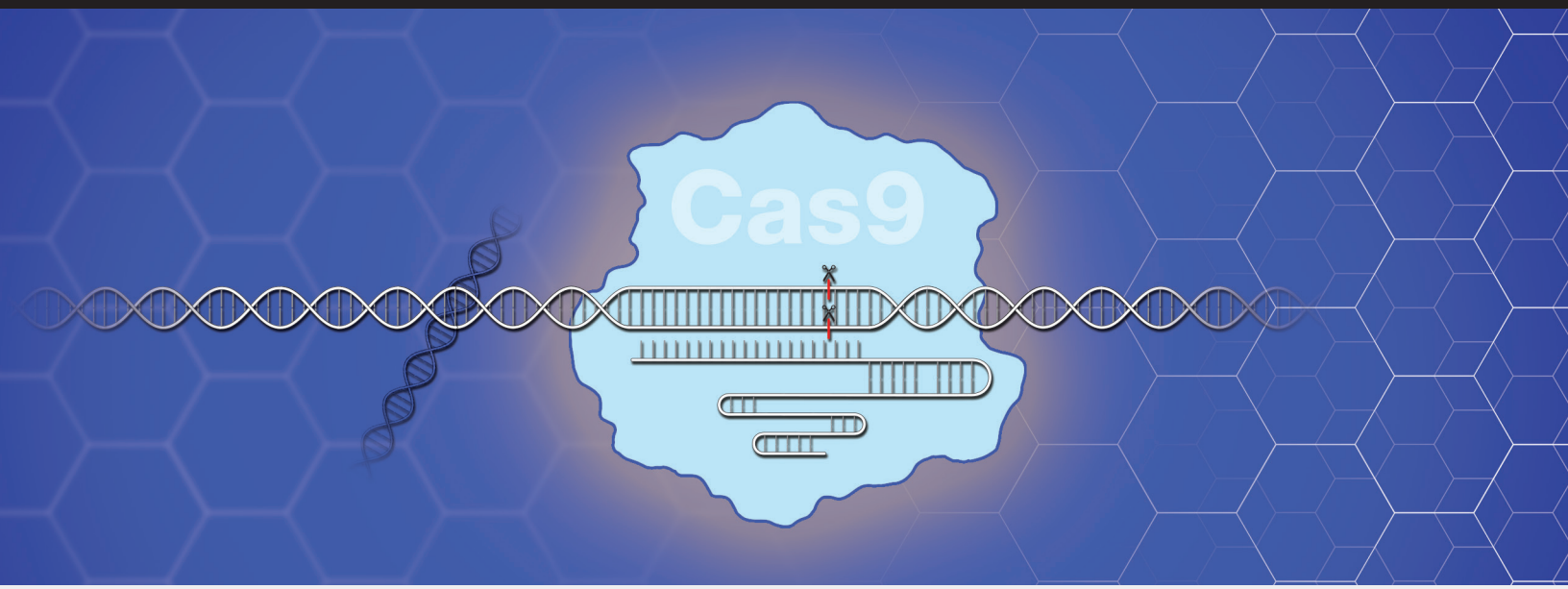
BIO-RAD Explorer



Out of the Blue CRISPR Kit

N° de référence 12012608EDU

Guide de l’enseignant

Remarque : La reproduction de toute partie du présent document est autorisée exclusivement à des fins non commerciales d’enseignement. L’usage commercial du contenu protégé par le droit d’auteur, incluant l’utilisation dans des matériaux éducatifs pour laquelle un paiement est reçu, nécessite l’autorisation expresse de la part de Bio-Rad™ Laboratories, Inc. Contactez-nous à l’adresse **explorer@bio-rad.com** pour de plus amples informations.

Ce produit n’est pas destiné à l’auto-médication.

Pour l’assistance technique, contactez votre service Bio-Rad local ou le **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723) option 2 pour les États-Unis.

