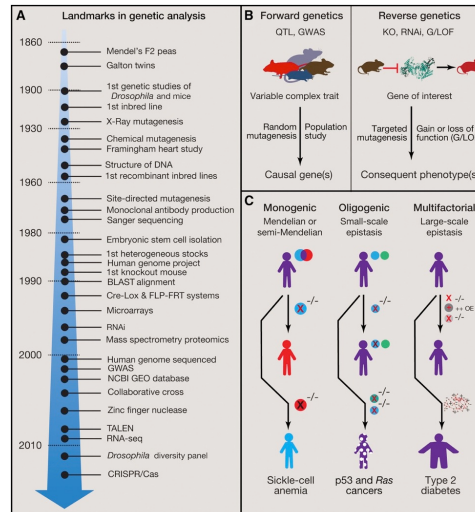


Génétique inverse, transfert de gènes **Manipulations génétiques,** **Organismes génétiquement modifiés**

AVANT CRISPR:
Recombinaison homologue au locus
APRES CRISPR:
édition de génome

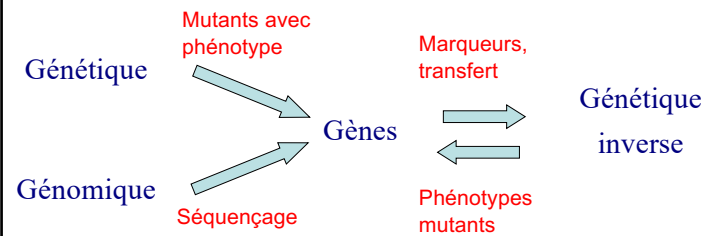
1



2

Génétique inverse, reverse, transfert de gènes

Du génotype au phénotype



3

Utilisation de modèle animaux pour la thérapie génique

Stratégie d'étude des maladies génétiques :

- Établir un modèle animal de la maladie en établissant une lignée stable de souris transgéniques
- Tester des thérapies géniques sur des souriceaux pour mimer le traitement des patients.

1- Etablissement d'une lignée stable d'animaux modèles:

- par injection dans le pronucléus mâle, mais peu efficace
- par injection de cellules ES modifiées (éventuellement grâce à **CRISPR**) dans un blastocyste, mais problème du chimérisme

2- Traitement par thérapie génique d'individus mimant la maladie:

par le protocole prévu en thérapie humaine: traitement de cellules différenciées, de cellules souches, éventuellement d'embryons, par **CRISPR** de plus en plus souvent

4

**Génétique inverse, transfert de gènes
Manipulations génétiques,
Organismes génétiquement modifiés**



AVANT CRISPR:

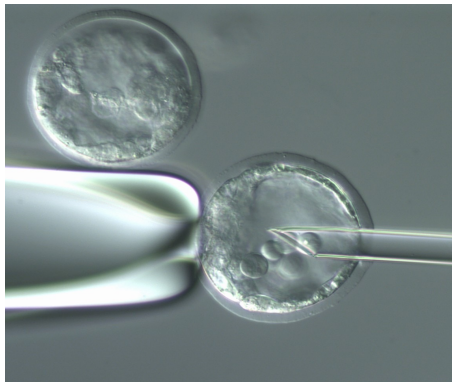
Recombinaison homologue au locus

APRES CRISPR:

