

# Les nouvelles approches de modification ciblée du génome

*“Talking about the future is better than letting it sneak up on us. We need to do more of this or we will be left with very limited vocabulary in the space between positive and negative hype.”*

- George Church, speaking on the potential of CRISPR technology

Professor of Genetics at Harvard Medical School and Director of PersonalGenomes.org,

Pierre Cordelier, PHD

INSERM UMR 1037, Centre de recherche en cancérologie de Toulouse

## ATELIER 2016 de la PLATEFORME GENETIQUE ET SOCIETE

*Pour toute utilisation du contenu de cette présentation, veuillez citer l'auteur, son organisme d'appartenance, le volet 1 des ateliers « Modifications ciblées des génomes et enjeux éthiques » de la Plateforme « génétique et société » de Toulouse, le titre du document ainsi que la date. Merci*

# Un potentiel sans précédent pour la médecine de précision



Propulsée par les récents progrès dans les capacités de séquençage de l'ADN et les études d'association pangénomique, **l'édition du génome** offre la promesse de guérir les maladies génétiques chez les humains.

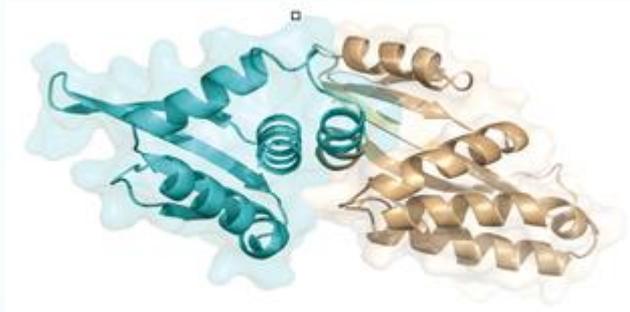
Dans d'autres organismes, **l'édition du génome** peut aider à remodeler la biosphère au profit de l'environnement et des sociétés humaines.

Cependant, comme toute grande avancée, **l'édition du génome** présente des risques.

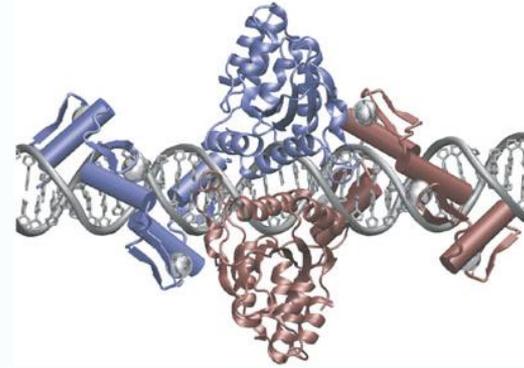
Il est ainsi essentiel de veiller à ce que l'ingénierie des génomes soit la plus efficace et la plus spécifique possible.

# Les différents outils d'édition du génome

Dans le passé, les outils disponibles pour modifier le génomes présentait de nombreuses limitations, dont la principale était le manque d'efficacité.