BIO-RAD

Cher enseignant

Le rythme des progrès réalisés dans les sciences de la vie et l'ingénioisité des hommes changent nos vies et le futur de nos étudiants jour après jour. Les scientifiques sont aujourd'hui capables de mettre à profit la capacité innée d'une cellule à réparer son ADN pour modifier le génome. Diverses approches à l'édition du génome ont été développées. Parmi elles, le système CRISP (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »)/Cas9 se distingue par sa précision, sa facilité d'utilisation et son faible coût. Découvert comme un type d'immunité des procaryotes, ce système révolutionne aujourd'hui la recherche scientifique, l'agriculture et la médecine.

Avec Out of the Blue CRISPR Kit, vos étudiants disposeront des outils pour réaliser une réelle modification génétique dans leur salle de classe. Module d'apprentissage d'un nouveau genre, cette trousse suscitera l'enthousiasme de vos étudiants et leur offrira le privilège d'expérimenter la technologie CRISP ! Avec les réactifs, techniques et organismes habituels, vos étudiants s'exerceront sans aucun danger à l'édition du génome par CRISPR/Cas9 pour perturber le gène *lacZ* chez la bactérie *E. coli*. Le phénotype qui en résulte sera révélé immédiatement au moyen du criblage bleu-blanc. De plus, vos étudiants pourront utiliser la PCR pour confirmer l'édition chromosomique à l'aide du module optionnel complémentaire de génotypage Out of the Blue Genotyping Extension. Dès lors que vos étudiants auront acquis des connaissances plus approfondies sur les aptitudes uniques et des limites de la technologie CRISP/Cas9, ils pourront tenir des discussions plus poussées sur les promesses, les risques et l'éthique en matière de modification génétique.

Les activités incluses dans cette trousse ont été développées en partenariat avec Sherry Annee, ancienne présidente de la National Association of Biology Teachers et professeure en biotechnologie à la Brebeuf Preparatory Academy à Indianapolis, Indiana, et Thomas Tubon Jr., professeur et directeur du programme Stem Cell Program de l'université Madison Area Technical College de Madison, Wisconsin.

Votre retour d'information constitue une aide précieuse dans nos efforts permanents pour améliorer notre programme et nos produits. N'hésitez pas à nous faire part de vos anecdotes, commentaires et suggestions.

Partagez les réussites de vos étudiants sur le réseau social @bioradeducation.

L'Équipe Bio-Rad Explorer
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547
explorer@bio-rad.com

Sommaire

Avant de commencer

Conservation des trousses 1
Consignes de sécurité 1
Composants de la trousse 2
Informations relatives à la commande 3
Aperçu des activités de la trousse 4
Chronologie des activités 5
Adéquation du programme 6

Préparation réalisée par l'enseignant

Instructions de préparation 7
Informations préalables destinées à l'enseignant 12

Guide de l'enseignant

Activité 1 : Introduction à la technologie d'édition du génome CRISP/Cas9 15
Activité 2 : Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR 16
Activité de synthèse : Identification et analyse bio-informatique des sites recherchés par la protéine Cas9 17

Annexe A : Débat structuré entre étudiants sur l'édition du génome par CRISPR 19
Annexe B : Le système CRISPR/Cas9 et le système immunitaire microbien 23
Annexe C : Instructions relatives à la préparation de boîtes de gélose LB pour petit micro-ondes 25

Ressources 28

Mentions légales 29

Conservation des trousses

Sur réception de la trousse Out of the Blue CRISPR Gene Editing Kit :

1. Consigner l'emplacement de conservation et les numéros de lots indiqués sur les étiquettes produits.

2. Conserver la trousse de réactifs **Out of the Blue CRISPR Kit** au congélateur (–20 °C).

3. Conserver la **gélose nutritive LB en poudre** et les **gélules de bouillon LB** à température ambiante (~20 °C).

4. Visiter le site **bio-rad.com/outoftheblue** pour télécharger les dernières versions du guide de l'enseignant et du guide de l'étudiant.

Le **support technique** est joignable à l'adresse support@bio-rad.com ou 1-800-4BIORAD, option 2.

