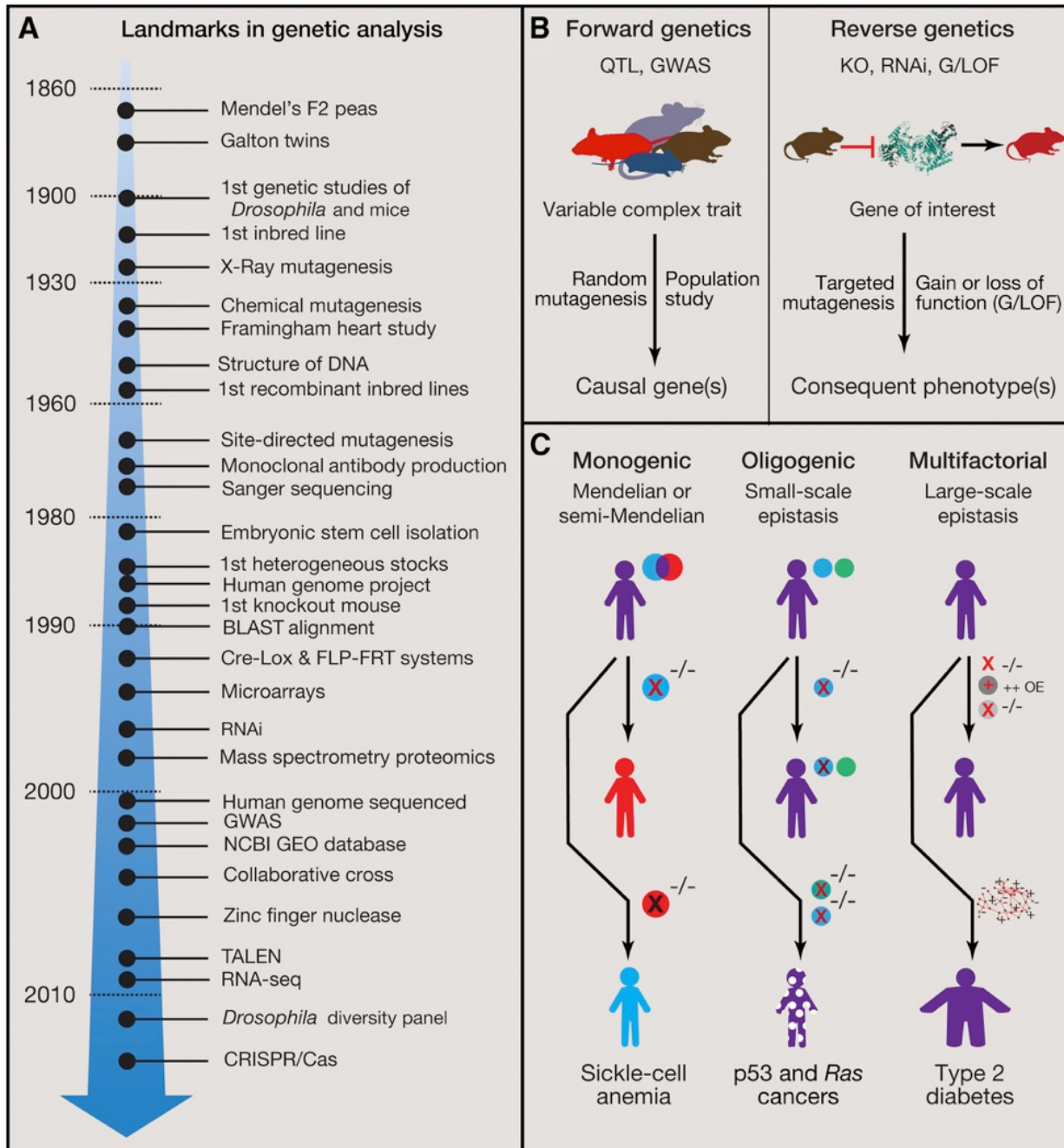


**Génétique inverse, transfert de gènes
Manipulations génétiques,
Organismes génétiquement modifiés**

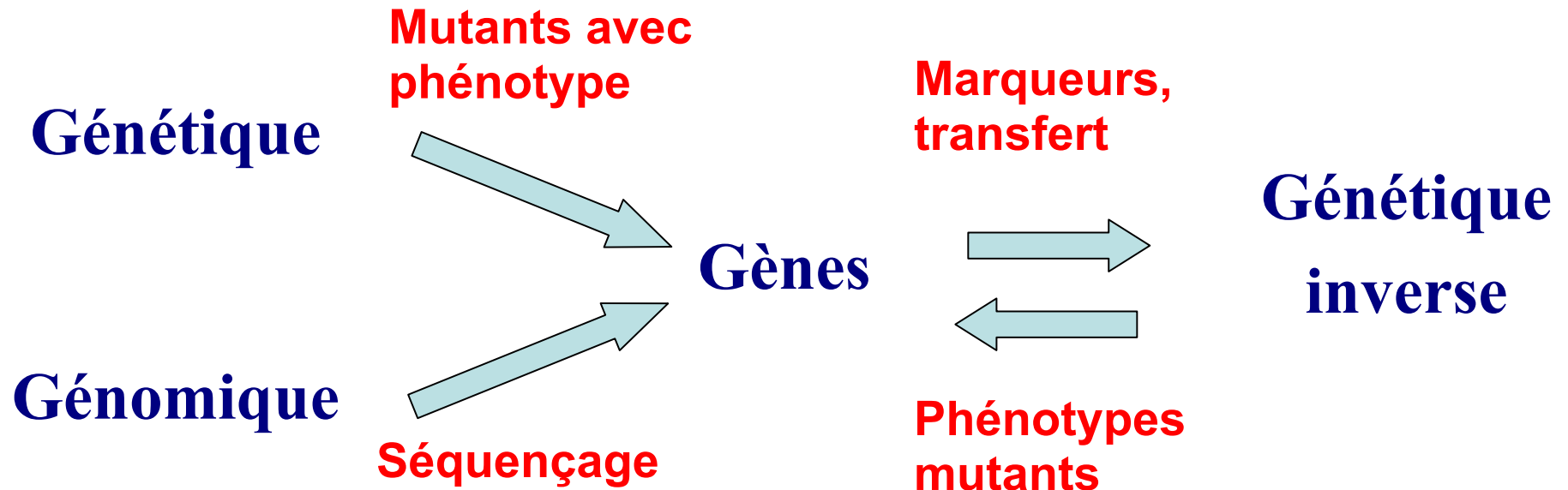
**Recombinaison homologue au locus:
AVANT CRISPR**

**APRES CRISPR: "genome editing", "édition
de génome"**



Génétique inverse, reverse, transfert de gènes

Du génotype au phénotype



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

**Recombinaison homologue au locus:
AVANT CRISPR**

**APRES CRISPR: "genome editing", "édition
de génome"**

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:

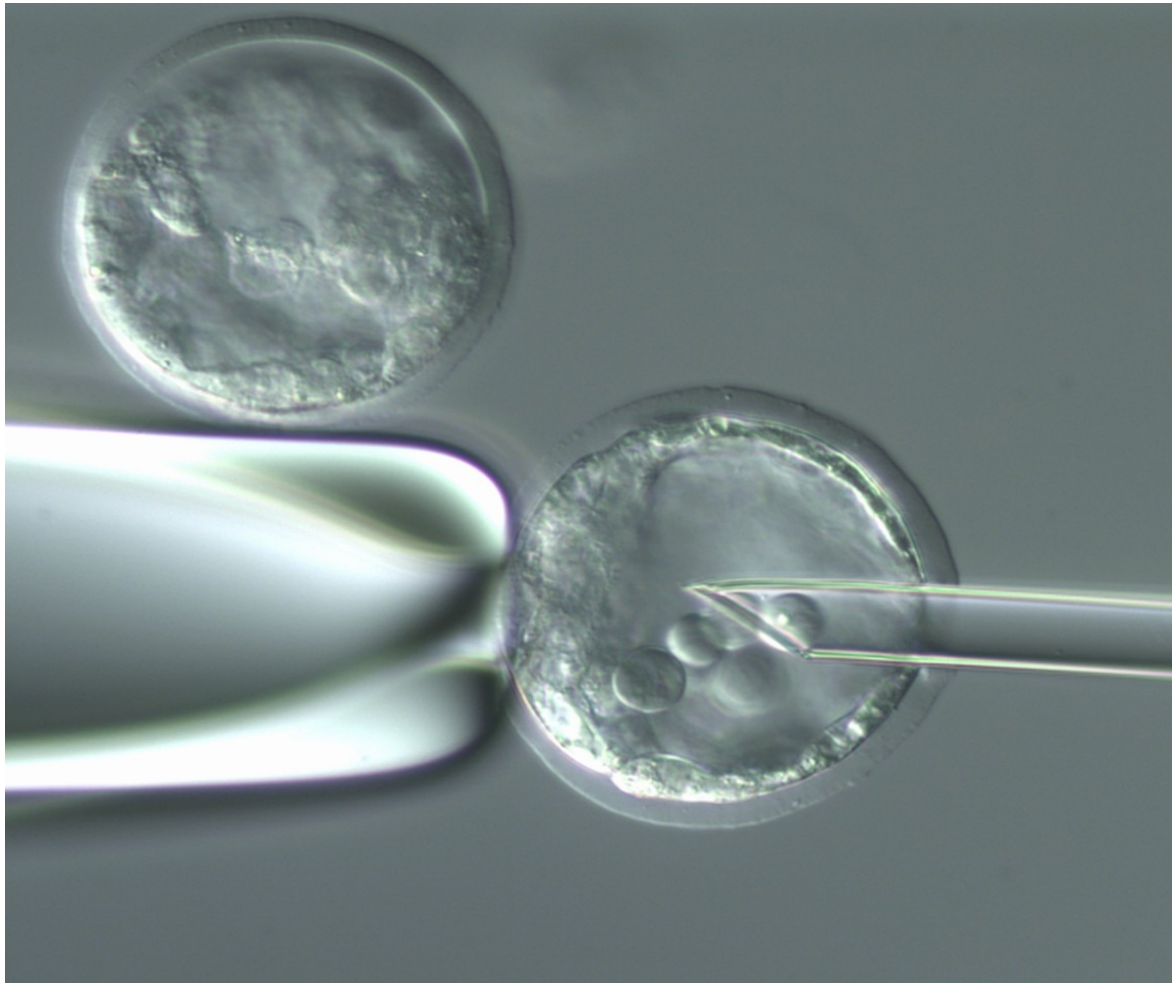
- par injection dans le pronucléus mâle: peu efficace mais **CRISPR** peut changer la donne, à nouveau
- par injection de cellules ES modifiées (éventuellement grâce à **CRISPR**) dans un blastocyste, problème du chimérisme

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

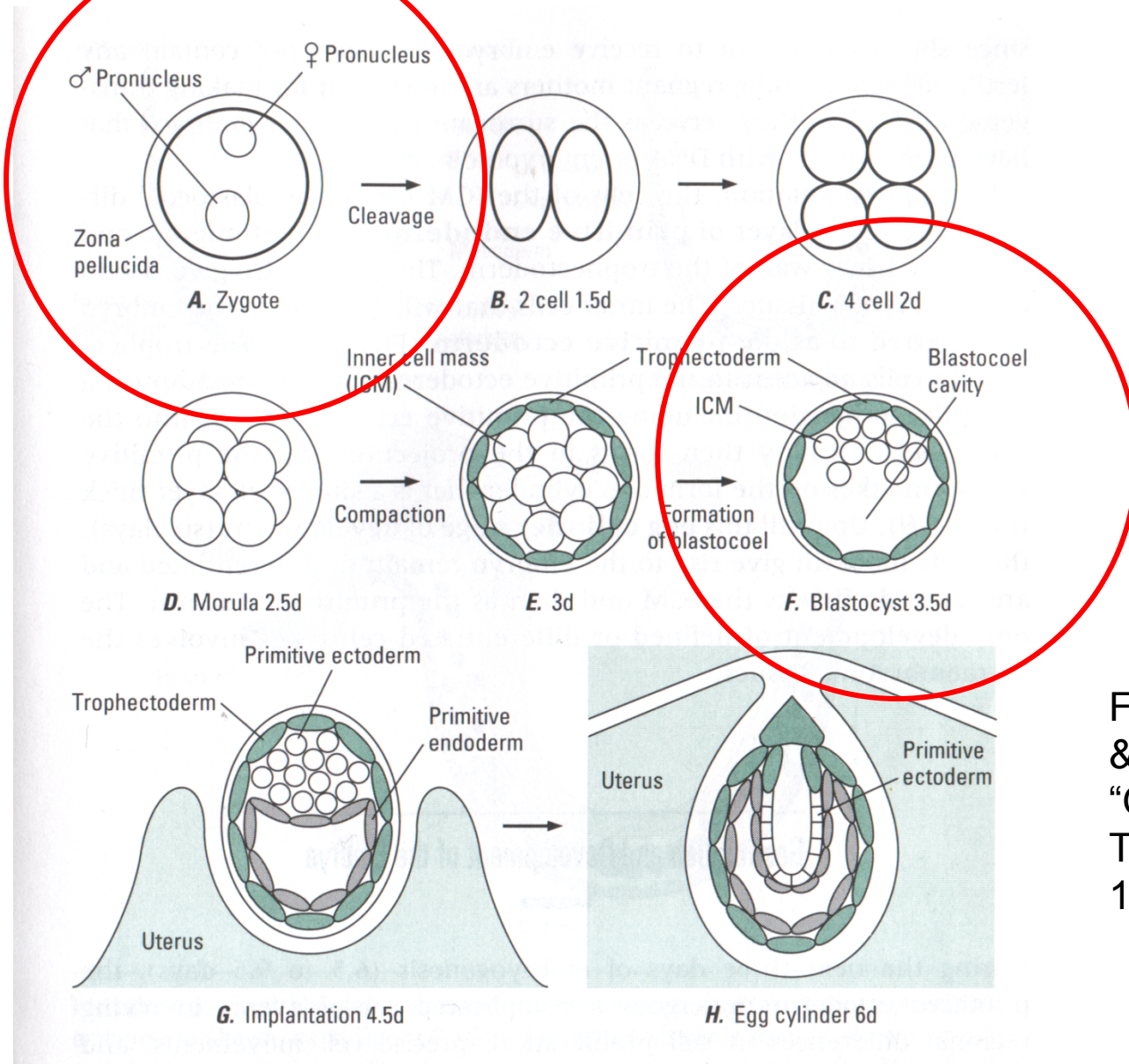
par le protocole prévu en thérapie humaine: traitement de cellules différenciées, de cellules souches, éventuellement d'embryons...