meganuclease

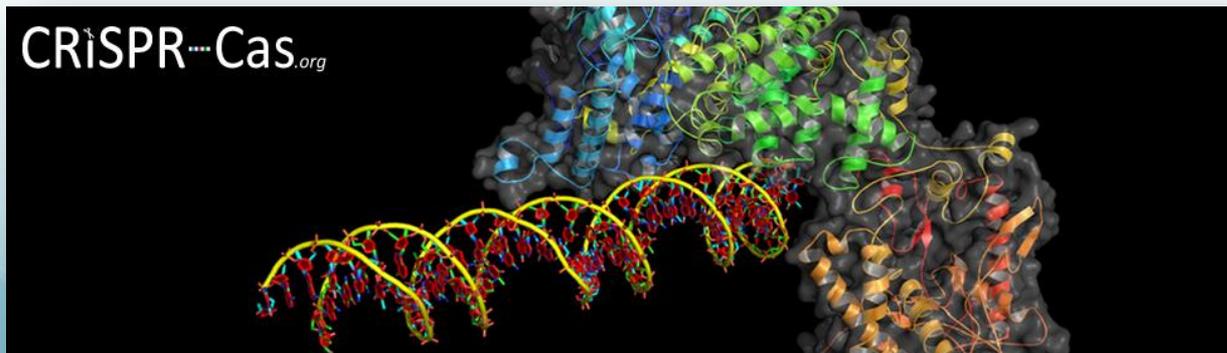


Zinc finger nuclease



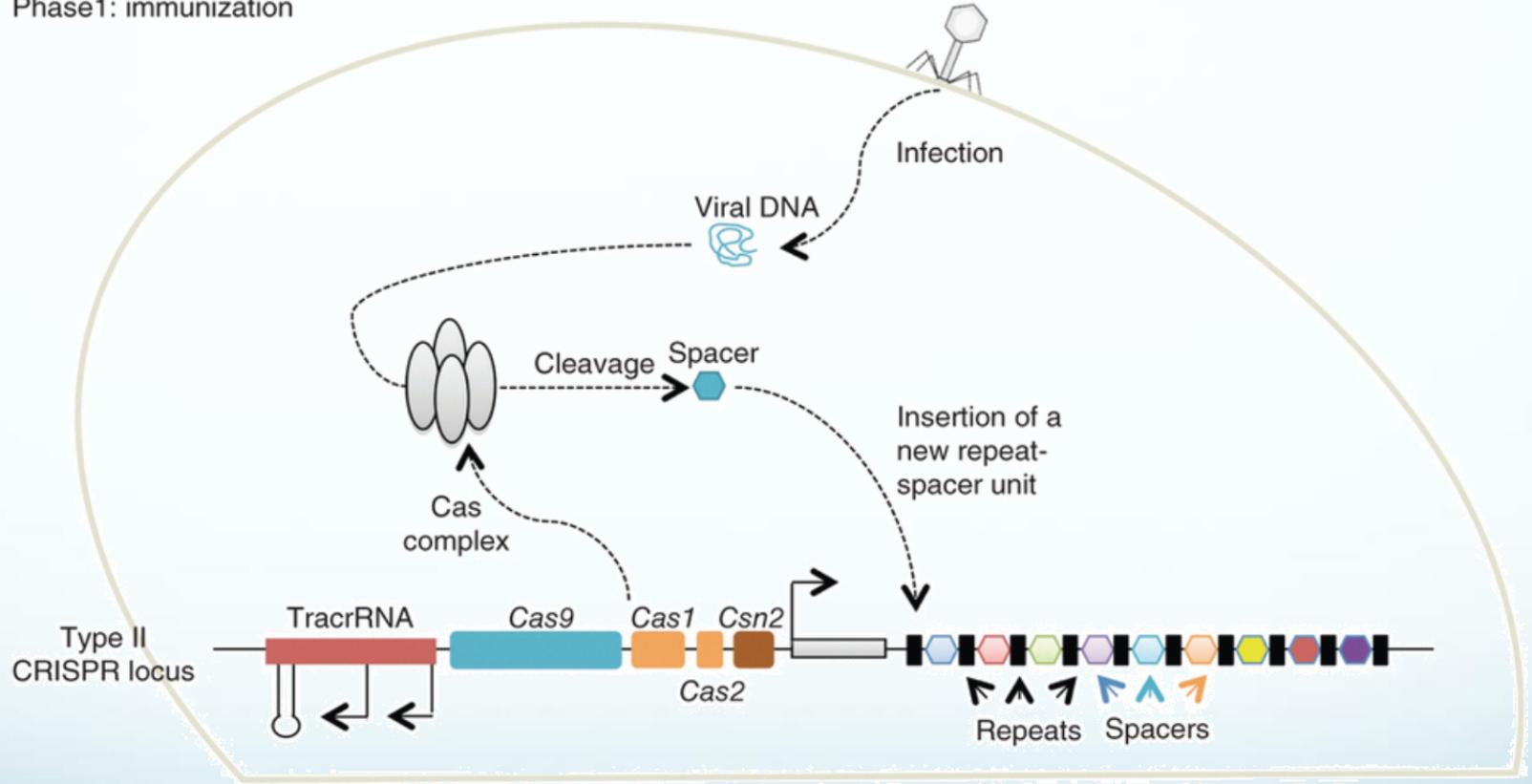
TALEN

La situation a changé avec l'émergence du système CRISPR / cas9, qui est simple, peu coûteux et remarquablement efficace.