Consignes de sécurité

La trousse Out of the Blue CRISPR Kit et son jeu de recharge contiennent de la kanamycine et de la spectinomycine qui peuvent causer des réactions allergiques ou des irritations. Ces deux antibiotiques sont additionnés au milieu LB gélosé que les étudiants seront amenés à manipuler dans le cadre de leurs activités. Les personnes souffrant d'allergie à l'un de ces composants ou à des antibiotiques similaires doivent consulter leur médecin avant de manipuler les matériaux et réactifs de cette trousse. Au terme des activités de laboratoire, placez toutes les boîtes de culture bactérienne et tous les matériels en contact avec les bactéries dans une solution d'eau de Javel à 10 % pendant au moins 20 minutes pour les décontaminer. Suivez les réglementations locales pour d'autres recommandations relatives à l'élimination.

La souche bactérienne *E. coli* HB101-pBRKan contenue dans cette trousse est non pathogène et a été génétiquement modifiée pour empêcher sa croissance en l'absence de milieu enrichi. Cependant, les pratiques d'usage en microbiologie doivent être utilisées.

Tout comme les enzymes de restriction, la protéine Cas9 coupe l'ADN à la différence toutefois que Cas9 est programmable et qu'elle peut être guidée pour couper une séquence spécifique d'ADN. L'activité en laboratoire de la trousse Out of the Blue CRISPR Kit suppose l'utilisation de la protéine Cas9 pour couper un gène spécifique nommé *lacZ*, qui n'est présent que dans les bactéries. Les étudiants couperont le gène *lacZ* et remplaceront une partie de la séquence par un insert d'ADN qui va perturber le gène. L'opération de perturbation du gène *lacZ* chez les bactéries est une pratique aussi courante en salle de classe qu'en laboratoire de recherche. L'approche utilisée dans cette activité laboratoire se fonde sur des pratiques scientifiques éprouvées et sécurisées et utilise la protéine Cas9 comme un nouveau ciseau moléculaire.

Les consignes de sécurité de base applicables en laboratoire doivent être respectées, y compris le port de gants et de lunettes de sécurité.

Composants de la trousse

Chaque trousse contient le matériel nécessaire pour 8 postes de travail étudiants.

Article	**Quantité**
E. coli HB101-pBRKan, lyophilisé	1 flacon
Matrice d'ADN plasmidique donneur (pLZDonor)	215 µl
Matrice d'ADN donneur et ARN plasmidique guide (pLZDonorGuide)	215 µl
Mélange KIX Mix	263 mg
Spectinomycine en poudre	18 mg
L (+) arabinose, lyophilisé	600 mg
Gélose nutritive LB en poudre	25 g
Bouillon LB en gélule, pour 50 ml de bouillon LB	1 gélule
Anse d'inoculation, stérile, 10 µl	80
Boîtes de Pétri, 60 mm, stérile	60
Tubes de microcentrifugeuse, sans additif, 2,0 ml	90
Solution de transformation (50 mM $CaCl_2$, pH 6,1), stérile	15 ml
Guide de démarrage rapide	1
Guide des réponses de l'enseignant	1

Matériels requis (non inclus dans cette trousse)	**Quantité**
Micropipette et pointes à volume réglable de 100 – 1 000 µl	1 – 8
Micropipette et pointes à volume réglable de 20 – 200 µl	4 – 8
Micropipette et pointes à volume réglable de 2 – 20 µl	4 – 8
Balance, plage de 1 à 10 g	1
Autoclave ou micro-ondes	1
Thermomètre (0 – 60 °C)	1
Bain sec ou bain-marie à régulation de la température	1
Mousses de flottaison, pour bain sec	8
Erlenmeyer ou flacon autoclavable à bouchon, 500 ml	1*
Erlenmeyer ou flacon autoclavable à bouchon, 1 l	1*
Flacon autoclavable avec bouchon, 150 – 250 ml	1
Éprouvette graduée, 500 ml	1
Eau désionisée ou distillée	750 ml
Glace pilée et récipient (par ex. seau à glace ou cupule en polystyrène)	8
Ciseau	8
Marqueurs indélébiles	8
Papier d'aluminium	
Eau de Javel, solution à 10 %	
Ruban adhésif de laboratoire	

Matériels recommandés (non inclus dans cette trousse)	**Quantité**
Incubateur ou incubateur-agitateur avec plateau	1
Contrôleur de pipettes et pipettes sérologiques stériles	1
Agitateur vortex	1
Portoir	8

* Si votre micro-ondes ne peut pas contenir de flacon d'un litre, reportez-vous à l'annexe C pour obtenir différentes instructions sur la préparation des boîtes de gélose LB. Dans ce cas, il vous faudra deux flacons de 500 ml supplémentaires.