édition de génome

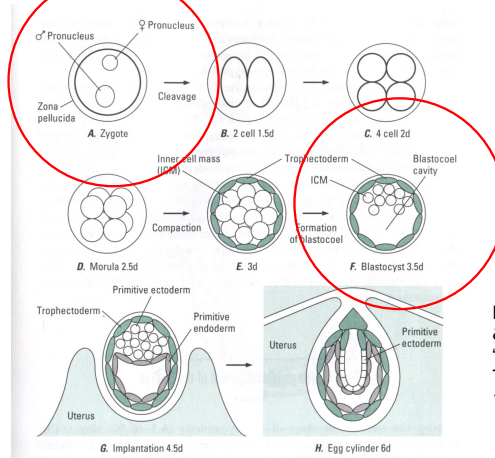
5

Inactivation chez la souris



6

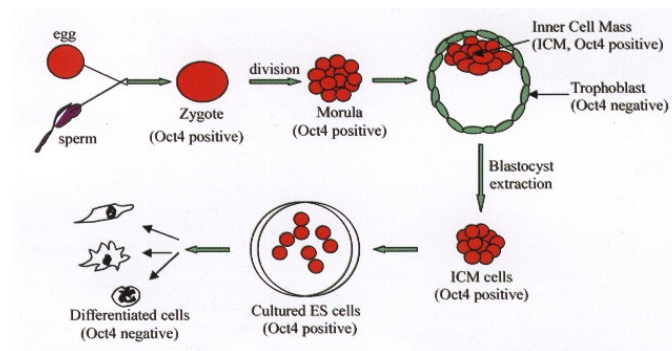
Développement précoce de la souris



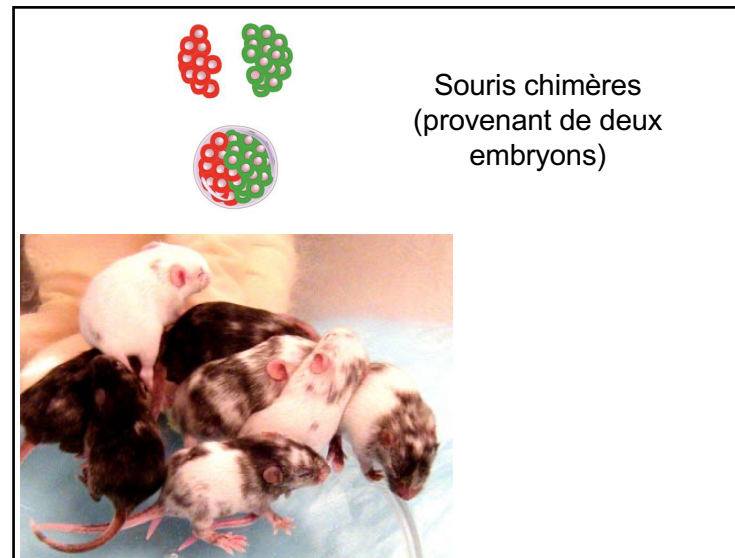
From Sedivy
& Joyner
"Gene
Targeting"
1992

