Remy et al., 2017).

### Genome Editing via Oviductal Nucleic Acid Delivery (GONAD)

GONAD has the advantages of electroporation without requiring sacrifice of embryo donor animals or *ex vivo* embryo manipulation. In this technique, the RNP complex is directly injected into the oviduct of a pregnant mouse or rat, followed by *in situ* electroporation. It was first described to generate NHEJ using Cas9 mRNA (Takahashi et al., 2015; Gurumurthy et al., 2016, 2019b) and then the improved GONAD (iGONAD) was reported by Ohtsuka et al. (2018) in mice to efficiently generate indels mutations, large deletions, and ssODN and LsDNA-based KI (up to 1 kb), by replacing Cas9 mRNA by Cas9 RNP. Other groups have demonstrated the efficiency of iGONAD in rats for gene disruption and ssODN-based KI (Kobayashi et al., 2018; Takabayashi et al., 2018) and in mice by substituting Cas9 with AsCpf1 (Ohtsuka et al., 2018) (for review see Sato et al., 2020).

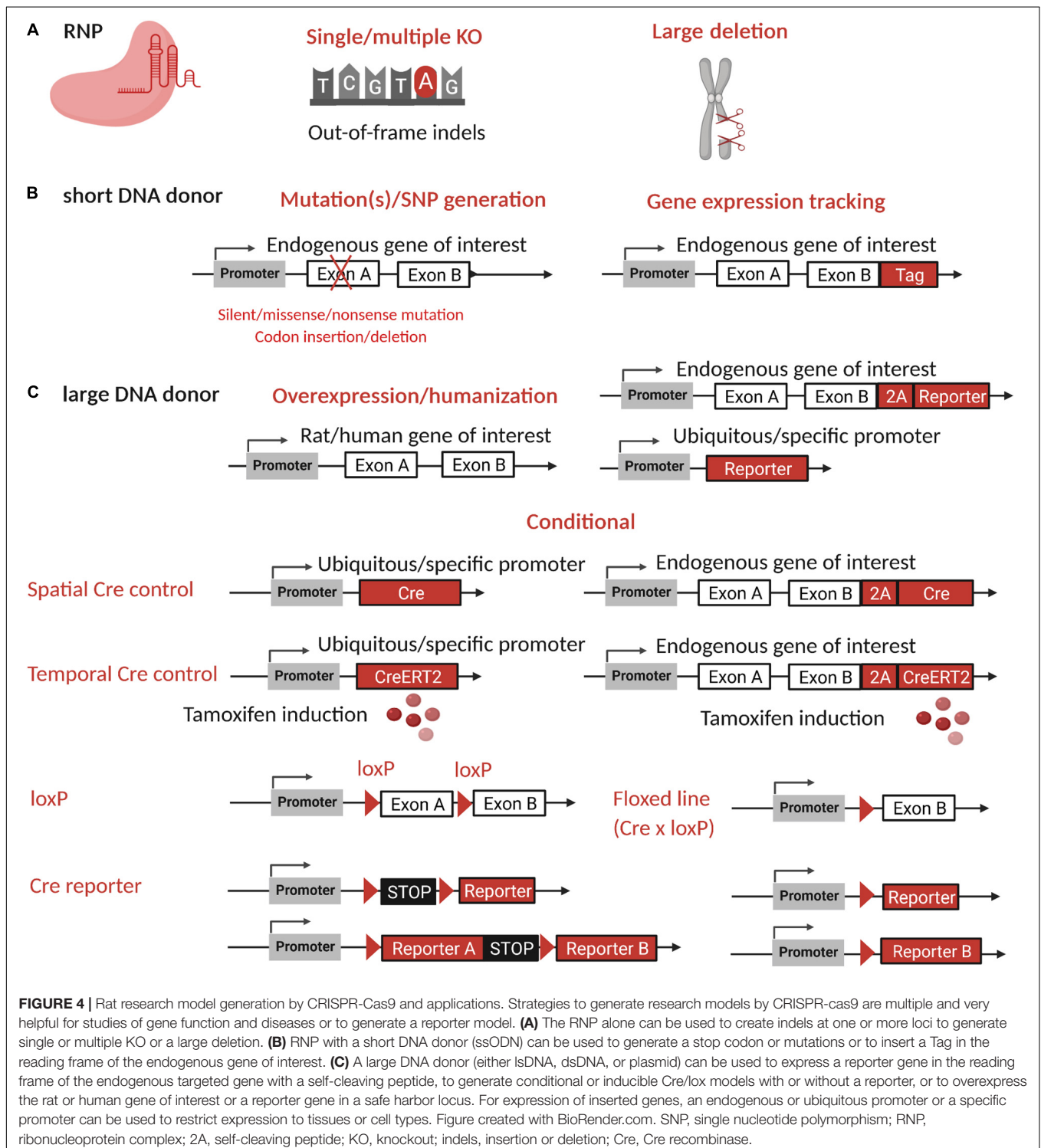
### Viral Vectors

Since efficacy of KI using long DNA donors is still low, AAV vectors have been used to deliver DNA cargo. Although AAV has a reduced packaging capacity (~5.2 Kb), that limits their use in delivering large functional components of TALEN and SpCas9, some studies have reported AAV-mediated delivery (mainly with the serotype 6) (Ellis et al., 2013) to generate mutations in mouse and rat zygotes, by using either a dual-AAV system carrying SpCas9 and sgRNA in separate vectors (Yoon et al., 2018) or sgRNA and a shorter Cas9 ortholog in an "all-in-one" vector (Edraki et al., 2019). Two groups have also managed to generate KI mice (Mizuno et al., 2018; Chen et al., 2019) and rats (Mizuno et al., 2018) by combining zygote electroporation to deliver the RNP complex and AAV transduction to introduce a large donor dsDNA (up to 4.9 kb) with efficiency ranging from 6 to 100% depending on the viral

concentration (Mizuno et al., 2018). The method has not been rigorously compared with other methods and requires generation of high-purity AAV vectors.

Sleeping Beauty and PiggyBac transposons systems have been optimized to deliver CRISPR-Cas system into cells to increase

gene editing efficiency and allow multi-allele targeting (Weber et al., 2015; Xu et al., 2017; Hu et al., 2018; Ye et al., 2019). Note, however, that CRISPR-Cas integration by transposon into the genome and its long-term expression in the cells could lead to off-target effects.



## Rat Research Models and Applications

Today, it is possible to generate a broad range of genetically modified models, from simple KOs with precise mutations or gene overexpression, to conditional or reporter models. Below, we describe the main strategies to develop these models, which also are illustrated in **Figure 4**. Main resources available to find and develop rat models are available in **Table 1**. **Table 6** describes models already developed to study genes of the immune system. Genome editing application in genetic disease studies is also explained and illustrated by the existing models listed in **Table 7**. Advantages of the rat as a model for those two applications are highlighted in this section.

## Strategies to Develop Genetically Modified Models

### Single, Multiple or Large Modifications

A KO model can be efficiently generated through out-of-frame indels (**Figure 4A**) by careful design of gRNA. Some of these will lead to a reading frame shift with a premature termination codon followed by mRNA degradation and no translation of the protein. All mechanisms of premature termination codon followed by mRNA degradation are not fully understood on mammals and exceptions exist (Dyle et al., 2020). Most often, the CRISPR-Cas system is designed to target one of the first exons of the gene, but another approach is to generate a promoter-less allele that can lead to a more severe phenotype than the KO model (El-Brolosy et al., 2019). In that case, KO can be easily confirmed by detection at the mRNA level. This strategy has not been used commonly, but it could be particularly useful in the rat, for which protein detection tools are limited. Mainly, these models have been developed by nuclease DSB induction, but adenosine-base editor is also an alternative with mouse and rat (Ma Y. et al., 2018; Yang L. et al., 2018; Wang X. et al., 2020).

Multiple KO models can be generated using multiple RNP complexes (Ma et al., 2014a,b), but to avoid large deletions, they should not be located on the same chromosome (**Figure 4A**). Translocation between chromosomes is also a risk that can be reduced using ssODNs and different Cas (Bothmer et al., 2020). Outcomes analysis for multiple KO can be challenging and should be carefully considered when designing CRISPR tools.

For large genomic KOs involving several consecutive genes, two DSBs can be induced by designing gRNA on both sides of the region of interest (**Figure 4A**). If both DSBs occur at the same time, the result will be a large deletion of this region of interest. To our knowledge, the biggest deletion achieved to date in rats is 24,499 Kb (Bircling et al., 2017).

ssODNs that include a STOP codon can be used to create a nonsense mutation and inactivate a specific gene (**Figure 4B**). The rate of KI is usually lower than the frequency of indels, but because both the KI and a large fraction (>70%) of indels (Guo et al., 2018; Taheri-Ghahfarokhi et al., 2018) induce out-of-frame mutations, this increases the chance of obtaining a KO animal.

ssODNs containing a mutation observed in a human disease have been used to generate animal models (**Figure 4B**) such as for cystic fibrosis (Dreano et al., 2019; **Table 7**). The use of ssODNs will allow inclusion of specific features, such as restriction sites, to

facilitate KI genotyping. Base- and prime-editing, are particularly fitting tools for generating mutations. Base editing has already been applied in the rat (Yang L. et al., 2018) but prime editing only in the mouse for now (Liu Y. et al., 2020).

### Gene Overexpression

Overexpression of the gene of interest might be useful for gaining a better understanding of its role. The gene can be overexpressed by its insertion with its promoter or with an ubiquitous promoter (**Figure 4C**, right panel). In the past, this effect has been achieved through transgenesis, but expression of a randomly inserted cassette is affected by the genomic locus where it is inserted. Advances in genome-editing tools have made it possible to target a permissive locus, also called a “safe harbor,” to overcome this issue (Saunders, 2020). *Rosa26* and *Hprt* are the most commonly used safe harbors that have been targeted in rat embryos (Kobayashi et al., 2012; Remy et al., 2014).

Humanized animal models are of great value to better study human diseases by insertion of the human gene into the animal genome (**Figure 4C**, right panel). For some projects, cDNA of the gene of interest is enough and can be used to generate humanized models, as it was done for a humanized model of cystic fibrosis (Birket et al., 2020).

### Conditional Models

Site-specific recombinase systems (SSR) are used for conditional excision or inversion of the targeted site. Their application requires the generation of two lines, one expressing the specific SSR and one displaying the two specific DNA sites flanking the locus of interest (**Figure 4C**, lower panel). These lines are then crossed to combine both mutations in a single animal line (Bircling et al., 2009). The Cre/lox system is the most commonly used SSR system option for mouse conditional models, even though other variants and other systems (FLP-FRT, Dre-rox, Nigri-nox, and others) have been used and combined. To the best of our knowledge, Cre/lox is the only SSR system that has been used to generate conditional rat models. The use of targeted nucleases permits precise insertion of Cre behind the endogenous promoter (**Figure 4C**, lower panel), allowing reliable and relevant tissue or cell specific expression of Cre (for a review see Kim H. et al., 2018). To achieve temporal control of the gene of interest, drug-inducible systems are used (Navabpour et al., 2020). Fusion of Cre with estrogen receptor 2 (Cre-ERT2) leads to sequestration of Cre in the cytoplasm, and the addition of tamoxifen at a certain time point induces Cre-ERT2 translocation into the nucleus, allowing Cre to recombine loxP sites (**Figure 4C**, lower panel). These animal lines should be carefully bred and analyzed to limit toxicity and leakage (Song and Palmiter, 2018). Cre/CreERT2 models characterization at some point requires the use of Cre reporter models expressing a floxed STOP before a reporter gene (**Figure 4C**, lower panel). After Cre recombination, reporter expression is turned on and specific expression can be characterized. Validation of loxP models requires Cre or CreERT2 models (**Figure 4C**, lower panel). The observed phenotype will then be specific to the Cre expressing tissues and the loxP line tested.

**TABLE 6 |** Genetically engineered rat models for genes of the immune system.

<b>(A)</b>					
<b>Immunology domain</b>	<b>Gene/genetic modification</b>	<b>Genomic tool used</b>	<b>References</b>	<b>Phenotype and rats vs. mice</b>	<b>Depository or breeder company ID</b>
Immuno-deficient models	<i>Rag1/KO</i> or <i>Rag2/KO</i>	Meganuclease CRISPR	Zschemisch et al., 2012; Ménoret et al., 2013; Tsuchida et al., 2014; Chang et al., 2015; Noto et al., 2018	T-B-NK+. <i>Rag1/KO</i> or <i>Rag2/KO</i> rats and mice show similar phenotypes	<i>Rag2</i> KO; NBRP Rat #0894
	<i>Foxn1/KO</i>	CRISPR	Goto et al., 2016	T-B+NK+. <i>Foxn1/KO</i> rats and mice show similar immune and albino phenotypes	RGD #10053598 #10053601
	<i>Il2rg/KO</i>	TALENs CRISPR	Mashimo et al., 2010; Samata et al., 2015; Kuijk et al., 2016	T-B+/-NK-. <i>Il2rg/KO</i> rats and mice show similar phenotype	#0585
	<i>Rag1/KO</i> or <i>Rag2/KO</i> or <i>Prkdc/KO</i> or and <i>Il2rg/KO</i>	ZFNs TALEN CRISPR	Mashimo et al., 2012; Ménoret et al., 2018; He et al., 2019	T-B-NK-. KO rats and mice show similar phenotypes	IL2Rg-Rag2 KO; NBRP Rat #0895 RRG (TRIP)
	<i>Human SIRPa/Tg</i>	BAC microinjection	Goto et al., 2016; Jung et al., 2016; Yang X. et al., 2018; Ménoret et al., 2020	↓ phagocytosis human cells. <i>hSIRPa/Tg</i> rats and mice show similar phenotype	
	<i>Rag1/KO</i> or <i>Rag2/KO</i> or <i>Prkdc/KO</i> or + <i>Il2rg/KO</i> + <i>human SIRPa/Tg</i>	ZFNs, TALENs, CRISPR	Yang X. et al., 2018; Ménoret et al., 2020	T-B- NK-, ↓ phagocytosis human cells Similar phenotypes in KO and Tg rats and corresponding mice as well in KO NOD mice which have a spontaneous mutation in Sirpa	RRGS (TRIP)
	<i>Ighm, Iglc, Igkc /KO</i>	ZFNs	Ménoret et al., 2010; Panzer et al., 2018	T+B-NK+. <i>Ighm/KO</i> and <i>IgKc/KO</i> rats and mice show similar phenotype	IgM KO (Ligand)
	<i>Human Ig heavy and/or light chain loci/Tg</i>	BAC microinjection	Osborn et al., 2013; Ouisse et al., 2017; Xu et al., 2018	Production of human IgG binding domains for the generation of fully human mAbs <i>Human Ig heavy and/or light chain loci/Tg</i> rats and mice show similar phenotype	Ligand
	<i>C3/KO</i>	CRISPR	Xu et al., 2018	Role of complement in neuropathy during chemotherapy model not available in mice because of defects in complement activation in mice	RGD #19165133
CDs and membrane molecules	<i>HLA-B27 + hb2m/Tg</i>	DNA microinjection	Hammer et al., 1990	<i>HLA-B27 + hb2m/Tg</i> rats are a much better model of spondyloarthropathy than are <i>HLA-B27 + hb2m/Tg</i> mice	<i>HLA-B27</i> RGD #7387221
	<i>hCD55 + hCD59/Tg</i>	DNA microinjection	Charreau et al., 1996a, 1999	<i>hCD55 + hCD59/Tg</i> rat hearts were heterotopically grafted in primates Not possible for corresponding mice	/
	<i>hCD46/Tg</i>	DNA microinjection	Niewiesk et al., 1997	Model of measles infection and complement control. <i>hCD46/Tg</i> rats and mice show similar phenotypes	/
	<i>hCD4/hCCR5/Tg</i>	DNA microinjection	Kepler et al., 2002	<i>hCD4/hCCR5/Tg</i> rats are a closer model to human <i>hCD4/hCCR5/Tg</i> mice exhibited very little or no productive infection	/
	<i>hFasL/Tg</i>	DNA microinjection	Tesson et al., 1999; Bouchet et al., 2002	Expression in endothelial cells Model not available in mice	/
	<i>hCD21/Tg</i>	DNA microinjection	Yang et al., 2003	Model of EBV infection <i>hCD21/Tg</i> rats and mice show similar phenotypes	/
	<i>hCD64/Tg</i>	DNA microinjection	van Vuuren et al., 2006	Depletion of macrophages a CD64-immunotoxin and inhibition of arthritis Transgenic rats and mice have similar expression	/
	<i>hP2Y2R/Tg</i>	Lentiviral vector	Agca et al., 2009	Tissue inflammation, increase in certain leukocyte populations No hP2Y2R transgenic mouse line generated	/
	<i>Cd247</i> (CD3 ζ chain)/KO*	ZFNs	Rudemiller et al., 2014	Fewer kidney lesions in a model of hypertension similar immune phenotype in <i>Cd247/KO</i> rats and mice in T cell signaling and depletion of T cells No model of hypertension analysis in <i>Cd247/KO</i> mice	RGD #6484582 #6484564 #6484568

(Continued)

TABLE 6 | Continued

(A)					
Immunology domain	Gene/genetic modification	Genomic tool used	References	Phenotype and rats vs. mice	Depository or breeder company ID
	<i>Tlr4</i> /KO	TALENs	Ferguson et al., 2013	<i>Tlr4</i> /KO rats and mice show similar decreased pro-inflammatory cytokine secretion upon lipopolysaccharide stimulation	RRRC #694
	<i>Cd40</i> /KO*	CRISPR	Haller et al., 2017	<i>Cd40</i> /KO rats have fewer kidney lesions in a model of hypertension than mice No model of hypertension analysis in <i>Cd40</i> /KO mice	RRRC #840
	<i>Adora2b</i> /KO*	ZFNs	Nayak et al., 2015	<i>Adora2b</i> /KO rats but not mice showed decreased pro-inflammatory cytokine secretion and less cardiac and renal injury/fibrosis in response to hypertension	RGD #6484715
	<i>Clec1</i> /KO	ZFNs	Lopez Robles et al., 2017	<i>Clec1</i> /KO rats but not mice showed increased inflammatory responses by DCs	(TRIP)
	<i>Cd59</i> /KO	CRISPR	Yao and Verkman, 2017b	<i>Cd59</i> /KO rats and not mice (showed mild hemolytic anemia and a faithful model of neuromyelitis optica	RGD #13792606
	<i>Kv1.3</i> /KO	ZFNs	Chiang et al., 2017	<i>Kv1.3</i> KO rats are a better and closer model to human. Mouse T cells, unlike rat or human T cells, co-express additional redundant <i>Kv1</i> channels	/
Cytokines/ secreted products and their receptors	<i>Avp</i> /Tg	DNA microinjection	Jessop et al., 1995	A model for the study of thymic arginine vasopressin in T cell differentiation	/
	<i>Ifng</i> /Tg	DNA microinjection	Egwuagu et al., 1999a,b	No analysis of AVP expression in thymus of transgenic mice IFN $\gamma$ expression in the eye in a model of uveitis Conflicting results: IFN-g exacerbates uveitis in the rat and confers protection in the mouse	/
	<i>TGFb1</i> /KO*	ZFNs	Chen et al., 2013	Rats and mice <i>TGFb1</i> /KO with a T cell-specific deletion of the <i>Tgfb1</i> gene developed lethal immunopathology in multiple organs	RGD #5131989
	<i>Il22bp</i> /KO	CRISPR	Martin et al., 2016	<i>IL22BP</i> protective in models of colitis and psoriasis	(TRIP)
	<i>Ifnar1</i> /KO	CRISPR	Qaisar et al., 2017	Absence of IFN-I responses <i>Ifnar1</i> /KO rats and mice not analyzed in the same way	RGD #12910493 #12910494
	<i>Il15</i> /KO	ZFNs	Renaud et al., 2017	A genetic model of NK-cell deficiency in rats <i>Il15</i> /KO rats and mice show similar phenotypes	RRRC #769
	<i>Tbet</i> /KO	ZFNs	Ma Z. G. et al., 2018	T-bet can direct Th1 lineage commitment <i>Tbet</i> /KO rats and mice show similar phenotypes	/
	<i>Csf1r</i> /KO	ES cells	Pridans et al., 2018	Absence of most macrophages in most tissues. Macrophages effects in development of multiple organ systems in rats were distinct from those reported in mice	/
Intracellular molecules	<i>Csf1r-GFP</i> /KI	DNA microinjection	Irvine et al., 2020	<i>Csf1r-GFP</i> /KI rats and mice show similar phenotypes	/
	<i>HMOX1</i> /Tg	DNA microinjection	Braudeau et al., 2003	<i>HMOX1</i> /Tg only described in rats	/
	<i>Hmx1</i> /KO	ZFNs	Atsaves et al., 2017	<i>Hmx1</i> /KO rats and mice show similar phenotype with generalized inflammation and kidney lesions and lethality	/
	<i>Ian5</i> /Tg	PAC microinjection	Michalkiewicz et al., 2004	A model that shows the essential role of IAN5 for lymphoid development. IAN5 rescues lymphopenia in BB rats with a mutation in the <i>Ian5</i> gene	/
	<i>Notch1</i> /Tg	DNA microinjection	van den Brandt et al., 2005	Blockade of thymic development and T cell lymphopenia <i>Notch1</i> /Tg rats and mice show similar phenotypes	/
	Selenoprotein M/Tg	DNA microinjection	Hwang et al., 2008	Maintenance of a high level of antioxidant status Selenoprotein M/Tg rats and mice show similar phenotypes in brain	/
	<i>Bcl2</i> /Tg	DNA microinjection	Iscache et al., 2011	Increased B cells and immunoglobulins <i>Bcl2</i> /Tg rats and mice show similar phenotypes	/
	<i>Cyp2j4</i> /KO	ZFNs	Behmoaras et al., 2015	<i>Cyp2j4</i> determines a profibrotic macrophage transcriptome Implications in various inflammatory conditions Similar results in <i>Cyp2j4</i> /KO rats and mice	RGD #12904679

(Continued)

TABLE 6 | Continued

(A)					
Immunology domain	Gene/genetic modification	Genomic tool used	References	Phenotype and rats vs. mice	Depository or breeder company ID
	<i>Ahr</i> /KO	ZFNs TALENs CRISPR	Harrill et al., 2013; Phadnis-Moghe et al., 2016	A variety of T and B cell alterations. <i>Ahr</i> /KO rats are more analyzed than <i>Ahr</i> /KO mice Rats showed other organ alterations	RGD #12903250 (Horizon Discovery); RGD #12903272 (Horizon discovery) RGD #13838845 (not available) RRRC#831 (CRISPR) RGD #15090819 #15090817 (TALEN, not available) (TRIP)
	<i>Aire</i> /KO	ZFNs	Ossart et al., 2018	Autoimmunity in several organs <i>Aire</i> /KO rats not observed in <i>Aire</i> /KO mice	/
	<i>Prox1 promoter-EGFP/Tg</i>	BAC microinjection	Jung E. et al., 2017	Visualization of all lymphatic vessels <i>Prox1 promoter-EGFP/Tg</i> rats and mice show similar phenotypes	/
	<i>Eogt</i> /KO	TALENs	Hao et al., 2018	O-GlcNAc glycosylation deficiency with defect in Notch signaling in autoimmune hepatitis <i>Eogt</i> /KO rats and mice show similar phenotypes	/
	<i>Paraoxonase 1</i> /KO	CRISPR	Bai et al., 2018	Thymocyte blockade at the CD4/CD8 double-negative to double-positive transition stage No mouse model reported	RGD #12790692 #12790698 #12790695
	<i>S100A8 transgenic rats/Tg</i>	DNA microinjection	Okada et al., 2018	Altered macrophage function in a colitis model <i>S100A8/Tg</i> rats and mice show similar phenotypes	/
(B)					
<b>Gene/KO</b>					
Miscellaneous			<i>Snx25</i> /KO, <i>Axl</i> /KO*, <i>Cd14</i> /KO*, <i>Cd55</i> /KO, <i>Cd226</i> /KO, <i>Cyba</i> /KO*, <i>Cybb</i> /KO*, <i>Fyn</i> /KO*, <i>Gpr183</i> /KO*, <i>Ifnar1</i> /KO		Unpublished, available at MCW RGD

\*Performed in the Dahl/S strain. WCM RGD, Wisconsin Medical College Rat Genomic Database. EBV; Epstein Barr virus.

Other systems have been used in mouse and rat for spatiotemporal control. Tetracycline (Tet) on or off systems, like SSR systems, require two lines, one carrying a Tet (or doxycycline, its derivative)-sensitive transcriptional activator and one on the targeted locus carrying the Tet-responsive promoter element (Kim H. et al., 2018). The use of Tet systems for the development of transgenic mice has been reviewed previously (Sun et al., 2007) and applied to the generation of inducible rat models (Tesson et al., 1999; Table 6). For cell specific depletion, the diphtheria toxin receptor can be expressed under a cell specific promoter such as CX3CR1 for microglia depletion in rat (Vichaya et al., 2020).

Rat research is long way behind mouse studies for development of conditional models because of the decades-long use of mouse ES cells (Ramírez-Solis et al., 1995). Use of ES cells remains time consuming in mouse and technically challenging in rat. Efforts have currently been deployed to generate conditional models using CRISPR-Cas9 with all the difficulties previously discussed for large and complex insertion. Overcoming these hurdles is a major issue for both mouse and rat but it is required

for the rat. A multicenter study in mice showed that loxP KI using two ssODNs and RNP complexes is less efficient than using a single long DNA donor (Gurumurthy et al., 2019a). Sequential insertion of each loxP ssODN by microinjection and electroporation of one and two-cell embryos has also been tested but is technically demanding (Horii et al., 2017).