Out of the Blue CRISPR Kit

Informations relatives à la commande

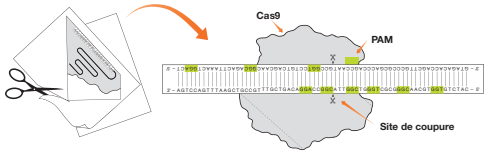
N° de référence	Description
Trousses et jeux de recharge	
12012608EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit**
12012620EDU	**Out of the Blue CRISPR Kit Refill Pack**
12012607EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension**
12012708EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension Refill Pack**
17006070EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension with Small Fast Blast Electrophoresis Pack**
17006284EDU	**Out of the Blue Genotyping Extension with Small UView Electrophoresis Pack**
17006081EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits**
17006285EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small UView DNA Electrophoresis Pack**
17006286EDU	**Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small Fast Blast DNA Electrophoresis Pack**
Consommables	
1660472EDU	**LB Nutrient Agar**, 500 g
1660412EDU	**LB Broth Capsule**, pour 50 ml de bouillon LB
1660421EDU	**LB Nutrient Broth**, 10 ml
1660470EDU	**Petri Dishes**, 500
2239430EDU	**2 ml EZ Micro Test Tubes**, 500
1660471EDU	**Inoculation Loops**, 80
Équipement et matériels de laboratoire	
1660501EDU	**Mini Incubation Oven**, 120 V
17002944EDU	**Benchtop Shaking Incubator Starter Set**, 120 V
17002946EDU	**Benchtop Shaking Incubator Starter Set**, 230 V pour l'Europe et le Royaume-Uni
12005504EDU	**Petri Dish Shelf for Shaking Incubator**
12011919EDU	**Mini Centrifuge**, 100 – 240 V
1660610EDU	**BR-2000 Vortexer**, 120 V
1660611EDU	**BR-2000 Vortexer**, 220 V pour l'Union européenne
1660621EDU	**BR-2000 Vortexer**, 220 V pour le Royaume-Uni
1660490EDU	**Professional Pipet Controller**
1660481EDU	**Green Racks**, jeu de 5 portoirs

Aperçu des activités de la trousse

Activité 1

Introduction à la technologie d'édition du génome CRISP/Cas9

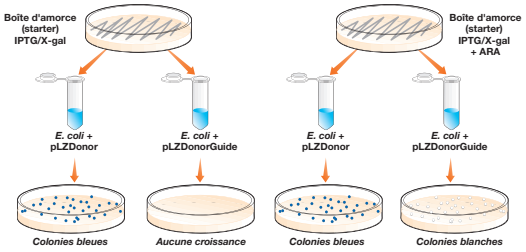
Après avoir lu les informations, les étudiants utiliseront un modèle papier pour parcourir les différentes étapes de coupure de l'ADN par le système CRISPR/Cas9 et les étapes de réparation par recombinaison homologue. Ensuite, ils utiliseront un modèle mathématique pour démontrer la précision bien plus grande du système CRISPR/Cas9 par rapport aux enzymes de restriction.



Activité 2

Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR

Les étudiants modifieront le gène *lacZ* chromosomique des bactéries *E. coli* à l'aide de systèmes d'expression à plasmides appliqués à la matrice d'ADN donneur et à l'ARN guide. Ensuite, ils utiliseront la méthode de criblage bleu-blanc pour calculer la performance de modification génétique avant de formuler des explications scientifiques relatives à leurs observations.