7

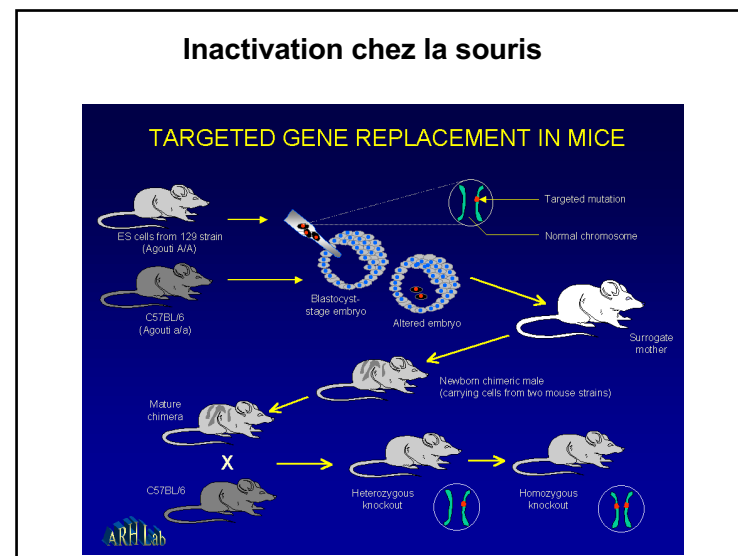
Inactivation chez la souris



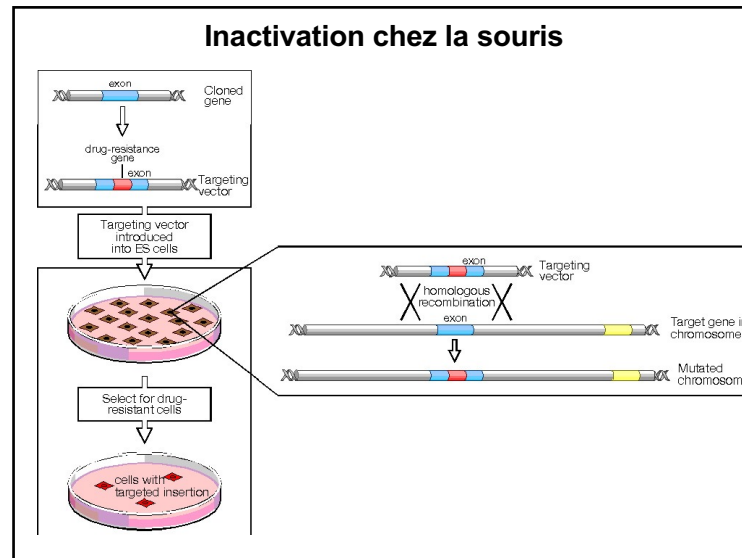
8



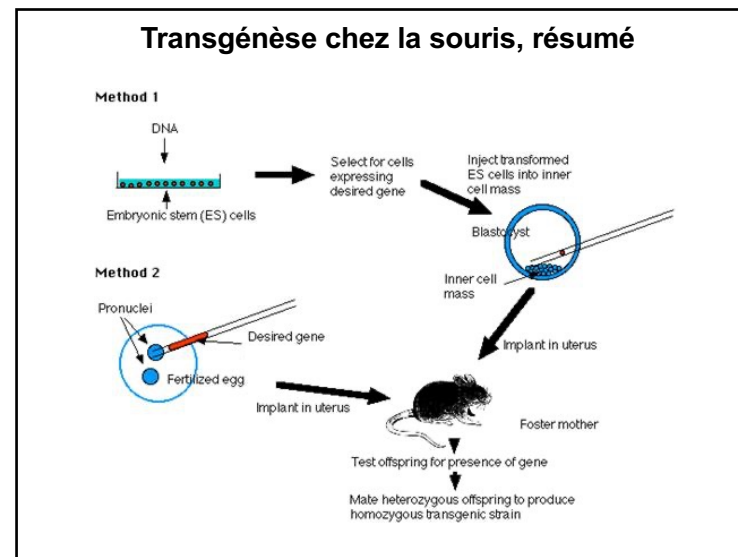
9



10



11



12

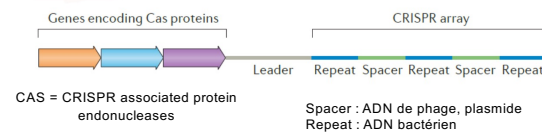
**Génétique inverse, transfert de gènes
Manipulations génétiques,
Organismes génétiquement modifiés**