CRISPR de plus en plus souvent

Inactivation chez la souris

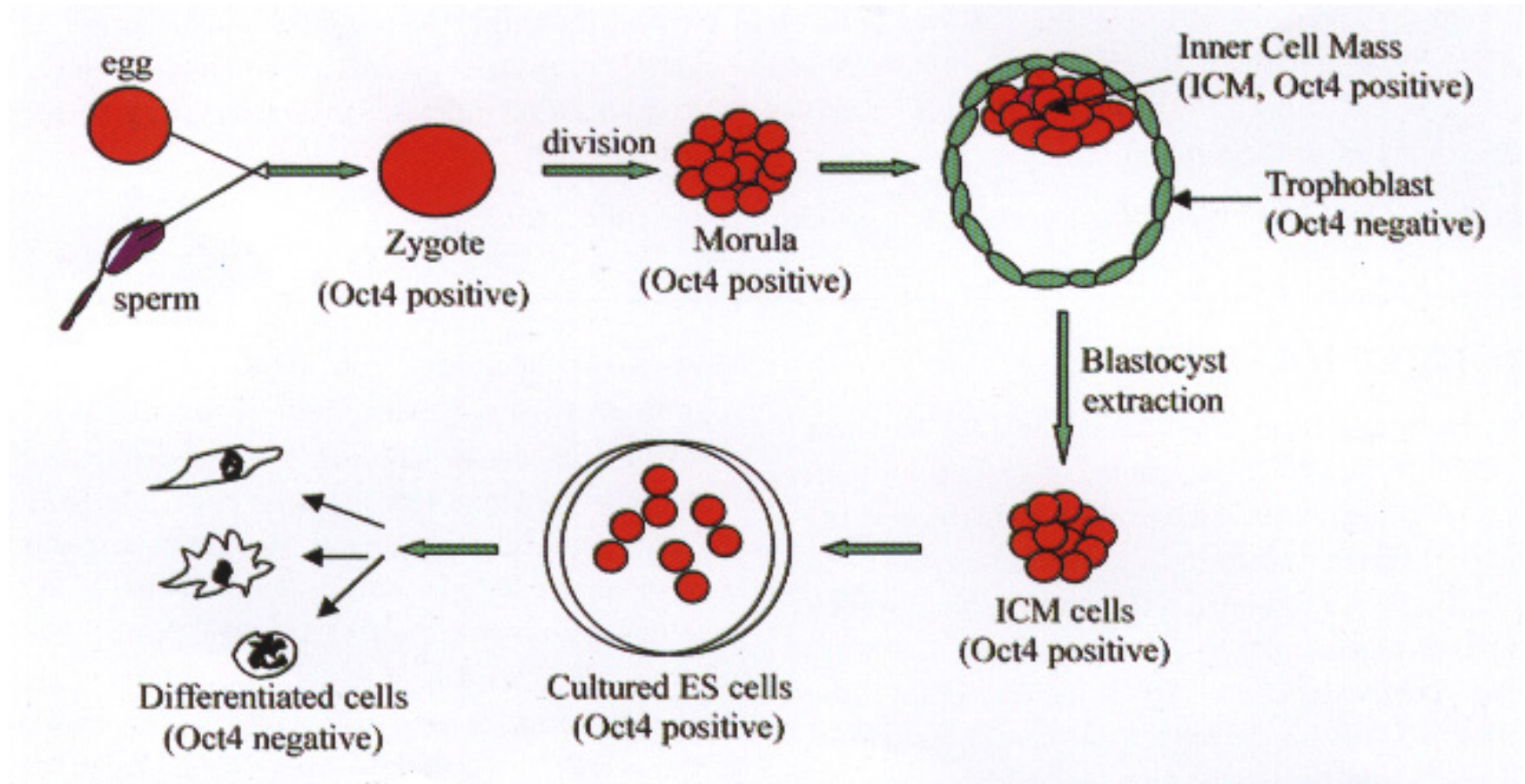


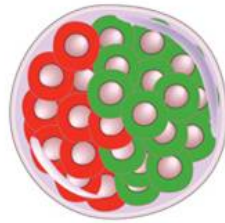
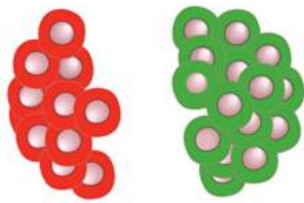
Développement précoce de la souris



From Sedivy
& Joyner
"Gene
Targeting"
1992

Inactivation chez la souris



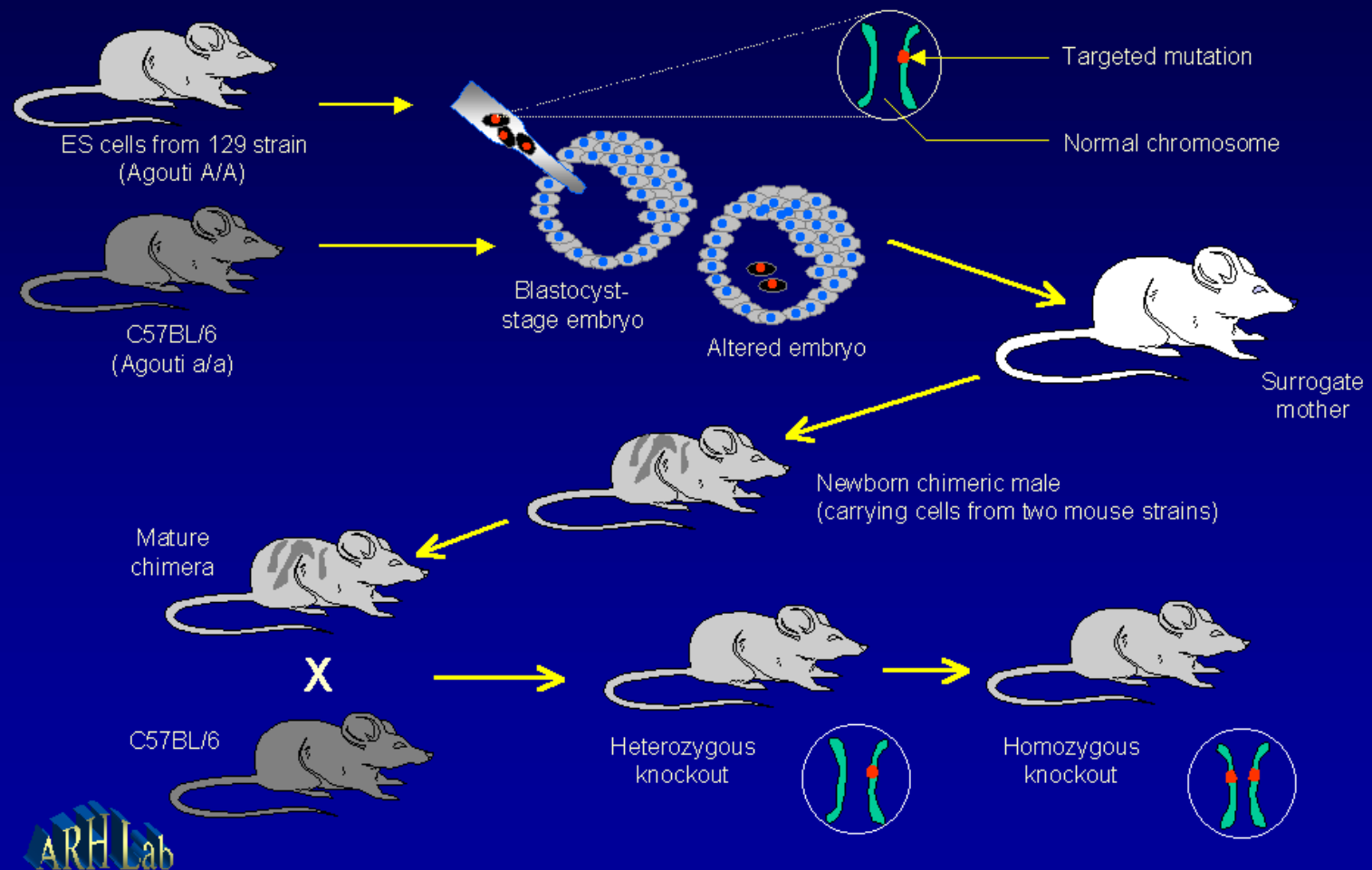


**Souris chimères
(provenant de deux
embryons)**

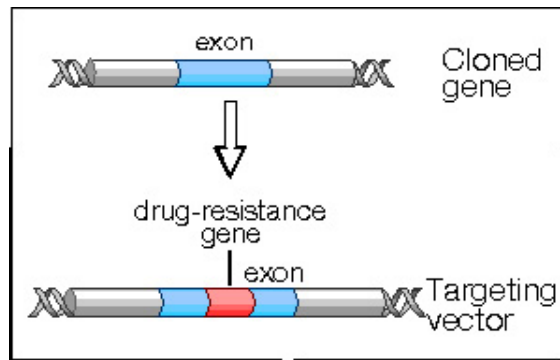


Inactivation chez la souris

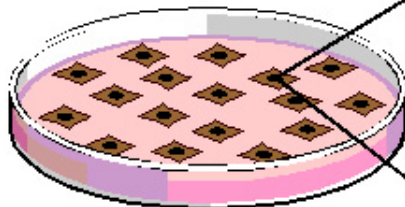
TARGETED GENE REPLACEMENT IN MICE



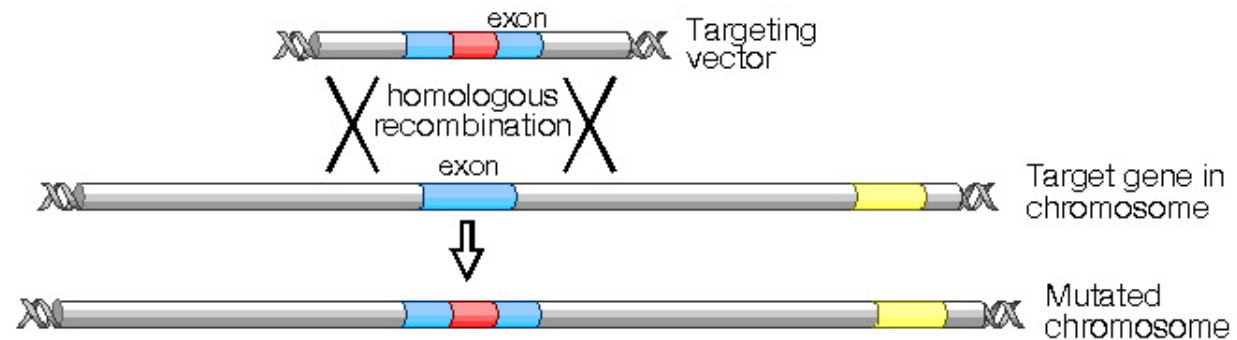
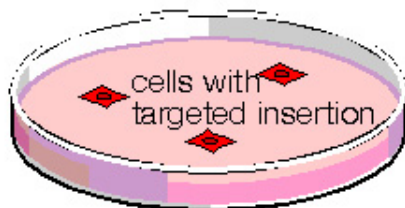
Inactivation chez la souris