### Reporter and Tagged Rat Models

Transgenic ubiquitous reporter models have been generated with different fluorophores and promoters. The most developed and used models are animals that express fluorogenic proteins in different tissues, such as CAG-GFP rats (Remy et al., 2014; Ménoret et al., 2015). Today, with CRISPR-Cas systems, a reporter gene or a tag can directly be inserted at the end of the reading frame by replacing the stop codon of the endogenous locus of interest (Figures 4B,C, upper left panel). A fusion protein or two separated molecules expressed at the same level can be generated using self-cleaving peptides. Our team has generated a KI IL22bp-T2A-eGFP rat model to identify cells expressing this gene (submitted). For advanced reporter models, conditional

**TABLE 7** | Genetically modified rat models of human genetic diseases.

System/organ affected	Human genetic disease	Gene/genetic modification	Genomic tool used	References	Rats vs. mice	Depository or breeder company ID
<b>Cardiovascular</b>	pulmonary arterial hypertension	<i>BMPR2/KO</i>	ZFN	Ranchoux et al., 2015; Hautefort et al., 2019; Manaud et al., 2020	<i>Bmpr2</i> KO rats showed pulmonary vascular cell phenotypes closer to human patients than in <i>Bmpr2</i> KO mice	RGD#38501086 (not available) RGD #14975305 #14981588
	Primary pulmonary hypertension 4 (PPH4)	<i>Kcnk3/KO</i>	CRISPR-Cas9	Lambert et al., 2019	Rats have a <i>Kcnk3</i> gene as humans do but mice do not	/
	Atrial fibrillation, familial, 18 (ATFB18)	<i>Myh4/KO</i>	CRISPR-Cas9	Peng et al., 2017	This model reproduces the human disease No <i>Myh4/KO</i> mouse model is reported	/
	Familial hypertrophic cardiomyopathy and myocardial genetic diseases	<i>Myh7b/KO</i>	CRISPR-Cas9	Chen et al., 2020	This model reproduces the human disease No <i>Myh7b/KO</i> mouse model is reported	/
	Danon disease	<i>Lamp2/KO</i>	TALEN	Wang et al., 2017; Ma S. et al., 2018	<i>Lamp2</i> -KO rats could be a more valuable animal model for DD than <i>Lamp2</i> /KO mice	RGD #13703119
<b>Nervous system</b>	Epileptic encephalopathy, early infantile, 63 (EIEE63)	<i>Cplx1/KO</i>	CRISPR-Cas9	Xu et al., 2020	<i>Cplx1</i> /KO rats and mice show different phenotypes Rat model reproduces the disease better	/
	Dystonia 25 (DYT25)	<i>Gnal/KO</i>	CRISPR-Cas9	Yu-Taeger et al., 2020	<i>Gnal</i> /KO rats show early symptoms as in patients not seen in <i>Gnal</i> /KO mice	/
	Cockayne syndrome	<i>Ercc6/KO (Kl R571X)</i>	CRISPR-Cas9	Xu et al., 2019	The brain is more affected in CSB-deficient rats vs. mice	/
	Neonatal hydrocephalus	<i>L1cam/KO</i>	CRISPR-Cas9	Emmert et al., 2019b	<i>L1cam</i> /KO rats and mice show similar phenotypes similar to those of patients	RRRC #850 + 851
		<i>Ccdc39/Kl point mutation c.916+2T</i>	CRISPR-Cas9	Emmert et al., 2019a	<i>Ccdc39</i> KO rats and mice show similar phenotypes Rats are more suitable for imaging and surgical experiments	/
	Schizophrenia	<i>Drd2/Kl reporter</i>	CRISPR-Cas9	Yu et al., 2016	Inter-species difference of DRD2 expression between rats and mice	/
	Amyotrophic lateral sclerosis	<i>Fus/Kl point mutation R521C</i>	CRISPR-Cas9	Zhang T. et al., 2018	<i>Fus</i> /KI rats and mice show an altered phenotype with subtle differences	/
	Neurofibromatosis type 1	<i>Nf1/KO</i>	CRISPR-Cas9	Moutal et al., 2017; Dischinger et al., 2018	<i>Nf1</i> /KO rats have a more pronounced phenotype than <i>Nf1</i> /KO mice	/
	Cystic leukoencephalopathy	<i>RNaseT2/KO BigDel</i>	CRISPR-Cas9	Sinkevicius et al., 2018	No <i>RNaseT2</i> /KO mice reported	RGD #13781890, not available
	Epileptic encephalopathy, early infantile, 24 (EIEE24)	<i>Hcn1/KO</i>	TALEN	Nishitani et al., 2019	<i>Hcn1</i> /KO rats but not <i>Hcn1</i> /KO mice exhibited epilepsy	NBRP Rat #0821 #0820 #0819 #0822
	MECP2-related severe neonatal encephalopathy, Rett-like syndrome (RTT)	<i>Mecp2/KO</i>	ZFN	Engineer et al., 2015	<i>Mecp2</i> /KO rats displayed more symptoms of RTT than KO mice	RGD #11567272; Horizon Discovery
	Fragile X syndrome/Asperger syndrome, X-linked, 1 (ASPGX1)	<i>Fmr1/Nlgn3/DKOZFN</i>		Hamilton et al., 2014	Similar phenotype for <i>Fmr1/Nlgn3/DKO</i> rats and mice. Rats more suitable than mice for analysis of complex behavioral and social activities	RGD #11568700; Horizon Discovery; Nlgn3) RGD #11568040; Horizon Discovery; <i>Fmr1</i> KO; RGD #11553873
	Phelan-McDermid syndrome	<i>Shank3/KO Shank3/KO BigDel</i>	ZFN CRISPR-Cas9	Harony-Nicolas et al., 2017 Song et al., 2019	<i>Shank3</i> -KO rats showed normal social interaction and self-grooming behaviors whereas <i>Shank3</i> -KO mice do not	/
Angelman syndrome	<i>Ube3A/KO BigDel</i>	CRISPR-Cas9	Dodge et al., 2020	As in patients, <i>Ube3A</i> /KO rats bear a large deletion of the gene whereas <i>Ube3A</i> /KO mice not	/	

(Continued)

TABLE 7 | Continued

System/organ affected	Human genetic disease	Gene/genetic modification	Genomic tool used	References	Rats vs. mice	Depository or breeder company ID
	Intellectual deficiency from genetic origin	<i>Cplx1/KO</i>	CRISPR-Cas9	Xu et al., 2020	<i>Cplx1/KO</i> rats showed ataxia, dystonia, exploratory deficits, anxiety and sensory deficits but normal cognitive function	/
	Essential tremor	<i>Aspa and Hcn1/KO</i>	TALEN	Nishitani et al., 2020	<i>Aspa and Hcn1/KO</i> rats developed tremor	NBRP Rat #0806 #0805 ( <i>Aspa KO</i> ); Cf <b>Table 6</b> pour <i>Hcn1 KO</i>
	Ataxia-telangiectasia	<i>Atm/KO</i>	ZFN	Quek et al., 2017	<i>Atm/KO</i> rats show cerebellar atrophy and neurodegeneration which are poorly recapitulated in <i>Atm/KO</i> mice	NBRP #0627 #0649
	Autism spectrum disorder	<i>Cntnap2/KO</i>	ZFN CRISPR	Scott et al., 2018	<i>Cntnap2/KO</i> rats better recapitulate certain behavioral symptoms than <i>do Cntnap2/KO</i> mice	RGD #11568646; Horizon Discovery; RGD #25330087 (CRISPR); /
		<i>Shank2/KO</i>	ZFN	Modi et al., 2018	<i>Shank2/KO</i> rats show behavior and electroencephalography abnormalities not seen in <i>Shank2/KO</i> mice	/
	Canavan disease	<i>Aspa/KO</i>	TALEN	Nishitani et al., 2016	<i>Aspa/KO</i> rats and mice show similar phenotypes similar to those of patients	NBRP Rat #0806 #0805
	Familial focal epilepsy	<i>Depdc5/KO</i>	TALEN	Marsan et al., 2016	Homozygous <i>Depdc5/KO</i> rats and mice have similar phenotypes but heterozygous <i>Depdc5/KO</i> rats and not mice had altered neuron excitability and firing patterns	NBRP Rat #0739
	Parkinson's disease	<i>Lrrk2/KO</i>	ZFN	Ness et al., 2013	<i>Lrrk2/KO</i> rats and mice show similar phenotypes similar to those of patients	RGD #7241053; <i>Lrrk1/Lrrk2 KO</i> Horizon Discovery RGD #7241047; <i>Lrrk1/Lrrk2 KO</i> Horizon Discovery RGD #7241050; <i>Lrrk2/KO</i> ; Horizon discovery RGD #7241056; <i>Lrrk2/KO</i> ; Horizon Discovery
	Alpha-synuclein autosomal dominants forms of Parkinson's disease	<i>SNCA-A53T-A30P/Tg</i>	DNA microinjection	Lelan et al., 2011	<i>SNCA-A53T</i> transgenic rats and mice have similar phenotypes	/
	Familial Parkinson's disease	<i>DJ-1 and Pink1/KO</i>	ZFNs	Sun et al., 2013	<i>DJ-1 and Pink1/KO</i> rats and mice show similar phenotypes similar to those of patients	<i>DJ-1</i> RGD #7241054 + RGD #7241049 <i>Pink1/KO</i> ; Horizon discovery
	congenital generalized lipodystrophy	<i>Bscl2/KO</i>	ENU	Ebihara et al., 2015	<i>Bscl2/KO</i> rats have brain reduction and azoospermia as in patients, <i>Bscl2/KO</i> mice do not reproduce these pathologies	NBRP Rat #0763
	Autosomal-dominant lateral temporal lobe epilepsy	<i>LG11/KO</i>	ENU	Baulac et al., 2012	Rats reproduce the human disease and are complementary to the <i>KO</i> mice	NBRP Rat #0656
<b>Gastrointestinal</b>	Hereditary tyrosinemia type I	<i>Fah/KO</i>	CRISPR	Zhang et al., 2016	<i>Fah/KO</i> rats developed liver fibrosis and cirrhosis, not observed in <i>Fah/KO</i> mutant mice	RGD #10002791 (TALEN; PhysGenKO) RGD #14398825 (CRISPR) RGD #14398828 (CRISPR)

(Continued)

TABLE 7 | Continued

System/organ affected	Human genetic disease	Gene/genetic modification	Genomic tool used	References	Rats vs. mice	Depository or breeder company ID
	Hirschsprung disease	<i>Ednrb/KO</i>	CRISPR-Cas9	Wang et al., 2019a	<i>Ednrb/KO</i> rats in a particular strain caused embryonic lethality and megacolon as in certain strains of <i>Ednrb/KO</i> mice	/
	Rotor syndrome	<i>OATP1B2 /KO</i>	CRISPR-Cas9	Ma et al., 2020	<i>OATP1B2 /KO</i> rats reproduce the hyperbilirubinemia observed in patients	/
	Atypical hereditary non-polyposis colorectal cancer	<i>Msh6/KO</i>	ENU mutagenesis	van Bostel et al., 2008	<i>Msh6/KO</i> develop a spectrum of tumors	/
	familial colon cancer	<i>Apc/KO</i>	ENU mutagenesis	Amos-Landgraf et al., 2007	<i>Apc/KO</i> recapitulates pathology better than mouse models	RRRC#00782 + RRRC#718 (Amos-Landgraf) NBRP Rat #0443
<b>Muscle</b>	Muscular dystrophy (Duchenne and Becker forms)	<i>Dmd/KO and BigDel</i>	TALENs and CRISPR-Cas9	Larcher et al., 2014; Nakamura et al., 2014	<i>Dmd/KO</i> rats better recapitulate the pathology than <i>Dmd/KO</i> mice	NBRP Rat #0779 NBRP Rat #0780 NBRP Rat #0781 RGD #12880037; (TRIP)
	Myostatin-related muscle hypertrophy	<i>Mstn/KO</i>	ZFN	Mendias et al., 2015; Gu et al., 2016	In contrast to <i>Mstn/KO</i> mice, <i>Mstn/ KO</i> rats showed higher muscle fiber contractibility and lifelong increase in weight in male but not female	RGD #5131964 (PhysGen KO) RGD #5143985 (PhysGenKO) RGD #5131954 (PhysGen KO)
<b>Lung</b>	Cystic fibrosis	<i>Cftr/KO</i>	ZFN	Tuggle et al., 2014	<i>Cftr/KO</i> rat and mice show similar phenotypes that are mostly similar to those in patients. Rats but not mice have tracheal and bronchial submucosal glands.	RGD #14392817 (SAGE, not available) RGD #14392813; Horizon discovery RGD #14392815; Horizon discovery
		<i>Cftr/KO and DF508</i>	CRISPR-Cas9	Dreano et al., 2019	<i>Cftr/KO</i> and <i>DF508</i> rats and mice show similar phenotypes. <i>DF508</i> rats and mice show phenotypes that are milder than in their <i>Cftr/KO</i> counterparts. Rats but not mice have tracheal and bronchial submucosal glands	/
		<i>CFTR/KI and G5551D</i>	ZFN	Birket et al., 2020	CFTR/KI G5551D humanized rats display normalization of several pulmonary parameters after ivacaftor treatment	/
<b>Endocrine</b>	Glucocorticoid resistance	<i>Nr3c1/cKO</i>	CRISPR-Cas9	Scheimann et al., 2019	<i>Nr3c1/cKO</i> in CNS specific brain regions using injection of AAV-Cre vectors not possible in mice	/
	Estrogen resistance (ESTRR)	<i>Esr1/KO and Esr2/KO</i>	ZFN	Rumi et al., 2014; Khristi et al., 2019	<i>Esr1/KO</i> rats and mice show similar phenotypes similar to those of patients	RRRC#701 ( <i>Esr1 KO</i> ) RRRC#849 ( <i>Esr1 KO</i> ) RRRC#742 ( <i>Esr2 KO</i> ) RRRC#677 ( <i>Esr2 KO</i> )
	Congenital hypothyroidism	<i>Tshr/KO</i>	CRISPR-Cas9	Yang et al., 2018	<i>Tshr/KO</i> rats and certain strains of <i>Tshr KO</i> mice show similar phenotypes similar to those of patients	/
	Allan-Herndon Dudley-syndrome	<i>Mct8/KO</i>	CRISPR-Cas9	Bae et al., 2020	<i>Mct8/KO</i> rats showed growth and reduced sperm motility and viability <i>Mct8/KO</i> mice did not show growth retardation	/
<b>Metabolic</b>	Congenital leptin deficiency	<i>Lep/KO</i>	CRISPR-Cas9	Guan et al., 2017	<i>Lep/KO</i> rats and mice show similar phenotypes similar to those of patients	/
	Leptin receptor deficiency	<i>Lepr/KO</i>	CRISPR-Cas9 and TALEN	Bao et al., 2015; Chen Y. et al., 2017	<i>Lep/KO</i> rats and mice show similar phenotypes similar to those of patients	/
	Aceruloplasminemia	<i>Cp/KO</i>	CRISPR-Cas9	Kenawi et al., 2019	<i>Cp/KO</i> rats show similar plasma biochemical alterations and profile of iron overload in liver and spleen as in humans <i>Cp/KO</i> mice showed different results	RGD #38501060 #38501061 #38501059; not available

(Continued)

TABLE 7 | Continued

System/organ affected	Human genetic disease	Gene/genetic modification	Genomic tool used	References	Rats vs. mice	Depository or breeder company ID
	Multiple mitochondrial dysfunctions syndrome, among them pulmonary artery hypertension	<i>Nfu1/K1 point mutation G206C</i>	CRISPR-Cas9	Niihori et al., 2020	<i>Nfu1/K1 point mutation G206C</i> is only reported in rats. The model shows both mitochondrial dysfunction, and pulmonary artery hypertension with more prevalence in females than in males, as in patients	/
	Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum	<i>Abcc6/KO</i>	ZFN	Li et al., 2017	<i>Abcc6/KO</i> rats allowed ex vivo perfusion of liver and spleen and definition of the liver as the primary site of the disease	RGD #13792683 #13792682 #10413850 #10413852 #10413854 #10413858 #10413856
	Diabetes mellitus, non-insulin-dependent, 5 (NIDDM5)	<i>AS160 (TBC1D4)/KO</i>	CRISPR-Cas9	Arias et al., 2019	<i>AS160-KO</i> rats and mice showed similar alterations in whole body assessment Rats' bigger size allowed measurements using single myofibers	RGD #38596327
	multiple mitochondrial dysfunctions syndrome	<i>Isca1/K1-mCherry-Cre</i>	CRISPR-Cas9	Yang et al., 2019	Developmental block in embryos at 8.5 days Not reported in mice	/
	Primary hyperoxaluria type 1 (PH1)	<i>Agxt/KO</i>	CRISPR-Cas9	Zheng et al., 2020	<i>Agxt/KO</i> rat model better recapitulate the disease than the <i>Agxt/KO</i> mice	/
		<i>Agxt/K1 mutation D205N</i>	CRISPR-Cas9	Zheng et al., 2018	<i>Agxt/K1 mutation D205N</i> model recapitulates the disease in rats Not reported in mice	/
	Familial hypercholesterolemia	<i>Ldlr-ApoE/DKO</i>	CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cpf1	Zhao et al., 2018; Lee J. G. et al., 2019	Double <i>Ldlr-ApoE/DKO</i> rats better recapitulate the pathology than do double <i>Ldlr-ApoE/DKO</i> mice	/
	Dwarfism	<i>Ghsr/Tg Ghsr/KO</i>	DNA microinjection ENU mutagenesis	Flavell et al., 1996 Shuto et al., 2002	Dwarfism in rats as in <i>Gshr/KO</i> mice Analysis of the role of GSHR in behavioral pathologies including eating disorders	RGD #12910127 RGD #1642278 (PhysGen) RRRC#421RRRC #405 RRRC#827
		<i>Ghsr/KO</i>	CRISPR-Cas9	Zallar et al., 2019		
	Hyaline fibromatosis syndrome	<i>Antxr2/KO</i>	CRISPR-Cas9	Liu X. et al., 2017	<i>Antxr2/KO</i> rats and mice show similar phenotype <i>Antxr2/KO</i> rats did not develop hypertension	/
	Obesity (OBESITY)	<i>Mc3R-Mc4R/DKO</i>	CRISPR-Cas9	You et al., 2016	Double <i>Mc3R-Mc4R/DKO</i> rats better recapitulate the pathology than do double <i>Mc3R-Mc4R/DKO</i> mice	RGD #13825199 (Mc4R KO) (Hubrecht Laboratory, Centre for Biomedical Genetics, 3584 CT Utrecht, The Netherlands. Hera Biolabs, Taconic.)
	Congenital hyperinsulinism	<i>Sur1/KO</i>	TALEN	Zhou et al., 2019	<i>Sur1/KO</i> rats and mice reproduce the disease Rats showed a particular glucose control profile	/
	Fumarase deficiency	<i>Fh/KO</i>	TALEN	Yu et al., 2019	<i>Fh/KO</i> rats and mice show similar phenotype and reproduce the disease	RGD #13792795 #13792794 (not available)
	Fabry disease	<i>Gla/KO</i>	CRISPR-Cas9	Miller et al., 2018	<i>Gla/KO</i> rats better recapitulate the pathology than do <i>Gla/KO</i> mice	RGD #10054398
	Oculocutaneous albinism type 1	<i>Tyr/KO</i>	TALEN	Mashimo et al., 2013	<i>Tyr/KO</i> rats and mice show similar phenotype and reproduce the disease	NBRP Rat #0666
	Wolfram syndrome	<i>Wfs1/KO</i>	ZFN	Plaas et al., 2017	<i>Wfs1/KO</i> rats better recapitulate the pathology than <i>Wfs1/KO</i> mice	/
<b>Nephrology</b>	Focal segmental glomerulosclerosis 2 (FSGS2)	<i>Trpc6/KO BigDel</i>	CRISPR-Cas9	Kim E. Y. et al., 2018	<i>Trpc6/KO</i> rats and mice were protected from FSGS2	RGD #11553908 #11553912 #11553902

(Continued)

TABLE 7 | Continued

System/organ affected	Human genetic disease	Gene/genetic modification	Genomic tool used	References	Rats vs. mice	Depository or breeder company ID
	C3 glomerulopathy	<i>C3/KO</i> <i>C3/KO</i>	ZFN CRISPR-Cas9	Negishi et al., 2018) Xu et al., 2018	C3/KO rats and mice display a similar phenotype Most mouse strains have a defective complement system downstream of C3	/ RGD #19165133
	REN-related kidney disease	<i>Ren/KO</i>	ZFN	Moreno et al., 2011	Rats like humans have 1 copy of the Ren gene whereas mice have 2 copies Rats faithfully recapitulate the disease	RGD #4139880 (PhysGen)
<b>Ophthalmology</b>	Autosomal dominant congenital stationary night blindness and retinitis pigmentosa	<i>Rho s334ter/Tg</i>	DNA microinjection	Liu et al., 1999	This is a unique widely used model of this disease	
	Retinitis pigmentosa 85 (RP85)	<i>Ahr/KO</i>	ZFN	Harrill et al., 2013	<i>Ahr/KO</i> rats and mice showed distinct phenotypes in the eye, liver and kidneys during normal development and toxic responses	Cf <b>Table 6</b>
	Autosomal dominant congenital stationary night blindness	<i>Pde6b/KO</i>	CRISPR-Cpf1	Yeo et al., 2019	<i>Pde6b /KO</i> rats and mice reproduce the disease Slower progression and larger anatomic architecture in rats are advantages versus the mouse model	/
	Familial exudative vitreoretinopathy	<i>Lrp5/KO</i>	CRISPR-Cas9	Ubels et al., 2020	<i>Lrp5/KO</i> rats show retinal and bone abnormalities Similar phenotype in <i>Lrp5/KO</i> mice	/
<b>Cancer</b>	Li-Fraumeni syndrome	<i>Tp53</i>	ES ZFN	McCoy et al., 2013	<i>Tp53/KO</i> rats developed more diverse tumors and more frequently than <i>Tp53/KO</i> mice	RGD #12904897 (Horizon Discovery) RGD #11553886NBRP Rat #0726 RRRC #00485 (ES)
<b>Immune and hematological systems</b>	Von Willebrand disease	<i>Vwf/KO BigDel</i>	CRISPR-Cas9	Garcia et al., 2020	<i>Vwf/KO</i> rats and mice display a similar phenotype	RGD #18182946 #39128242 #18182944
	Hemophilia A	<i>F8/KO</i>	ZFN	Nielsen et al., 2014	<i>F8/KO</i> rats and mice show similar phenotype	RGD #11531094 (Novo Nordisk, Maaloev, Denmark)
		<i>F8/KO (gene inversion)</i>	CRISPR-Cas9	Shi et al., 2020		RGD #13800746
	ALSP	<i>Csf1r/KO</i>	ES cells	Pridans et al., 2018	<i>Csf1r/KO</i> rats showed a more severe phenotype than patients and <i>Csf1r/KO</i> mice an even stronger one	/
	SCID	<i>Rag1/KO</i>	Meganucleases and CRISPR-Cas9	Tsuchida et al., 2014; Zschemisch et al., 2012; Ménoret et al., 2013	<i>Rag1/KO</i> rats and mice show similar phenotype	Cf <b>Table 6</b>
		<i>Rag2/KO</i>	CRISPR-Cas9	Liu Q. et al., 2017; Noto et al., 2018	<i>Rag2/KO</i> rats and mice show similar phenotype	Cf <b>Table 6</b>
		<i>Prkdc/KO</i>	CRISPR-Cas9	Mashimo et al., 2012; Ma et al., 2014a	<i>Prkdc/KO</i> rats and mice show similar phenotype	Cf <b>Table 6</b>
	X-linked SCID	<i>Il2Rg/KO</i>	ZFN, TALEN and CRISPR-Cas9	Mashimo et al., 2012; Samata et al., 2015; Kujik et al., 2016; Ménoret et al., 2018	<i>Il2rg/KO</i> rats and mice show similar phenotype	Cf <b>Table 6</b>
	APECED	<i>Aire/KO</i>	TALEN	Ossart et al., 2018	<i>Aire/KO</i> rats showed a more pronounced phenotype than <i>Aire/KO</i> mice	Cf <b>Table 6</b>
	Agammaglobulinemia non-Bruton type	<i>Ighm/KO</i>	TALEN CRISPR-Cas9	Ménoret et al., 2010; Panzer et al., 2018	<i>Ighm/KO</i> rats and mice show similar phenotype	Cf <b>Table 6</b>

tools can be used and combined, in particular for genetic lineage tracing (Liu K. et al., 2020).

## Models to Study Genes of the Immune System

In general terms, rats share more immune characteristics with humans than mice do (Wildner, 2019). As an example, complement levels in humans and rats are comparable (Ong and Mattes, 1989; Ménoret et al., 2020), whereas in most inbred mouse strains, they are undetectable or very low because of different genetic mutations (Ong and Mattes, 1989; Wetsel et al., 1990; Shultz et al., 1995).

The roles of genes identified in different immune pathophysiological processes, as well as others involved in normal immune responses, also have been analyzed and are listed in **Table 6**. For the sake of space and relevance of the rat model, only some of these generated genetically modified models are described in more detail below.

### Immunodeficient Rat Strains

KO of genes involved in early rearrangements of immunoglobulin in B cells and of the T cell receptor genes in T cells, such as *Rag1* (Zschemisch et al., 2012; Ménoret et al., 2013; Tsuchida et al., 2014), *Rag2* (Kuijk et al., 2016; Liu Q. et al., 2017; Noto et al., 2018), and *Prkdc* (Mashimo et al., 2012; Ma et al., 2014a; Beldick et al., 2018) have resulted in defective development of B and T cells (**Tables 6, 7**). KO of the gamma chain receptor of the IL-2 receptor (*Il2rg*) results in defects of differentiation of T, B, natural killer (NK), and innate lymphoid cells (Mashimo et al., 2010; Samata et al., 2015; Kuijk et al., 2016). Additionally, rat lines combining several genetic modifications, such as with the *Rag1*, *Rag2*, *Il2rg*, *Prkdc*, and *Foxn1* genes, have been developed (Mashimo et al., 2012; Goto et al., 2016; Ménoret et al., 2018; He et al., 2019). Transgenic rats for human SIRPα to inhibit phagocytosis in human cells have been described in recent years (Goto et al., 2016; Jung et al., 2016; Yang X. et al., 2018; Ménoret et al., 2020). These rats have been used in humanization of their immune system and/or other tissues in transplantation and regenerative medicine settings (for a review, see Adigbli et al., 2020) and in cancer research (He et al., 2019). In these models as in others, the larger size of the rat allows to do analysis of human cells of the blood more frequently than in mice. Furthermore, the normal complement levels in rats allow to analyze the effector function of different anti-human antibodies, not possible to do in mice (Ménoret et al., 2020). Other genetic modifications to improve immune or liver humanization that have been developed in mice, will probably also be applied to the present generation of immunodeficient rats (Adigbli et al., 2020).