AVANT CRISPR:
Recombinaison homologue au locus
➡ APRES CRISPR:
édition de génome

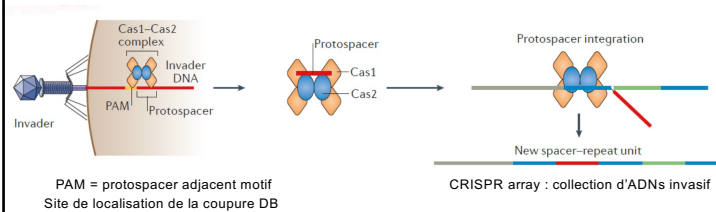
13

CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

❖ **Organisation du locus bactérien CRISPR/Cas9**



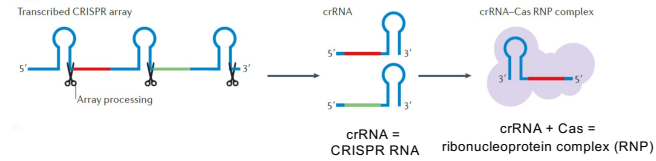
❖ **Adaptation**



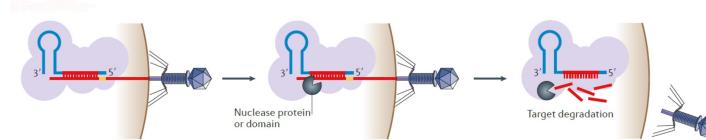
14

CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

❖ Expression et maturation du complexe CRISPR/Cas9



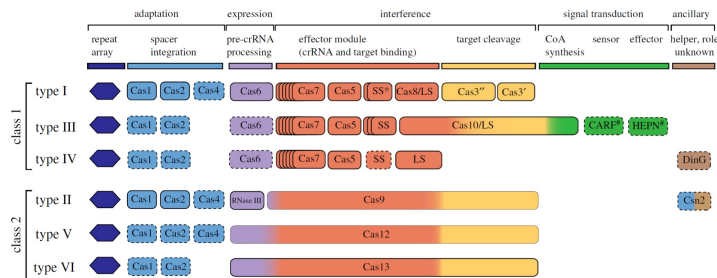
❖ Interférence (RNA-mediated defense system)



15

CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

Un système diversifié



16

16

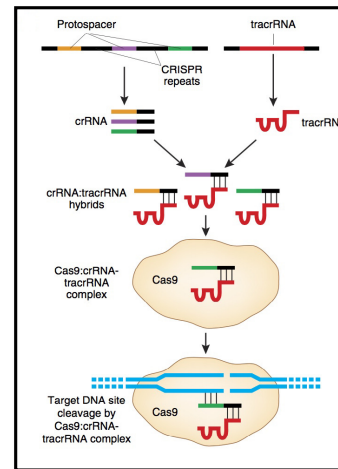
CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

Protospacer adjacent motif = PAM
2-6 pb (virus, plasmide)

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR RNA (crRNA)

CRISPR-Cas9 Type II



Streptococcus pyogenes

trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA)