# CRISPR/Cas, le “système immunitaire” bactérien

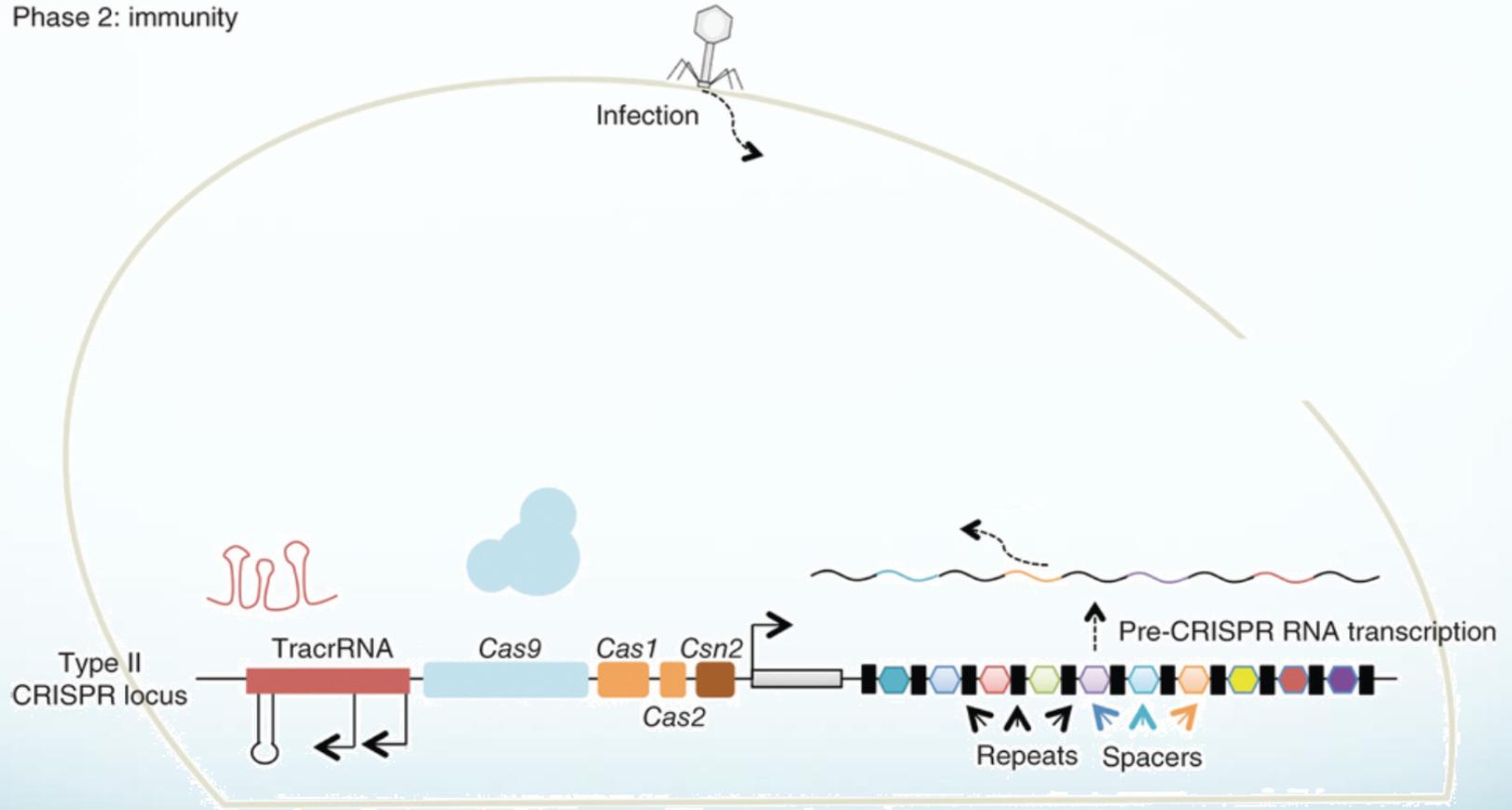
Phase1: immunization



Mali et al. *Nature Methods* 2013

# CRISPR/Cas, le “système immunitaire” bactérien