B cell-deficient rats have been described (Ménoret et al., 2010; Panzer et al., 2018) and used in organ transplantation models, and the rat may better recapitulate lesions mediated by complement activation through antibodies in the transplantation setting (Platt and Cascalho, 2018). One of these B cell-deficient strains (Ménoret et al., 2010) was obtained by disrupting the J sequence of the immunoglobulin heavy chain and further rendered deficient for both immunoglobulin light chains (Osborn et al., 2013). With the objective of generating fully human

monoclonal antibodies (mAbs), these immunoglobulin-deficient rats were humanized for immunoglobulins by transgenesis using BACs (Osborn et al., 2013). These animals can generate human mAbs with diversity and affinity (Osborn et al., 2013) and different versions of these animals have been generated (Harris et al., 2018; Clarke et al., 2019).

Inactivation of the C3 complement gene has allowed confirmation of a new role for complement in a model of polyneuropathy following chemotherapy. As stated earlier, the fact that complement levels in humans and rats are comparable (Ong and Mattes, 1989; Ménoret et al., 2020), makes the rat a model of choice for exploring the role of complement in different pathological situations (Xu et al., 2018).

### Cluster of Differentiation (CD) or Other Cell Membrane Molecules

In model of neuromyelitis optica induced by passive administration of human IgG autoantibodies targeting aquaporin-4, rats deficient in the cell membrane inhibitor of complement activation CD59 showed a much more pronounced neurological pathology than CD59 KO mice (Yao and Verkman, 2017a,b). This model emphasizes the role of complement in this pathology and the availability of a more relevant model of the disease than mice.

CLEC-1 is a cell membrane receptor expressed by dendritic cells (DCs) that reduces immune responses and plays a role in immune tolerance models (Thebault et al., 2009). CLEC-1 KO rats show enhanced *Il12p40* subunit mRNA expression in DCs and an exacerbation of downstream *in vitro* and *in vivo* CD4<sup>+</sup> Th1 and Th17 responses (Lopez Robles et al., 2017).

Human and rat (Maruoka et al., 2004) but not mouse cells express the Fc receptor for IgA (FcαRI, CD89; mice bear only a *FcαRI* pseudogene) (Launay et al., 2000). CD89 KO rats have been generated and have provided interesting new information on a model of IgA-induced nephropathy a frequent pathology in humans (submitted).

Similarly, human and rat DCs display quite similar profiles of Toll-like receptor (TLR) expression in different DC subsets, allowing to better explore their role in infectious and inflammatory diseases. DCs from both species express the TLR10, whereas mouse DC subsets do not show a particular profile of TLR expression and TLR10 is not expressed (mice bear only a *Thr10* pseudogene) (Hubert et al., 2006). Rats deficient for TLR10 have been generated and are being characterized (in preparation).

A human CD4/CCR5 transgenic rat model (Keppler et al., 2002) has been extensively used to analyze different aspects of HIV infection and treatment with more relevant results as compared to mice with similar transgenes (Goffinet et al., 2007).

In humans, HLA-B27 is strongly associated with a series of inflammatory diseases grouped together under the term “spondyloarthropathies.” In contrast to the negative results in transgenic mice, transgenic HLA-B27 rats spontaneously develop inflammatory disease in the same organs as those involved in humans (Hammer et al., 1990). This model has been extensively used and is the model of choice in this pathology (for a review, see Braem and Lories, 2012).

## Cytokines and Their Receptors

*Il22bp* KO rats show that IL22-binding protein is protective in models of inflammatory colitis (Martin et al., 2016) and psoriasis (Martin et al., 2017). *Il22bp*-GFP KI rats have facilitated precise definition of cell subsets that express IL22bp by different subsets of DCs in different tissues (submitted).

Viral infections can trigger autoimmune diabetes in rats and type I IFN  $\alpha/\beta$  receptor (IFNAR1) KO rats have a significantly delayed onset and frequency of diabetes. These findings support the idea that innate immunity influences autoimmune diabetes and encourage the use of targeted strategies to inhibit type I IFN  $\alpha/\beta$  (Qaisar et al., 2017).

NK cells could play a role in placenta generation, and IL-15 KO rats showed an absence of NK cells and several abnormal placental characteristics, supporting a role for NK cells (Renaud et al., 2017).

A *Csf1r* reporter gene (Irvine et al., 2020) and *Csf1r* KO (Pridans et al., 2018) lines are useful tools for the analysis of macrophages and of CSF1R biology (Hume et al., 2020). CSF1R is also the receptor for IL-34, and *Il34*-mutated rats exhibit depletion of microglia and Langerhans cells, as well as defects in tolerogenic immune responses (submitted).

## Intracellular Molecules

Certain molecules that regulate metabolic functions in many cell types, including in immune cells, have been analyzed using genetically modified rats. Transgenic rats for heme oxygenase-1 (HO-1) under the control of the ubiquitous H-2Kb promoter (Braudeau et al., 2003) and HO-1 KO rats (Atsavas et al., 2017) have facilitated dissection of different aspects of HO-1 effects, particularly in kidney, where the lesions observed in rats differ from those in mice.

The hydrocarbon receptor (AHR) is a transcription factor with an essential role in mediating toxic responses to environmental pollutants and in regulating many cellular pathways involving endogenous ligands. In *Ahr* KO rats, the percentages of T CD3+, T CD8+, and CD11c+ cells in the spleen and the activation of T cells are decreased, whereas the percentage of NK T cells and the activation of B cells is increased compared to wild-type rats (Phadnis-Moghe et al., 2016).

The lymphopenia observed in diabetic biobreeding rats results from a spontaneous mutation in the immune-associated nucleotide gene 5 (*Ian5*), a protein expressed in the mitochondria membrane where it regulates apoptosis. Lymphocyte numbers are normalized when a normal *Ian5* gene is transgenically expressed (Michalkiewicz et al., 2004).

Some of the most commonly used immune system models developed in rats are based on intrinsic characteristics of the species. For example, the rat has always been an important model of autoimmune arthritis (Holmdahl et al., 2001) and HLA-B27 transgenic rats recapitulate spondyloarthropathies much better than do HLA-B27 transgenic mice.

Certain immune reagents, such as antibodies recognizing leukocyte differentiation antigens, are less abundant in rats than in mice but more so than in other experimental species. High-density flow cytometry techniques have not yet been applied in the analysis of the rat immune system and will clearly

be of great interest when coupled with modification of rat immune system genes.

## Genetic Diseases Models

For 150 years, spontaneous or induced (ENU) genetic mutations in the rat have been used as models of human genetic diseases. For a decade, the advent of genetic engineering tools such as ZFN, TALEN, and CRISPR-Cas have led to a real revolution in obtaining specific and targeted genetic mutations in rats for the study of human genetic diseases. These advances, coupled with historical knowledge and use of the rat in many research fields, have increased the generation of rat models of human genetic diseases. More than 6000 genetic diseases have been described, and several databases have recorded variants that are associated with or responsible for genetic diseases. Several important genetic diseases have been modeled in rats. A complete list is presented in **Table 7**, and a brief description of the most useful models is provided below.

### Cardiovascular Diseases (CVD)

Because of its larger size allowing catheterization, lower cardiac frequency versus mice, and historical use in CVD, the rat has been an important model for a series of genetically modified rat models of CVD.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) results from a reshaping and thickening of the walls of medium and small caliber pulmonary vessels. By their frequencies and effects, the mutations in the *Bmpr2* gene are the main variants responsible for inheritable forms of isolated PAH. *Bmpr2* KO rats show some of the critical clinical, cellular, and molecular dysfunctions described in human PAH both in the heart and vessels (Ranchoux et al., 2015; Hautefort et al., 2019; Manaud et al., 2020). Although rarer, mutations in the *Kcnk3* gene encoding a potassium channel have also been described as causative in PAH. *Kcnk3* KO rats develop age-dependent PAH associated with characteristic electrophysiological and molecular alterations in the myocardium and vessels (Lambert et al., 2019). Because the *Kcnk3* gene is not functional in mice, this rat model offers new insights into the mechanisms of PAH and in the testing of therapeutics.

To investigate the role of the *MYL4* gene in atrial cardiomyopathy, *Myl4*-KO or mutated rats have been generated. Both show a phenotype similar to affected patients and are new models for further mechanistic analysis (Peng et al., 2017).

Danon disease (DD) is a metabolic disease caused by mutations in the *LAMP2* gene, and the most common symptom is cardiomyopathy. Recently generated *Lamp2* KO rats show similarities to DD patients at the heart tissue level and with multisystem lesions, constituting an important new animal model of DD (Ma S. et al., 2018).

### Neurological Diseases

In neurobiology and cognitive studies, the rat, because of its larger size and more complex and richer behavior, is preferred as a rodent model. Genetically modified rats have provided several important models for neurological disorders with a genetic component.

Mutations in complexin-1 (CPLX1) gene lead to epileptic encephalopathy with onset on infancy. *Cplx1* KO rats have different phenotypes from mice. Both show profound ataxia, but in rats, behavior is more affected, and they have more abnormal histomorphology of the stomach and intestine, resulting in early death (Xu et al., 2020).

A nonsense mutation in the Cockayne syndrome B gene, *Ercc6*, more profoundly affects the rat brain than the mouse KO for the same gene (Xu et al., 2019). In these rats, RNA-seq analysis has revealed transcription dysregulation that contributes to the neurologic disease.

Neonatal hydrocephalus has been analyzed using two different models of mutated rats, one with an invalidation of the *L1cam* gene (Emmert et al., 2019b) and the other with a KI of a specific mutation in the *Ccdc39* gene (Emmert et al., 2019a). These models allow for neurosurgery procedures that are difficult to perform in mice, with resulting characterization of the lymphatic-mediated cerebrospinal fluid circulation and inflammation in this disease.

As a model for familial amyotrophic lateral sclerosis, rats with a FUS point mutation KI via CRISPR-Cas9 express a physiological level of this mutant, along with cognitive impairment and neuromuscular signs. In this rat model, FUS KI highlighted sleep-wake and circadian disturbances as early alarm signals (Zhang T. et al., 2018).

Neurofibromatosis type 1 is an autosomal dominant disease arising from mutations in the NF1 gene that results in the development of tumors in the nervous system, neurological disorders and chronic idiopathic pain (Dischinger et al., 2018). *Nf1* KO rats show increased nociceptor excitability and hyperalgesia. These models are important in the search for a potential key target (CRMP2) for therapeutic intervention (Moutal et al., 2017).

RNASET2 deficiency in humans is associated with cystic leukoencephalopathy. *RnaseT2* KO rats are the only rodent model of this disease. Despite a less severe neurodegeneration phenotype than in patients, this model is useful for studying RNASET2 function, especially for hippocampal neuroinflammation (Sinkevicius et al., 2018).

A group of neurodevelopmental diseases, gathered under the name of autism spectrum disorders (ASDs), are characterized by heterogeneous capabilities in social interactions and by stereotyped behaviors. One subtype of ASD is associated with mutations in the MECP2 gene, causing an X-linked neurodevelopmental disorder named Rett syndrome. *Mecp2* KO rats clearly show both motor and behavioral deficits early in development, more pronounced than in mice (Patterson et al., 2016). Another subtype of ASD is ASD/Fragile X syndrome. Two KO rat models have been generated for this condition, one syndromic (*Fmr1*) and one non-syndromic (*Ngn3*) (Hamilton et al., 2014). These KO rats show some ASD-relevant phenotypes for investigations at the genetic level. Phelan-McDermid syndrome is another ASD-associated condition, caused by mutations in the SHANK3 gene. In contrast to *Shank3* KO mice, *Shank3* KO rats showed normal social interaction but impaired social memory (Harony-Nicolas et al., 2017; Song et al., 2019). Similarly, *Shank2* KO rats better recapitulate the condition than the KO mice (Modi et al., 2018). Angelman syndrome results

from mutations in the *UBE3A* gene, which in most cases is a large gene deletion, and in a small fraction with mutations in exon 2. The *Ube3A* mouse model bears a null mutation of exon 2, whereas the rat model is closer to the human condition with a large deletion of the *Ube3a* gene. The rat model mimics human Angelman syndrome with abnormalities in motor coordination and cognitive function (Dodge et al., 2020).

## Muscular Diseases

Myopathies are a set of neuromuscular diseases, the most common of which is Duchenne's muscular dystrophy (1 in 3300 newborn babies) resulting from mutations in the dystrophin gene (DMD). As in humans, *Dmd* KO rats show decreased muscle strength as well as a degradation/regeneration phenotype in skeletal muscles, heart, and diaphragm (Larcher et al., 2014; Nakamura et al., 2014). Of note, *Dmd* KO rats but not mice present cardiovascular alterations close to those observed in humans, which are the main cause of death in patients. All of these clinical signs and pathological features are much more pronounced than in *Dmd* KO mice. Rats are becoming an increasingly used model for the study of different aspects of Duchenne's and Becker's myopathies, including biomarkers, neurological abnormalities, and immune/inflammatory responses (Robertson et al., 2017; Ouisse et al., 2019; Caudal et al., 2020; Szabó et al., 2021).

## Pulmonary Diseases

Cystic fibrosis is one of the most common genetic diseases in western populations (approximately 1 in 4000 newborns) and is caused by mutations in the *CFTR* gene. The most common mutation in humans is the missense mutation DF508, which leads to abnormal CFTR function and mucus accumulation. Cystic fibrosis is characterized by airway and digestive pathology with a reduced life expectancy. Mice do not have submucosal glands, in contrast to humans and rats. Rats with the DF508 mutation (Dreano et al., 2019), as well as with a complete KO for *Cftr*, have been generated (Tuggle et al., 2014; Dreano et al., 2019). *Cftr* KO rats showed a very severe digestive phenotype and lung lesions in surviving older animals, and reduced weight and life expectancy, although milder in DF508 rats. Very recently, a humanized model of cystic fibrosis was created by inserting the human CFTR cDNA sequence harboring a G551D mutation by KI into the rat genome, downstream of the endogenous *Cftr* promoter (Birket et al., 2020).

## Metabolic Diseases

To study disorders of metabolism, leptin, a cytokine-like hormone principally produced by white adipose tissues, was deleted in rats. Microarray analysis has been performed in *Lep* KO rats to evaluate alterations in white adipose gene expression and to explore pathways involved in metabolic diseases with leptin deficiency (Guan et al., 2017). The leptin receptor (*Lepr*) has also been deleted in rats, and these animals show hyperphagia, obesity, hyperglycemia, and dyslipidemia. This model could complement the existing models (db/db mice and Zucker rats) and be useful for research in obesity and diabetes (Bao et al., 2015; Chen Y. et al., 2017).

Hereditary aceruloplasminemia is a genetic disease characterized by progressive iron overload (liver and brain)

and is related to mutations in the ceruloplasmin (*CP*) gene. In contrast to *Cp* KO mice, *Cp* KO rats mimic the human phenotype with hepatosplenic iron load and could be more appropriate for providing information to understand and treat the disease (Kenawi et al., 2019).

Abnormal calcification and phosphate deposition are the basis of generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum, both caused by mutations in the *ABCC6* gene. These mutations lead to generalized arterial calcification through the body in infancy. Because *ABCC6* is expressed in liver and kidney, an important question is the respective role of these organs in the generalized disease. Given their small size, mice KO for *Abcc6* are not suitable for *ex vivo* perfusion experiments. *Ex vivo* perfusion of liver and kidneys from *Abcc6* KO rats has revealed that the liver is the primary site of molecular pathology in these process and points to a preferential target of the liver to treat them (Li et al., 2017).

The low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) and apolipoprotein E (*APOE*) genes control normal levels of cholesterol and other forms of fat in the blood. A deficiency in *LDLR* is the cause of familial hypercholesterolemia and a deficiency in *APOE* is involved in several age-related fatty acid diseases. Recently, two reports (Zhao et al., 2018; Lee J. G. et al., 2019) described double-KO for *Ldlr* and *ApoE* genes in rats. These rats mimic more closely than KO mice the pathological changes observed in hyperlipidemia and atherosclerosis in humans with genetic deficiencies and in normal individuals.

Melanocortin-3 and -4 receptors (*MC3R* and *MC4R*) regulate energy and body weight. *Mc3R-Mc4R* double-KO rats exhibit worse phenotypic features than single-KO rats and *Mc3R-Mc4R* double-KO mice (You et al., 2016).

Fabry disease is an X-linked lysosomal storage disease caused by  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -Gal A) deficiency resulting from mutations in the *GLA* gene.  $\alpha$ -Gal A KO mouse models do not recapitulate the cardiorenal findings observed in humans and *Gla* KO rats more closely mimic the disease phenotypes observed in patients (Miller et al., 2018).

Wolfram syndrome (WS) is a genetic disorder caused by mutations in the *WFS1* gene. Previous mouse models of WS involved only partial diabetes and other symptoms of the disease, whereas *Wfs1* KO rats developed diabetes as well as neuronal degeneration, as do patients (Plaas et al., 2017).

## Kidney Diseases

Renin (*REN*) mutations are involved in *REN*-related kidney disease and tubular dysgenesis. The role of *RAS* in the regulation of blood pressure and kidney function has been extensively analyzed in rats (Jacob, 2010), including the generation of one of the first transgenic rat models (Mullins et al., 1990). Although humans and rats have only one copy of the renin gene, mice have two genes and thus increased renin expression levels (10-fold higher than their one-copy counterparts) (Hansen et al., 2004). *Ren* KO rats have lower blood pressure and severe kidney underdevelopment, reproducing the kidney lesions observed in *REN*-related kidney disease and tubular dysgenesis (Moreno et al., 2011).

## Ophthalmology Diseases

Retinitis pigmentosa (RP) is a group of inherited mutations causing photoreceptor degeneration, loss of night vision, and blindness. Rhodopsin mutations comprise an important fraction of autosomal dominant RP. Transgenic rats harboring the *Rho s334ter* mutation are a widely used model for this pathology (Liu et al., 1999).

As noted, *AHR* is a ligand-activated transcription factor involved in the development of multiple tissues and activated by a large number of exogenous toxic compounds and endogenous ligands, such as kynurenes. *Ahr* KO rats and mice show ophthalmologic lesions as well as different renal and hepatic developmental and homeostatic lesions (Harrill et al., 2013).

## Cancer

The tumor suppressor *TP53* is a central player in cancer biology, and mutations in the *TP53* gene are the most frequent mutations observed in human cancers. *Tp53* KO rats develop a wide variety of tumors, most frequently sarcomas, which are rarely observed in mice. These rats have been used in carcinogenicity assays for drug development (McCoy et al., 2013).

## Immune and Hematological Systems

For hemophilia A, *FvIII* KO rats have no detectable *FVIII* activity, and their activated thromboplastin time and clotting time are significantly prolonged. Episodes of spontaneous bleeding requiring treatments were observed in 70% of the *FvIII* KO rats (Nielsen et al., 2014; Shi et al., 2020). In the rat genome, it is interesting to note that the *F8* gene is situated on chromosome 18, rather than the X chromosome as in humans, mice, dogs, and sheep (Lozier and Nichols, 2013).

Monocyte colony-stimulating factor (*CSF-1*) is, along with *IL-34*, a regulator of macrophages and myeloid DC development, acting through the *CSF-1R* (Ma et al., 2012). Humans with point mutations or less frequently deficiency for *CSF-1R* develop adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia, likely because of a decrease in the number of microglia (Hume et al., 2020). *Csf1r* KO rats (Pridans et al., 2018) develop some or all of the symptoms and lesions of the disease, but with greater severity and more bone lesions than in humans, whereas *Csf1r* KO mouse models show an even more severe phenotype (Hume et al., 2020).

*AIRE* plays a key role in central tolerance by regulating the expression of peripheral tissue antigens in epithelial cells of the thymus and by eliminating autoreactive T cells. Patients with the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal-dystrophy syndrome have genetic defects in *AIRE*. *Aire* KO rats show signs of generalized autoimmunity and clinical signs of disease that are much more pronounced than in *Aire* KO mice and closer to manifestations in humans (Ossart et al., 2018).

## CONCLUSION AND PERSPECTIVES

CRISPR-Cas system is now the tool of choice for genome editing, particularly for the rat for which ES cells are limited compared to the mouse. In the last decade, efforts have been made to improve

this tool and its delivery but two main hurdles persist. Some loci are still difficult or impossible to edit, and the efficiency of large or complex KI is still too low. Although many advances have been developed in the application of the CRISPR-Cas system to human cells and sometimes in mice, many remain to be applied in rat model generation.

Rats often proved to be better mimics of human situation than mice. It is particularly evident in CVD, neurobiology, ophthalmology, muscular diseases, and immunology, but few of the large number of genetic diseases in these or other organ systems have been modeled in rats. It is difficult to predict when the rat will be better than the mouse, nevertheless, it seems reasonable to try to generate new genetically modified rats in these areas. Moreover, to the best of our knowledge and among the models that can be compared, there are no mouse genetic or immune models that better reproduce human disease than rat. Future work using the CRISPR-Cas system will likely generate new rat models of genetic diseases and to study genes functions. Extensive work in QTLs associated with major polygenic diseases has been performed in rats (Gauguier, 2016; Shimoyama et al., 2017). Within these QTLs, the genes that could be responsible for a given disease will likely be targets of choice in future studies.

Other genes that would be logical to target in rats are those that are absent in mice and present in humans, given that 78 out of the 2544 Mb of the rat genome is common between humans and rats but not humans and mice (Gibbs et al., 2004). Examples within the immune system include *Tlr10* and *Cd89*.

## REFERENCES

- Adigbli, G., Ménoret, S., Cross, A. R., Hester, J., Issa, F., and Anegon, I. (2020). Humanization of immunodeficient animals for the modeling of transplantation, graft versus host disease and regenerative medicine. *Transplantation* 104, 2290–2306. doi: 10.1097/TP.0000000000003177
- Agca, C., Seye, C., Kashuba Benson, C. M., Rikka, S., Chan, A. W. S., Weisman, G. A., et al. (2009). Development of a novel transgenic rat overexpressing the P2Y(2) nucleotide receptor using a lentiviral vector. *J. Vasc. Res.* 46, 447–458. doi: 10.1159/000194274
- Aida, T., Nakade, S., Sakuma, T., Izu, Y., Oishi, A., Mochida, K., et al. (2016). Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17:979. doi: 10.1186/s12864-016-3331-9
- Aird, E. J., Lovendahl, K. N., St Martin, A., Harris, R. S., and Gordon, W. R. (2018). Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun. Biol.* 1:54. doi: 10.1038/s42003-018-0054-2
- Aitman, T., Dhillon, P., and Geurts, A. M. (2016). A RAtional choice for translational research? *Dis. Model Mech.* 9, 1069–1072. doi: 10.1242/dmm.027706
- Aitman, T. J., Petretto, E., and Behmoaras, J. (2010). “Genetic mapping and positional cloning,” in *Rat Genomics: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*, ed. I. Anegon (Totowa, NJ: Humana Press), 13–32. doi: 10.1007/978-1-60327-389-3\_2
- Amos-Landgraf, J. M., Kwong, L. N., Kendzierski, C. M., Reichelderfer, M., Torrealba, J., Weichert, J., et al. (2007). A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4036–4041. doi: 10.1073/pnas.0611690104
- Anzalone, A. V., Koblan, L. W., and Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat. Biotechnol.* 38, 824–844. doi: 10.1038/s41587-020-0561-9

A limitation of rats versus mice that cannot be resolved is also one of its advantages: its bigger size, which brings higher breeding costs.

The rat will continue to be a critical experimental model based on its bigger size and its inherent physiological characteristics, as well as a large and growing body of physiology and genomic data. Tools for modifying the rat genome as well as analyzing the genome are key to the development of new models for understanding biology and diseases.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors performed the bibliographic research and participated in writing the manuscript. IA planned the review and secured the funding.

## FUNDING

This work was performed in the context of different programs: Biogenouest by Région Pays de la Loire, IBISA program, TEFOR (Investissements d’Avenir French Government program, ANR-INSB-0014), LabCom SOURIRAT project (ANR-14-LAB5-0008), Labex IGO project (Investissements d’Avenir French Government program, ANR-11-LABX-0016-01), IHU-Cesti project (Investissements d’Avenir French Government program, ANR-10-IBHU-005, Nantes Métropole and Région Pays de la Loire), Fondation Progreffe, and collaboration with genOWay.

- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., et al. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157. doi: 10.1038/s41586-019-1711-4
- Arias, E. B., Zheng, X., Agrawal, S., and Cartee, G. D. (2019). Whole body glucoregulation and tissue-specific glucose uptake in a novel Akt substrate of 160 kDa knockout rat model. *PLoS One* 14:e0216236. doi: 10.1371/journal.pone.0216236
- Atsaves, V., Detsika, M. G., Poulaki, E., Gakiopoulou, H., and Lianos, E. A. (2017). Phenotypic characterization of a novel HO-1 depletion model in the rat. *Transgenic Res.* 26, 51–64. doi: 10.1007/s11248-016-9986-9
- Ayabe, S., Nakashima, K., and Yoshiki, A. (2019). Off- and on-target effects of genome editing in mouse embryos. *J. Reprod. Dev.* 65, 1–5. doi: 10.1262/jrd.2018-128
- Bae, H. S., Jin, Y.-K., Ham, S., Kim, H. K., Shin, H., Cho, G.-B., et al. (2020). CRISPR/Cas9-mediated knockout of Mct8 reveals a functional involvement of Mct8 in testis and sperm development in a rat. *Sci. Rep.* 10:11148. doi: 10.1038/s41598-020-67594-2
- Bai, L., Shi, G., Ma, Y., Zhang, L., Guan, F., Zhang, X., et al. (2018). Paraoxonase 1 knockout rats have impaired T cell development at the CD4/CD8 double-negative to double-positive transition stage. *Sci. Rep.* 8:14457. doi: 10.1038/s41598-018-32780-w
- Bao, D., Ma, Y., Zhang, X., Guan, F., Chen, W., Gao, K., et al. (2015). Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 5:15942. doi: 10.1038/srep15942
- Baulac, S., Ishida, S., Mashimo, T., Boillot, M., Fumoto, N., Kuwamura, M., et al. (2012). A rat model for LGII-related epilepsies. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3546–3557. doi: 10.1093/hmg/dds184
- Behmoaras, J., Diaz, A. G., Venda, L., Ko, J.-H., Srivastava, P., Montoya, A., et al. (2015). Macrophage epoxygenase determines a profibrotic

- transcriptome signature. *J. Immunol.* 194, 4705–4716. doi: 10.4049/jimmunol.1402979
- Beldick, S. R., Hong, J., Altamentova, S., Khazaei, M., Hundal, A., Zavvarian, M.-M., et al. (2018). Severe-combined immunodeficient rats can be used to generate a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury to facilitate studies of engrafted human neural stem cells. *PLoS One* 13:e0208105. doi: 10.1371/journal.pone.0208105
- Bernard, I., Fournié, G. J., and Saoudi, A. (2010). Genomics studies of immune-mediated diseases using the BN-LEW rat model. *Methods Mol. Biol.* 597, 389–402. doi: 10.1007/978-1-60327-389-3\_26
- Birket, S. E., Davis, J. M., Fernandez-Petty, C. M., Henderson, A. G., Oden, A. M., Tang, L., et al. (2020). Ivacaftor Reverses Airway Mucus Abnormalities in a Rat Model Harboring a Humanized G551D-CFTR. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 202, 1271–1282. doi: 10.1164/rccm.202002-0369OC
- Birling, M.-C., Gofflot, F., and Warot, X. (2009). Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome. *Methods Mol. Biol.* 561, 245–263. doi: 10.1007/978-1-60327-019-9\_16
- Birling, M.-C., Schaeffer, L., André, P., Lindner, L., Maréchal, D., Ayadi, A., et al. (2017). Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci. Rep.* 7:43331. doi: 10.1038/srep43331
- Bischoff, N., Wimberger, S., Maresca, M., and Brakebusch, C. (2020). Improving precise CRISPR genome editing by small molecules: is there a magic potion? *Cells* 9:1318. doi: 10.3390/cells9051318
- Bode, V. C. (1984). Ethylnitrosourea mutagenesis and the isolation of mutant alleles for specific genes located in the T region of mouse chromosome 17. *Genetics* 108, 457–470.
- Bothmer, A., Gareau, K. W., Abdulkarim, H. S., Buquicchio, F., Cohen, L., Viswanathan, R., et al. (2020). Detection and modulation of DNA translocations during multi-gene genome editing in T cells. *CRISPR J.* 3, 177–187. doi: 10.1089/crispr.2019.0074
- Bouchet, D., Tesson, L., Ménoret, S., Charreau, B., Mathieu, P., Yagita, H., et al. (2002). Differential sensitivity of endothelial cells of various species to apoptosis induced by gene transfer of Fas ligand: role of FLIP levels. *Mol. Med.* 8, 612–623.
- Braem, K., and Lories, R. J. (2012). Insights into the pathophysiology of ankylosing spondylitis: contributions from animal models. *Joint Bone Spine* 79, 243–248. doi: 10.1016/j.jbspin.2011.09.008
- Braudeau, C., Bouchet, D., Toquet, C., Tesson, L., Ménoret, S., Iyer, S., et al. (2003). Generation of heme oxygenase-1-transgenic rats. *Exp. Biol. Med.* 228, 466–471.
- Briner, A. E., Donohoue, P. D., Gomaa, A. A., Selle, K., Slorach, E. M., Nye, C. H., et al. (2014). Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. *Mol. Cell* 56, 333–339. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.019
- Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K., and Palmiter, R. D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4438–4442. doi: 10.1073/pnas.82.13.4438
- Brown, A. J., Fisher, D. A., Kouranova, E., McCoy, A., Forbes, K., Wu, Y., et al. (2013). Whole-rat conditional gene knockout via genome editing. *Nat. Methods* 10, 638–640. doi: 10.1038/nmeth.2516
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., et al. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135, 1287–1298. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.007
- Carbery, I. D., Ji, D., Harrington, A., Brown, V., Weinstein, E. J., Liaw, L., et al. (2010). Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 186, 451–459. doi: 10.1534/genetics.110.117002
- Carlson, C. M., Dupuy, A. J., Fritz, S., Roberg-Perez, K. J., Fletcher, C. F., and Largaespada, D. A. (2003). Transposon mutagenesis of the mouse germline. *Genetics* 165, 243–256.
- Carlson-Stevermer, J., Abdeen, A. A., Kohlenberg, L., Goedland, M., Molugu, K., Lou, M., et al. (2017). Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing. *Nat. Commun.* 8:1711. doi: 10.1038/s41467-017-01875-9
- Caudal, D., François, V., Lafoux, A., Ledevin, M., Anegon, I., Le Guiner, C., et al. (2020). Characterization of brain dystrophins absence and impact in dystrophin-deficient Dmdmdx rat model. *PLoS One* 15:e0230083. doi: 10.1371/journal.pone.0230083
- Chang, N. K., Gu, J., Gu, S., Osorio, R. W., Concepcion, W., and Gu, E. (2015). Arterial flow regulator enables transplantation and growth of human fetal kidneys in rats. *Am. J. Transplant.* 15, 1692–1700. doi: 10.1111/ajt.13149
- Charpentier, M., Khedher, A. H. Y., Menoret, S., Brion, A., Lamribet, K., Dardillac, E., et al. (2018). CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat. Commun.* 9:1133. doi: 10.1038/s41467-018-03475-7
- Charreau, B., Ménoret, S., Tesson, L., Azimzadeh, A., Audet, M., Wolf, P., et al. (1999). Protection against hyperacute xenograft rejection of transgenic rat hearts expressing human decay accelerating factor (DAF) transplanted into primates. *Mol. Med.* 5, 617–630.
- Charreau, B., Tesson, L., Buscail, J., Soullillou, J. P., and Anegon, I. (1996a). Analysis of human CD59 tissue expression directed by the CMV-IE-1 promoter in transgenic rats. *Transgenic Res.* 5, 443–450.
- Charreau, B., Tesson, L., Soullillou, J. P., Pourcel, C., and Anegon, I. (1996b). Transgenesis in rats: technical aspects and models. *Transgenic Res.* 5, 223–234. doi: 10.1007/BF01972876
- Chen, C. C. A., Geurts, A. M., Jacob, H. J., Fan, F., and Roman, R. J. (2013). Heterozygous knockout of transforming growth factor- $\beta$ 1 protects Dahl S rats against high salt-induced renal injury. *Physiol. Genomics* 45, 110–118. doi: 10.1152/physiolgenomics.00119.2012
- Chen, F., Ding, X., Feng, Y., Seebeck, T., Jiang, Y., and Davis, G. D. (2017). Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting. *Nat. Commun.* 8:14958. doi: 10.1038/ncomms14958
- Chen, Y., Lu, W., Gao, N., Long, Y., Shao, Y., Liu, M., et al. (2017). Generation of obese rat model by transcription activator-like effector nucleases targeting the leptin receptor gene. *Sci. China Life Sci.* 60, 152–157. doi: 10.1007/s11427-016-5049-y
- Chen, P., Li, Z., Nie, J., Wang, H., Yu, B., Wen, Z., et al. (2020). MYH7B variants cause hypertrophic cardiomyopathy by activating the CaMK-signaling pathway. *Sci. China. Life Sci.* 63, 1–16. doi: 10.1007/s11427-019-1627-y
- Chen, S., Lee, B., Lee, A. Y.-F., Modzelewski, A. J., and He, L. (2016). Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J. Biol. Chem.* 291, 14457–14467. doi: 10.1074/jbc.M116.733154
- Chen, S., Sun, S., Moonen, D., Lee, C., Lee, A. Y.-F., Schaffer, D. V., et al. (2019). CRISPR-READI: efficient generation of knockin mice by CRISPR RNP electroporation and AAV donor infection. *Cell Rep.* 27, 3780.e4–3789.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.103
- Chiang, E. Y., Li, T., Jeet, S., Peng, I., Zhang, J., Lee, W. P., et al. (2017). Potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 cooperatively and compensatorily regulate antigen-specific memory T cell functions. *Nat. Commun.* 8:14644. doi: 10.1038/ncomms14644
- Clarke, S. C., Ma, B., Trinklein, N. D., Schellenberger, U., Osborn, M. J., Ouisse, L.-H., et al. (2019). Multispecific antibody development platform based on human heavy chain antibodies. *Front. Immunol.* 9:3037. doi: 10.3389/fimmu.2018.03037
- Codner, G. F., Mianné, J., Caulder, A., Loeffler, J., Fell, R., King, R., et al. (2018). Application of long single-stranded DNA donors in genome editing: generation and validation of mouse mutants. *BMC Biol.* 16:70. doi: 10.1186/s12915-018-0530-7
- Concordet, J.-P., and Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 46, W242–W245. doi: 10.1093/nar/gky354
- Cui, X., Ji, D., Fisher, D. A., Wu, Y., Briner, D. M., and Weinstein, E. J. (2011). Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 29, 64–67. doi: 10.1038/nbt.1731
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., et al. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–607. doi: 10.1038/nature.09886
- Dewey, C., Wu, J. Q., Cawley, S., Alexandersson, M., Gibbs, R., and Pachter, L. (2004). Accurate identification of novel human genes through simultaneous gene prediction in human. *Mouse, and Rat. Genome Res.* 14, 661–664. doi: 10.1101/gr.1939804

- Ding, X., Seebeck, T., Feng, Y., Jiang, Y., Davis, G. D., and Chen, F. (2019). Improving CRISPR-Cas9 genome editing efficiency by fusion with chromatin-modulating peptides. *CRISPR J.* 2, 51–63. doi: 10.1089/crispr.2018.0036
- Dischinger, P. S., Tovar, E. A., Essenburg, C. J., Madaj, Z. B., Gardner, E. E., Callaghan, M. E., et al. (2018). NF1 deficiency correlates with estrogen receptor signaling and diminished survival in breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 4:29. doi: 10.1038/s41523-018-0080-8
- Dodge, A., Peters, M. M., Greene, H. E., Dietrick, C., Botelho, R., Chung, D., et al. (2020). Generation of a novel rat model of angelman syndrome with a complete Ube3a gene deletion. *Autism Res.* 13, 397–409. doi: 10.1002/aur.2267
- Doe, B., Brown, E., and Boroviak, K. (2018). Generating CRISPR/Cas9-derived mutant mice by zygote cytoplasmic injection using an automatic microinjector. *Methods Protoc.* 1:5. doi: 10.3390/mps1010005
- Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., et al. (1987). Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576–578. doi: 10.1038/330576a0
- Dreano, E., Bacchetta, M., Simonin, J., Galmiche, L., Usal, C., Slimani, L., et al. (2019). Characterization of two rat models of cystic fibrosis—KO and F508del CFTR—generated by Crispr-Cas9. *Anim. Model. Exp. Med.* 2, 297–311. doi: 10.1002/ame2.12091
- Dyle, M. C., Kolakada, D., Cortazar, M. A., and Jagannathan, S. (2020). How to get away with nonsense: mechanisms and consequences of escape from nonsense-mediated RNA decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 11:e1560. doi: 10.1002/wrna.1560
- Ebihara, C., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Mashimo, T., Tomita, T., Zhao, M., et al. (2015). Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4238–4249. doi: 10.1093/hmg/ddv156
- Edraki, A., Mir, A., Ibraheim, R., Gainetdinov, I., Yoon, Y., Song, C.-Q., et al. (2019). A compact, high-accuracy Cas9 with a dinucleotide PAM for in vivo genome editing. *Mol. Cell* 73, 714.e4–726.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.003
- Egwuagu, C. E., Mahdi, R. M., Chan, C. C., Szein, J., Li, W., Smith, J. A., et al. (1999a). Expression of interferon-gamma in the lens exacerbates anterior uveitis and induces retinal degenerative changes in transgenic Lewis rats. *Clin. Immunol.* 91, 196–205. doi: 10.1006/clim.1999.4701
- Egwuagu, C. E., Szein, J., Mahdi, R. M., Li, W., Chao-Chan, C., Smith, J. A., et al. (1999b). IFN-gamma increases the severity and accelerates the onset of experimental autoimmune uveitis in transgenic rats. *J. Immunol.* 162, 510–517.
- El-Brolosy, M. A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., et al. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568, 193–197. doi: 10.1038/s41586-019-1064-z
- Ellis, B. L., Hirsch, M. L., Barker, J. C., Connelly, J. P., Steininger, R. J., and Porteus, M. H. (2013). A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology* 454, 1074. doi: 10.1186/1743-422X-10-74
- Emmert, A. S., Iwasawa, E., Shula, C., Schultz, P., Lindquist, D., Dunn, R. S., et al. (2019a). Impaired neural differentiation and glymphatic CSF flow in the Cdc39 rat model of neonatal hydrocephalus: genetic interaction with L1cam. *Dis. Model Mech.* 12:dmm040972. doi: 10.1242/dmm.040972
- Emmert, A. S., Vuong, S. M., Shula, C., Lindquist, D., Yuan, W., Hu, Y.-C., et al. (2019b). Characterization of a novel rat model of X-linked hydrocephalus by CRISPR-mediated mutation in L1cam. *J. Neurosurg.* 132, 945–958. doi: 10.3171/2018.10.JNS181015
- Engineer, C. T., Rahebi, K. C., Borland, M. S., Buell, E. P., Centanni, T. M., Fink, M. K., et al. (2015). Degraded neural and behavioral processing of speech sounds in a rat model of Rett syndrome. *Neurobiol. Dis.* 83, 26–34. doi: 10.1016/j.nbd.2015.08.019
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. doi: 10.1038/292154a0
- Ferguson, C., McKay, M., Harris, R. A., and Homanics, G. E. (2013). Toll-like receptor 4 (Tlr4) knockout rats produced by transcriptional activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene inactivation. *Alcohol* 47, 595–599. doi: 10.1016/j.alcohol.2013.09.043
- Fernández, A., Josa, S., and Montoliu, L. (2017). A history of genome editing in mammals. *Mamm. Genome* 28, 237–246. doi: 10.1007/s00335-017-9699-2
- Filippova, J., Matveeva, A., Zhuravlev, E., and Stepanov, G. (2019). Guide RNA modification as a way to improve CRISPR/Cas9-based genome-editing systems. *Biochimie* 167, 49–60. doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.003
- Flavell, D. M., Wells, T., Wells, S. E., Carmignac, D. F., Thomas, G. B., and Robinson, I. C. (1996). Dominant dwarfism in transgenic rats by targeting human growth hormone (GH) expression to hypothalamic GH-releasing factor neurons. *EMBO J.* 15, 3871–3879.
- Frit, P., Ropars, V., Modesti, M., Charbonnier, J. B., and Calsou, P. (2019). Plugged into the Ku-DNA hub: the NHEJ network. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 147, 62–76. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2019.03.001
- Fujii, W., Ito, H., Kanke, T., Ikeda, A., Sugiura, K., and Naito, K. (2019). Generation of genetically modified mice using SpCas9-NG engineered nuclease. *Sci. Rep.* 9:12878. doi: 10.1038/s41598-019-49394-5
- Fujii, W., Kakuta, S., Yoshioka, S., Kyuwa, S., Sugiura, K., and Naito, K. (2016). Zygote-mediated generation of genome-modified mice using Streptococcus thermophilus 1-derived CRISPR/Cas system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 473–476. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.070
- Galetto, R., Duchateau, P., and Pâques, F. (2009). Targeted approaches for gene therapy and the emergence of engineered meganucleases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 9, 1289–1303. doi: 10.1517/14712590903213669
- Garcia, J., Flood, V. H., Haberichter, S. L., Fahs, S. A., Mattson, J. G., Geurts, A. M., et al. (2020). A rat model of severe VWD by elimination of the VWF gene using CRISPR/Cas9. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 4, 64–71. doi: 10.1002/rth2.12280
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., et al. (2017). Programmable base editing of AT to GC in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471. doi: 10.1038/nature24644
- Gauguier, D. (2016). Application of quantitative metabolomics in systems genetics in rodent models of complex phenotypes. *Arch. Biochem. Biophys.* 589, 158–167. doi: 10.1016/j.abb.2015.09.016
- Geurts, A. M., Cost, G. J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J. C., Choi, V. M., et al. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325, 433–433. doi: 10.1126/science.1172447
- Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428, 493–521. doi: 10.1038/nature02426
- Giraldo, P., and Montoliu, L. (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res.* 10, 83–103. doi: 10.1023/a:1008918913249
- Goffinet, C., Allespach, I., and Keppler, O. T. (2007). HIV-susceptible transgenic rats allow rapid preclinical testing of antiviral compounds targeting virus entry or reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1015–1020. doi: 10.1073/pnas.0607414104
- Gordon, J. W., and Ruddle, F. H. (1982). Germ line transmission in transgenic mice. *Prog. Clin. Biol. Res.* 85(Pt B), 111–124.
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., and Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7380–7384.
- Goto, T., Hara, H., Nakauchi, H., Hochi, S., and Hirabayashi, M. (2016). Hypomorphic phenotype of Foxn1 gene-modified rats by CRISPR/Cas9 system. *Transgenic Res.* 25, 533–544. doi: 10.1007/s11248-016-9941-9
- Gu, B., Posfai, E., and Rossant, J. (2018). Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos. *Nat. Biotechnol.* 36, 632–637. doi: 10.1038/nbt.4166
- Gu, H., Cao, Y., Qiu, B., Zhou, Z., Deng, R., Chen, Z., et al. (2016). Establishment and phenotypic analysis of an Mstn knockout rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 115–122. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.030
- Guan, L.-J., Xu, K.-X., Xu, S.-Y., Li, N.-N., Wang, X.-R., Xia, Y.-K., et al. (2017). Profiles of metabolic gene expression in the white adipose tissue, liver and hypothalamus in leptin knockout (Lep $\Delta$ 114/ $\Delta$ 114) rats. *J. Biomed Res.* 31, 528–540. doi: 10.7555/JBR.31.20170021
- Guo, T., Feng, Y.-L., Xiao, J.-J., Liu, Q., Sun, X.-N., Xiang, J.-F., et al. (2018). Harnessing accurate non-homologous end joining for efficient precise deletion in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Genome Biol.* 19:170. doi: 10.1186/s13059-018-1518-x
- Gurumurthy, C. B., O'Brien, A. R., Quadros, R. M., Adams, J., Alcaide, P., Ayabe, S., et al. (2019a). Reproducibility of CRISPR-Cas9 methods for generation of

- conditional mouse alleles: a multi-center evaluation. *Genome Biol.* 20:171. doi: 10.1186/s13059-019-1776-2
- Gurumurthy, C. B., Sato, M., Nakamura, A., Inui, M., Kawano, N., Islam, M. A., et al. (2019b). Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD. *Nat. Protoc.* 14, 2452–2482. doi: 10.1038/s41596-019-0187-x
- Gurumurthy, C. B., Takahashi, G., Wada, K., Miura, H., Sato, M., and Ohtsuka, M. (2016). GONAD: a novel CRISPR/Cas9 genome editing method that does not require ex vivo handling of embryos. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 88, 15.8.1–15.8.12. doi: 10.1002/0471142905.hg1508s88
- Gutschner, T., Haemmerle, M., Genovese, G., Draetta, G. F., and Chin, L. (2016). Post-translational Regulation of Cas9 during G1 enhances homology-directed repair. *Cell Rep.* 14, 1555–1566. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.019
- Haller, S. T., Kumarasamy, S., Folt, D. A., Wuescher, L. M., Stepkowski, S., Karamchandani, M., et al. (2017). Targeted disruption of Cd40 in a genetically hypertensive rat model attenuates renal fibrosis and proteinuria, independent of blood pressure. *Kidney Int.* 91, 365–374. doi: 10.1016/j.kint.2016.08.015
- Hamilton, S. M., Green, J. R., Veeraragavan, S., Yuva, L., McCoy, A., Wu, Y., et al. (2014). Fmr1 and Nlgn3 knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders. *Behav. Neurosci.* 128, 103–109. doi: 10.1037/a0035988
- Hammer, R. E., Maika, S. D., Richardson, J. A., Tang, J. P., and Taurog, J. D. (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63, 1099–1112. doi: 10.1016/0092-8674(90)90512-d
- Hansen, P. B., Yang, T., Huang, Y., Mizel, D., Briggs, J., and Schnermann, J. (2004). Plasma renin in mice with one or two renin genes. *Acta Physiol. Scand.* 181, 431–437. doi: 10.1111/j.1365-201X.2004.01315.x
- Hao, M., Qiao, J., and Qi, H. (2020). Current and emerging methods for the synthesis of single-stranded DNA. *Genes* 11:116. doi: 10.3390/genes11020116
- Hao, X., Li, Y., Wang, J., Ma, J., Zhao, S., Ye, X., et al. (2018). Deficient O-GlcNAc glycosylation impairs regulatory T cell differentiation and notch signaling in autoimmune hepatitis. *Front. Immunol.* 9:2089. doi: 10.3389/fimmu.2018.02089
- Harony-Nicolas, H., Kay, M., du Hoffmann, J., Klein, M. E., Bozdagi-Gunal, O., Riad, M., et al. (2017). Oxytocin improves behavioral and electrophysiological deficits in a novel Shank3-deficient rat. *Elife* 6:e18904. doi: 10.7554/eLife.18904
- Harrill, J. A., Hukkanen, R. R., Lawson, M., Martin, G., Gilger, B., Soldatow, V., et al. (2013). Knockout of the aryl hydrocarbon receptor results in distinct hepatic and renal phenotypes in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 503–518. doi: 10.1016/j.taap.2013.06.024
- Harris, K. E., Aldred, S. F., Davison, L. M., Ogana, H. A. N., Boudreau, A., Brüggemann, M., et al. (2018). Sequence-based discovery demonstrates that fixed light chain human transgenic rats produce a diverse repertoire of antigen-specific antibodies. *Front. Immunol.* 9:889. doi: 10.3389/fimmu.2018.00889
- Hashimoto, M., and Takemoto, T. (2015). Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci. Rep.* 5:11315. doi: 10.1038/srep11315
- Hashimoto, M., Yamashita, Y., and Takemoto, T. (2016). Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev. Biol.* 418, 1–9. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.07.017
- Hautefort, A., Mendes-Ferreira, P., Sabourin, J., Manaud, G., Bertero, T., Rucker-Martin, C., et al. (2019). Bmpr2 mutant rats develop pulmonary and cardiac characteristics of pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 139, 932–948. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033744
- He, D., Zhang, J., Wu, W., Yi, N., He, W., Lu, P., et al. (2019). A novel immunodeficient rat model supports human lung cancer xenografts. *FASEB J.* 33, 140–150. doi: 10.1096/fj.201800102RR
- Heigwer, F., Kerr, G., and Boutros, M. (2014). E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods* 11, 122–123. doi: 10.1038/nmeth.2812
- Hirabayashi, M., Takahashi, R., Ito, K., Kashiwazaki, N., Hirao, M., Hirasawa, K., et al. (2001). A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit, and pig genomes. *Exp. Anim.* 50, 125–131. doi: 10.1538/expanim.50.125
- Hirano, H., Gootenberg, J. S., Horii, T., Abudayyeh, O. O., Kimura, M., Hsu, P. D., et al. (2016). Structure and engineering of francisella novicida Cas9. *Cell* 164, 950–961. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.039
- Hirosune, S., Kiyonari, H., Jin, M., Kumamoto, K., Yoshida, K., Shinohara, M., et al. (2020). Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends. *Sci. Rep.* 10:2518. doi: 10.1038/s41598-020-58893-9
- Holmdahl, R., Lorentzen, J. C., Lu, S., Olofsson, P., Wester, L., Holmberg, J., et al. (2001). Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 184, 184–202. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1840117.x
- Horie, K., Yusa, K., Yae, K., Odajima, J., Fischer, S. E. J., Keng, V. W., et al. (2003). Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9189–9207. doi: 10.1128/mcb.23.24.9189-9207.2003
- Horii, T., Morita, S., Kimura, M., Terawaki, N., Shibutani, M., and Hatada, I. (2017). Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci. Rep.* 7:7891. doi: 10.1038/s41598-017-08496-8
- Hu, K., Li, Y., Wu, W., Chen, H., Chen, Z., Zhang, Y., et al. (2018). High-performance gene expression and knockout tools using sleeping beauty transposon system. *Mob. DNA* 9:33. doi: 10.1186/s13100-018-0139-y
- Huang, G., Ashton, C., Kumbhani, D. S., and Ying, Q.-L. (2011). Genetic manipulations in the rat: progress and prospects. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20, 391–399. doi: 10.1097/MNH.0b013e328347768a
- Hubert, F.-X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, J.-M., Ouabed, A., Heslan, M., et al. (2006). Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 177, 1007–1016. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1007
- Hume, D. A., Caruso, M., Ferrari-Cestari, M., Summers, K. M., Pridans, C., and Irvine, K. M. (2020). Phenotypic impacts of CSF1R deficiencies in humans and model organisms. *J. Leukoc. Biol.* 107, 205–219. doi: 10.1002/JLB.MR0519-143R
- Hur, J. K., Kim, K., Been, K. W., Baek, G., Ye, S., Hur, J. W., et al. (2016). Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpfl1 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 34, 807–808. doi: 10.1038/nbt.3596
- Hwang, D. Y., Sin, J. S., Kim, M. S., Yim, S. Y., Kim, Y. K., Kim, C. K., et al. (2008). Overexpression of human selenoprotein M differentially regulates the concentrations of antioxidants and H2O2, the activity of antioxidant enzymes, and the composition of white blood cells in a transgenic rat. *Int. J. Mol. Med.* 21, 169–179.
- Ikeda, A., Fujii, W., Sugiura, K., and Naito, K. (2019). High-fidelity endonuclease variant HypaCas9 facilitates accurate allele-specific gene modification in mouse zygotes. *Commun. Biol.* 2:371. doi: 10.1038/s42003-019-0627-8
- Inui, M., Miyado, M., Igarashi, M., Tamano, M., Kubo, A., Yamashita, S., et al. (2014). Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 4:5396. doi: 10.1038/srep05396
- Irvine, K. M., Caruso, M., Cestari, M. F., Davis, G. M., Keshvari, S., Sehgal, A., et al. (2020). Analysis of the impact of CSF-1 administration in adult rats using a novel Csf1r-mApple reporter gene. *J. Leukoc. Biol.* 107, 221–235. doi: 10.1002/JLB.MA0519-149R
- Iscache, A.-L., Ménoiret, S., Tesson, L., Rémy, S., Usal, C., Pedros, C., et al. (2011). Effects of BCL-2 over-expression on B cells in transgenic rats and rat hybridomas. *Int. Immunol.* 23, 625–636. doi: 10.1093/intimm/dxr071
- Jacob, H. J. (2010). “The Rat: a model used in biomedical research,” in *Rat Genetics: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*, ed. I. Anegón (Totowa, NJ: Humana Press), 1–11. doi: 10.1007/978-1-60327-389-3\_1
- Jang, D. E., Lee, J. Y., Lee, J. H., Koo, O. J., Bae, H. S., Jung, M. H., et al. (2018). Multiple sgRNAs with overlapping sequences enhance CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency. *Exp. Mol. Med.* 50:16. doi: 10.1038/s12276-018-0037-x
- Janssen, J. M., Chen, X., Liu, J., and Gonçalves, M. A. F. V. (2019). The chromatin structure of CRISPR-Cas9 Target DNA controls the balance between mutagenic and homology-directed gene-editing events. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 16, 141–154. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.009
- Jessop, D. S., Murphy, D., and Larsen, P. J. (1995). Thymic vasopressin (AVP) transgene expression in rats: a model for the study of thymic AVP hyper-expression in T cell differentiation. *J. Neuroimmunol.* 62, 85–90. doi: 10.1016/0165-5728(95)00107-d
- Jiang, F., and Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 46, 505–529. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., et al. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 343:1247997. doi: 10.1126/science.1247997
- Joyce, C., Burton, D. R., and Briney, B. (2020). Comparisons of the antibody repertoires of a humanized rodent and humans by high throughput sequencing. *Sci. Rep.* 10:1120. doi: 10.1038/s41598-020-57764-7
- Joyner, A. L., Skarnes, W. C., and Rossant, J. (1989). Production of a mutation in mouse En-2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 338, 153–156. doi: 10.1038/338153a0
- Jung, C. J., Ménoret, S., Brusselle, L., Tesson, L., Usal, C., Chenouard, V., et al. (2016). Comparative analysis of piggyBac, CRISPR/Cas9 and TALEN mediated BAC transgenesis in the zygote for the generation of humanized SIRPA rats. *Sci. Rep.* 6:31455. doi: 10.1038/srep31455
- Jung, C. J., Zhang, J., Trenchard, E., Lloyd, K. C., West, D. B., Rosen, B., et al. (2017). Efficient gene targeting in mouse zygotes mediated by CRISPR/Cas9-protein. *Transgenic Res.* 26, 263–277. doi: 10.1007/s11248-016-9998-5
- Jung, E., Gardner, D., Choi, D., Park, E., Jin Seong, Y., Yang, S., et al. (2017). Development and characterization of A Novel Prox1-EGFP lymphatic and schlemm's canal reporter rat. *Sci. Rep.* 7:5577. doi: 10.1038/s41598-017-06031-3
- Justice, M. J., Noveroske, J. K., Weber, J. S., Zheng, B., and Bradley, A. (1999). Mouse ENU mutagenesis. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1955–1963. doi: 10.1093/hmg/8.10.1955
- Kaneko, T., and Mashimo, T. (2015). Simple genome editing of rodent intact embryos by electroporation. *PLoS One* 10:e0142755. doi: 10.1371/journal.pone.0142755
- Kaneko, T., and Nakagawa, Y. (2020). Genome editing of rodents by electroporation of CRISPR/Cas9 into frozen-warmed pronuclear-stage embryos. *Cryobiology* 92, 231–234. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.01.016
- Kaneko, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., and Mashimo, T. (2014). Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci. Rep.* 4:6382. doi: 10.1038/srep06382
- Kartje, Z. J., Barkau, C. L., Rohilla, K. J., Ageely, E. A., and Gagnon, K. T. (2018). Chimeric guides probe and enhance Cas9 biochemical activity. *Biochemistry* 57, 3027–3031. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00107
- Kawamata, M., and Ochiya, T. (2010). Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14223–14228. doi: 10.1073/pnas.1009582107
- Kenawi, M., Rouger, E., Island, M.-L., Leroyer, P., Robin, F., Rémy, S., et al. (2019). Ceruloplasmin deficiency does not induce macrophagic iron overload: lessons from a new rat model of hereditary aceruloplasminemia. *FASEB J.* 33, 13492–13502. doi: 10.1096/fj.201901106R
- Keppler, O. T., Welte, F. J., Ngo, T. A., Chin, P. S., Patton, K. S., Tsou, C.-L., et al. (2002). Progress toward a human CD4/CCR5 transgenic rat model for de novo infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Exp. Med.* 195, 719–736. doi: 10.1084/jem.20011549
- Khristi, V., Ghosh, S., Chakravarthi, V. P., Wolfe, M. W., and Rumi, M. A. K. (2019). Transcriptome data analyses of prostatic hyperplasia in Esr2 knockout rats. *Data Brief*. 24:103826. doi: 10.1016/j.dib.2019.103826
- Kim, E., Koo, T., Park, S. W., Kim, D., Kim, K., Cho, H.-Y., et al. (2017). In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun* 8:14500. doi: 10.1038/ncomms14500
- Kim, E. Y., Yazdizadeh Shotorbani, P., and Dryer, S. E. (2018). Trpc6 inactivation confers protection in a model of severe nephrosis in rats. *J. Mol. Med.* 96, 631–644. doi: 10.1007/s00109-018-1648-3
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., and Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab. Anim. Res.* 34, 147–159. doi: 10.5625/lar.2018.34.4.147
- Kim, S., Koo, T., Jee, H.-G., Cho, H.-Y., Lee, G., Lim, D.-G., et al. (2018). CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome Res.* 28, 367–373. doi: 10.1101/gr.231936.117
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., and Kim, J.-S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24, 1012–1019. doi: 10.1101/gr.171322.113
- Kim, Y., Cheong, S.-A., Lee, J. G., Lee, S.-W., Lee, M. S., Baek, I.-J., et al. (2016). Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. *Nat. Biotechnol.* 34, 808–810. doi: 10.1038/nbt.3614
- Kitada, K., Ishishita, S., Tosaka, K., Takahashi, R., Ueda, M., Keng, V. W., et al. (2007). Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nat. Methods* 4, 131–133. doi: 10.1038/nmeth1002
- Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., Yamaguchi, T., Tamura, C., Sanbo, M., Hirabayashi, M., et al. (2012). Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato. *Stem Cells Dev.* 21, 2981–2986. doi: 10.1089/scd.2012.0065
- Kobayashi, T., Namba, M., Koyano, T., Fukushima, M., Sato, M., Ohtsuka, M., et al. (2018). Successful production of genome-edited rats by the rGONAD method. *BMC Biotechnol.* 18:19. doi: 10.1186/s12896-018-0430-5
- Koller, B. H., Hagemann, L. J., Doetschman, T., Hagaman, J. R., Huang, S., Williams, P. J., et al. (1989). Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8927–8931. doi: 10.1073/pnas.86.22.8927
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., and Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420–424. doi: 10.1038/nature17946
- Kuijk, E. W., Rasmussen, S., Blokzijl, F., Huch, M., Gehart, H., Toonen, P., et al. (2016). Generation and characterization of rat liver stem cell lines and their engraftment in a rat model of liver failure. *Sci. Rep.* 6:22154. doi: 10.1038/srep22154
- Labuhn, M., Adams, F. F., Ng, M., Knoess, S., Schambach, A., Charpentier, E. M., et al. (2018). Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR–Cas9 applications. *Nucleic Acids Res.* 46, 1375–1385. doi: 10.1093/nar/gkx1268
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., and Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res.* 47, W171–W174. doi: 10.1093/nar/gkz365
- Lamas-Toranzo, I., Martínez-Moro, A., O Callaghan, E., Millán-Blanca, G., Sánchez, J. M., Lonergan, P., et al. (2020). RS-1 enhances CRISPR-mediated targeted knock-in in bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 87, 542–549. doi: 10.1002/mrd.23341
- Lambert, M., Capuano, V., Boet, A., Tesson, L., Bertero, T., Nakhleh, M. K., et al. (2019). Characterization of Kcnk3-Mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 125, 678–695. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314793
- Lanza, D. G., Gaspero, A., Lorenzo, I., Liao, L., Zheng, P., Wang, Y., et al. (2018). Comparative analysis of single-stranded DNA donors to generate conditional null mouse alleles. *BMC Biol.* 16:69. doi: 10.1186/s12915-018-0529-0
- Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., et al. (2014). Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 9:e110371. doi: 10.1371/journal.pone.0110371
- Launay, P., Grossetête, B., Arcos-Fajardo, M., Gaudin, E., Torres, S. P., Beaudoin, L., et al. (2000). Fcα receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J. Exp. Med.* 191, 1999–2009. doi: 10.1084/jem.191.11.1999
- Le, Q., Nguyen, V., and Park, S. (2019). Recent advances in the engineering and application of streptavidin-like molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7355–7365. doi: 10.1007/s00253-019-10036-5
- Lee, C. M., Barber, G. P., Casper, J., Clawson, H., Diekhans, M., Gonzalez, J. N., et al. (2020). UCSC Genome Browser enters 20th year. *Nucleic Acids Res.* 48, D756–D761. doi: 10.1093/nar/gkz1012
- Lee, H. K., Willi, M., Miller, S. M., Kim, S., Liu, C., Liu, D. R., et al. (2018). Targeting fidelity of adenine and cytosine base editors in mouse embryos. *Nat. Commun.* 9:4804. doi: 10.1038/s41467-018-07322-7
- Lee, H. K., Willi, M., Smith, H. E., Miller, S. M., Liu, D. R., Liu, C., et al. (2019). Simultaneous targeting of linked loci in mouse embryos using base editing. *Sci. Rep.* 9:1662. doi: 10.1038/s41598-018-33533-5
- Lee, J. G., Ha, C. H., Yoon, B., Cheong, S.-A., Kim, G., Lee, D. J., et al. (2019). Knockout rat models mimicking human atherosclerosis created by Cpf1-mediated gene targeting. *Sci. Rep.* 9:2628. doi: 10.1038/s41598-019-38732-2