effector complexes

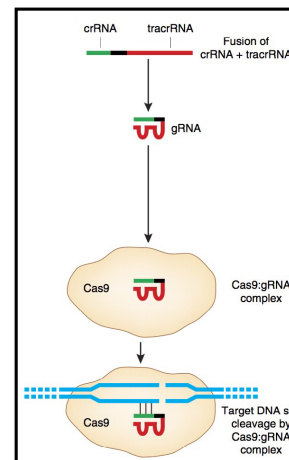
Cas9 endonuclease

➤ Cassure double-brin

17

CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes

Prix Nobel de chimie 2020
E. Carpentier & J. Doudna

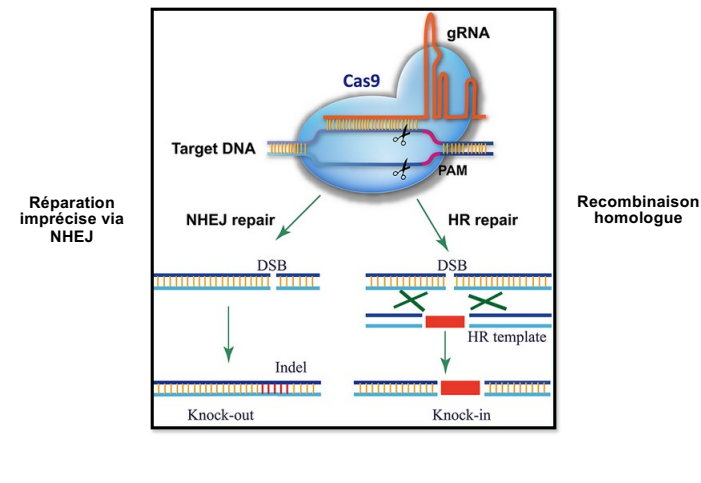


Outil de ciblage :
Homologie acides nucléiques

Cassure double-brin ciblée

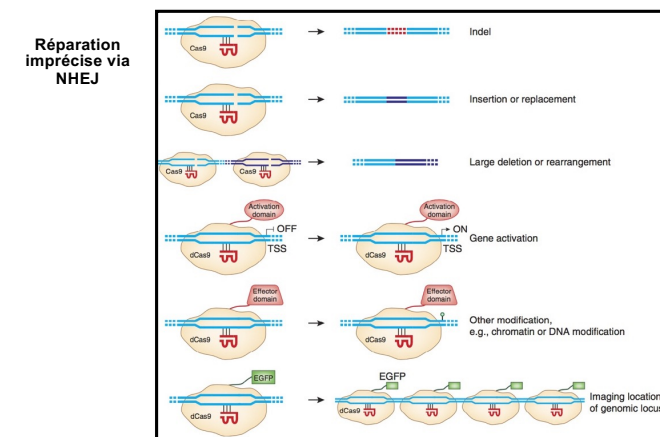
18

CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes



19

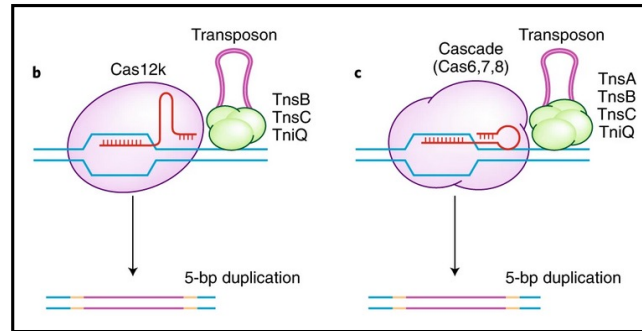
CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes



<https://www.youtube.com/watch?v=4YKFw2KZA5o>

20

CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes



Coupure via transposase : pas de système de réparation impliqué

21

Utilisation de modèle animaux pour la thérapie génique

Stratégie d'étude des maladies génétiques :

- Établir un modèle animal de la maladie en établissant une lignée stable de souris transgéniques
- Tester des thérapies géniques sur des souriceaux pour mimer le traitement des patients.

1- Etablissement d'une lignée stable d'animaux modèles:

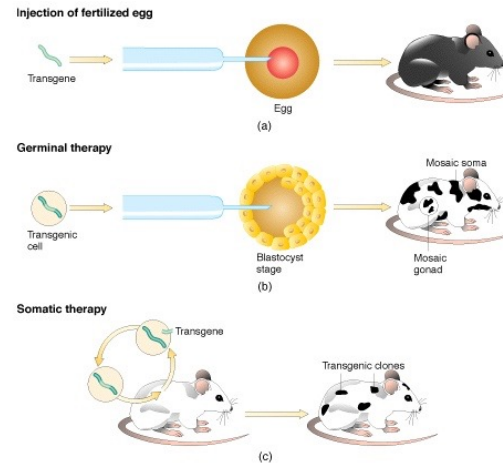
- par injection dans le pronucléus mâle, mais peu efficace
- par injection de cellules ES modifiées (éventuellement grâce à CRISPR) dans un blastocyste, mais problème du chimérisme

2- Traitement par thérapie génique d'individus mimant la maladie:

par le protocole prévu en thérapie humaine: traitement de cellules différenciées, de cellules souches, éventuellement d'embryons, par CRISPR de plus en plus souvent

22

Modèle animaux : modifications germinales ou somatiques



23

Thérapie génique

Quelle molécule transférer et quelles cellules traiter?

ADN: manipulation génétique de cellules progénitrices (longue durée), ou manipulation génétique de cellules différenciées (à refaire régulièrement)

Interdiction de modifier lignée germinale.

ARN: directement traduit dans cytoplasme, effets secondaires si grandes quantités d'ARN circulant

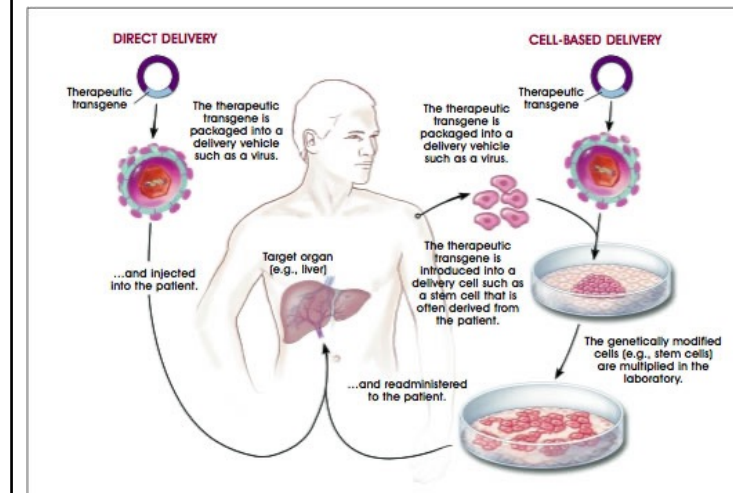
Comment transférer?