Targeting vector
introduced
into ES cells

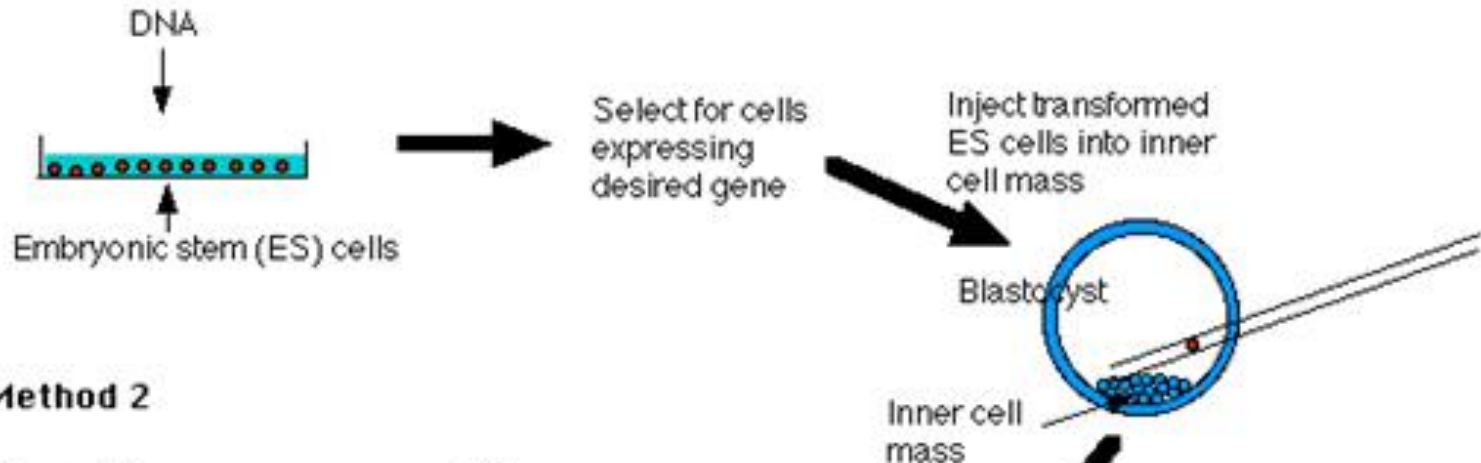


Select for drug-
resistant cells

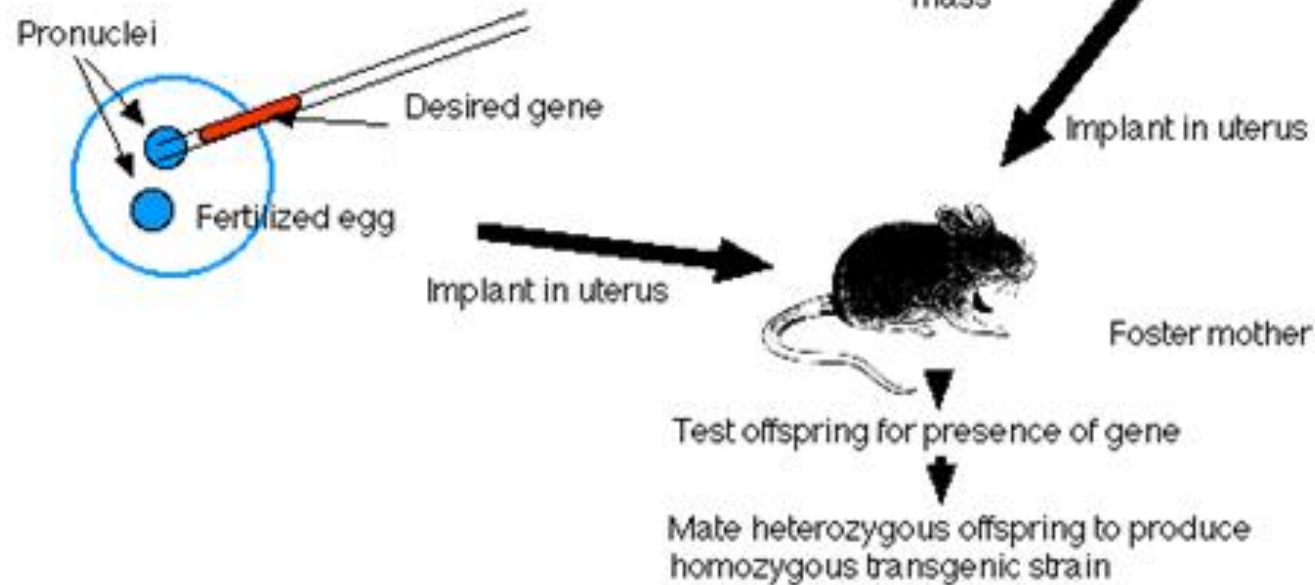


Transgénèse chez la souris, résumé

Method 1



Method 2



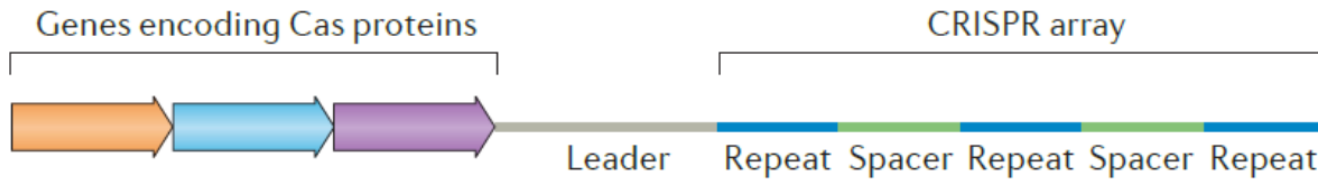
**Génétique inverse, transfert de gènes
Manipulations génétiques,
Organismes génétiquement modifiés**

**Recombinaison homologue au locus:
AVANT CRISPR**

**APRES CRISPR: "genome editing", "édition
de génome"**

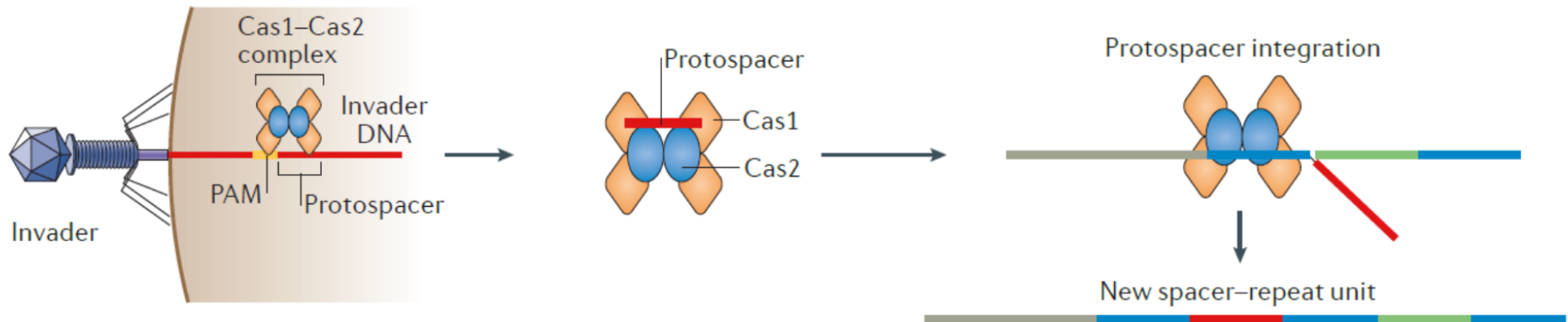
CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

Organisation du locus bactérien CRISPR/Cas9



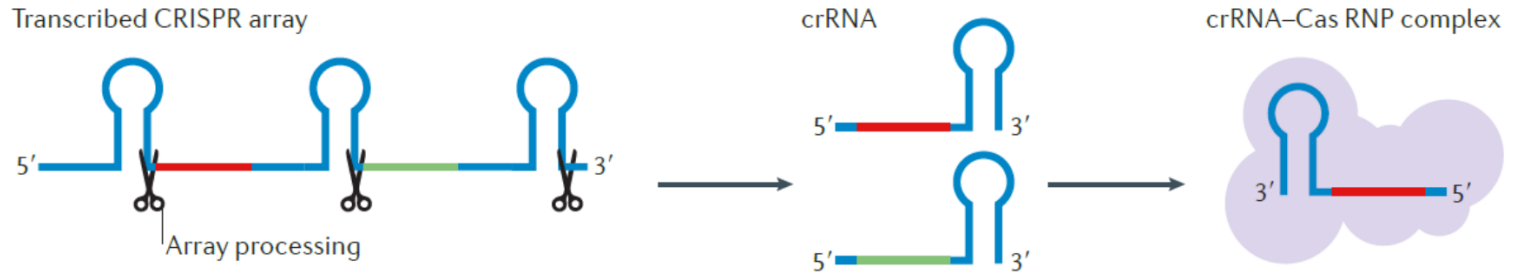
Spacer : ADN de phage, plasmide
Repeat : ADN bactérien