- Lee, K., Mackley, V. A., Rao, A., Chong, A. T., Dewitt, M. A., Corn, J. E., et al. (2017). Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering. *Elife* 6:e25312. doi: 10.7554/eLife.25312
- Lelan, F., Boyer, C., Thinar, R., Rémy, S., Usal, C., Tesson, L., et al. (2011). Effects of human alpha-synuclein A53T-A30P mutations on SVZ and local olfactory bulb cell proliferation in a transgenic rat model of parkinson disease. *Parkinsons Dis.* 2011:987084. doi: 10.4061/2011/987084
- Lerman, L. O., Kurtz, T. W., Touyz, R. M., Ellison, D. H., Chade, A. R., Crowley, S. D., et al. (2019). Animal models of hypertension: a scientific statement from the american heart association. *Hypertension* 73, e87–e120. doi: 10.1161/HYP.000000000000090
- Li, D., Qiu, Z., Shao, Y., Chen, Y., Guan, Y., Liu, M., et al. (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 681–683. doi: 10.1038/nbt.2661
- Li, W., Teng, F., Li, T., and Zhou, Q. (2013). Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 31, 684–686. doi: 10.1038/nbt.2652
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., et al. (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299–1310. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.006
- Li, Q., Kingman, J., van de Wetering, K., Tannouri, S., Sundberg, J. P., and Uitto, J. (2017). Abcc6 knockout rat model highlights the role of liver in PPI homeostasis in pseudoxanthoma elasticum. *J. Invest. Dermatol.* 137, 1025–1032. doi: 10.1016/j.jid.2016.11.042
- Liang, P., Sun, H., Sun, Y., Zhang, X., Xie, X., Zhang, J., et al. (2017). Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell* 8, 601–611. doi: 10.1007/s13238-017-0418-2
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Ravinder, N., and Chesnut, J. D. (2017). Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J. Biotechnol.* 241, 136–146. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.011
- Ling, X., Xie, B., Gao, X., Chang, L., Zheng, W., Chen, H., et al. (2020). Improving the efficiency of precise genome editing with site-specific Cas9-oligonucleotide conjugates. *Sci. Adv.* 6:eaz0051. doi: 10.1126/sciadv.aaz0051
- Liu, C., Li, Y., Peng, M., Laties, A. M., and Wen, R. (1999). Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter during photoreceptor degeneration. *J. Neurosci.* 19, 4778–4785.
- Liu, K., Jin, H., and Zhou, B. (2020). Genetic lineage tracing with multiple DNA recombinases: a user's guide for conducting more precise cell fate mapping studies. *J. Biol. Chem.* 295, 6413–6424. doi: 10.1074/jbc.REV120.011631
- Liu, Y., Li, X., He, S., Huang, S., Li, C., Chen, Y., et al. (2020). Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discovery* 6:27. doi: 10.1038/s41421-020-0165-z
- Liu, Z., Schiel, J. A., Maksimova, E., Strezoska, Ž, Zhao, G., Anderson, E. M., et al. (2020). ErCas12a CRISPR-MAD7 for model generation in human cells, mice, and rats. *CRISPR J.* 3, 97–108. doi: 10.1089/crispr.2019.0068
- Liu, Q., Zhou, S., Fan, C., Huang, W., Li, Q., Liu, S., et al. (2017). Biodistribution and residence time of adenovector serotype 5 in normal and immunodeficient mice and rats detected with bioluminescent imaging. *Sci. Rep.* 7:3597. doi: 10.1038/s41598-017-03852-0
- Liu, X., Yuan, W., Li, J., Yang, L., and Cai, J. (2017). ANTXR2 knock-out does not result in the development of hypertension in rats. *Am. J. Hypertens.* 30, 182–187. doi: 10.1093/ajh/hpw125
- Liu, Z., Lu, Z., Yang, G., Huang, S., Li, G., Feng, S., et al. (2018). Efficient generation of mouse models of human diseases via ABE- and BE-mediated base editing. *Nat. Commun.* 9:2338. doi: 10.1038/s41467-018-04768-7
- Lomova, A., Clark, D. N., Campo-Fernandez, B., Flores-Bjurström, C., Kaufman, M. L., Fitz-Gibbon, S., et al. (2019). Improving gene editing outcomes in human hematopoietic stem and progenitor cells by temporal control of DNA repair. *Stem Cells* 37, 284–294. doi: 10.1002/stem.2935
- Lopez Robles, M. D., Pallier, A., Huchet, V., Le Texier, L., Remy, S., Braudeau, C., et al. (2017). Cell-surface C-type lectin-like receptor CLEC-1 dampens dendritic cell activation and downstream Th17 responses. *Blood Adv.* 1, 557–568. doi: 10.1182/bloodadvances.2016002360
- Lozier, J. N., and Nichols, T. C. (2013). Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. *Semin. Hematol.* 50, 175–184. doi: 10.1053/j.seminhematol.2013.03.023
- Lu, B., Geurts, A. M., Poirier, C., Petit, D. C., Harrison, W., Overbeek, P. A., et al. (2007). Generation of rat mutants using a coat color-tagged sleeping beauty transposon system. *Mamm. Genome* 18, 338–346. doi: 10.1007/s00335-007-9025-5
- Ma, M., Zhuang, F., Hu, X., Wang, B., Wen, X.-Z., Ji, J.-F., et al. (2017). Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxed alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system. *Cell Res.* 27, 578–581. doi: 10.1038/cr.2017.29
- Ma, S., Zhang, M., Zhang, S., Wang, J., Zhou, X., Guo, G., et al. (2018). Characterisation of Lamp2-deficient rats for potential new animal model of danon disease. *Sci. Rep.* 8:6932. doi: 10.1038/s41598-018-24351-w
- Ma, Y., Yu, L., Zhang, X., Xin, C., Huang, S., Bai, L., et al. (2018). Highly efficient and precise base editing by engineered dCas9-guide tRNA adenosine deaminase in rats. *Cell Discov.* 4:39. doi: 10.1038/s41421-018-0047-9
- Ma, Z.-G., Dai, J., Yuan, Y.-P., Bian, Z.-Y., Xu, S.-C., Jin, Y.-G., et al. (2018). T-bet deficiency attenuates cardiac remodelling in rats. *Basic Res. Cardiol.* 113:19. doi: 10.1007/s00395-018-0678-x
- Ma, X., Lin, W. Y., Chen, Y., Stawicki, S., Mukhyala, K., Wu, Y., et al. (2012). Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* 20, 676–687. doi: 10.1016/j.str.2012.02.010
- Ma, X., Shang, X., Qin, X., Lu, J., Liu, M., and Wang, X. (2020). Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2 knockout rats generated by CRISPR/Cas9: a novel model for drug transport and hyperbilirubinemia disease. *Acta Pharm Sin. B* 10, 850–860. doi: 10.1016/j.apsb.2019.11.007
- Ma, Y., Chen, W., Zhang, X., Yu, L., Dong, W., Pan, S., et al. (2016). Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing in rats by inhibiting NHEJ and using Cas9 protein. *RNA Biol.* 13, 605–612. doi: 10.1080/15476286.2016.1185591
- Ma, Y., Shen, B., Zhang, X., Lu, Y., Chen, W., Ma, J., et al. (2014a). Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 9:e89413. doi: 10.1371/journal.pone.0089413
- Ma, Y., Zhang, X., Shen, B., Lu, Y., Chen, W., Ma, J., et al. (2014b). Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res.* 24, 122–125. doi: 10.1038/cr.2013.157
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Tivey, A. R. N., and Lopez, R. (2019). Using EMBL-EBI services via web interface and programmatically via web services. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 66:e74. doi: 10.1002/cpbi.74
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 67–83. doi: 10.1038/s41579-019-0299-x
- Manaud, G., Nossent, E. J., Lambert, M., Ghigna, M.-R., Boët, A., Vinhas, M.-C., et al. (2020). Comparison of human and experimental pulmonary veno-occlusive disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 63, 118–131. doi: 10.1165/rcmb.2019-0015OC
- Marsan, E., Ishida, S., Schramm, A., Weckhuysen, S., Muraca, G., Lecas, S., et al. (2016). Depdc5 knockout rat: a novel model of mTORopathy. *Neurobiol. Dis.* 89, 180–189. doi: 10.1016/j.nbd.2016.02.010
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7634–7638. doi: 10.1073/pnas.78.12.7634
- Martin, J. C., Bériou, G., Heslan, M., Bossard, C., Jarry, A., Abidi, A., et al. (2016). IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol.* 9, 539–549. doi: 10.1038/mi.2015.83
- Martin, J. C., Wolk, K., Bériou, G., Abidi, A., Witte-Händel, E., Louvet, C., et al. (2017). Limited presence of IL-22 binding protein, a natural IL-22 inhibitor, strengthens psoriatic skin inflammation. *J. Immunol.* 198, 3671–3678. doi: 10.4049/jimmunol.1700021
- Maruoka, T., Nagata, T., and Kasahara, M. (2004). Identification of the rat IgA Fc receptor encoded in the leukocyte receptor complex. *Immunogenetics* 55, 712–716. doi: 10.1007/s00251-003-0626-1
- Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M. C., Bilate, A. M., Ingram, J. R., and Ploegh, H. L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* 33:538. doi: 10.1038/nbt.3190

- Mashimo, T., Kaneko, T., Sakuma, T., Kobayashi, J., Kunihiro, Y., Voigt, B., et al. (2013). Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. *Sci. Rep.* 3:1253. doi: 10.1038/srep01253
- Mashimo, T., Takizawa, A., Kobayashi, J., Kunihiro, Y., Yoshimi, K., Ishida, S., et al. (2012). Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Rep.* 2, 685–694. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.009
- Mashimo, T., Takizawa, A., Voigt, B., Yoshimi, K., Hiai, H., Kuramoto, T., et al. (2010). Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* 5:e8870. doi: 10.1371/journal.pone.0008870
- McCoy, A., Besch-Williford, C. L., Franklin, C. L., Weinstein, E. J., and Cui, X. (2013). Creation and preliminary characterization of a Tp53 knockout rat. *Dis. Model Mech.* 6, 269–278. doi: 10.1242/dmm.009704
- Meek, S., Buehr, M., Sutherland, L., Thomson, A., Mullins, J. J., Smith, A. J., et al. (2010). Efficient gene targeting by homologous recombination in rat embryonic stem cells. *PLoS One* 5:e14225. doi: 10.1371/journal.pone.0014225
- Mendias, C. L., Lynch, E. B., Gumucio, J. P., Flood, M. D., Rittman, D. S., Van Pelt, D. W., et al. (2015). Changes in skeletal muscle and tendon structure and function following genetic inactivation of myostatin in rats. *J. Physiol.* 593, 2037–2052. doi: 10.1113/jphysiol.2014.287144
- Ménoret, S., De Cian, A., Tesson, L., Remy, S., Usal, C., Boulé, J.-B., et al. (2015). Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci. Rep.* 5:14410. doi: 10.1038/srep14410
- Ménoret, S., Fontanière, S., Jantz, D., Tesson, L., Thinard, R., Rémy, S., et al. (2013). Generation of Rag1-knockout immunodeficient rats and mice using engineered meganucleases. *FASEB J.* 27, 703–711. doi: 10.1096/fj.12-219907
- Ménoret, S., Iscache, A.-L., Tesson, L., Rémy, S., Usal, C., Osborn, M. J., et al. (2010). Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur. J. Immunol.* 40, 2932–2941. doi: 10.1002/eji.201040939
- Ménoret, S., Ouisse, L.-H., Tesson, L., Delbos, F., Garnier, D., Remy, S., et al. (2018). Generation of immunodeficient rats with Rag1 and Il2rg gene deletions and human tissue grafting models. *Transplantation* 102, 1271–1278. doi: 10.1097/TP.0000000000002251
- Ménoret, S., Ouisse, L.-H., Tesson, L., Remy, S., Usal, C., Guiffes, A., et al. (2020). In vivo analysis of human immune responses in immunodeficient rats. *Transplantation* 104, 715–723. doi: 10.1097/TP.0000000000003047
- Michalkiewicz, M., Michalkiewicz, T., Ettinger, R. A., Rutledge, E. A., Fuller, J. M., Moralejo, D. H., et al. (2004). Transgenic rescue demonstrates involvement of the *Ian5* gene in T cell development in the rat. *Physiol. Genomics* 19, 228–232. doi: 10.1152/physiolgenomics.00126.2004
- Miller, J. J., Aoki, K., Moehring, F., Murphy, C. A., O'Hara, C. L., Tiemeyer, M., et al. (2018). Neuropathic pain in a Fabry disease rat model. *JCI Insight* 3:e99171. doi: 10.1172/jci.insight.99171
- Miura, H., Gurumurthy, C. B., Sato, T., Sato, M., and Ohtsuka, M. (2015). CRISPR/Cas9-based generation of knockdown mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. *Sci. Rep.* 5:12799. doi: 10.1038/srep12799
- Miyasaka, Y., Uno, Y., Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Yoshimura, T., Tanaka, T., et al. (2018). CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics* 19:318. doi: 10.1186/s12864-018-4713-y
- Mizuno, N., Mizutani, E., Sato, H., Kasai, M., Ogawa, A., Suchy, F., et al. (2018). Intra-embryo gene cassette knockin by CRISPR/Cas9-mediated genome editing with adeno-associated viral vector. *iScience* 9, 286–297. doi: 10.1016/j.isci.2018.10.030
- Modi, M. E., Brooks, J. M., Guilmette, E. R., Beyna, M., Graf, R., Reim, D., et al. (2018). Hyperactivity and Hypermotivation associated with increased striatal mGluR1 signaling in a Shank2 Rat model of autism. *Front. Mol. Neurosci.* 11:107. doi: 10.3389/fnmol.2018.00107
- Moreno, C., Hoffman, M., Stodola, T. J., Didier, D. N., Lazar, J., Geurts, A. M., et al. (2011). Creation and characterization of a renin knockout rat. *Hypertension* 57, 614–619. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163840
- Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J.-D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., et al. (2015). CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat. Methods* 12, 982–988. doi: 10.1038/nmeth.3543
- Moutal, A., Yang, X., Li, W., Gilbraith, K. B., Luo, S., Cai, S., et al. (2017). CRISPR/Cas9 editing of Nf1 gene identifies CRMP2 as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1-related pain that is reversed by (S)-Lacosamide. *Pain* 158, 2301–2319. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001002
- Mullins, J. J., Peters, J., and Ganten, D. (1990). Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344, 541–544. doi: 10.1038/344541a0
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., and Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* 31, 1120–1123. doi: 10.1093/bioinformatics/btu743
- Nakade, S., Mochida, K., Kunii, A., Nakamae, K., Aida, T., Tanaka, K., et al. (2018). Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system. *Nat. Commun.* 9:3270. doi: 10.1038/s41467-018-05773-6
- Nakagawa, Y., Sakuma, T., Takeo, T., Nakagata, N., and Yamamoto, T. (2018). Electroporation-mediated genome editing in vitrified/warmed mouse zygotes created by IVF via ultra-superovulation. *Exp. Anim.* 67, 535–543. doi: 10.1538/expanim.18-0062
- Nakamura, K., Fujii, W., Tsuboi, M., Tanihata, J., Teramoto, N., Takeuchi, S., et al. (2014). Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci. Rep.* 4:5635. doi: 10.1038/srep05635
- Navabpour, S., Kwapis, J. L., and Jarome, T. J. (2020). A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 108, 732–748. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.12.013
- Nayak, S., Khan, M. A. H., Wan, T. C., Pei, H., Linden, J., Dwinell, M. R., et al. (2015). Characterization of Dahl salt-sensitive rats with genetic disruption of the A2B adenosine receptor gene: implications for A2B adenosine receptor signaling during hypertension. *Purinergic Signal.* 11, 519–531. doi: 10.1007/s1302-015-9470-7
- Negishi, E., Fukuda, N., Otsuki, T., Katakawa, M., Komatsu, K., Chen, L., et al. (2018). Involvement of complement 3 in the salt-sensitive hypertension by activation of renal renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 315, F1747–F1758. doi: 10.1152/ajprenal.00370.2018
- Ness, D., Ren, Z., Gardai, S., Sharpnack, D., Johnson, V. J., Brennan, R. J., et al. (2013). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)-deficient rats exhibit renal tubule injury and perturbations in metabolic and immunological homeostasis. *PLoS One* 8:e66164. doi: 10.1371/journal.pone.0066164
- Nguyen, D. N., Roth, T. L., Li, P. J., Chen, P. A., Apathy, R., Mamedov, M. R., et al. (2020). Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* 38, 44–49. doi: 10.1038/s41587-019-0325-6
- Nielsen, L. N., Winberg, B., Häger, M., Holmberg, H. L., Hansen, J. J., Roepstorff, K., et al. (2014). A novel F8<sup>-/-</sup> rat as a translational model of human hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 12, 1274–1282. doi: 10.1111/jth.12635
- Niewiesk, S., Schneider-Schaulies, J., Ohnismus, H., Jassoy, C., Schneider-Schaulies, S., Diamond, L., et al. (1997). CD46 expression does not overcome the intracellular block of measles virus replication in transgenic rats. *J. Virol.* 71, 7969–7973.
- Niihori, M., Eccles, C. A., Kurdyukov, S., Zemskova, M., Varghese, M. V., Stepanova, A. A., et al. (2020). Rats with a human mutation of NFU1 develop pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 62, 231–242. doi: 10.1165/rcmb.2019-0065OC
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., et al. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 353:aaf8729. doi: 10.1126/science.aaf8729
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., et al. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156, 935–949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001
- Nishitani, A., Kunisawa, N., Sugimura, T., Sato, K., Yoshida, Y., Suzuki, T., et al. (2019). Loss of HCN1 subunits causes absence epilepsy in rats. *Brain Res.* 1706, 209–217. doi: 10.1016/j.brainres.2018.11.004
- Nishitani, A., Nagayoshi, H., Takenaka, S., Asano, M., Shimizu, S., Ohno, Y., et al. (2020). Involvement of NMDA receptors in tremor expression in *Aspa/Hcn1* double-knockout rats. *Exp. Anim.* 69, 388–394. doi: 10.1538/expanim.20-0025
- Nishitani, A., Tanaka, M., Shimizu, S., Kunisawa, N., Yokoe, M., Yoshida, Y., et al. (2016). Involvement of aspartoacylase in tremor expression in rats. *Exp. Anim.* 65, 293–301. doi: 10.1538/expanim.16-0007