Activité de synthèse

Identification et analyse bio-informatique des sites recherchés par la protéine Cas9

Les étudiants appliqueront leurs connaissances pour identifier les sites cibles potentiels de la protéine Cas9 dans les gènes liés à des états pathologiques. Puis, en s'appuyant sur les résultats BLAST, les étudiants classeront les sites potentiels recherchés qu'ils ont identifiés sur la base des risques que présente l'édition hors site.

Chronologie des activités

Les activités de cette trousse sont prévues pour trois cours de 90 minutes ou plus, comme indiqué dans le tableau 1. Une chronologie alternative pour des cours d'env. 50 minutes est présentée dans le tableau 2.

Tableau 1. Chronologie suggérée pour des cours de 90 minutes ou plus une à deux fois par semaine.

	Cours 1	Cours 2	Cours 3
Travail en classe	Cours théorique d'introduction ou autre enseignement direct Commencer l'activité 1 « Introduction à la technologie d'édition du génome CRISP/Cas9 », Parties 1 à 4	Activité 2 : Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR, Partie 2. Réaliser l'édition du gène	Commencer l'activité de synthèse
Travail personnel	Terminer l'activité 1 Activité 2 : Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR, Partie 1. Répondre aux questions préalables aux travaux de laboratoire	Les étudiants récupèrent leurs boîtes après incubation et analysent les résultats Activité 2, Partie 3. Répondre aux questions postérieures aux travaux de laboratoire	Terminer l'activité de synthèse

Tableau 2. Chronologie alternative pour des cours d'env. 50 minutes tous les jours.

	Cours 1	Cours 2	Cours 3	Cours 4	Cours 5
Travail en classe	Cours théorique d'introduction ou autre enseignement direct Commencer l'activité 1 Introduction à la technologie d'édition du génome CRISP/Cas9	Commencer l'activité 2 : Travaux en laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR, Partie 2. Réaliser l'édition du gène	Suite Activité 2, Partie 2.	Terminer l'activité 2, Partie 2. Commencer l'activité 2, Partie 3. Répondre aux questions postérieures aux travaux de laboratoire	Commencer l'activité de synthèse
Travail personnel	Terminer l'activité 1 Commencer l'activité 2, Partie 1. Répondre aux questions préalables aux travaux de laboratoire			Terminer l'activité 2, Partie 3. Répondre aux questions postérieures aux travaux de laboratoire	Terminer l'activité de synthèse

Adéquation du programme

Connaissances préalables requises

- Bases sur la structure et les fonctions de l'ADN, de l'ARN et des protéines
- Appariement des bases nucléiques (comment écrire un brin d'ADN ou d'ARN complémentaire)
- Théorie fondamentale (ADN → ARN → Protéine → Caractère)
- Calculs simples de probabilité
- Étapes clés de la transformation bactérienne, y compris la structure et le fonctionnement des plasmides, les marqueurs de sélection d'antibiorésistance, et les protéines de stress
- Méthodes de culture bactérienne sur milieu gélosé
- Utilisation d'une micropipette

Concepts, thèmes et compétences

- **Structure et fonction de l'ADN, de l'ARN et des protéines** — Cas9 est une protéine et une nucléase qui coupe l'ADN à l'endroit indiqué par l'ARN guide. Les structures de ces trois composants du système CRISPR – protéine, ADN et ARN – font partie intégrante de ses fonctions.
- **Théorie fondamentale** — Les étudiants perturberont le gène *lacZ* (ADN), qui code (par le biais de l'ARNm) la β-galactosidase (protéine), une enzyme permettant à *E. coli* d'hydroliser le lactose, un sucre présent dans le lait (caractère). Les étudiants modifieront le gène *lacZ* et observeront un changement visible de phénotype.
- **Transformation bactérienne** — Cette activité pratique de laboratoire comprend la transformation des bactéries à l'aide de plasmides qui codent les composants du système CRISPR/Cas9. Le processus de transformation bactérienne met à profit les propriétés chimiques des parois des cellules bactériennes et de l'ADN pour insérer une information génétique dans un organisme.
- **Génie génétique** — La manipulation ou la modification de génomes par l'ingénierie en vue d'obtenir un phénotype particulier est l'objectif sous-jacent du génie génétique. La transformation bactérienne et l'édition du gène par CRISPR sont deux techniques issues du champs plus large du génie génétique.
- **Bio-informatique** — Les étudiants apprendront à utiliser la technique d'alignement BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) pour déterminer les risques relatifs d'édition d'un gène hors site par rapport aux sites potentiellement recherchés par la protéine Cas9 et pour évaluer la sécurité en utilisant ces sites dans la thérapie génique par CRISPR.
- **Questions éthiques, légales et sociales** — De nombreuses questions de portée plus larges se posent quant à l'utilisation de la technologie CRISPR qui permet de modifier relativement facilement le patrimoine génétique.