ADN doit pénétrer dans le noyau, s'insérer, être exprimé, virus possible mais problèmes d'immunogénicité et d'efficacité

ADN/ARN dans un liposome, ou sur des nanoparticules, problème d'efficacité
ARN doit pénétrer cellule et ne pas être détruit: chemically-modified RNAs

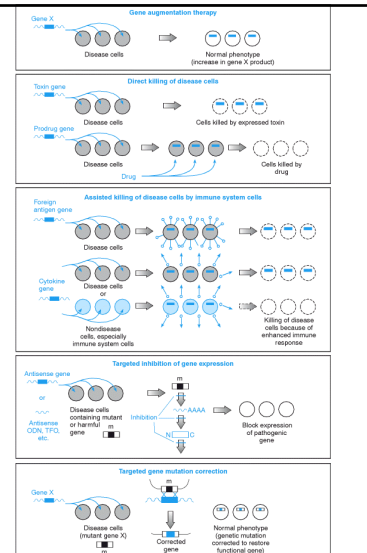
24

Thérapie génique : stratégies



25

Différentes possibilités ...



26

Utilisation de modèle animaux pour la thérapie génique

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

MUSCULAR DYSTROPHY

Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy

Leonela Amosii,^{1*} Chengzu Long,^{1*†} Hui Li,¹ Alex A. Mireault,¹ John M. Shelton,² Efrain Sanchez-Ortiz,¹ John R. McAnally,¹ Samadrita Bhattacharyya,¹ Florian Schmidt,³ Dirk Grimm,³ Stephen D. Hauschka,⁴ Rhonda Bassel-Duby,¹ Eric N. Olson^{1‡}

Amosii et al., *Sci. Transl. Med.* **9**, eaan8081 (2017) 29 November 2017

Deletions of exon 50 of the dystrophin gene are among the most common single exon deletions causing DMD.

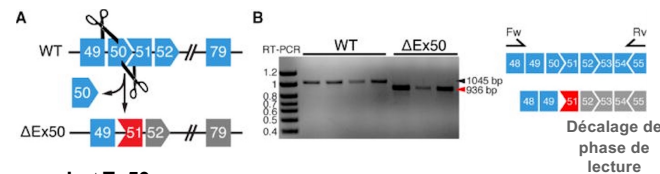
Utilisation de CRISPR pour 1) établir modèle murin et 2) outil de thérapie

27

Utilisation de modèle animaux pour la thérapie génique

1- Établir un modèle animal de la maladie portant une délétion de l'exon du gène codant la dystrophine pour mimer la DMD humaine

- Délétion par double CRISPR/Cas9, sgRNAs dirigés vers les introns autour de l'exon 50
- Recherche de souriceaux F0 pour indel dans gènes de la dystrophine



➤ souris ΔEx50 :

- nécrose musculaire à l'âge de 3 semaines
- infiltration inflammatoire à l'âge de 2 mois
- élévation de la créatine kinase sérique (indiquant des lésions musculaires)

Amosii et al., *Sci. Transl. Med.* **9**, eaan8081 (2017) 29 November 2017

28

Thérapie génique

2012 **Glybera**: **traitement de pancréatite génétique grave: LPLD** (lipoprotein lipase deficiency): **virus contenant une copie du gène**, ne s'insère pas, reste cytoplasmique.

Injections dans muscle de la cuisse, traitement censé durer 10 ans au moins. Tests cliniques OK. Mise sur le marché à 1,6 millions de \$ (Traitement alternatif 300 000 \$ par an).

Pas de demande, commercialisation stoppée en 2016.