- Noto, F. K., Adjan-Steffey, V., Tong, M., Ravichandran, K., Zhang, W., Arey, A., et al. (2018). Sprague dawley Rag2-null rats created from engineered spermatogonial stem cells are immunodeficient and permissive to human xenografts. *Mol. Cancer Ther.* 17, 2481–2489. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0156
- Noto, F. K., Sangodkar, J., Adejebi, B. T., Moody, S., McClain, C. B., Tong, M., et al. (2020). The SRG rat, a sprague-dawley Rag2/Il2rg double-knockout validated for human tumor oncology studies. *PLoS One* 15:e0240169. doi: 10.1371/journal.pone.0240169
- Ohtsuka, M., Sato, M., Miura, H., Takabayashi, S., Matsuyama, M., Koyano, T., et al. (2018). i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* 19:25. doi: 10.1186/s13059-018-1400-x
- Okada, K., Itoh, H., Kamikubo, Y., Adachi, S., and Ikemoto, M. (2018). Establishment of S100A8 transgenic rats to understand innate property of S100A8 and its immunological role. *Inflammation* 41, 59–72. doi: 10.1007/s10753-017-0664-8
- Okuyama, M., and Funahashi, H. (2012). Glycosaminoglycans improves early development of zona-free 8-cell rat embryos to blastocysts in a chemically defined medium, but not the pregnancy rate following transfer of the blastocysts. *J. Reprod. Dev.* 58, 295–301. doi: 10.1262/jrd.11-092h
- Ong, G. L., and Mattes, M. J. (1989). Mouse strains with typical mammalian levels of complement activity. *J. Immunol. Methods* 125, 147–158. doi: 10.1016/0022-1759(89)90088-4
- Osborn, M. J., Ma, B., Avis, S., Binnie, A., Dilley, J., Yang, X., et al. (2013). High-affinity IgG antibodies develop naturally in Ig-knockout rats carrying germline human IgH/Igk/Igλ loci bearing the rat CH region. *J. Immunol.* 190, 1481–1490. doi: 10.4049/jimmunol.1203041
- Ossart, J., Moreau, A., Autrusseau, E., Ménoret, S., Martin, J. C., Besnard, M., et al. (2018). Breakdown of immune tolerance in AIRE-deficient rats induces a severe autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy-like autoimmune disease. *J. Immunol.* 201, 874–887. doi: 10.4049/jimmunol.1701318
- Ouisse, L.-H., Gautreau-Rolland, L., Devilder, M.-C., Osborn, M., Moyon, M., Visentin, J., et al. (2017). Antigen-specific single B cell sorting and expression-cloning from immunoglobulin humanized rats: a rapid and versatile method for the generation of high affinity and discriminative human monoclonal antibodies. *BMC Biotechnol.* 17:3. doi: 10.1186/s12896-016-0322-5
- Ouisse, L.-H., Remy, S., Lafoux, A., Larcher, T., Tesson, L., Chenouard, V., et al. (2019). Immunophenotype of a Rat model of duchenne's disease and demonstration of improved muscle strength after anti-CD45RC antibody treatment. *Front. Immunol.* 10:2131. doi: 10.3389/fimmu.2019.02131
- Palmer, N., and Kaldis, P. (2016). "Chapter One - regulation of the embryonic cell cycle during mammalian preimplantation development," in *Current Topics in Developmental Biology Mammalian Preimplantation Development*, ed. M. L. DePamphilis (Cambridge, MA: Academic Press), 1–53. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.05.001
- Palminter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C., et al. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300, 611–615. doi: 10.1038/300611a0
- Pandey, S., and Dvorakova, M. C. (2020). Future perspective of diabetic animal models. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 20, 25–38. doi: 10.2174/1871530319666190626143832
- Panzer, S. E., Wilson, N. A., Verhoven, B. M., Xiang, D., Rubinstein, C. D., Redfield, R. R., et al. (2018). Complete B cell deficiency reduces allograft inflammation and intragraft macrophages in a rat kidney transplant model. *Transplantation* 102, 396–405. doi: 10.1097/TP.0000000000002010
- Patterson, K. C., Hawkins, V. E., Arps, K. M., Mulkey, D. K., and Olsen, M. L. (2016). MeCP2 deficiency results in robust Rett-like behavioural and motor deficits in male and female rats. *Hum. Mol. Genet.* 25, 3303–3320. doi: 10.1093/hmg/ddw179
- Peng, H., Zheng, Y., Zhao, Z., Liu, T., and Li, J. (2018). Recognition of CRISPR/Cas9 off-target sites through ensemble learning of uneven mismatch distributions. *Bioinformatics* 34, i757–i765. doi: 10.1093/bioinformatics/bty558
- Peng, W., Li, M., Li, H., Tang, K., Zhuang, J., Zhang, J., et al. (2017). Dysfunction of myosin light-chain 4 (MYL4) leads to heritable atrial cardiomyopathy with electrical, contractile, and structural components: evidence from genetically-engineered rats. *J. Am. Heart Assoc.* 6:e007030. doi: 10.1161/JAHA.117.007030
- Phadnis-Moghe, A. S., Chen, W., Li, J., Crawford, R. B., Bach, A., D'Ingillo, S., et al. (2016). Immunological characterization of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) knockout rat in the presence and absence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology* 368–369, 172–182. doi: 10.1016/j.tox.2016.08.019
- Philippeaux, J. (1856). Note sur l'extirpation des capsules surrénales chez les rats albinos (*Mus ratus*). *C. R. Acad. Sci.* 43, 904–906.
- Pickar-Oliver, A., and Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 490–507. doi: 10.1038/s41580-019-0131-5
- Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., Jagomäe, T., Toots, M., Koppel, T., et al. (2017). Wfs1-deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome: insulin-dependent diabetes, optic nerve atrophy and medullary degeneration. *Sci. Rep.* 7:10220. doi: 10.1038/s41598-017-09392-x
- Platt, J. L., and Cascalho, M. (2018). B Cells in transplantation of rat, mouse, and man. *Transplantation* 102, 357–358. doi: 10.1097/TP.0000000000002051
- Ponce de León, V., Mérrilat, A.-M., Tesson, L., Aneón, I., and Hummler, E. (2014). Generation of TALEN-mediated GRdim knock-in rats by homologous recombination. *PLoS One* 9:e88146. doi: 10.1371/journal.pone.0088146
- Pridans, C., Raper, A., Davis, G. M., Alves, J., Sauter, K. A., Lefevre, L., et al. (2018). Pleiotropic impacts of macrophage and microglial deficiency on development in rats with targeted mutation of the Csf1r locus. *J. Immunol.* 201, 2683–2699. doi: 10.4049/jimmunol.1701783
- Qaisar, N., Lin, S., Ryan, G., Yang, C., Oikemus, S. R., Brodsky, M. H., et al. (2017). A critical role for the type I interferon receptor in virus-induced autoimmune diabetes in rats. *Diabetes* 66, 145–157. doi: 10.2337/db16-0462
- Qin, W., Dion, S. L., Kutny, P. M., Zhang, Y., Cheng, A. W., Jillette, N. L., et al. (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics* 200, 423–430. doi: 10.1534/genetics.115.176594
- Quek, H., Luff, J., Cheung, K., Kozlov, S., Gatei, M., Lee, C. S., et al. (2017). Rats with a missense mutation in *Atm* display neuroinflammation and neurodegeneration subsequent to accumulation of cytosolic DNA following unrepaired DNA damage. *J. Leukoc. Biol.* 101, 927–947. doi: 10.1189/jlb.4VMA0716-316R
- Ramírez-Solis, R., Liu, P., and Bradley, A. (1995). Chromosome engineering in mice. *Nature* 378, 720–724. doi: 10.1038/378720a0
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., et al. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154, 1380–1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021
- Ranchoux, B., Antigny, F., Rucker-Martin, C., Hautefort, A., Péchoux, C., Bogaard, H. J., et al. (2015). Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation* 131, 1006–1018. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750
- Ranjha, L., Howard, S. M., and Cejka, P. (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma* 127, 187–214. doi: 10.1007/s00412-017-0658-1
- Rees, H. A., and Liu, D. R. (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat. Rev. Genet.* 19, 770–788. doi: 10.1038/s41576-018-0059-1
- Remy, S., Chenouard, V., Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Brusselle, L., et al. (2017). Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation. *Sci. Rep.* 7:16554. doi: 10.1038/s41598-017-16328-y
- Remy, S., Tesson, L., Ménoret, S., Usal, C., De Cian, A., Thepenier, V., et al. (2014). Efficient gene targeting by homology-directed repair in rat zygotes using TALE nucleases. *Genome Res.* 24, 1371–1383. doi: 10.1101/gr.171538.113
- Renaud, J.-B., Boix, C., Charpentier, M., De Cian, A., Cochenne, J., Duvernois-Berthet, E., et al. (2016). Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Rep.* 14, 2263–2272. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.018
- Renaud, S. J., Scott, R. L., Chakraborty, D., Rumi, M. A. K., and Soares, M. J. (2017). Natural killer-cell deficiency alters placental development in rats. *Biol. Reprod.* 96, 145–158. doi: 10.1095/biolreprod.116.142752

- Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L., and Corn, J. E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* 34, 339–344. doi: 10.1038/nbt.3481
- Robertson, A. S., Majchrzak, M. J., Smith, C. M., Gagnon, R. C., Devidze, N., Banks, G. B., et al. (2017). Dramatic elevation in urinary amino terminal titin fragment excretion quantified by immunoassay in Duchenne muscular dystrophy patients and in dystrophin deficient rodents. *Neuromuscul. Disord.* 27, 635–645. doi: 10.1016/j.nmd.2017.05.009
- Robertson, L., Pederick, D., Piltz, S., White, M., Nieto, A., Ahladas, M., et al. (2018). Expanding the RNA-guided endonuclease toolkit for mouse genome editing. *CRISPR J.* 1, 431–439. doi: 10.1089/crispr.2018.0050
- Rudemiller, N., Lund, H., Jacob, H. J., Geurts, A. M., Mattson, D. L., and PhysGen Knockout Program (2014). CD247 modulates blood pressure by altering T-lymphocyte infiltration in the kidney. *Hypertension* 63, 559–564. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02191
- Rumi, M. A. K., Dhakal, P., Kubota, K., Chakraborty, D., Lei, T., Larson, M. A., et al. (2014). Generation of Esr1-knockout rats using zinc finger nuclease-mediated genome editing. *Endocrinology* 155, 1991–1999. doi: 10.1210/en.2013-2150
- Samata, B., Kikuchi, T., Miyawaki, Y., Morizane, A., Mashimo, T., Nakagawa, M., et al. (2015). X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) rats for xeno-transplantation and behavioral evaluation. *J. Neurosci. Methods* 243, 68–77. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.01.027
- Sato, M., Takabayashi, S., Akasaka, E., and Nakamura, S. (2020). Recent advances and future perspectives of in vivo targeted delivery of genome-editing reagents to germ cells, embryos, and fetuses in mice. *Cells* 9:799. doi: 10.3390/cells9040799
- Saunders, T. (2020). *Single Copy Transgene Integration in ROSA26 Safe Harbor*. International Society for Transgenic Technologies. Available online at: <https://www.transtechsociety.org/index.php?src=blog&srctype=detail&blogid=19> (accessed September 29, 2020).
- Sayers, E. W., Agarwala, R., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Clark, K., et al. (2019). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 47, D23–D28. doi: 10.1093/nar/gky1069
- Schatoff, E. M., Zafra, M. P., and Dow, L. E. (2019). Base editing the mammalian genome. *Methods* 164–165, 100–108. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.02.022
- Scheimann, J. R., Moloney, R. D., Mahbod, P., Morano, R. L., Fitzgerald, M., Hoskins, O., et al. (2019). Conditional deletion of glucocorticoid receptors in rat brain results in sex-specific deficits in fear and coping behaviors. *eLife* 8:e44672. doi: 10.7554/eLife.44672
- Schwartzberg, P. L., Goff, S. P., and Robertson, E. J. (1989). Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* 246, 799–803. doi: 10.1126/science.2554496
- Scott, K. E., Schormans, A. L., Pacoli, K. Y., De Oliveira, C., Allman, B. L., and Schmid, S. (2018). Altered auditory processing, filtering, and reactivity in the Cntnap2 Knock-out rat model for neurodevelopmental disorders. *J. Neurosci.* 38, 8588–8604. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0759-18.2018
- Shapiro, J., Iancu, O., Jacobi, A. M., McNeill, M. S., Turk, R., Rettig, G. R., et al. (2020). Increasing CRISPR efficiency and measuring its specificity in HSPCs using a clinically relevant system. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17, 1097–1107. doi: 10.1016/j.omtm.2020.04.027
- Shi, Q., Mattson, J. G., Fahs, S. A., Geurts, A. M., Weiler, H., and Montgomery, R. R. (2020). The severe spontaneous bleeding phenotype in a novel hemophilia A rat model is rescued by platelet FVIII expression. *Blood Adv.* 4, 55–65. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000944
- Shimoyama, M., Smith, J. R., Bryda, E., Kuramoto, T., Saba, L., and Dwinell, M. (2017). Rat Genome and Model Resources. *ILAR J.* 58, 42–58. doi: 10.1093/ilar/ilw041
- Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., et al. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154, 180–191.
- Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., et al. (2002). Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J. Clin. Invest.* 109, 1429–1436. doi: 10.1172/JCI13300
- Singh, P., Schimenti, J. C., and Bolcun-Filas, E. (2015). A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics* 199, 1–15. doi: 10.1534/genetics.114.169771
- Sinkevicius, K. W., Morrison, T. R., Kulkarni, P., Caffrey Cagliostro, M. K., Iriah, S., Malmberg, S., et al. (2018). RNaseT2 knockout rats exhibit hippocampal neuropathology and deficits in memory. *Dis. Model Mech.* 11:dmm032631. doi: 10.1242/dmm.032631
- Smith, J. R., Hayman, G. T., Wang, S.-J., Laulederkind, S. J. F., Hoffman, M. J., Kaldunski, M. L., et al. (2020). The year of the rat: the rat genome database at 20: a multi-species knowledgebase and analysis platform. *Nucleic Acids Res.* 48, D731–D742. doi: 10.1093/nar/gkz1041
- Sommer, D., Peters, A., Wirtz, T., Mai, M., Ackermann, J., Thabet, Y., et al. (2014). Efficient genome engineering by targeted homologous recombination in mouse embryos using transcription activator-like effector nucleases. *Nat. Commun.* 5:3045. doi: 10.1038/ncomms4045
- Song, A. J., and Palmiter, R. D. (2018). Detecting and avoiding problems when using the Cre-lox system. *Trends Genet.* 34, 333–340. doi: 10.1016/j.tig.2017.12.008
- Song, J., Yang, D., Xu, J., Zhu, T., Chen, Y. E., and Zhang, J. (2016). RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nat. Commun.* 7:10548. doi: 10.1038/ncomms10548
- Song, T.-J., Lan, X.-Y., Wei, M.-P., Zhai, F.-J., Boeckers, T. M., Wang, J.-N., et al. (2019). Altered behaviors and impaired synaptic function in a novel rat model with a complete Shank3 deletion. *Front. Cell Neurosci.* 13:111. doi: 10.3389/fncel.2019.00111
- Stemmer, M., Thumberger, T., Keyer, M., del, S., Wittbrodt, J., and Mateo, J. L. (2015). CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One* 10:e0124633. doi: 10.1371/journal.pone.0124633
- Sun, J., Kouranova, E., Cui, X., Mach, R. H., and Xu, J. (2013). Regulation of dopamine presynaptic markers and receptors in the striatum of DJ-1 and Pink1 knockout rats. *Neurosci. Lett.* 557(Pt B), 123–128. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.034
- Sun, Y., Chen, X., and Xiao, D. (2007). Tetracycline-inducible expression systems: new strategies and practices in the transgenic mouse modeling. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39, 235–246. doi: 10.1111/j.1745-7270.2007.00258.x
- Sung, Y. H., Baek, I.-J., Kim, D. H., Jeon, J., Lee, J., Lee, K., et al. (2013). Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat. Biotechnol.* 31, 23–24. doi: 10.1038/nbt.2477
- Szabó, P. J., Ebner, J., Konig, X., Hamza, O., Watzinger, S., Trojanek, S., et al. (2021). Cardiovascular phenotype of the Dmdmdx rat – a suitable animal model for Duchenne muscular dystrophy. *Dis. Model. Mech.* 14:dmm047704. doi: 10.1242/dmm.047704
- Szpirer, C. (2020). Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes. *bioRxiv [Preprint]* doi: 10.1101/2020.03.23.003384
- Taheri-Ghahfarokhi, A., Taylor, B. J. M., Nitsch, R., Lundin, A., Cavallo, A.-L., Madeyski-Bengtson, K., et al. (2018). Decoding non-random mutational signatures at Cas9 targeted sites. *Nucleic Acids Res.* 46, 8417–8434. doi: 10.1093/nar/gky653
- Takabayashi, S., Aoshima, T., Kabashima, K., Aoto, K., Ohtsuka, M., and Sato, M. (2018). i-GONAD (improved genome-editing via oviductal nucleic acids delivery), a convenient in vivo tool to produce genome-edited rats. *Sci. Rep.* 8:12059. doi: 10.1038/s41598-018-30137-x
- Takahashi, G., Gurumurthy, C. B., Wada, K., Miura, H., Sato, M., and Ohtsuka, M. (2015). GONAD: genome-editing via oviductal nucleic acids delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci. Rep.* 5:11406. doi: 10.1038/srep11406
- Teixeira, M., Py, B. F., Bosc, C., Laubretton, D., Moutin, M.-J., Marvel, J., et al. (2018). Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Sci. Rep.* 8:474. doi: 10.1038/s41598-017-18826-5
- Teng, F., Cui, T., Feng, G., Guo, L., Xu, K., Gao, Q., et al. (2018). Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov.* 4:63. doi: 10.1038/s41421-018-0069-3
- Terao, M., Tamano, M., Hara, S., Kato, T., Kinoshita, M., and Takada, S. (2016). Utilization of the CRISPR/Cas9 system for the efficient production of mutant mice using crRNA/tracrRNA with Cas9 nickase and FokI-dCas9. *Exp. Anim.* 65, 275–283. doi: 10.1538/expanim.15-0116
- Tesson, L., Charreau, B., Ménoret, S., Gilbert, E., Soullou, J. P., and Anegon, I. (1999). Endothelial expression of Fas ligand in transgenic rats under the

- temporal control of a tetracycline-inducible system. *Transplant. Proc.* 31, 1533–1534.
- Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B. J., Remy, S., et al. (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29, 695–696. doi: 10.1038/nbt.1940
- The Commission to the European Parliament and the Council (2015–2017). *The Commission to the European Parliament and the Council 2019 Report on the Statistics on the use of Animals for Scientific Purposes in the Member States of the European Union in 2015–2017. Eur-lex.* Available online at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1581689520921&uri=CELEX:52020DC0016> [Accessed July 9, 2020].
- Thebault, P., Lhermite, N., Tilly, G., Le Texier, L., Quillard, T., Heslan, M., et al. (2009). The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *J. Immunol.* 183, 3099–3108.
- Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503–512. doi: 10.1016/0092-8674(87)90646-5
- Tong, C., Huang, G., Ashton, C., Wu, H., Yan, H., and Ying, Q.-L. (2012). Rapid and cost-effective gene targeting in rat embryonic stem cells by TALENs. *J. Genet. Genomics* 39, 275–280. doi: 10.1016/j.jgg.2012.04.004
- Tong, C., Li, P., Wu, N. L., Yan, Y., and Ying, Q.-L. (2010). Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 467, 211–213. doi: 10.1038/nature09368
- Tran, N.-T., Bashir, S., Li, X., Rossius, J., Chu, V. T., Rajewsky, K., et al. (2019). Enhancement of precise gene editing by the association of Cas9 with homologous recombination factors. *Front. Genet.* 10:365. doi: 10.3389/fgene.2019.00365
- Trimidal, S. G., Benjamin, R., Bae, J. E., Han, M. V., Kong, E., Singer, A., et al. (2019). Can designer indels be tailored by gene editing?: can indels be customized? *Bioessays* 41:e1900126. doi: 10.1002/bies.201900126
- Tsuchida, T., Zheng, Y.-W., Zhang, R.-R., Takebe, T., Ueno, Y., Sekine, K., et al. (2014). The development of humanized liver with Rag1 knockout rats. *Transplant. Proc.* 46, 1191–1193. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.026
- Tuggle, K. L., Birket, S. E., Cui, X., Hong, J., Warren, J., Reid, L., et al. (2014). Characterization of defects in ion transport and tissue development in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-knockout rats. *PLoS One* 9:e91253. doi: 10.1371/journal.pone.0091253
- Ubel, J. L., Diegel, C. R., Foxa, G. E., Ethen, N. J., Lensing, J. N., Madaj, Z. B., et al. (2020). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5-deficient rats have reduced bone mass and abnormal development of the retinal vasculature. *CRISPR J.* 3, 284–298. doi: 10.1089/crispr.2020.0009
- van Boxtel, R., Gould, M. N., Cuppen, E., and Smits, B. M. G. (2010). ENU mutagenesis to generate genetically modified rat models. *Methods Mol. Biol.* 597, 151–167. doi: 10.1007/978-1-60327-389-3\_11
- van Boxtel, R., Toonen, P. W., van Roekel, H. S., Verheul, M., Smits, B. M. G., Korving, J., et al. (2008). Lack of DNA mismatch repair protein MSH6 in the rat results in hereditary non-polyposis colorectal cancer-like tumorigenesis. *Carcinogenesis* 29, 1290–1297. doi: 10.1093/carcin/bgn094
- van den Brandt, J., Kwon, S.-H., Hünig, T., McPherson, K. G., and Reichardt, H. M. (2005). Sustained pre-TCR expression in Notch1IC-transgenic rats impairs T cell maturation and selection. *J. Immunol.* 174, 7845–7852. doi: 10.4049/jimmunol.174.12.7845
- van Vuuren, A. J., van Roon, J. A. G., Walraven, V., Stuij, I., Harmsen, M. C., McLaughlin, P. M. J., et al. (2006). CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model. *J. Immunol.* 176, 5833–5838. doi: 10.4049/jimmunol.176.10.5833
- Verkuijl, S. A., and Rots, M. G. (2019). The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR-Cas9 editing efficiencies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 55, 68–73. doi: 10.1016/j.copbio.2018.07.005
- Vichaya, E. G., Malik, S., Sominsky, L., Ford, B. G., Spencer, S. J., and Dantzer, R. (2020). Microglia depletion fails to abrogate inflammation-induced sickness in mice and rats. *J. Neuroinflammation* 17:172. doi: 10.1186/s12974-020-01832-2
- Wang, H., Hu, Y.-C., Markoulaki, S., Welstead, G. G., Cheng, A. W., Shivalila, C. S., et al. (2013a). TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nat. Biotechnol.* 31, 530–532. doi: 10.1038/nbt.2595
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., et al. (2013b). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910–918. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.025
- Wang, J., Dang, R., Miyasaka, Y., Hattori, K., Torigoe, D., Okamura, T., et al. (2019a). Null mutation of the endothelin receptor type B gene causes embryonic death in the GK rat. *PLoS One* 14:e0217132. doi: 10.1371/journal.pone.0217132
- Wang, J., Liu, Z., Bellen, H. J., and Yamamoto, S. (2019b). Navigating MARRVEL, a web-based tool that integrates human genomics and model organism genetics information. *J. Vis. Exp.* doi: 10.3791/59542
- Wang, L., Shao, Y., Guan, Y., Li, L., Wu, L., Chen, F., et al. (2015). Large genomic fragment deletion and functional gene cassette knock-in via Cas9 protein mediated genome editing in one-cell rodent embryos. *Sci. Rep.* 5:17517. doi: 10.1038/srep17517
- Wang, L., Wang, J., Cai, W., Shi, Y., Zhou, X., Guo, G., et al. (2017). A critical evaluation of liver pathology in humans with danon disease and experimental correlates in a rat model of LAMP-2 deficiency. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* 53, 105–116. doi: 10.1007/s12016-017-8598-3
- Wang, W., Kutny, P. M., Byers, S. L., Longstaff, C. J., DaCosta, M. J., Pang, C., et al. (2016). Delivery of Cas9 protein into mouse zygotes through a series of electroporation dramatically increases the efficiency of model creation. *J. Genet. Genomics* 43, 319–327. doi: 10.1016/j.jgg.2016.02.004
- Wang, X., Liu, Z., Li, G., Dang, L., Huang, S., He, L., et al. (2020). Efficient gene silencing by adenine base editor-mediated start codon mutation. *Mol. Ther.* 28, 431–440. doi: 10.1016/j.yjmthe.2019.11.022
- Wang, Z., Wang, Y., Wang, S., Gorzalski, A. J., McSwiggin, H., Yu, T., et al. (2020). Efficient genome editing by CRISPR-Mb3Cas12a in mice. *J. Cell. Sci.* 133:jcs240705. doi: 10.1242/jcs.240705
- Wang, Y., Zhou, X.-Y., Xiang, P.-Y., Wang, L.-L., Tang, H., Xie, F., et al. (2014). The meganuclease I-SceI containing nuclear localization signal (NLS-I-SceI) efficiently mediated mammalian germline transgenesis via embryo cytoplasmic microinjection. *PLoS One* 9:e108347. doi: 10.1371/journal.pone.0108347
- Weber, J., Öllinger, R., Friedrich, M., Ehmer, U., Barenboim, M., Steiger, K., et al. (2015). CRISPR/Cas9 somatic multiplex-mutagenesis for high-throughput functional cancer genomics in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 13982–13987. doi: 10.1073/pnas.1512392112
- Wefers, B., Meyer, M., Ortiz, O., Hrabé de Angelis, M., Hansen, J., Wurst, W., et al. (2013). Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3782–3787. doi: 10.1073/pnas.1218721110
- Wetzel, R. A., Fleischer, D. T., and Haviland, D. L. (1990). Deficiency of the murine fifth complement component (C5). A 2-base pair gene deletion in a 5'-exon. *J. Biol. Chem.* 265, 2435–2440.
- Wildner, G. (2019). Are rats more human than mice? *Immunobiology* 224, 172–176. doi: 10.1016/j.imbio.2018.09.002
- Xia, C.-H., Ferguson, I., Li, M., Kim, A., Onishi, A., Li, L., et al. (2018). Essential function of NHE8 in mouse retina demonstrated by AAV-mediated CRISPR/Cas9 knockdown. *Exp. Eye Res.* 176, 29–39. doi: 10.1016/j.exer.2018.06.026
- Xu, C., Qi, X., Du, X., Zou, H., Gao, F., Feng, T., et al. (2017). piggyBac mediates efficient in vivo CRISPR library screening for tumorigenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 722–727. doi: 10.1073/pnas.1615735114
- Xu, J., Zhang, L., Xie, M., Li, Y., Huang, P., Saunders, T. L., et al. (2018). Role of complement in a rat model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *J. Immunol.* 200, 4094–4101. doi: 10.4049/jimmunol.1701716
- Xu, Y., Wu, Z., Liu, L., Liu, J., and Wang, Y. (2019). Rat model of cockayne syndrome neurological disease. *Cell Rep.* 29, 800.e5–809.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.028
- Xu, Y., Zhao, X.-M., Liu, J., Wang, Y.-Y., Xiong, L.-L., He, X.-Y., et al. (2020). Complexin I knockout rats exhibit a complex neurobehavioral phenotype including profound ataxia and marked deficits in lifespan. *Pflugers. Arch.* 472, 117–133. doi: 10.1007/s00424-019-02337-5
- Yamamoto, S., Ooshima, Y., Nakata, M., Yano, T., Nishimura, N., Nishigaki, R., et al. (2015). Efficient gene-targeting in rat embryonic stem cells by CRISPR/Cas and generation of human kynurenine aminotransferase II (KAT II) knock-in rat. *Transgenic Res.* 24, 991–1001. doi: 10.1007/s11248-015-9909-1