Instructions relatives à la préparation

Étape de préparation	Temps requis	Quand commencer
Préparer les boîtes de milieu LB gélosé	1 – 2 h plus deux jours pour le séchage	3 – 14 jours avant l'activité
Réhydrater *E. coli*	5 min plus 8 – 24 h d'incubation	2 jours avant l'activité
Ensemencer les boîtes d'amorce (starter) par striation	20 min plus 24 h d'incubation	24 jours avant l'activité
Distribuer les solutions	1 h	Jusqu'à 3 jours avant l'activité

Conseils

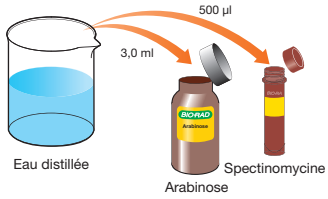
- Incuber les bactéries *E. coli* réhydratées à 37 °C pour obtenir des résultats optimaux.
- Si l'incubation a lieu à température ambiante (20 – 25 °C), incuber les boîtes starter pendant 72 h. Si la préparation des boîtes d'amorce (starter) a lieu le week-end, les incuber à température ambiante pendant 72 h.

Préparer les boîtes de gélose LB 3 – 7 jours avant l'activité 2

Si le micro-ondes disponible ne peut pas contenir de flacon d'un litre, se reporter à l'annexe C pour obtenir d'autres instructions sur la préparation des boîtes.

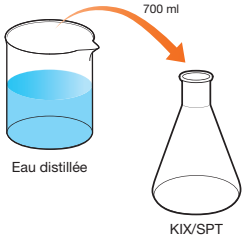
1. Étiqueter un flacon de 500 ml avec les mentions **KIX** et un flacon de 1 l avec les lettres **KIX/SPT**.

2. Ajouter 3,0 ml d'eau distillée ou désionisée dans le flacon d'arabinose. Faire tourbillonner ou mélanger par pipetage pendant environ 30 s pour initier la dissolution. Faire tourbillonner brièvement ou mélanger par intervalles de quelques minutes jusqu'à dissolution complète. La dissolution complète de l'arabinose peut prendre plus de 10 min.

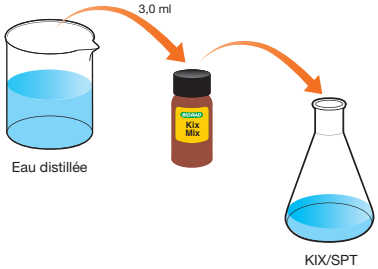


3. Ajouter 500 µl d'eau distillée ou désionisée dans le flacon de spectinomycine. Faire tourbillonner ou mélanger par pipetage jusqu'à dissolution.

4. Ajouter 700 ml d'eau distillée ou désionisée dans le flacon étiqueté **KIX/SPT**.



5. Ajouter 3,0 ml d'eau distillée ou désionisée dans le flacon KIX Mix, refermer le flacon et agiter pour mélanger pendant 5 s. Verser la bouillie KIX Mix dans le flacon **KIX/SPT**.

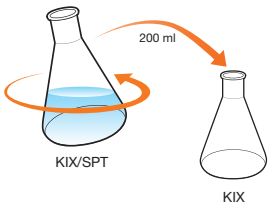


Consigne de sécurité ! Le mélange KIX Mix contient de la kanamycine, de l'IPTG et de l'X-gal qui sont des produits dangereux lorsqu'ils sont inhalés. Ne retirez pas la poudre KIX Mix de son contenant sans y avoir préalablement ajouté de l'eau.