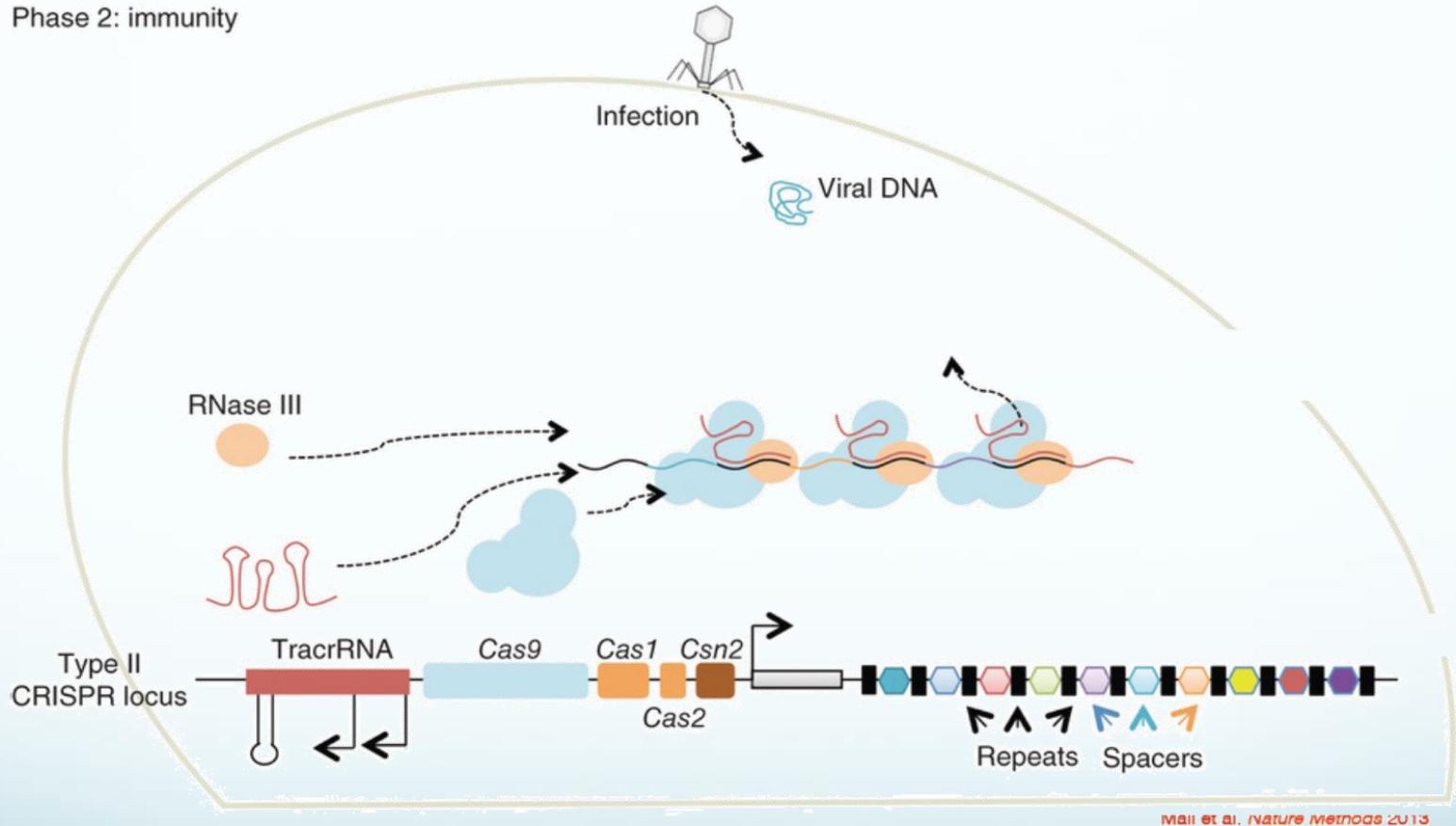
Phase 2: immunity



Mali et al. *Nature Methods* 2013

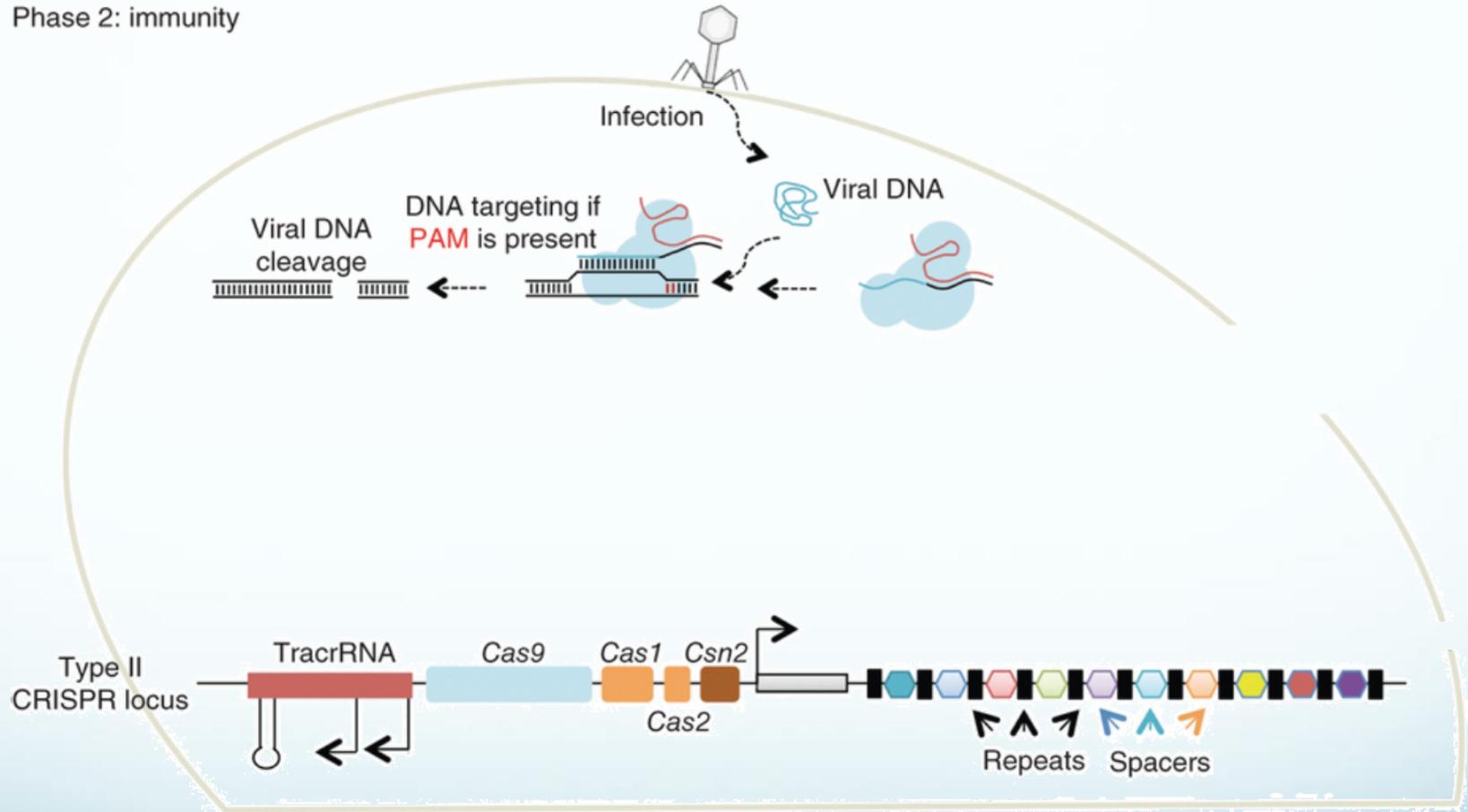
# CRISPR/Cas, le “système immunitaire” bactérien