Adaptation

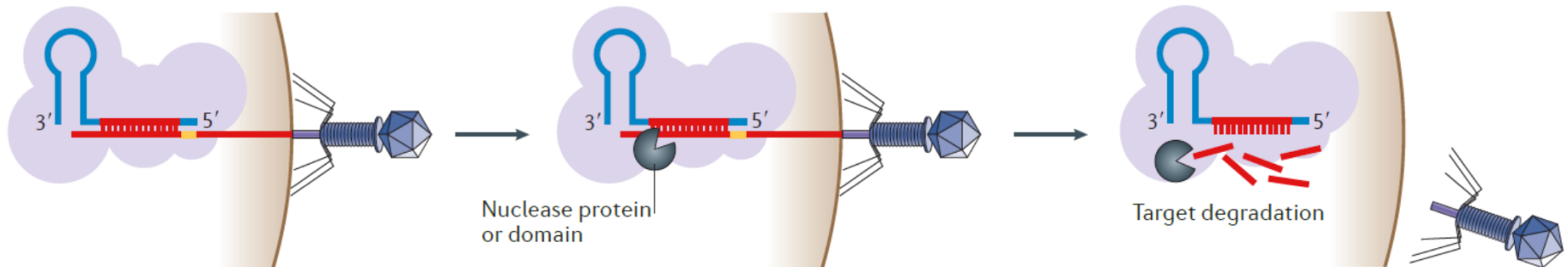


CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

Expression et maturation du complexe CRISPR/Cas9

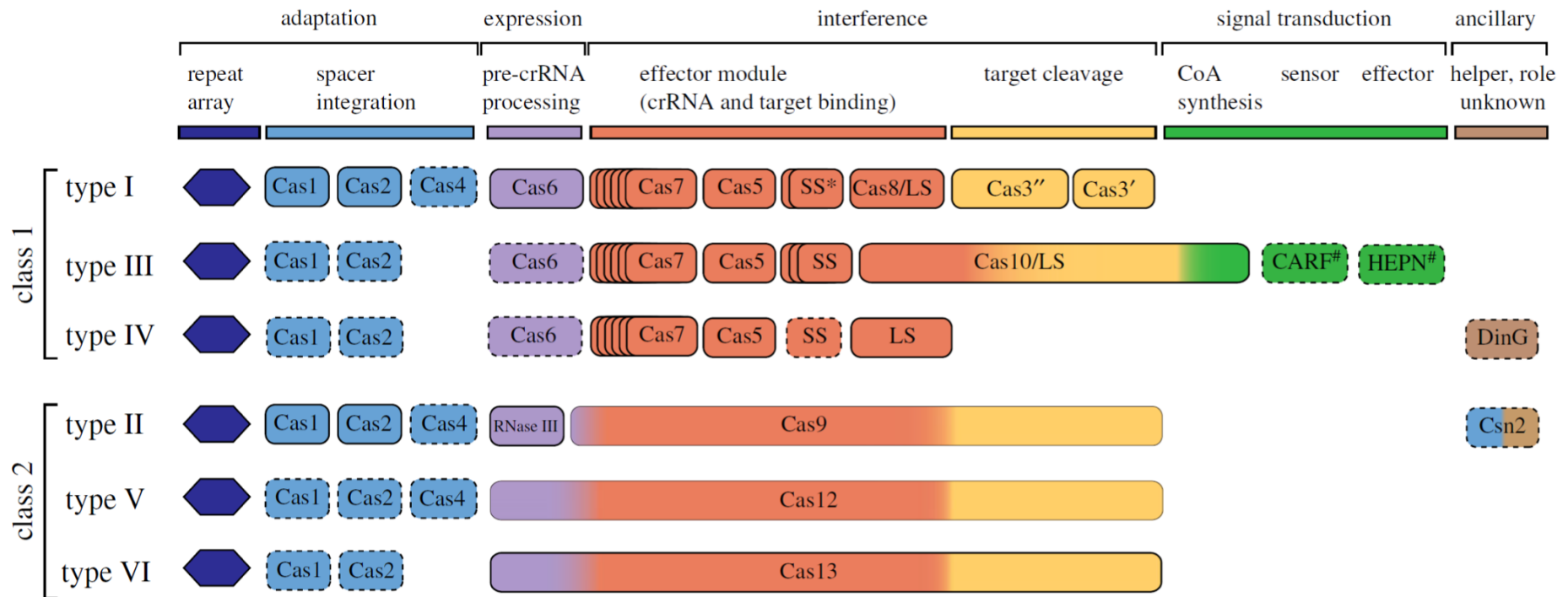


Interférence



CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

Un système diversifié

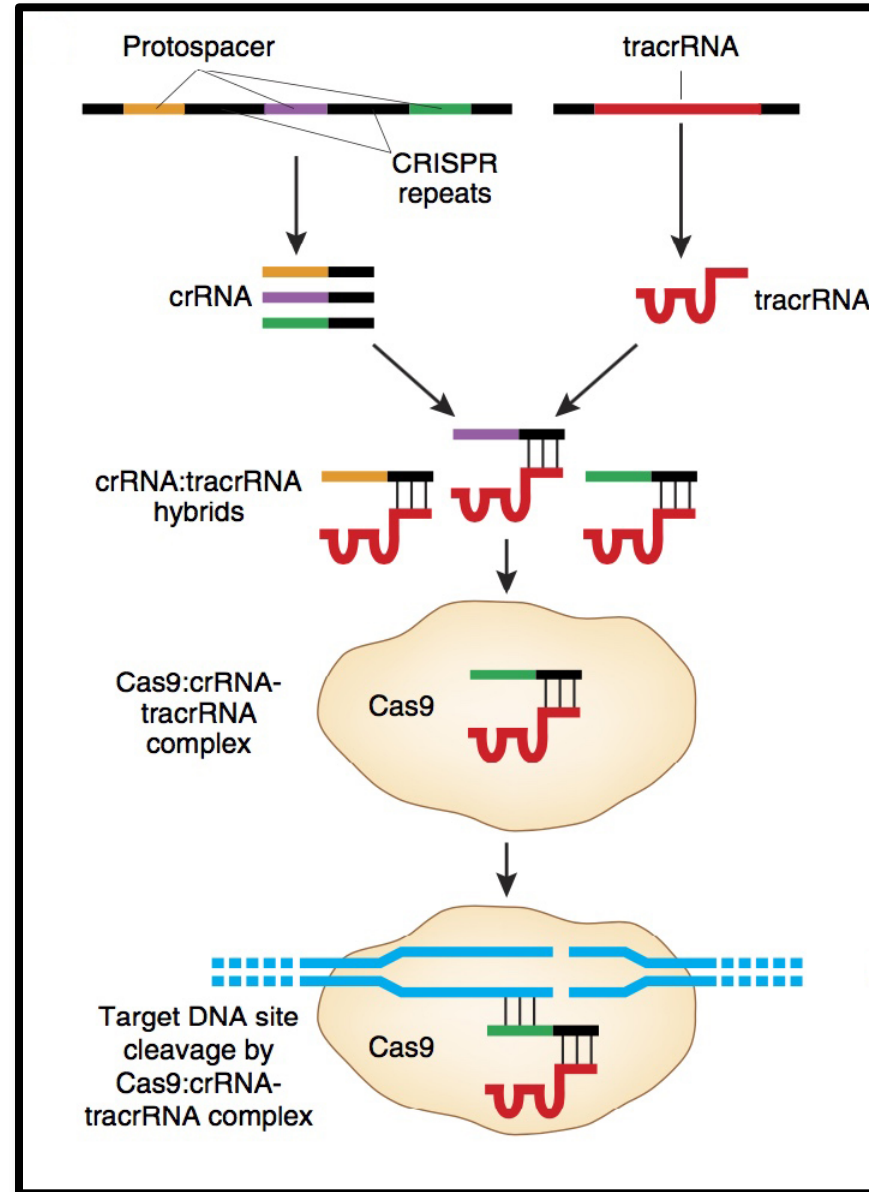


CRISPR-Cas systèmes de défense des génomes bactériens

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

Clustered **R**egularly
Interspaced **S**hort
Palindromic **R**epeats

CRISPR RNA
(crRNA)