- Yang, J., Yi, N., Zhang, J., He, W., He, D., Wu, W., et al. (2018). Generation and characterization of a hypothyroidism rat model with truncated thyroid stimulating hormone receptor. *Sci. Rep.* 8:4004. doi: 10.1038/s41598-018-22405-7
- Yang, L., Zhang, X., Wang, L., Yin, S., Zhu, B., Xie, L., et al. (2018). Increasing targeting scope of adenosine base editors in mouse and rat embryos through fusion of TadA deaminase with Cas9 variants. *Protein Cell* 9, 814–819. doi: 10.1007/s13238-018-0568-x
- Yang, X., Zhou, J., He, J., Liu, J., Wang, H., Liu, Y., et al. (2018). An immune system-modified rat model for human stem cell transplantation research. *Stem Cell Rep.* 11, 514–521. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.06.004
- Yang, L., Ikeda, H., Lai, Y., Yoshiki, T., and Takada, K. (2003). Epstein-barr virus infection of rat lymphocytes expressing human CD21 results in restricted latent viral gene expression and not in immunoblastic transformation. *J. Med. Virol.* 70, 126–130. doi: 10.1002/jmv.10369
- Yang, X., Lu, D., Zhang, X., Chen, W., Gao, S., Dong, W., et al. (2019). Knockout of ISCA1 causes early embryonic death in rats. *Anim. Model. Exp. Med.* 2, 18–24. doi: 10.1002/ame2.12059
- Yao, X., and Verkman, A. S. (2017a). Complement regulator CD59 prevents peripheral organ injury in rats made seropositive for neuromyelitis optica immunoglobulin G. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:57. doi: 10.1186/s40478-017-0462-4
- Yao, X., and Verkman, A. S. (2017b). Marked central nervous system pathology in CD59 knockout rats following passive transfer of Neuromyelitis optica immunoglobulin G. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:15. doi: 10.1186/s40478-017-0417-9
- Yao, X., Wang, X., Hu, X., Liu, Z., Liu, J., Zhou, H., et al. (2017). Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res.* 27, 801–814. doi: 10.1038/cr.2017.76
- Ye, L., Park, J. J., Dong, M. B., Yang, Q., Chow, R. D., Peng, L., et al. (2019). In vivo CRISPR screening in CD8 T cells with AAV-sleeping beauty hybrid vectors identifies membrane targets for improving immunotherapy for glioblastoma. *Nat Biotechnol* 37, 1302–1313. doi: 10.1038/s41587-019-0246-4
- Yeh, C. D., Richardson, C. D., and Corn, J. E. (2019). Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nat. Cell Biol.* 21, 1468–1478. doi: 10.1038/s41556-019-0425-z
- Yeo, J. H., Jung, B. K., Lee, H., Baek, I.-J., Sung, Y. H., Shin, H.-S., et al. (2019). Development of a Pde6b gene knockout rat model for studies of degenerative retinal diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60, 1519–1526. doi: 10.1167/iovs.18-25556
- Yoon, Y., Wang, D., Tai, P. W. L., Riley, J., Gao, G., and Rivera-Pérez, J. A. (2018). Streamlined ex vivo and in vivo genome editing in mouse embryos using recombinant adeno-associated viruses. *Nat. Commun.* 9:412. doi: 10.1038/s41467-017-02706-7
- Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B., and Mashimo, T. (2016). ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat. Commun.* 7:10431. doi: 10.1038/ncomms10431
- You, P., Hu, H., Chen, Y., Zhao, Y., Yang, Y., Wang, T., et al. (2016). Effects of melanocortin 3 and 4 receptor deficiency on energy homeostasis in rats. *Sci. Rep.* 6:34938. doi: 10.1038/srep34938
- Yu, D., Zhong, Y., Li, X., Li, Y., Li, X., Cao, J., et al. (2016). Generation of TALEN-mediated FH knockout rat model. *Oncotarget* 7, 61656–61669. doi: 10.18632/oncotarget.11429
- Yu, H., Koilkonda, R. D., Chou, T.-H., Porciatti, V., Mehta, A., Hentall, I. D., et al. (2015). Consequences of zygote injection and germline transfer of mutant human mitochondrial DNA in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E5689–E5698. doi: 10.1073/pnas.1506129112
- Yu, Q., Liu, Y.-Z., Zhu, Y.-B., Wang, Y.-Y., Li, Q., and Yin, D.-M. (2019). Genetic labeling reveals temporal and spatial expression pattern of D2 dopamine receptor in rat forebrain. *Brain Struct. Funct.* 224, 1035–1049. doi: 10.1007/s00429-018-01824-2
- Yu, Y., Guo, Y., Tian, Q., Lan, Y., Yeh, H., Zhang, M., et al. (2020). An efficient gene knock-in strategy using 5'-modified double-stranded DNA donors with short homology arms. *Nat. Chem. Biol.* 16, 387–390. doi: 10.1038/s41589-019-0432-1
- Yu-Taeger, L., Ott, T., Bonsi, P., Tomczak, C., Wassouf, Z., Martella, G., et al. (2020). Impaired dopamine- and adenosine-mediated signaling and plasticity in a novel rodent model for DYT25 dystonia. *Neurobiol. Dis.* 134:104634. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104634
- Zallar, L. J., Tunstall, B. J., Richie, C. T., Zhang, Y. J., You, Z. B., Gardner, E. L., et al. (2019). Development and initial characterization of a novel ghrelin receptor CRISPR/Cas9 knockout wistar rat model. *Int. J. Obes.* 43, 344–354. doi: 10.1038/s41366-018-0013-5
- Zan, Y., Haag, J. D., Chen, K.-S., Shepel, L. A., Wigington, D., Wang, Y.-R., et al. (2003). Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat. Biotechnol.* 21, 645–651. doi: 10.1038/nbt830
- Zhang, H., Pan, H., Zhou, C., Wei, Y., Ying, W., Li, S., et al. (2018). Simultaneous zygotic inactivation of multiple genes in mouse through CRISPR/Cas9-mediated base editing. *Development* 145:dev168906. doi: 10.1242/dev.168906
- Zhang, T., Jiang, X., Xu, M., Wang, H., Sang, X., Qin, M., et al. (2018). Sleep and circadian abnormalities precede cognitive deficits in R521C FUS knockin rats. *Neurobiol. Aging* 72, 159–170. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.08.025
- Zhang, J.-P., Li, X.-L., Li, G.-H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G. D., et al. (2017). Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol.* 18:35. doi: 10.1186/s13059-017-1164-8
- Zhang, L., Shao, Y., Li, L., Tian, F., Cen, J., Chen, X., et al. (2016). Efficient liver repopulation of transplanted hepatocyte prevents cirrhosis in a rat model of hereditary tyrosinemia type I. *Sci. Rep.* 6:31460. doi: 10.1038/srep31460
- Zhang, X., Liang, P., Ding, C., Zhang, Z., Zhou, J., Xie, X., et al. (2016). Efficient production of gene-modified mice using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Sci. Rep.* 6:32565. doi: 10.1038/srep32565
- Zhao, Y., Yang, Y., Xing, R., Cui, X., Xiao, Y., Xie, L., et al. (2018). Hyperlipidemia induces typical atherosclerosis development in Ldlr and apoE deficient rats. *Atherosclerosis* 271, 26–35. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.015
- Zheng, R., Fang, X., He, L., Shao, Y., Guo, N., Wang, L., et al. (2018). Generation of a primary hyperoxaluria type 1 disease model via CRISPR/Cas9 system in rats. *Curr. Mol. Med.* 18, 436–447. doi: 10.2174/1566524019666181212092440
- Zheng, R., Li, Y., Wang, L., Fang, X., Zhang, J., He, L., et al. (2020). CRISPR/Cas9-mediated metabolic pathway reprogramming in a novel humanized rat model ameliorates primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 98, 947–957. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.049
- Zhou, X., Xu, C., Zou, Z., Shen, X., Xie, T., Zhang, R., et al. (2019). The characteristics of glucose metabolism in the sulfonylurea receptor 1 knockout rat model. *Mol. Med.* 25:2. doi: 10.1186/s10020-018-0067-9
- Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S., and Jaenisch, R. (1989). Germline transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 342, 435–438. doi: 10.1038/342435a0
- Zschemisch, N.-H., Glage, S., Wedekind, D., Weinstein, E. J., Cui, X., Dorsch, M., et al. (2012). Zinc-finger nuclease mediated disruption of Rag1 in the LEW/Ztm rat. *BMC Immunol.* 13:60. doi: 10.1186/1471-2172-13-60

**Conflict of Interest:** YC and VC are genOway employees.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Chenouard, Remy, Tesson, Ménoret, Ouisse, Cherifi and Anegon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Annexe 2 : Figures et tableaux supplémentaires « Highly Efficient Knockin in Human iPS Cells and Rat Embryos by CRISPR/Cas9 Molecular Optimization »

## Highly Efficient Knockin in Human iPS Cells and Rat Embryos by CRISPR/Cas9 Molecular Optimization

Vanessa Chenouard<sup>1,2</sup>, Isabelle Leray<sup>3</sup>, Laurent Tesson<sup>1</sup>, Séverine Remy<sup>1</sup>, Agnès Fortun<sup>4,5</sup>, Karine Bernardeau<sup>4,6</sup>, Yacine Cherifi<sup>2</sup>, Laurent David<sup>1,3</sup>, Ignacio Anegon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Nantes, [CHU Nantes], Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France

<sup>2</sup>genOway, Lyon, 69007, France

<sup>3</sup>Nantes Université, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS3556, Nantes, France

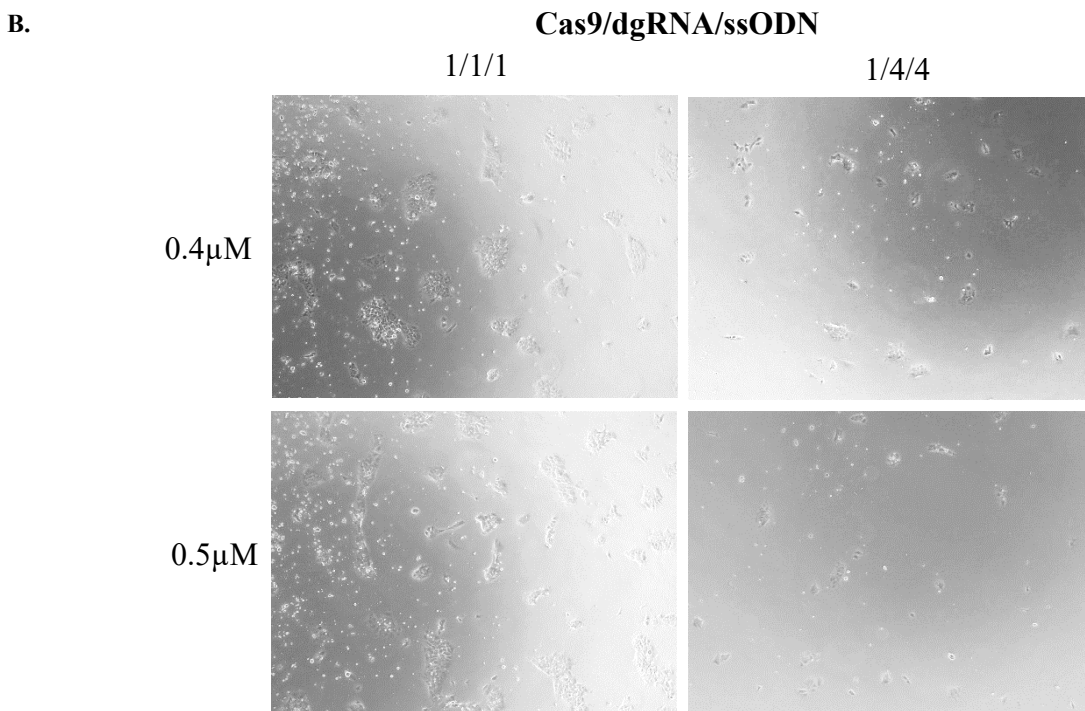
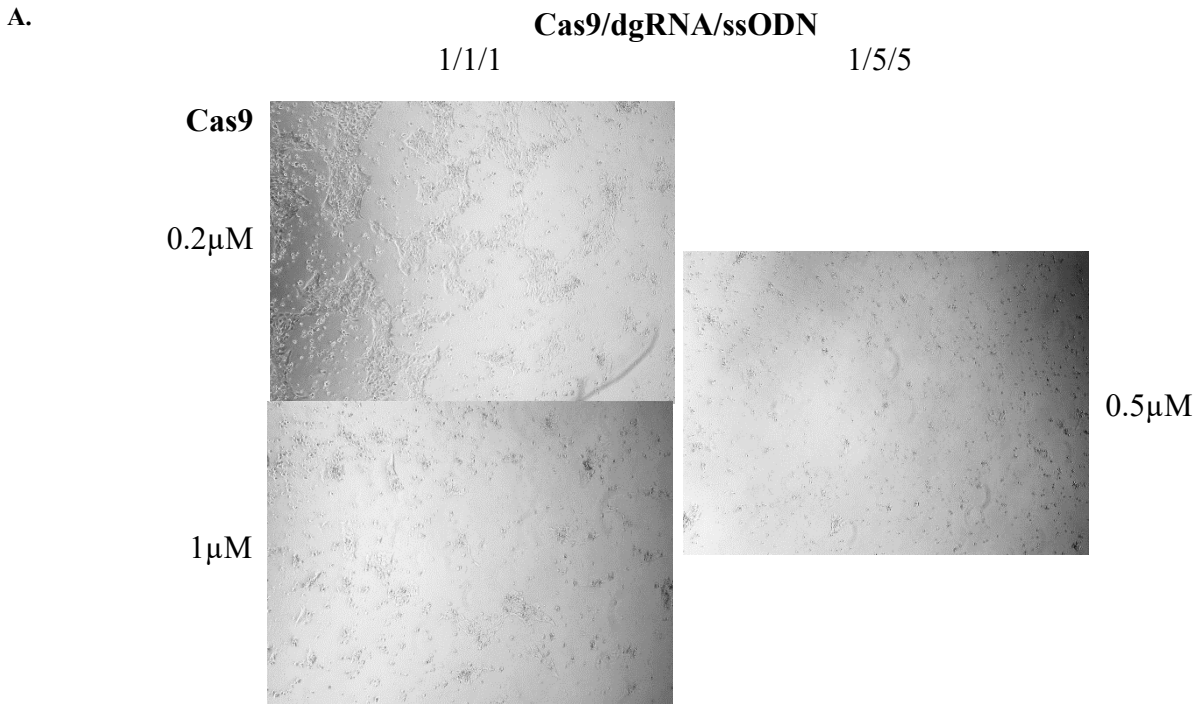
<sup>4</sup>P2R « Production de protéines recombinantes », CRCINA, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>5</sup>Nantes Université, CHU de Nantes, Cibles et médicaments des infections et du cancer, IICiMed, EA 1155, F-44000 Nantes, France

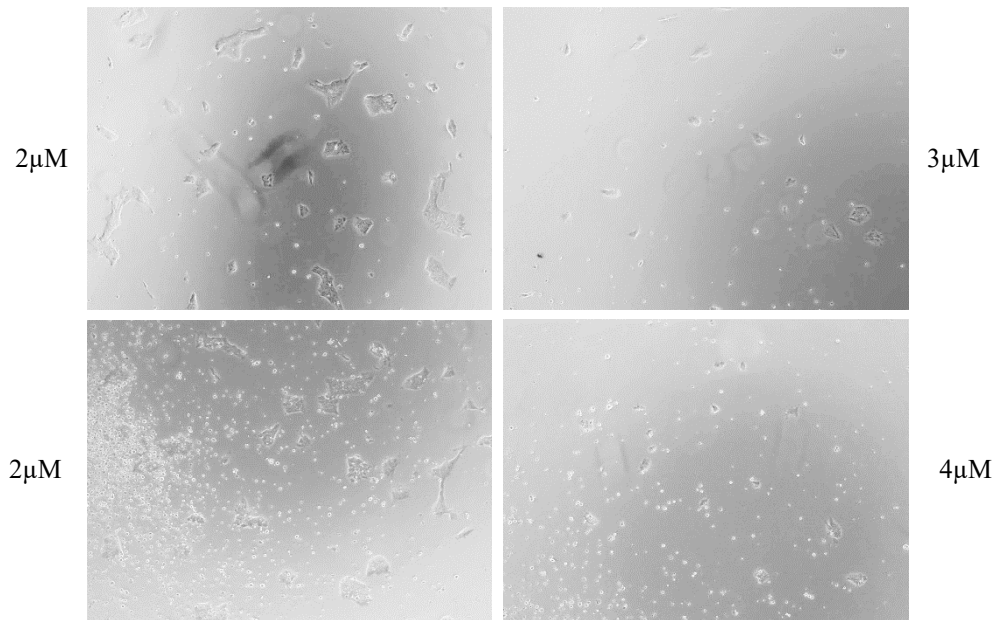
<sup>6</sup>Université de Nantes, Inserm, CRCINA, F-44000 Nantes, France

**\*Correspondence:**

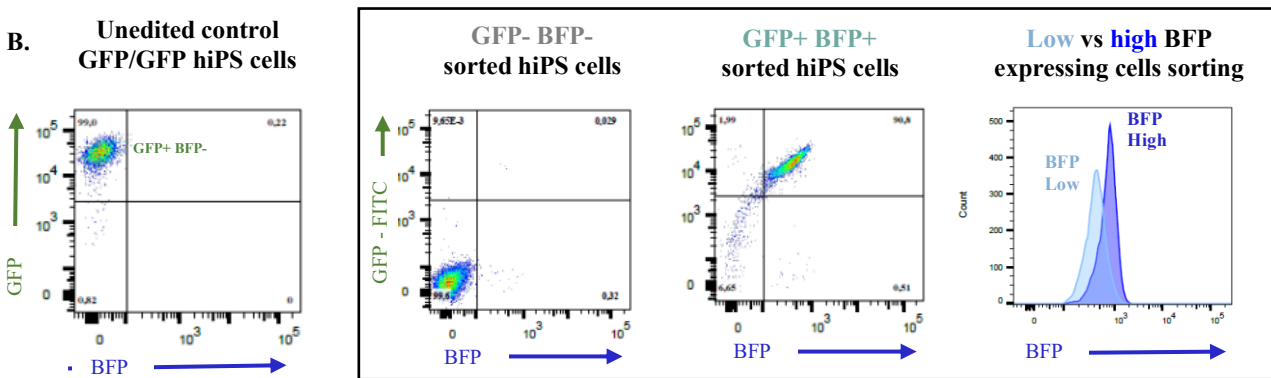
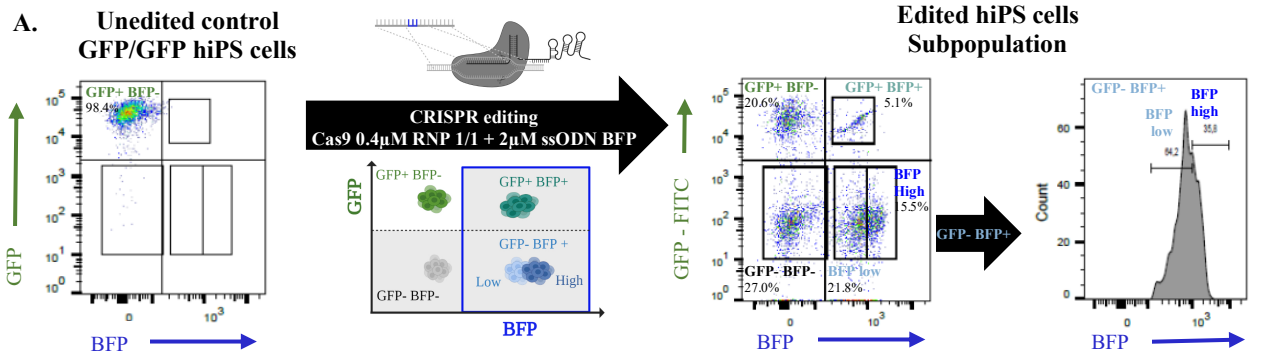
[ianegon@nantes.inserm.fr](mailto:ianegon@nantes.inserm.fr)



**Figure S1: Observation of hiPS cells culture and formation of colonies with Zeiss Axio vert.A1 microscope (5X) 2 days after electroporation of Cas9 protein with ratio Cas9/dgRNA/ssODN. A.** Cells edited with 0.2μM of Cas9 protein ratio Cas9/dgRNA/ssODN 1/1/1 formed nice colonies indicating that they have well recovered from electroporation 2 days later (35% of confluency). In comparison, cells electroporated with 0.5μM ratio 1/5/5 and 1μM of Cas9 with 1/1/1 display much more toxicity (about 5 and 15% of confluency, respectively) and form less and smaller colonies. **B.** Cells electroporated with ratio 1/4/4 and 0.4 and 0.5μM of Cas9 showed 5 times more toxicity (5% and 3% confluency, respectively) than the same concentration of Cas9 with ratio 1/1/1 (25% of confluency for both conditions). Ratio 1/1/1 allow formation of numerous colonies compared to higher ratios. dgRNA, dual guide RNA; ssODN, single-stranded oligonucleotide.



**Figure S2: Microscopic observation with Zeiss Axio vert.A1 microscope (5X) of hiPS cells 2 days post-electroporation with Cas9 0.4μM, RNP ratio Cas9/dgRNA 1/1 and 2, 3 or 4μM of ssODN. Electroporation of 3μM and 4μM of ssODN with Cas9 0.4μM and RNP ratio 1/1 shows low confluences (10% and 5% respectively compared to their 2μM control (25% and 20%, respectively)). Moreover, with 2μM of ssODN, hiPS cells form numerous colonies compared to higher concentrations. dgRNA, dual guide RNA; ssODN, single-stranded oligonucleotide.**



**Figure S3: Cell sorting strategies to discriminate subpopulations obtained by CRISPR/Cas9 edition with 0.4 $\mu$ M of Cas9 RNP ratio (Cas9/dgRNA) 1/1 and 2 $\mu$ M of ssODN BFP. Phenotyping of hiPS cells GFP expressing cells edited with 0.4 $\mu$ M of Cas9 RNP ratio (Cas9/dgRNA) 1/1 and 2 $\mu$ M of ssODN before **A.** and after **B.** cell sorting of GFP-BFP-, GFP+ BFP+, GFP- BFP low and GFP- BFP high subpopulations. hiPS, human induced pluripotent stem cells; GFP, Green Fluorescent Protein; BFP, Blue Fluorescent Protein; ssODN, single-stranded oligonucleotide.**

**Table S1. CRISPR/Cas9 mediated edition and KI generation on rat embryos with dgRNA rEphx2 and ssODN XbaI.**

Cas9 (μM)	Ratio RNP (Cas9/dgRNA)	ssODN (μM)	No. of days of electroporation	No. of foster females used	No. of analyzed /No. of transferred embryos (%)	No. edited embryos, include KI (%)	No. KI embryos (%)
0.1	1/1	2	4	4	26 / 104 (25.0%)	19 (73.1%)	8 (30.8%)
0.2	1/1	2	3	4	30 / 108 (27.8%)	29 (96.8%)	16 (51.6%)
0.4	1/1	2	3	4	39 / 115 (33.9%)	37 (94.9%)	13 (34.2%)
0.2	1/2	2	3	3	24 / 88 (27.3%)	24 (100%)	9 (37.5%)

ssODN, single-stranded oligonucleotide; KI, knockin.