Phase 2: immunity



# CRISPR/Cas, le “système immunitaire” bactérien

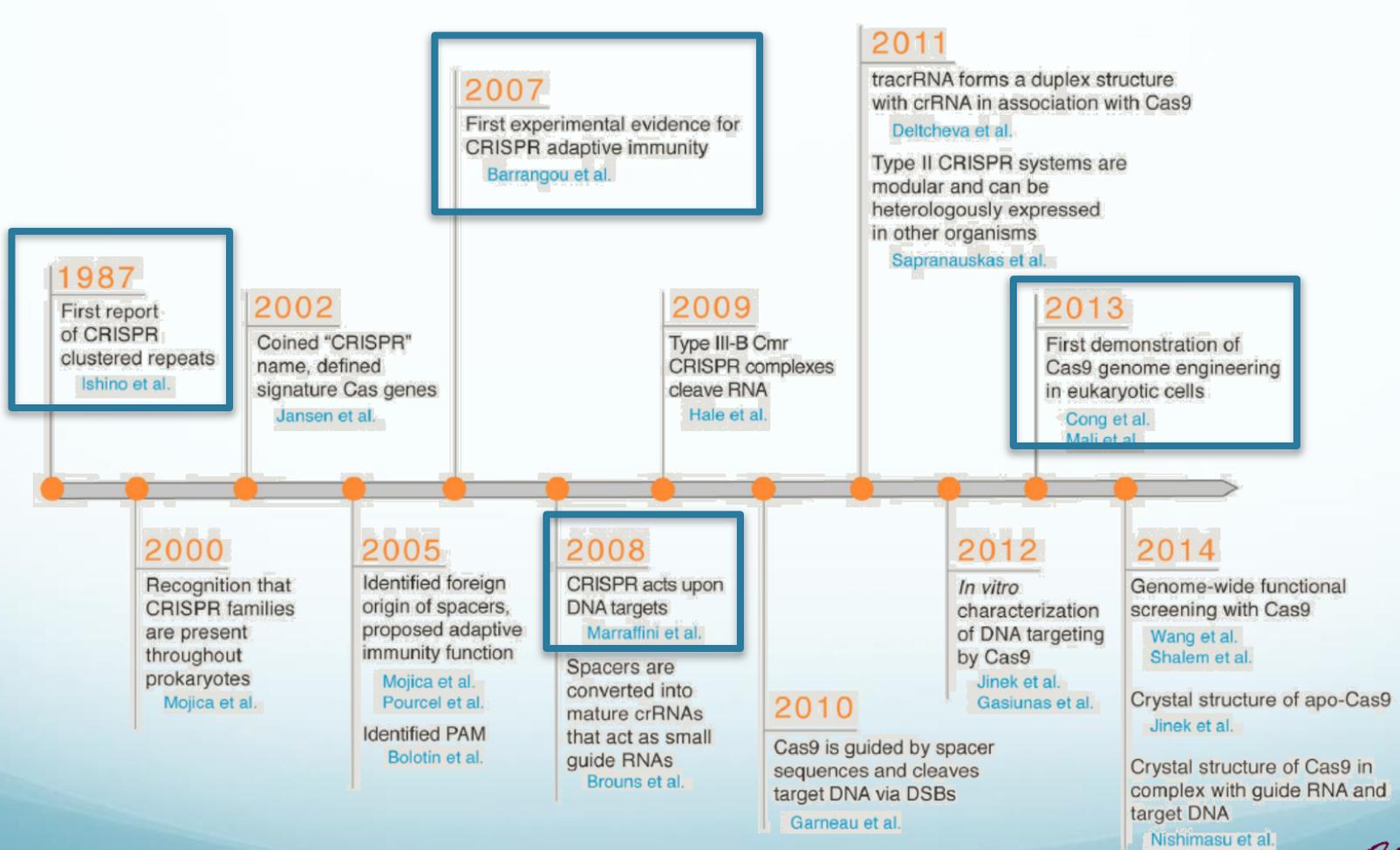
Phase 2: immunity



Mali et al. *Nature Methods* 2013

# Chronologie du système CRISPR/Cas

*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*  
cluster de répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées



# Les américains adorent travailler dans leur garage...



amazon



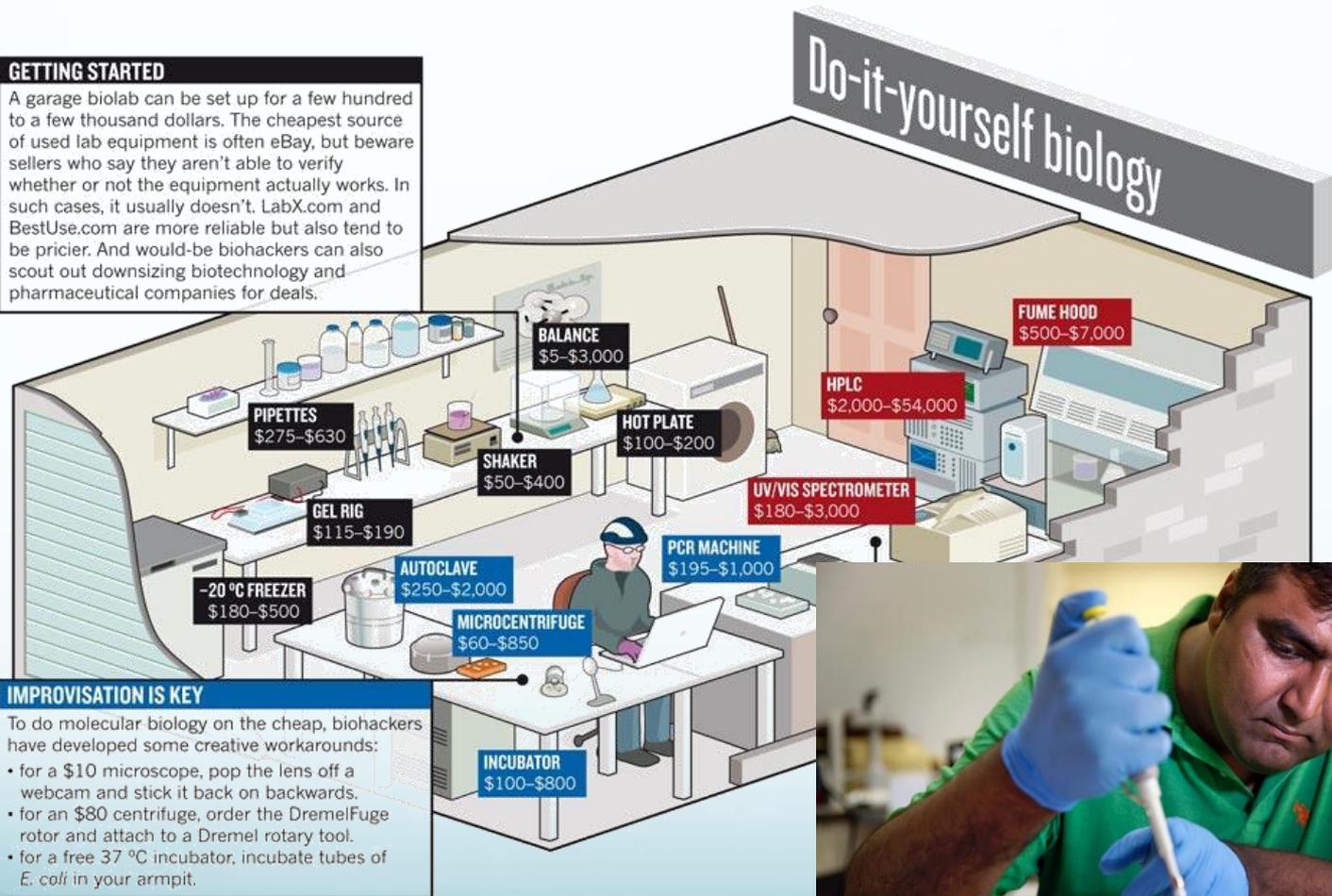
Disney



# L'émergence du DIY (*do it yourself*)

## GETTING STARTED

A garage biolab can be set up for a few hundred to a few thousand dollars. The cheapest source of used lab equipment is often eBay, but beware sellers who say they aren't able to verify whether or not the equipment actually works. In such cases, it usually doesn't. LabX.com and BestUse.com are more reliable but also tend to be pricier. And would-be biohackers can also scout out downsizing biotechnology and pharmaceutical companies for deals.