Remarque : Il est possible que KIX Mix ne se dissolve pas complètement et que des grumeaux se forment.

6. Répéter l'étape 5 au moins deux fois pour rincer totalement le flacon KIX Mix.

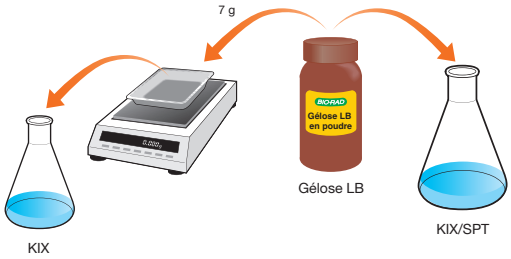
7. Agiter la solution pendant 20 s ou jusqu'à ce que la poudre blanche non dissoute forme une suspension homogène. Verser sans attendre 200 ml dans le flacon de 500 ml étiqueté **KIX**.



8. Ajouter 7 g de gélose LB en poudre dans le flacon **KIX**. Ajouter le reste de la gélose LB en poudre dans le flacon **KIX/SPT**.

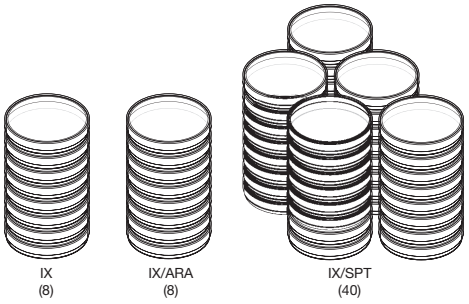
9. Autoclaver les deux flacons pendant 30 min en cycle liquide ou les placer au micro-ondes et porter à ébullition trois fois en veillant à ne pas les surchauffer.

   Remarque : En cas d'utilisation d'une autoclave, lisez l'étape 16 ci-dessous avant de passer à l'étape 9.

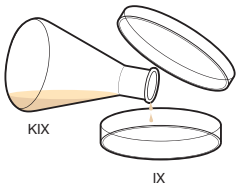


10. Étiqueter huit boîtes avec la mention **IX** et huit boîtes avec les lettres **IX/ARA**. Étiqueter 40 boîtes avec la mention **IX/SPT**.

    Important ! KIX Mix contient de la kanamycine (K), un antibiotique utilisé pour la sélection d'*E. coli* HB101-pBRKan. Toutes les boîtes de gélose LB de cette activité contiennent de la kanamycine. Dans un souci de simplification, « K » et kanamycine ne figurent pas dans les textes ni sur les étiquettes des matériels aux étudiants. Si vous préférez aborder la question du rôle de kanamycine avec vos étudiants, remplacez les étiquettes **IX** par des étiquettes **KIX**.

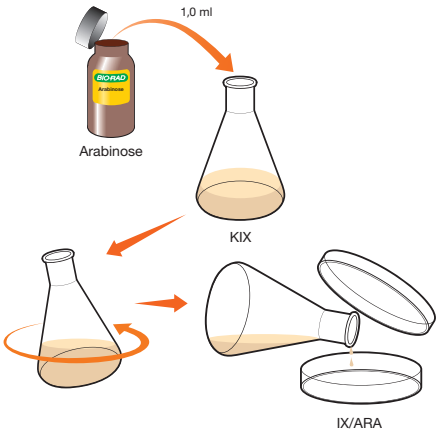


11. Remplir rapidement huit boîtes **IX** d'un tiers à la moitié (~10 ml) de gélose LB fondue étiquetée **KIX**.

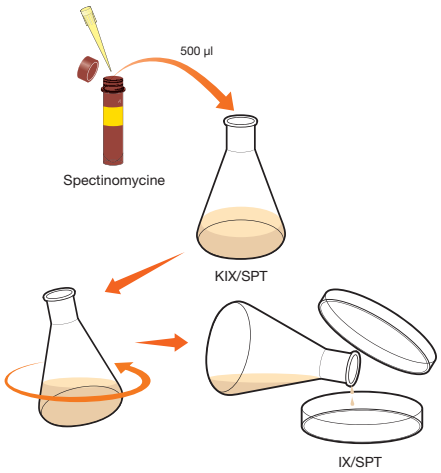


12. Ajouter 1,0 ml d'arabinose déshydratée dans le reste de gélose **LB** étiquetée KIX. Mélanger en agitant et remplir huit boîtes **IX/ARA** d'environ 1 tiers à la moitié (~10 ml) de gélose fondue.