31

BIOWORLD™

The Daily Biopharmaceutical News Source
Now From Thomson Reuters

[explore »](#)

[about](#)

[conferences](#)

[reports](#)

[staff](#)

[store](#)

First Gene Therapy Glybera (Finally) Gets EMA Approval

By Nuala Moran
Staff Writer

Patients with LPL are unable to process fat particles in the bloodstream, which accumulate to cause severe attacks of pancreatitis. "Patients with LPL are afraid of eating a normal meal because it can lead to acute and extremely painful inflammation of the pancreas, often resulting in a visit to intensive care," Aldag noted. "Now, for the first time, a treatment exists for these patients that not only reduces this risk of getting severely sick, but also has a multiyear beneficial effect after just a single injection."

The need for a single treatment marks a divide between Glybera and enzyme replacement therapies for similar inherited enzyme deficiency disorders, which must be administered on a chronic basis. Marketed enzyme replacement therapies cost between €150,000 and €450,000 per patient, per annum, and Aldag thinks the pricing for Glybera should be a multiple of some price in that range to reflect the fact that a one-off-treatment with Glybera has an effect that lasts over years.

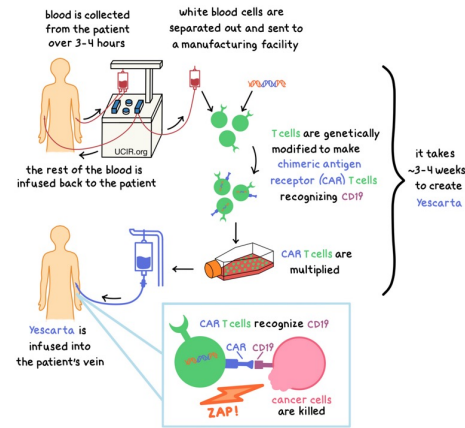
32

Thérapie génique

2017 YESCARTA: immunothérapie de lymphome non

Hodgkinien: cellules exprimant récepteur antagoniste chimérique dirigé contre CD19 à la surface des cellules cancéreuses: "CAR-T cells", injectées au patient. Les cellules sont celles du patient, modifiées par génie génétique.

Effets secondaires immunologiques, neurologiques.



33

NewScientist

Gene therapy cures leukaemia in eight days

> 26 March 2013 by [Andy Coghlan](#)
 > Magazine issue 2910. [Subscribe and save](#)
 > For similar stories, visit the [Cancer](#) and [Genetics](#) Topic Guides

WITHIN just eight days of starting a novel gene therapy, David Aponte's "incurable" leukaemia had vanished. For four other patients, the same happened within eight weeks, although one later died from a blood clot unrelated to the treatment, and another after relapsing.

The cured trio, who were all previously diagnosed with usually fatal relapses of acute lymphoblastic leukaemia, have now been in remission for between 5 months and 2 years. [Michel Sadelain](#) of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York, co-leader of the group that designed the trial, says that a second trial of 50 patients is being readied, and the team is looking into using the technique to treat other cancers.

The key to the new therapy is identifying a molecule unique to the surface of cancer cells, then genetically engineering a patient's immune cells to attack it.

34

Thérapie génique

Recherche en cours :

2017 : **MYBPC3** (myosin binding protein C3, 11p11.2)
gène de susceptibilité à des cardiomyopathies (1:500 adultes)

=> Mort subite par arrêt cardiaque

https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/Disease_HPOTerms.php?lng=FR

35

ARTICLE

doi:10.1038/nature23305

Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Hong Ma^{1*}, Nuria Martí-Gutierrez^{1*}, Sang-Wook Park^{2*}, Jun Wu^{3*}, Yeonmi Lee³, Keiichiro Suzuki³, Amy Koski¹, Dongmei Ji¹, Tomonari Hayama¹, Riffat Ahmed¹, Hayley Darby¹, Crystal Van Dyken¹, Ying Li¹, Eunju Kang¹, A.-Reum Park², Daesik Kim¹, Sang-Tae Kim², Jianhui Gong^{4,6,7,8}, Ying Gu^{5,6,7}, Xun Xu^{5,6,7}, David Battaglia^{1,9}, Sacha A. Krieg⁴, David M. Lee⁴, Diana H. Wu⁹, Don P. Wolf⁴, Stephen B. Heitner¹⁰, Juan Carlos Izpisua Belmonte¹¹, Paula Amato¹², Jin-Soo Kim¹², Sanjiv Kaul¹⁰ & Shoukhrat Mitalipov^{1,10} §