## IMPROVISATION IS KEY

To do molecular biology on the cheap, biohackers have developed some creative workarounds:

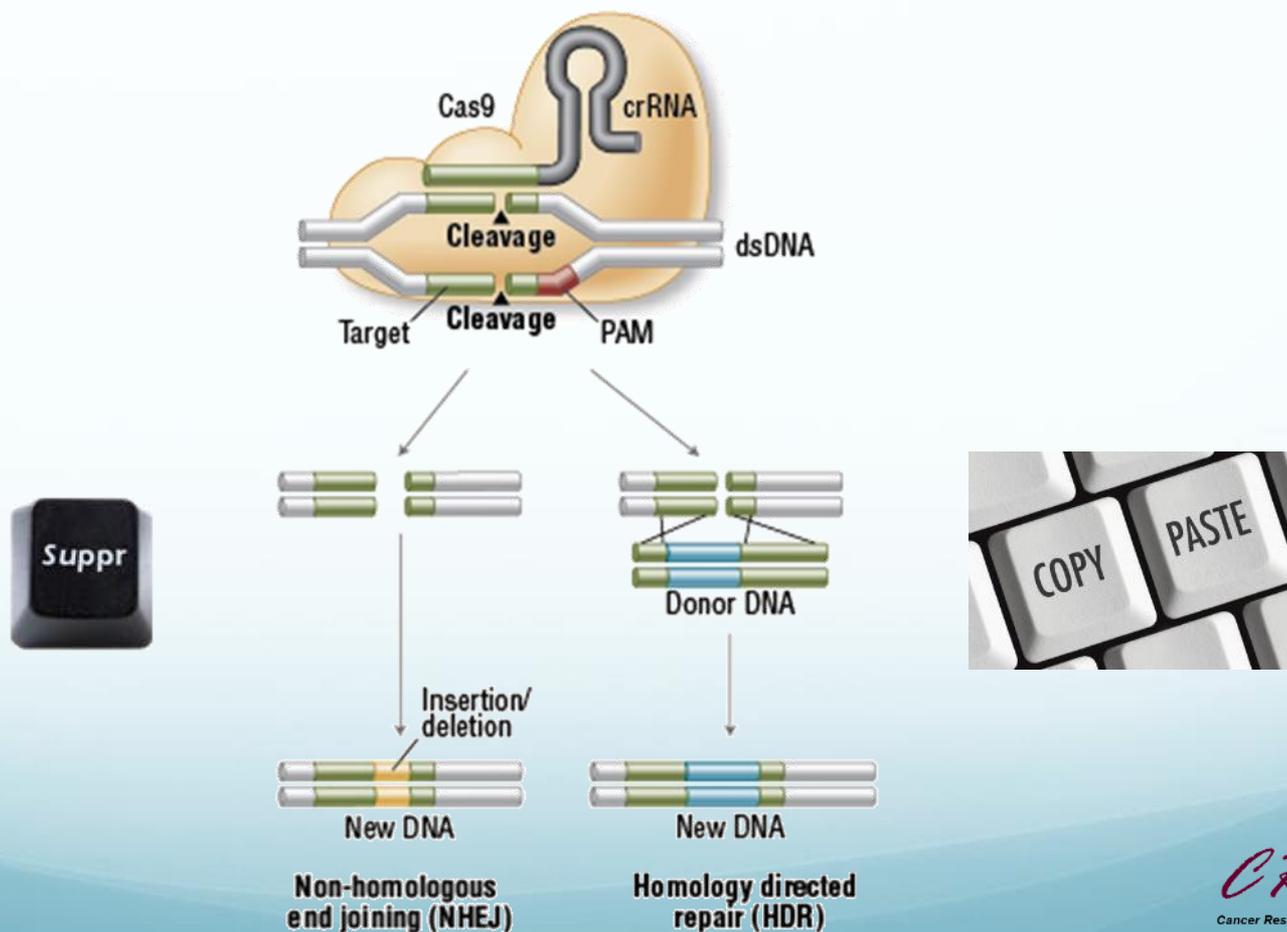
- for a \$10 microscope, pop the lens off a webcam and stick it back on backwards.
- for an \$80 centrifuge, order the DremelFuge rotor and attach to a Dremel rotary tool.
- for a free 37 °C incubator, incubate tubes of *E. coli* in your armpit.