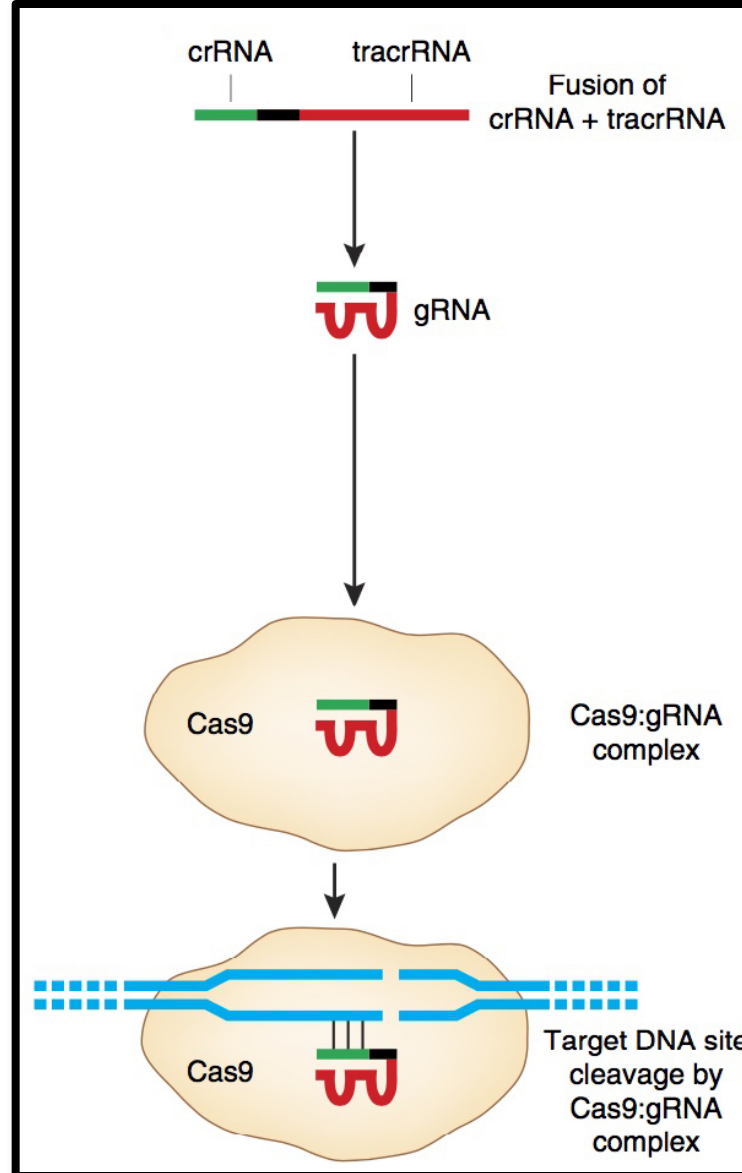
trans-activating
CRISPR RNA
(tracrRNA)

Cas9
endonuclease

➤ Cassure
double-brin

Streptococcus pyogenes

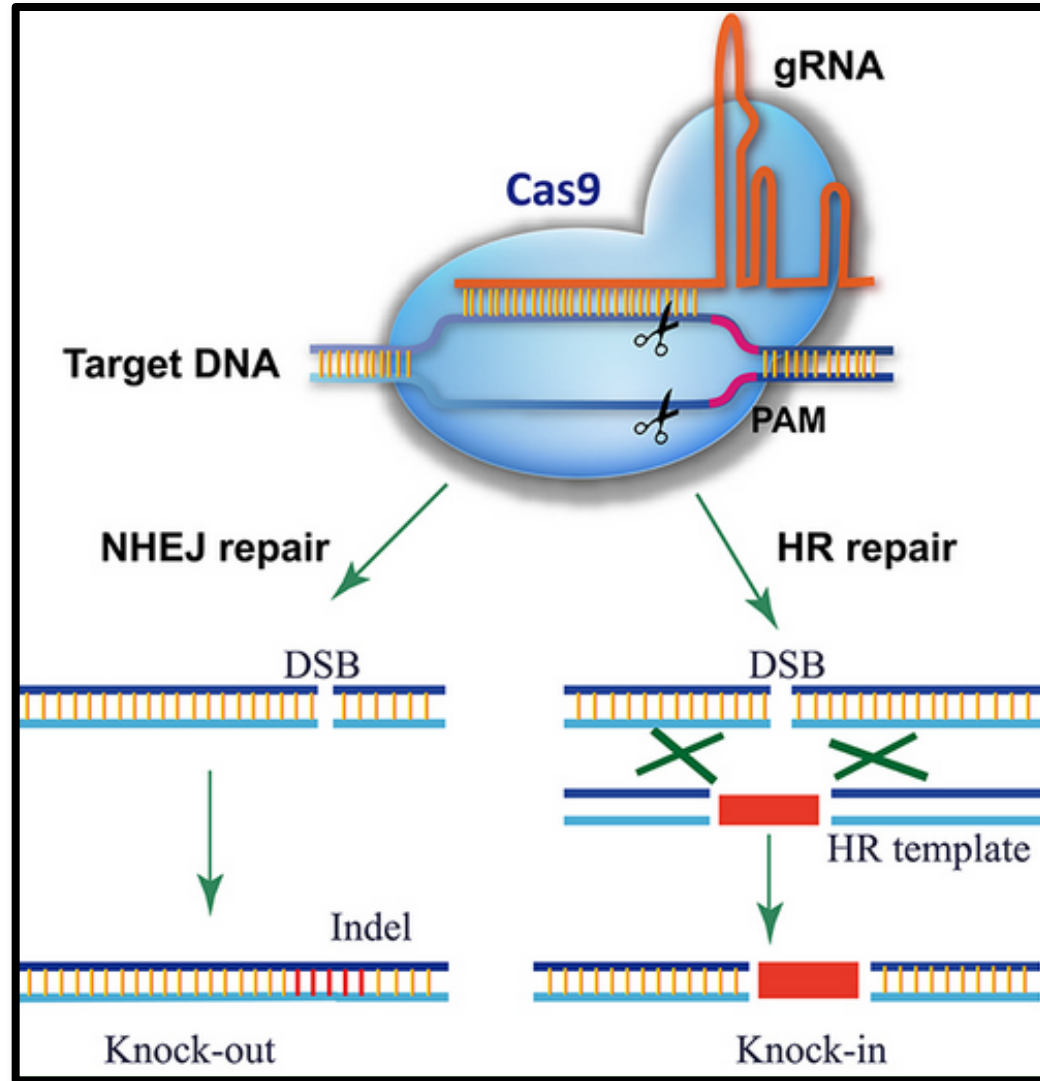
CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes



Outil de ciblage :
Homologie acides
nucléiques

Cassure double-brin
ciblée

CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes

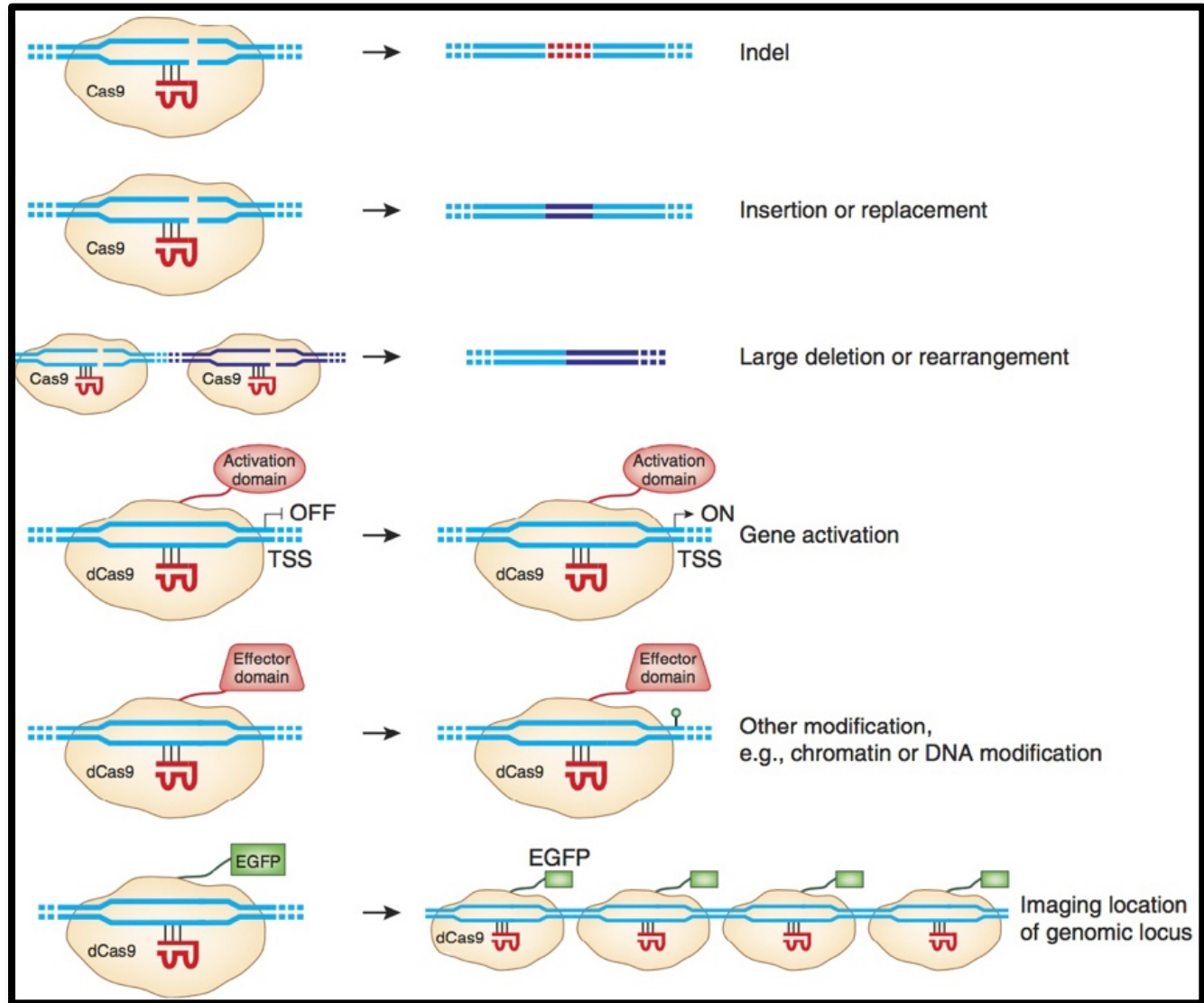


Réparation
imprécise via
NHEJ

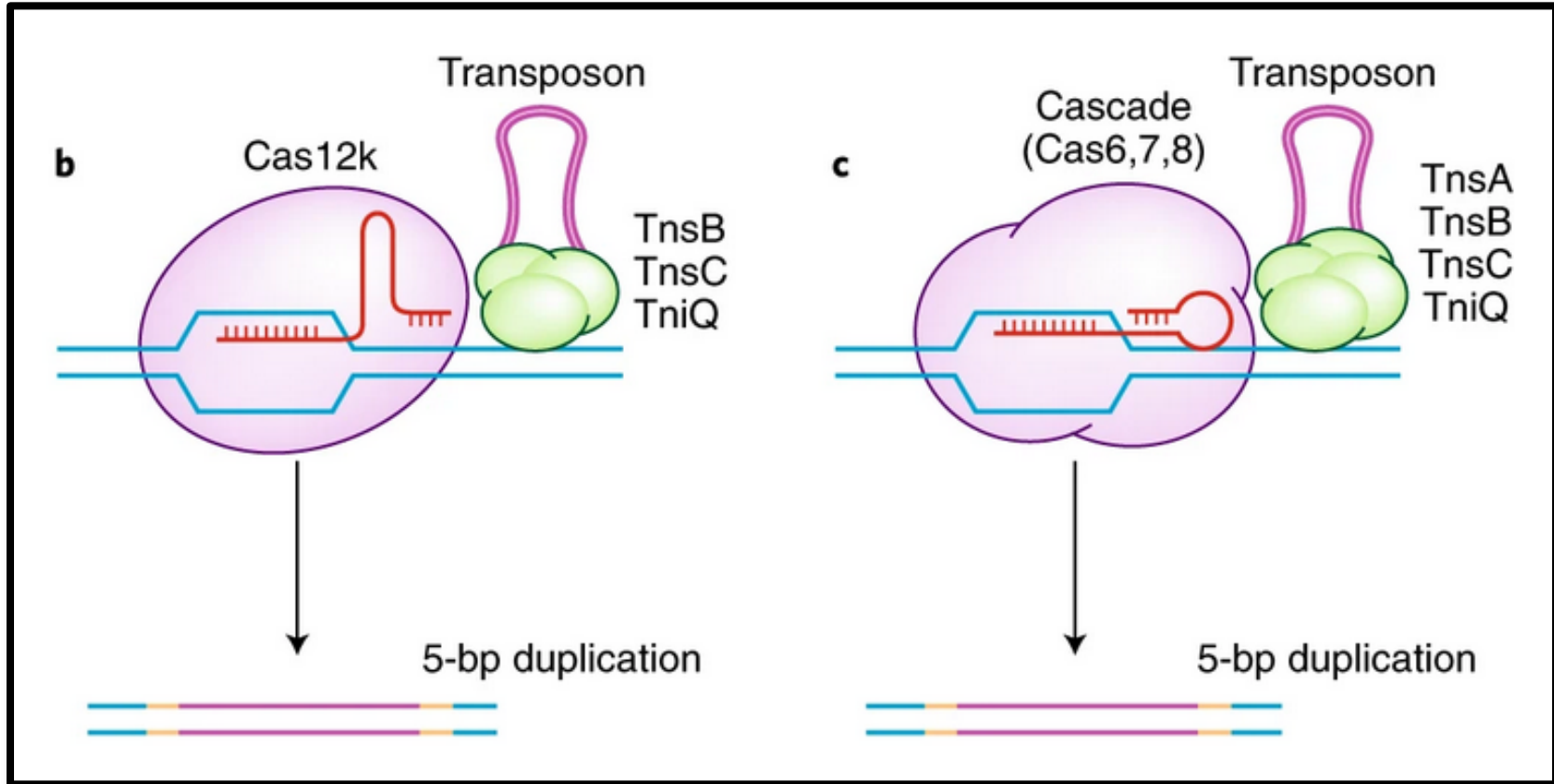
Recombinaison
homologue

CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes

Réparation
imprécise via
NHEJ



CRISPR-Cas systèmes de modification ciblée des génomes



Coupure via transposase : pas de système de réparation impliqué

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: peu efficace mais **CRISPR** peut changer la donne, à nouveau
- par injection de cellules ES modifiées (éventuellement grâce à **CRISPR**) dans un blastocyste, 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...

CRISPR de plus en plus souvent

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 Amoasii,^{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‡}

Amoasii *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 l'établissement du modèle et pour la thérapie

Utilisation de modèle animaux pour la thérapie génique

1- Engineering a mouse model with a common human DMD

« To optimize gene editing in vivo, we first generated mice lacking exon 50 of the *Dmd* gene, using the CRISPR/Cas9 system directed by two sgRNAs targeting sequences in the surrounding introns.

F0 generation pups were screened for indels, and a founder with a 245–bp deletion that completely eliminated exon 50 was chosen for further analysis. » -> DEx50

« Muscles from DEx50 mice displayed necrosis by 3 weeks of age. DEx50 mice showed severely dystrophic muscle with necrotic fibers and inflammatory infiltration by 2 months of age, and elevation of serum creatine kinase, indicative of muscle damage. »

Utilisation de modèle animaux pour la thérapie génique

2-Tailoring a single DNA cut genome editing strategy

- Proper exon splicing requires 3' and 5' splice acceptor and donor sites of exons. Exons also contain splicing regulatory sequences, such as an exonic splicing enhancer (ESE) sequence that is responsible for proper recognition by the splicing machinery and inclusion of the exon into the mRNA.
- We designed a sgRNA that targets a region adjacent to the exon 51 splice acceptor site (referred to as sgRNA-51) and cuts 9 bp away from the intron-exon junction.
- ❖ For the in vivo delivery of Cas9 and sgRNA-51 to the skeletal muscle and heart tissue, we used AAV9, which displays preferential tropism for these tissues ... and the CK8e promoter, which is highly specific for expression in the muscle and the heart.

Utilisation de modèle animaux pour la thérapie génique

Correction of the dystrophin reading frame in DEx50 mice by a single DNA cut

Sequence of the RT-PCR products of the DEx50-51 mouse dystrophin lower band confirmed that exon 49 spliced directly to exon 52, excluding exon 51. Sequence of RT-PCR products of DEx50 reframed (DEx50-RF) is also shown.