**Table S2. dgRNA, ssODN and genotyping primers sequences.**

Reactifs	Name	Sequence (5'-3')	Ref.
gRNA	rEphx2 2.3	GTGGCCGCGTTCGACCTTGA	(Remy et al., 2017)
	EGFP 2	CTCGTGACCACCTGACCTA	(Glaser et al., 2016)
ssODN	rEphx2 KI XbaI	*G*C*T*GCAGCCCGGCCATCATGGCGTGC GTGTGGCCGCTTCGctCTa GACGGAGTGTGGCCCTCCCCTCTATAGCCGGGGTCTGCGCCACACC*G *A*G*G	(Remy et al., 2017)
	ssODN BFP2 antisense	*G*G*C*ATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTA GCGGCTGAAGCACTGCACCCCGTGGCTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGC CAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTC*A*G*G*GT	(Glaser et al., 2016)
HMA-CE primers	rEphx2 Up	GGCAGGGTTTCTAGTTCTTGG	(Remy et al., 2017)
	rEphx2 Lo	TCTTGTAAACTGAGGCGGGTA	(Remy et al., 2017)
	rEphx2-LongUp	ACCTCATCATTCCTCCTCAGTT	
	rEphx2-Lo2	GTGACTGGAGGCGATGTTGT	
	rEphx2-Lo4	CACGGCAACACCAGAGCTTA	
	GFP-Up1	CGTAAACGGCCACAAGTTCA	
	GFP-Lo4	CTTG TAGTTGCCGTGCCT	
qPCR primers	rEphx2-188For	GGCGTCTCTAGTCTTAGGTTT	
	rEphx2-WT16Rev	AGCACTCCGTCAAGGT	
	rEphx2-KI16Rev	AGCACTCCGTCTAGAG	
	rAnks3-205For	CCCCAGCCTCCCACTTGTC	
	rAnks3-205Rev	AGGATGACTGAAATTGGTGGAGTTGC	

\*indicates bases with phosphorothioate modification. ssODN, single-stranded oligonucleotide; KI, knockin, qPCR, HMA-CE, heteroduplex mobility assay by capillary electrophoresis; quantitative polymerase chain reaction; GFP, Green Fluorescent Protein; BFP, Blue Fluorescent Protein; hiPS, human induced pluripotent stem cells.

# ANNEXE 3 : Génotypes des embryons de rats édités sur le locus rEphx2

Session	Conditions Cas9 (Ratio Cas9/gARN) + ssODN	E14	GENOTYPE				qPCR analysis				HMA-CE analysis			Sequencing analysis			
			KI	Indels (Sanger 670bp)	PCR Large deletion (HMA-CE 2,2 or 3,7Kb) or qPCR (Ex2 or 5p)		Edition	%WT	%KI	% Remaining	%Ex2	%5p	Dig. XbaI (Up-Lo)	Large Del (LongUp-Lo2) 2161 bp	Large Del (LongUp-Lo4) 3696 bp	Sanger manual reading	ICE tool sur PCR Up-Lo
#18	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E153	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0			-	Del 474	Del 1044	Del 56 bp/ins 23 bp	+12_15% / -18_4% / -8_4% / -12_1% / -13_1% / -9_1%	
#18	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E154	-	+	+	+	0,1	0,2	99,7			+	Del 367 / Del 1135	Del 389 / Del 1288	XbaI site with ins 2 bp (GT)tctaga "Ho"	+2_90% / -25_1%	
#18	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E155	-	+	-	+	16,3	0,0	83,7			-	-	-	WT/del 16 bp/?	-16_30% / -23_24% / +3_14% / WT 14% / -16_12%	
#18	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E156	+	+	+	+	0,0	12,1	87,9			+	Del 441	Del 748	KI /Del 8 bp?	-8_61% / KI_28% / -8_5%	
#18	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E157	+	+	-	+	0,1	22,2	77,8			+	-	-	KI/Del 6bp (Del11bp+ins5bp)	KI_41% / -6_36% / -6_13% / WT_5% / +7_1%	
#18	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E158	+	+	-	+	11,5	12,4	76,1			+	-	-	mosaic WT/KI/Del 6bp/?	-6_28% / -1_27% / WT_19% / KI_8% / -6_6% / +4_5%	
#18	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E159	+	+	+	+	0,6	10,0	89,3			+	Del 441	Del 699	KI/Del 48 bp/Del 6bp	KI_30% / -6_25% / WT_25% / -6_3% / -10_2% / +14_1% / +8_1% / -5_1%	
#22	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E177	-	+	-	+	60,5	0,0	39,4			-	-	-	WT/Del 6 bp	WT_48% / -6_35% / -6_12%	
#22	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E178	+	-	+	+	0,5	70,7	28,8	75,7	92,0	+	-	-	KI	KI_100%	
#22	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E179	+	+	-	+	36,0	4,0	60,0			+	(weak)	-	-	WT/Del 6bp	WT_57% / -6_28% / -6_9%
#22	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E180	-	+	-	+	55,7	0,5	43,8			-	-	-	WT/Del 5 bp (Del6bp+ins1bp)	WT_55% / -5_41%	
#22	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E181	+	+	+	+	3,9	2,1	94,0			+	(weak)	Del 285	Del 366	Del 290 bp/Del 23 bp(del32+ins9bp)	-30_6% / -28_4% / -3_3% / +6_2% / -20_2% / -16_2% / - 14_1% / -11_1%
#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E182	-	+	+	+	1,0	0,0	99,0			-	Del 878	Del 1145	WT/Del 34 bp	WT_41% / +1_8% / -27_4% / -9_4% / -16_2% / -22_2% / - 29_1%	
#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E183	-	+	+	+	0,3	0,0	99,7			-	Del 475	Del 675	Del 6 bp	-6_95% / -6_4%	

#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E184	+	+	+	+	0,2	16,1	83,6		+	Del 963 / Del 839	Del 1064	KI/Del 6 bp	-6_38% / <b>KI_35%</b> / -6_17% / <b>WT_4%</b> / -6_3%	
#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E185	-	+	+	+	1,4	0,0	98,5		-	Del 967 / Del 470	Del 1055 / Del 668	Del 6 bp	-6_100%	
#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E186	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9		-	Del 540	Del 668	Del 6 bp/Del 516 bp	-6_100%	
#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E187	-	+	+	+	0,3	12,4	87,3	89,3	82,6	+	del <100 (18/08/21) et XbaI neg(19/08)	Del 2269	Del 16 bp/ins 1 bp/ potential XbaI site ?	-16_70% / +1_23% / -16_4% <b>no KI on ICE or TIDER</b>
#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E188	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9		-	Del 520 / Del 307	Del 660	Del 1 bp/Del 6 bp	-1_47% / -6_38% / -6_11%	
#23	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E189	-	+	+	+	0,4	0,0	99,6		-	-	Del 243	Del 144 bp/Del 61 bp	-24_3% / -23_3% / +14_2% / +2_2% / -17_2% / -13_2% / - 29_1% / -5_1% / <b>KI_1%</b>	
#23	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E190	-	-	-	-	105,9	0,0	-5,9		-	-	-	WT	WT_97%	
#23	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E191	+	+	-	+	0,0	42,8	57,1		+	-	-	Mosaic <b>KI</b> /WT/Del 22 bp/Del 1 bp?	<b>KI_34%</b> / -22_22% / -1_21% / <b>WT_13%</b> / -22_6%	
#23	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E192	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0		-	Del 436	Del 1401 / Del 724	Del 6 bp	-6_89% / -6_9%	
#23	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E193	-	+	-	+	64,5	0,0	35,5		-	-	-	WT/Del 20 bp	WT_62% / -20_31% / KI_3%	
#23	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E194	-	+	-	+	74,1	0,0	25,9		-	-	-	WT/Del 34 bp	WT_83% / +14_2% / -29_1%	
#23	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E195	-	-	-	-	115,9	0,0	-15,9		-	-	-	WT	WT_99%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E196	-	+	-	+	0,1	0,0	99,9		-	-	-	Del 6 bp/Del 9 bp	-6_49% / -9_39% / -9_9%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E197	+	+	-	+	12,8	9,0	78,2		+	-	-	Mosaic <b>Del 185 bp</b> /Del 5 bp/ins 1bp/ <b>WT/KI</b>	-6_67% / <b>KI_14%</b> / <b>WT_4%</b> / -1_2% / +4_1% / -23_1% / - 3_1% / -6_1%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E198	-	+	-	+	22,0	0,0	78,0		-	-	-	Mosaic <b>Del 143 bp</b> /WT/Del 9bp?	<b>WT_19%</b> / -9_14% / -1_13% / <b>KI_10%</b> / -10_3% / -15_2% / - 14_2% / -24_1% / -23_1% / - 22_1% / -20_1% / -19_1%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E199	+	+	-	+	0,1	3,3	96,7		+	(weak)	-	Del 14 bp	-14_99%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E200	-	+	-	+	60,9	0,0	39,1		-	-	-	WT/Del 6 bp	WT_49% / -6_36% / -6_9% / - 6_2%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E201	-	-	-	-	109,0	0,0	-9,0		-	-	-	WT	WT_99%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E202	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9		-	Del 563	Del 778	Del 6 bp	-6_100%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E203	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0		-	Del 212	-	Del 6 bp/ins 2 bp	-6_41% / +2_37% / -6_9% / - 6_7%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E204	-	+	+	+	36,3	0,0	63,7		-	-	Del 1456 / Del 2761	WT/ins 2 bp(dell1bp+ins 3bp)	+2_58% / <b>WT_37%</b>	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E205	+	+	-	+	21,6	21,2	57,2		+	-	-	WT/KI/Del 6 bp	-6_32% / <b>WT_25%</b> / <b>KI_25%</b> / -6_11% / -6_3%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E206	+	+	+	+	0,1	36,2	63,7		+	Del 284	Del 416	Del 288 bp + <b>weak KI</b>	-4_3%	
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E207	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9		-	Del 1469	Del 1504	Del 6 bp	-6_99%	

#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E208	-	+	-	+	24,1	0,0	75,9			-	-	-	Mosaic : Del 37 bp/ WT/ ?	+2_28% / WT_23% / -3_15% / -3_9% / +11_4% / -20_1%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E209	-	+	+	+	0,1	22,8	77,1	97,0	98,2	-	Del 1029 and XbaI+ / Del 445	Del 1081 / Del 677	Del 6 bp	-6_98%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E210	-	+	+	+	25,8	0,0	74,2			-	-	Del 1611 / Del 859	Del 6 bp/WT	-6_62% / WT_25% / -6_6% / - 6_5%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E211	+	+	+	+	14,7	29,1	56,2			+	-	Del 893	WT/KI/Del 15 bp(del17+ins2bp)	KI_42% / -15_23% / WT_16% / -15_9% / -15_4%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E212	-	+	-	+	76,4	0,0	23,6			-	-	-	WT/ins 1 bp	WT_68% / +1_29%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E213	-	+	-	+	0,1	0,0	99,9			-	-	-	Del 19 bp/Del 1 bp	-19_47% / -1_40% / -19_2%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E214	-	+	-	+	53,3	0,0	46,7			-	-	-	WT/Del 2 bp	WT_49% / -2_43% / -2_5%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E215	-	+	-	+	0,0	0,0	99,9			-	-	-	Del 1 bp/Del 5 bp	-1_49% / -5_47%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E216	+	+	-	+	0,1	37,6	62,4			+	-	-	KI/Del 6bp	KI_49% / -6_33% / -6_15%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E217	-	+	+	+	31,1	0,0	68,9			-	-	Del 960	WT/Del 9 bp	-9_42% / WT_32% / -9_18% / -9_2%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E218	+	+	+	+	0,0	31,8	68,2			+	-	Del 935 (weak)	KI/Del 1 bp	-1_52% / KI_46%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E219	-	-	missed large Del 3'?	+	82,4	0,0	17,6	100,1	105,0	-	-	-	WT (+ noise)	WT_94% / -1_4%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E220	+	+	-	+	21,2	27,5	51,4			+	-	-	Ins 5 bp/WT/Del 4 bp/ KI	ins 5 bp_30%/del 4 bp_28%/KI_12%/WT_4%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E221	+	-	missed large Del 3'?	+	0,1	83,0	16,9	98,0	99,6	+	(50% dig XbaI)	(50% dig XbaI)	KI	KI_99%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E222	-	-	missed large Del 3'?	+	74,3	0,0	25,7	93,3	91,7	-	(50% dig XbaI)	(50% dig XbaI)	WT	WT_99%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E229	+	+	-	+	24,2	32,2	43,6			+	-	-	WT/KI/ins 1 bp	Ki 44%/WT 38%/+1 16%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E230	+	+	-	+	0,1	37,4	62,5			+	-	-	KI/Del 31 bp	KI_22% / -26_4% / +7_3% / - 6_3% / -4_3% / -29_2% / - 25_2% / -19_2% / +12_1% / - 30_1% / -14_1% / -7_1% / - 5_1%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E231	-	+	-	+	54,2	0,0	45,7			-	-	-	WT/Del 10 bp/Del 6 bp	WT_52% / -10_22% / -6_10% / -10_7% / -10_3% / -6_2%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E232	-	-	-	-	106,3	0,0	-6,3			-	-	-	WT	WT_99%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E233	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9			-	Del 667	Del 1004	Del 6 bp	-6_99%
#24	0,4µM Cas9 (1/1) + 2µM	E234	+	+	+	+	0,2	40,5	59,3			+	-	Del 1082	WT/KI/ins 1 bp	KI_16%/WT_10%/ins 1 bp_36%/ins 3 bp_31%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E235	-	+	+	+	41,2	0,0	58,8			-	-	Del 884 (weak)	WT/Del 6 bp	WT_44% / -6_43% / -6_9%
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E236	-	-	-	-	93,5	0,0	6,5			-	-	-	WT	WT_99%

#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E237	+	+	-	+	27,7	33,1	39,2			+	-	-	WT/KI + indels/ ?	WT_38% / KI_17% / -8_7% / -5_3% / -29_2% / -24_2% / -19_2% / -7_2% / -4_2% / +1_1% / -11_1% / -3_1%	
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E238	+	-	missed large Del 3'?	+	4,5	64,3	31,2	95,8	103,3	+	(50% dig XbaI)	(50% dig XbaI)	KI	KI_97% / WT_2%	
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E239	+	-	-	+	57,6	25,0	17,4			+	-	-	WT/KI	WT_67% / KI_32%	
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E240	-	+	-	+	30,7	0,0	69,3			-	-	-	WT/ins 1 bp	+1_70% / WT_27%	
#24	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E241	-	+	-	+	2,6	0,0	97,4			-	-	-	Del 1 bp/Del 26 bp/Del 16 bp (+ins3bp ?)	-1_27% / -22_19% / -26_11% / -16_10% / -16_9% / -22_7% / -26_6% / -26_2% / WT_2%	
#24	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E242	-	-	-	-	92,1	0,1	7,8			-	-	-	WT	WT_99%	
#24	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E243	+	-	-	+	50,8	34,7	14,6			+	-	-	WT/KI	WT_54% / KI_45%	
#24	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E244	-	-	-	-	100,1	0,0	-0,1			-	-	-	WT	WT_99%	
#24	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E245	-	+	-	+	78,3	0,0	21,7			-	-	-	WT/Del 6 bp	WT_77% / -6_17% / -6_2% / -6_2%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E246	+	+	+	+	0,0	9,0	91,0			+	-	Del 2896	Del 6 bp / KI	-6_53% / -6_12% / WT_10% / KI_10% / -6_6% / -19_5%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E247	-	+	+	+	0,0	50,3	49,7	114,6	111,9	+	-	Del 938	ins 2 bp (del1bp+ins3bp XbaI site) fake KI	+2_95%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E248	+	-	-	+	0,0	100,0	0,0			+	-	-	KI	KI_99%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E249	-	+	+	+	0,0	0,1	99,9			-	Del 361	Del 580	Del 284 bp/Del 3 bp?	+11_3% / +14_2% / +2_2% / -17_2% / -11_2% / -5_2% / -6_2% / +1_1% / -30_1% / -29_1% / -24_1% / -15_1% / -12_1% / -9_1%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E250	+	-	-	+	55,9	40,8	3,4			+	-	-	WT/KI	WT_55% / KI_44%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E251	+	+	-	+	0,2	16,8	83,0			+	(weak)	-	KI/Del 1 bp/Del 15 bp/del 4 bp	-1_53% / -4_20% / -15_14% / -4_7%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E252	-	+	-	+	0,0	0,1	99,8			-	-	-	Del 5 bp/Del 2 bp (del3+ins1bp)	-2_45% / -5_42% / -5_7% / -2_2%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E253	+	+	-	+	0,0	39,3	60,7			+	-	-	KI/Del 6 bp/? (del1bp+ins1bp)	KI_46% / -6_33% / -6_17%	
#25	0,2µM Cas9 (1/1) + 2µM	E254	+	+	-	+	0,0	39,8	60,2			+	-	-	KI/Del 6 bp	KI_48% / -6_33% / -6_15%	
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E255	-	-	-	-	110,2	0,0	-10,2			-	-	-	WT	WT_99%	
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E256	-	+	+	+	0,3	0,0	99,7			-	Del 1777 / Del 76	Del 1877 / Del 1406 / Del 860 / Del 323	Del 100 bp	+9_1% / -21_1% / -10_1%	
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E257	+	+	+	+	0,1	13,1	86,8			+	(include indels)	Del 1071	Del 1168	KI + noise or big del	-24_1% / -14_1% / -14_1%
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E258	-	-	-	-	113,0	0,0	-13,0			-	-	-	WT	WT_99%	

#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E259	-	-	-	-	105,1	0,0	-5,1		-	-	-	WT	WT_99%		
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E260	+	+	-	+	0,5	32,5	67,0	99,2	99,7	+	(dig XbaI)	(dig XbaI)	KI/Del 6 bp	KI_46% / -6_30% / -6_18% / WT_3%	
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E261	+	+	+	+	0,8	15,6	83,6			+	Del 409	Del 669	KI/Del 1 bp	-1_56% / KI_35% / WT_6%	
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E262	-	+	+	+	0,4	0,0	99,5			-	Del 381 (weak)	Del 148	Del 119 bp + Del 6 bp?	+3_7% / -16_1% / -15_1%	
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E263	-	-	+	+	10,3	0,1	89,6			-	Del 1750 / Del 1344 / Del 539	Del 1804 / Del 1416 / Del 516	WT + noise	WT_96%	
#25	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E264	+	+	+	+	31,1	8,3	60,7			+	Del 293	Del 331	WT/KI/Del 5 bp	WT_68% / KI_15% / -5_11% / -6_2% / -5_2%	
#26	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E275	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9			-	Del 626 / Del 400	Del 117	Del 6 bp	-6_100%	
#26	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E276	+	+	+	+	10,7	27,0	62,3			+	-	Del 2185 / Del 1129	WT/KI/Del 6 bp	KI_39% / -6_32% / WT_18% / -6_9%	
#26	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E277	+	-	missed large Del 3'?	+	0,0	66,9	33,1	90,8	96,2	+	(50% dig XbaI)	(50% dig XbaI)	KI	KI_100%	
#26	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E278	-	+	+	+	0,0	0,1	99,9			-	-	-	Del 6 bp/ Del 5 bp (del 8bp+ins 3 bp)	-6_49% / -5_24% / -5_17% / -5_6%	
#26	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E279	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0			-	-	Del 597	Del 6 bp/Del 10 bp	-6_49% / -10_43% / -10_4% / -6_1%	
#26	0,1µM Cas9 (1/1) + 2µM	E280	-	+	+	+	0,1	0,1	99,9	86,2	95,8	-	-	-	Del 2 bp/?	-2_29% / -2_28% / -6_15% / -2_12% / -5_10% / -5_2%	
#27	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E283	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0			-	Del 305 / Del 612	Del 150-200	Del 238 bp + ins 17 bp	Homozygous large deletion ICE unreadable	
#27	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E284	-	+	+	+	0,7	0,0	99,3			-	Del 381	-	Del 81 bp + ins 3 bp/ins 1 bp	-1_32%/+3_6%/-30_5%	
#27	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E285	+	+	+	+	55,2	16,2	28,6			+	-	Del 1136	WT/KI/Del 6 bp	WT_64%/KI_22%/-6_5%	
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E295	-	+	+	+	0,0	1,3	98,6			-	Del 49	-	Del 6 bp	-6_95%/-6_5%	
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E296	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0			-	Del 396	Del 903	Del 378 bp/ Del 6 bp	large deletion ICE unreadable	
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E297	+	+	+	+	0,0	44,5	55,5			+	Del 351	Del 266	KI/Del 321 bp	large deletion ICE unreadable	
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E298	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0			s	Del 460	-	Del 1 bp	-1_100%	
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E299	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9			-	Del 981	Del 1406 / Del 860 / Del 259	Del 23 bp (del 24bp+ins1bp)	-23_98%	
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E300	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9	96,3	100,1	+	(include indels)	Del 688	visible deletion (large peak)	iunreadable x2	-1_19%/-23_16%/WT_15%/-6_13%/...
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E301	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0			+	(include indels)	Del 733 / Del 486	Del 942	unreadable x2	WT_37%/-23_11%/-6_11%
#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E302	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0			+	Del 194	Del 1534	Del 183 bp and XbaI/ KI but primer rEphX2-188F deleted	large deletion ICE unreadable	

#28	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E303	+	+	-	+	0,0	39,1	60,9		+	-	-	KI/Del 6 pb	KI/Del 6 pb (ICE KI 48% Del 6pb 36%et 13%)
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E320	-	+	+	+	0,0	0,0	100,0		-	-	Del 605	Del 9 bp	-9_99%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E321	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9	100,9 111,3	-	Del 158	Del about 100	Del 105 bp	large deletion ICE unreadable
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E322	+	+	+	+	0,2	16,4	83,4		+	-	Del 1196 / Del 682	KI/Del 30 bp/Del 10 bp	KI_31%/-10_29%/-30_25%/-10_6%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E323	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9		-	Del 545	Del 1054	Del 23 bp/Del 5 bp	-23_72%/-5_7 et 5 et 3%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E324	-	+	+	+	0,1	0,0	99,9	107,0 110,1	-	Del 303	Del 865	Del 359 bp/Del 5 bp	-5_31/-5_25%/-5_6%/-22_3%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E325	+	+	+	+	38,9	10,7	50,4	105,6 106,6	+	Del 777	Del 940	Del 28 bp/WT/KI	WT_67%/KI_17%/-28_11%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E326	-	+	+	+	0,2	0,0	99,8	97,1 95,1	-	visible deletion (large peak)	Del 865	Del 173 bp/ ins 1 bp (del 4bp+ins5bp)	Del 177bp/Del 3+ins4bp
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E327	-	+	+	+	41,7	0,0	58,3		-	Del 944	-	WT/Del 23 bp	WT_74%/-23_23%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E328	+	+	-	+	63,0	31,8	5,3		+	-	-	WT/KI/Del 6 bp	-
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E329	+	+	-	+	11,8	20,0	68,3		+	-	-	WT/KI/Del 23 bp	WT_36%/-23_31%/KI_27%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E330	+	+	+	+	0,1	9,7	90,2		+	Del 423 (weak)	-	KI/Del 1 bp/Del 6 bp	-1_53%/KI_19%/-6_15%
#29	0,2µM Cas9 (1/2) + 2µM	E331	+	+	+	+	0,0	44,9	55,1		+	-	Del 861	Del 19 bp/KI	KI_53%/-19_40%

## Caractérisation du système CRISPR/Cas9 et amélioration de l'édition de génome pour la génération de cellules iPS humaines et de rats génétiquement modifiés

**Mots clés :** Edition de génome, CRISPR/Cas9, iPS, transgénèse rat, NanoDSF, clivage *in vitro*

**Résumé :** CRISPR/Cas9 a révolutionné l'édition de génome en l'élargissant à des espèces animales et des types cellulaires variés. Les nombreuses études sur CRISPR permettent une bonne compréhension générale du système (études cristallographiques, enzymatiques et mécanistiques...). Toutefois, il reste encore de nombreux aspects à étudier pour une meilleure maîtrise de l'édition de génome et une meilleure efficacité de génération de modèles génétiquement modifiés, même pour les plus complexes. Ces derniers nécessitent l'insertion d'une large séquence ADN (cassette d'expression, gène rapporteur, système conditionnel...) ou plusieurs séquences contenant une structure particulièrement complexe (double insertion de sites loxP flanquant un exon...) qui diminuent fortement l'efficacité de recombinaison homologue requise pour leur génération. J'ai donc caractérisé la base moléculaire du système CRISPR/Cas9. En particulier, j'ai étudié la formation du complexe RNP par différentes techniques notamment la « Nano Differential Scanning Fluorimetry » et sa fonctionnalité clivage *in*

*vitro*. Ces études m'ont permises de démontrer que, dans des conditions optimales de formation de ce complexe (tampon, Cas9, guide ARN...), un ratio Cas9 protéine /dual guide ARN 1/1 est suffisant. J'ai donc appliqué ce principe aux cellules iPS humaines et embryons de rats pour confirmer ces résultats et déterminer *in vivo* les concentrations optimales de Cas9 et court donneur ADN afin d'obtenir les meilleurs taux d'insertion d'une courte séquence simple. Cette preuve de concept nous a permis d'obtenir plus de 50% de succès dans les deux modèles utilisés. En parallèle, nous avons tenté deux approches d'import d'un donneur ADN via le guide ARN qui ne nous ont pas permis d'améliorer la génération de nos modèles mais d'autres stratégies de ce type sont en cours. L'ensemble de ces résultats permettra un emploi de CRISPR/Cas9 plus maîtrisée et ouvre la voie à une réflexion sur l'optimisation de l'utilisation des longs donneurs ADN pour la génération de modèles complexes de façons plus efficaces et maîtrisée.

## CRISPR/Cas9 system characterization and genome editing improvement for genetically modified human iPS cells and rat embryos generation

**Keywords :** genome editing, CRISPR/Cas9, iPS, rat transgenesis, NanoDSF, cleavage *in vitro*

**Abstract :** CRISPR/Cas9 has revolutionized genome editing by spreading human modeling to a large variety of species and types of cells. The numerous studies of this system have accelerated its understanding, in particular crystallography, enzymatic and mechanistic studies. Nevertheless, a large number of aspects remained to be studied for better control of genome editing and for improved genetically modified model's generation efficacy, especially for complex models. To generate those ones, insertion of large DNA sequence (expression cassette, reporter, conditional system...) or multiple sequences with complex structure (double insertion of loxP sites flanking exons...) is required. Those particularities reduce homologous recombination used for their generation. Thus, I have characterized the molecular basis of CRISPR/Cas9 system. In particular, I have studied RNP complex formation by different technics, in particular "Nano Differential

Scanning Fluorimetry", and its functionality by *in vitro* cleavage. I have demonstrated that using optimal RNP complex formation conditions (buffer, Cas9, guide RNA...) Cas9 protein/dual guide RNA ratio 1/1 is enough. We have next applied those settings to human iPS cells and rat embryos to confirm them *in vivo*. We also determine optimal Cas9 and short DNA donor concentrations to improve insertion efficiency. This proof of concept allowed us to reach more than 50% of success for both models. In parallel, we tested two unsuccessful strategies to import the DNA donor to the nucleus via the guide RNA. Other strategies are ongoing. All these results gives new insight into CRISPR/Cas9 usage to better master this tool. Moreover, it opened new reflexion for optimal large DNA donor usage for complex models generation with high efficacy and better control.