# Cependant, de l'avis des plus grands, *It's not something you can do in your garage...*

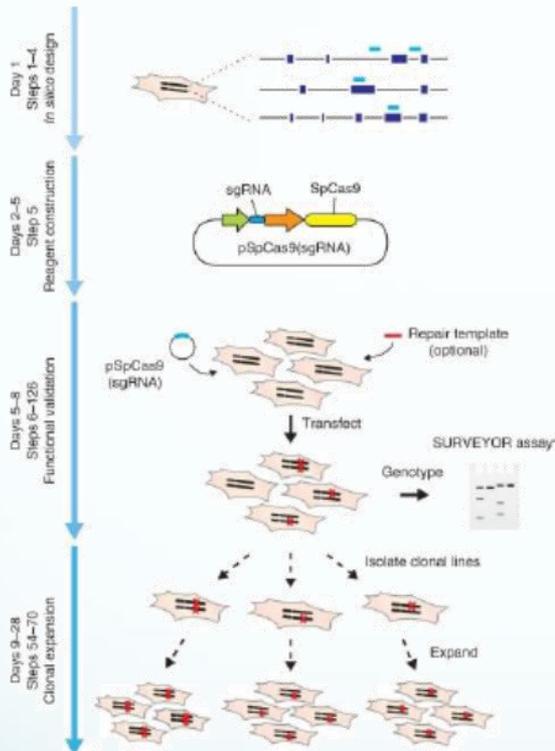
David Baltimore

Altérer la séquence d'origine (gauche) ou la remplacer par une nouvelle copie (droite)

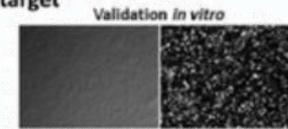


# Et tout ça, en combien de temps ?

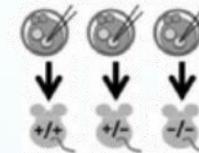
## Production d'une lignée transgénique murine



- Day 0; Design strategy, off-target analysis, and order oligos
- Day 1; PCR amplify target region and insert into pCAG-EGFP plasmid  
Anneal sgRNA oligos and insert into pX330 plasmid  
Transform into *E. coli*
- Day 2; Pick up and grow individual *E. coli* colonies
- Day 3; Miniprep and sequence
- Day 4; Transfect 293T cells with pCAG-EGFP-target  
and pX330-sgRNA plasmids
- Day 6; Observe the transfected cells  
and choose the best pX330-sgRNA
- Day 7; Inject pX330-sgRNA into zygotes  
and transfer to pseudopregnant females
- Day 26; GM pups born (extract DNA from tail tip)
- Day 27; PCR amplify target region and sequence
- Day 28; Identify mutations



Circular plasmid microinjection



6 month (conventional)

1 month (CRISPR/Cas9)

# Jusqu'où pouvons nous aller?

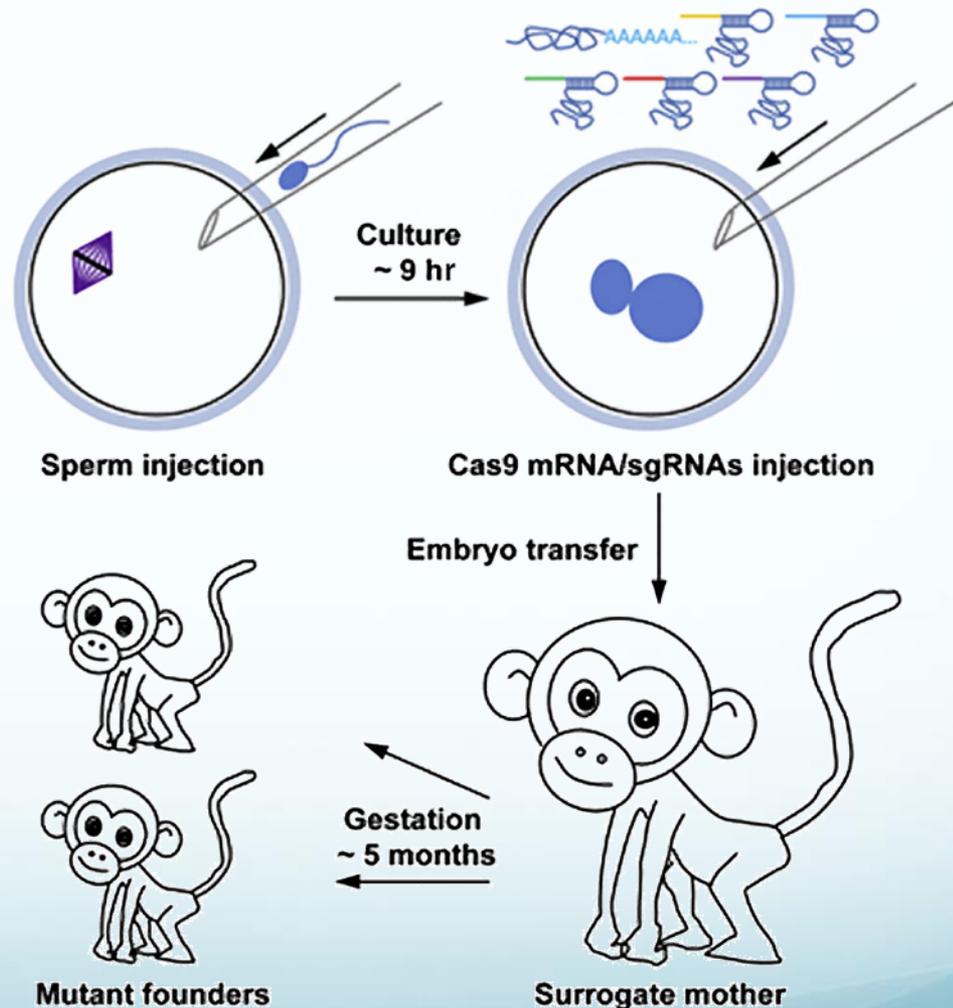
Génération de singe cynomolgus transgéniques à partir d'embryon unicellulaires  
(Cell, 2014)

Cinq ARNs guides ciblant trois gènes particuliers.