Genome editing has potential for the targeted correction of germline mutations. Here we describe the correction of the heterozygous *MYBPC3* mutation in human preimplantation embryos with precise CRISPR-Cas9-based targeting accuracy and high homology-directed repair efficiency by activating an endogenous, germline-specific DNA repair response. Induced double-strand breaks (DSBs) at the mutant paternal allele were predominantly repaired using the homologous wild-type maternal gene instead of a synthetic DNA template. By modulating the cell cycle stage at which the DSB was induced, we were able to avoid mosaicism in cleaving embryos and achieve a high yield of homozygous embryos carrying the wild-type *MYBPC3* gene without evidence of off-target mutations. The efficiency, accuracy and safety of the approach presented suggest that it has potential to be used for the correction of heritable mutations in human embryos by complementing preimplantation genetic diagnosis. However, much remains to be considered before clinical applications, including the reproducibility of the technique with other heterozygous mutations.

MYBPC3 gène de susceptibilité à des cardiomyopathies
1:500 adultes (Mort subite par arrêt cardiaque)

36

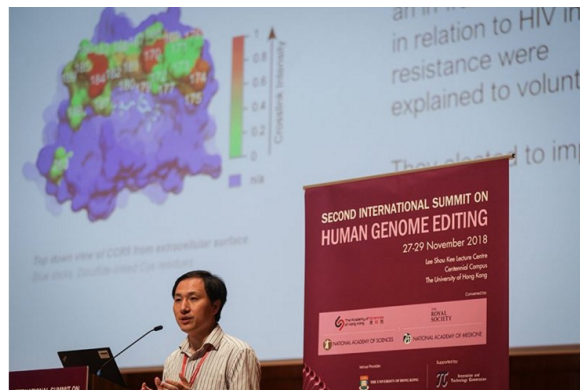
Thérapie génique

Le pire exemple?

- directement sur l'humain
- lignée germinale touchée puisque traitement au stade une cellule
- individus par encore malades et traitement préventif existant et efficace
- peu de contrôle de la manipulation (mosaïque)
- contrôle institutionnel et sociétal "hypocrite"

37

Novembre 2018: une grossesse gémellaire a donné naissance à Nana et Lula: "bébés Crispr" ou "bébés OGM".



He Jiankui a annoncé cette nouvelle à la veille de la seconde conférence internationale sur les modifications du génome humain, à Hong Kong.

38

He Jiankui a recruté 8 couples volontaires, formés par des hommes séropositifs pour le HIV et des femmes séronégatives. Les expériences de modifications de génome ont été menées entre mars 2017 et novembre 2018.



39

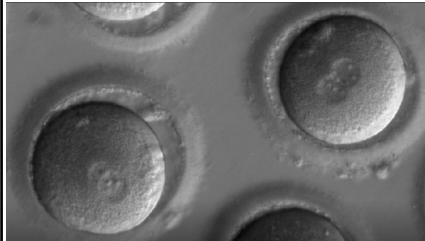
He Jankui: "Lorsque Lulu et Nana n'étaient encore qu'une seule cellule, l'intervention génétique a supprimé l'accès par lequel le VIH entre dans les cellules pour infecter l'hôte". (gène CCR5)



40

Oeufs humains fécondés *in vitro*

Technologie maîtrisée depuis les années 1980.



LOUISE BROWN NÉE EN 1978
PREMIER BEBE "EPROUVETTE"



41

He Jankui est rapidement désavoué par son Université.

***L'enquête révèle qu'il est peu probable que
l'Université ou l'Etat n'ait pas été au courant et n'ait
pas financé ses expériences, et que de nombreuses
personnalités suivaient les expériences en cours...***

"I certainly
don't approve
of what JK did."
(statement to Science)

"Wow, that's
quite an
achievement!"
(email to He Jankui)

Stephen Quake, Stanford University

42