C	WT	Exon 50	Exon 51
		CTGAGCACTACTGGAGCCT	CTGCCAGTCAGACTGTTACTCTAGTGACACAA
		L S T T G A	S A S Q T V T L V T Q
ΔEx50		Exon 49	Exon 51
		AGCACTCAGCCAGTGAAGCTGCCAGTC	AGACTGTTACTCTAGTGACACAA
		S T Q P V K L P V R L L L	STOP H N
ΔEx50-RF		Exon 49	Exon 51
		AGCACTCAGCCAGTGAAGCTGCCAGTC	AAGACTGTTACTCTAGTGACACAA
		S T Q P V K L P V K	T V T L V T Q
ΔEx50-51		Exon 49	Exon 52
		AGCACTCAGCCAGTGAAGGCAACACTGCAAGATT	TGGAACAGAGACGCCCC
		S T Q P V K A T L Q D L E Q R R P	

mutant: décalage
du cadre de
lecture

63%: redécalage
du cadre de
lecture

15%: délétion
de ESE de
l'exon 51

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 de 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

Thérapie génique

Exemples:

2012 **Glybera**: **traitement de pancréatite génétique grave: LPLD** (lipoprotein lipase deficiency): **virus contenant 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.

2017 **YESCARTA**: **traitement 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.

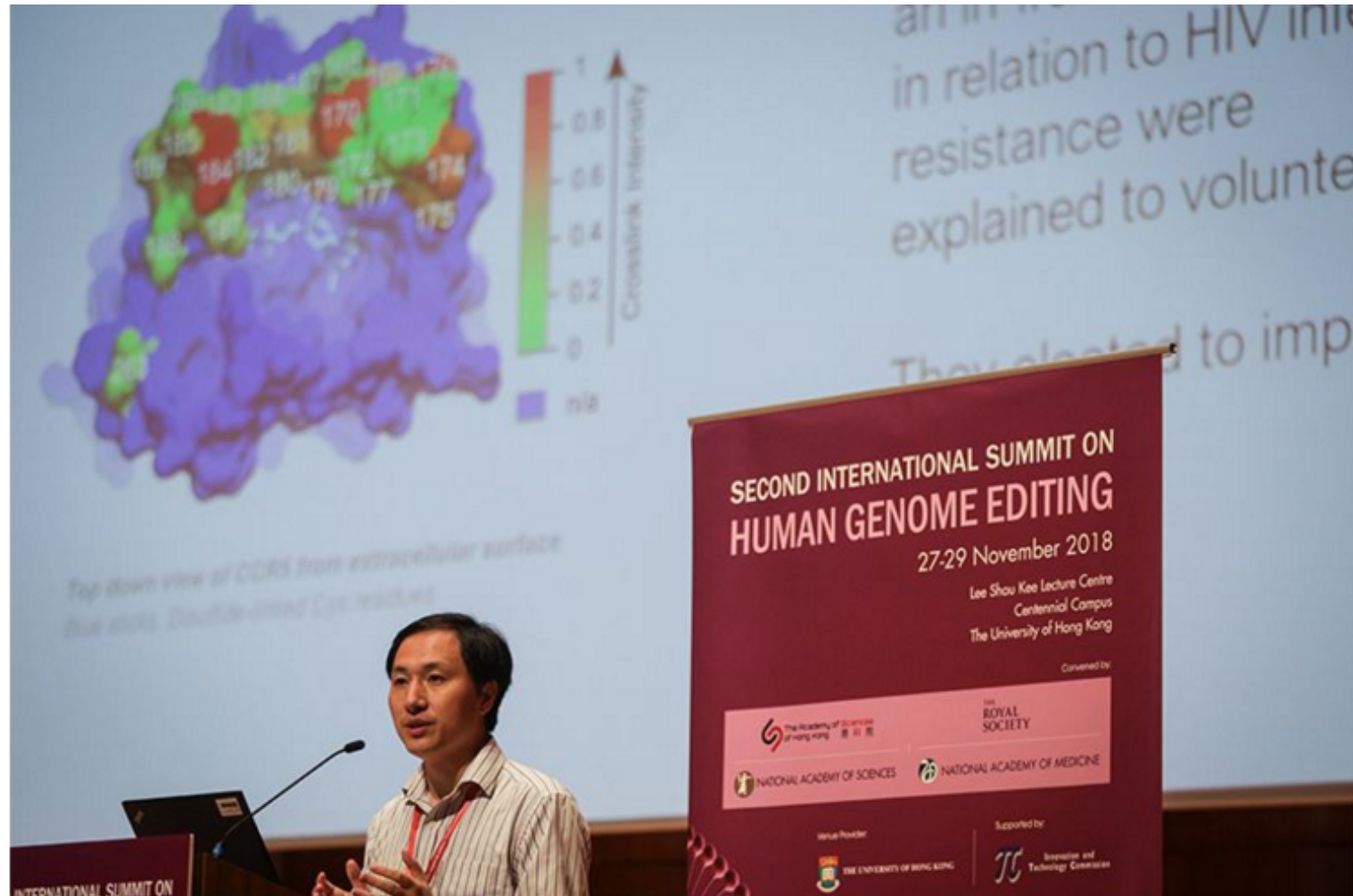
Effets secondaires immunologiques, neurologiques.

Thérapie génique

Le pire exemple?

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

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 conférence internationale sur les modifications du génome humain, à Hong Kong.

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

L'enquête sur les « bébés CRISPR » génétiquement modifiés confirme une autre grossesse en cours



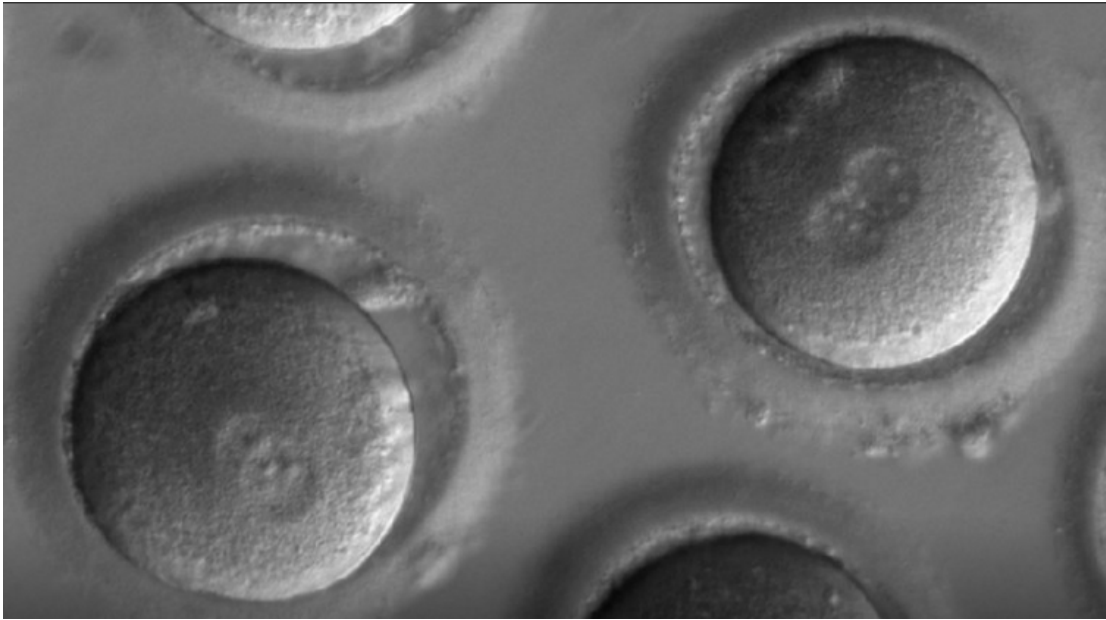
Nelly Lesage - 23 janvier 2019 - Sciences

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)



Oeufs humains fécondés *in vitro*

Technologie maîtrisée depuis les années 1980.



LOUISE BROWN NEE EN 1978
PREMIER BEBE "EPROUVETTE"



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...





Usbek & Rica

26/02/2019 07:00

#Santé

#Société

Les premiers bébés CRISPR auraient été accidentellement « augmentés »

Accueil / Santé / Actualités



— SANTÉ —

Les bébés OGM chinois seront-ils plus intelligents ?

ACTUALITÉ ⚡

Classé sous : **BÉBÉ**, **CRISPR-CAS9**, **VIH**



Céline Deluzarche
Journaliste

Publié le
03/03/2019



— SANTÉ —

Bébés OGM chinois : la mutation génétique aurait réduit leur espérance de vie

ACTUALITÉ ⚡

Classé sous : [BÉBÉ](#) , [CRISPR-CAS9](#) , [VIH](#)



Marie-Céline Ray
Journaliste

Publié le
04/06/2019