Sur 8 embryons traités, le système a réussi à agir sur 2 gènes sur 3.

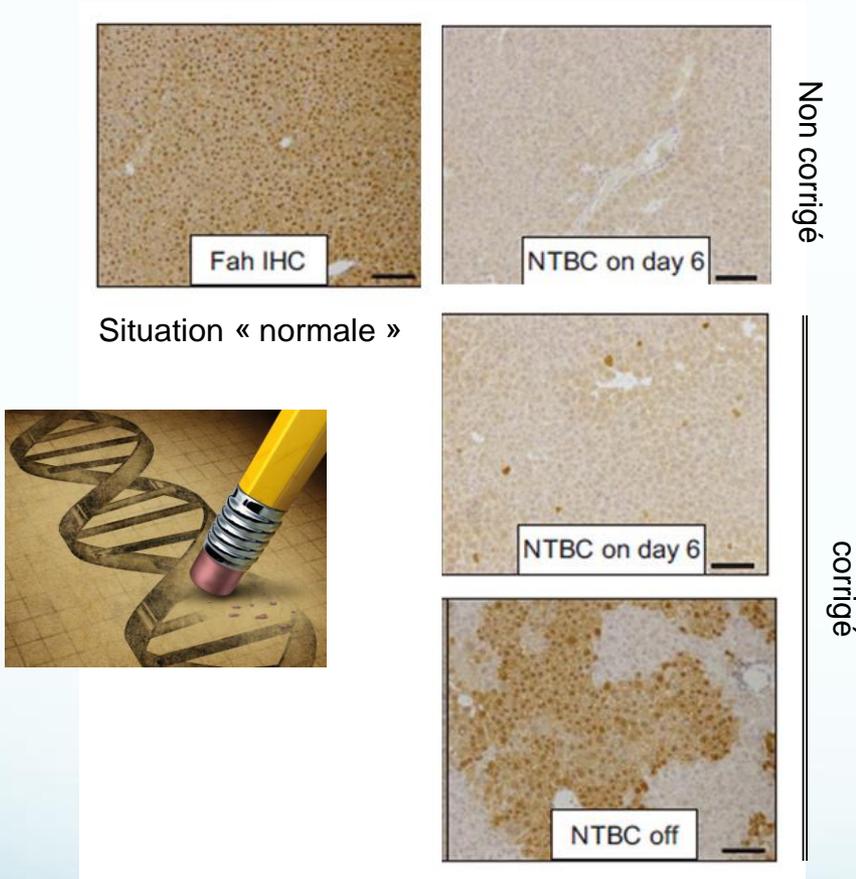
L'opération a été recommencée sur 86 embryons supplémentaires, transférés dans 29 femelles porteuses.

Une seule femelle est arrivée à terme, en donnant naissance à des jumeaux chez lesquels CRISPR/Cas9 avec agit simultanément sur 2 des 3 gènes.



# Pouvons nous corriger des maladies ?

Correction de la tyrosinémie dans des souris males adultes (Nature Biotechnology, 2015)



*Injection de trois ARNs guides ciblant trois séquences liées à la mutation.*

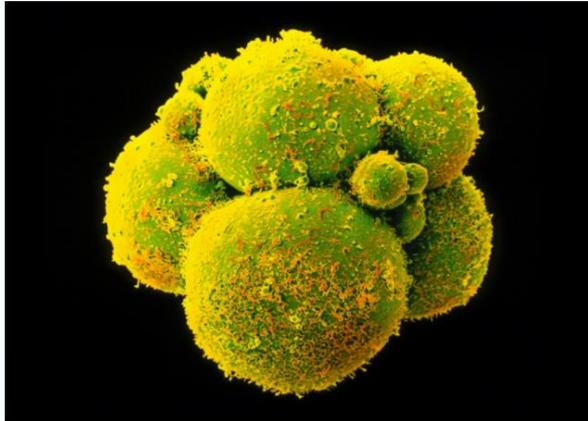
*Injection de la Cas9 et la séquence d'ADN non mutée.*

*0,5% des hépatocytes environ ont été corrigés.*

*30 jours plus tard, ces hépatocytes corrigés ont proliféré pour représenter environ 1/3 des cellules.*

*Les souris ont ainsi survécu.*

# Et chez l'homme ?



*Correction de la mutation HBB causant la bêta-thalassémie dans des embryons humains non viables (Protein cell 2015),*

*Cette étude révèle de nombreux obstacles pour l'utilisation du système à des fins « cliniques ».*

*Injection de 86 embryons. 54 des 71 embryons « survivants » (stade 8 cellules) 28 présentaient des évidences d'épissage correct, alors que seulement une fraction des embryons présentaient un matériel génétique « correct ».*

*Présence de très nombreuses mutations « off-target », peut être dues au caractère « anormal » de embryons.*

*Une nouvelle étude publiée il ya quelques jours et menée sur des embryons humains fertilisés, cette fois-ci de ciblage (destruction) pour résister à l'infection VIH, vient de paraître, reproduisant les mêmes limitations (off-target, faible efficacité de correction)*

***“It just emphasizes that there are still a lot of technical difficulties to doing precision editing in human embryo cells”***

# Intégrer les limitations (scientifiques) du système

*Good, better, best*

**Effet « off target » (hors cible) et clivage non désiré**

**Comment propager l'information ?**

Using gene delivery vectors  
Via stem cells

Paired nickases  
Double nicking  
Check with GWAS

**Inter et intra réarrangements chromosomiques**

Use DBS and Cas9 to correct

**Efficacité de clivage variable**

Modified Cas9 variants, paired nicking  
Modified sgRNAs