    Remarque : Rincez immédiatement le flacon KIX afin d'éviter que la gélose ne se solidifie et ne colle au fond.



13. Dès que le flacon **KIX/SPT** a suffisamment refroidi pour le tenir (env. 50 °C), ajouter 500 µl de spectinomycine réhydratée. Mélanger en agitant et remplir au moins 40 boîtes **IX/SPT** de un tiers à la moitié (~10 ml) de gélose fondue. Toute boîte supplémentaire préparée pourra servir de boîte de remplacement si nécessaire.



Remarque : Un excès de chaleur (>60 °C) aura pour effet de détruire la spectinomycine. N'ajoutez pas la spectinomycine avant que la gélose ait suffisamment refroidi pour être manipulée. À noter : la gélose se solidifiera à environ 27 °C et il conviendra de veiller à préparer les boîtes avant que la gélose ait trop refroidi. Pour éviter un refroidissement trop rapide, placez les flacons dans un bain-marie à 50 °C.

Remarque : Rincez immédiatement le flacon KIX/SPT afin d'éviter que la gélose ne se solidifie et ne colle au fond.

14. Après solidification (~30 min), laisser sécher les boîtes gélosées pendant deux jours à température ambiante, ouvertes et à l'obscurité.

Remarque : Les additifs **KIX** Mix sont photosensibles, mais les boîtes ne doivent pas être recouvertes lorsqu'elles sèchent. Le séchage des boîtes pendant deux jours améliore la prise des échantillons de transformation liquide pendant le cours.

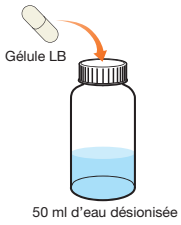
15. Après le séchage, empiler les boîtes et les envelopper dans du papier aluminium pour les protéger de la lumière, puis dans du plastique ou les remettre dans leur emballage en matière plastique. Conserver les boîtes à l'envers au réfrigérateur à 4 °C. Elles peuvent être conservées de cette manière pendant deux semaines au maximum avant l'utilisation.

Réhydrater les bactéries 2 jours avant l'activité 2

Si les boîtes d'amorce (starter) sont incubées à 37 °C, réhydrater les bactéries 2 jours avant l'activité 2.

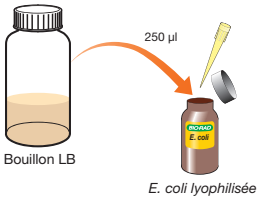
Si les boîtes d'amorce (starter) sont incubées à température ambiante, réhydrater les bactéries ***4*** jours avant l'activité 2.

16. Ajouter la gélule de bouillon LB et 50 ml de d'eau distillée ou désionisée dans un flacon de 150 à 250 ml. ***Fermer sans serrer*** et porter à ébullition dans l'autoclave ou au micro-ondes trois fois. Laisser refroidir le bouillon à température ambiante. Serrer le bouchon et conserver au réfrigérateur à 4 °C. Chauffer à température ambiante avant utilisation.



Remarque : En cas d'utilisation de l'autoclave, cette étape peut être combinée à l'étape 9 ci-dessus.

17. Avec une pointe de pipette ***stérile***, ajouter 250 µl de bouillon LB à température ambiante dans le flacon d'*E. coli* HB101-pBRKan lyophilisée. Refermer le flacon d'*E. coli* et agiter doucement pour remettre les bactéries en suspension. Incuber le flacon pendant 8 à 24 heures à 37 °C.

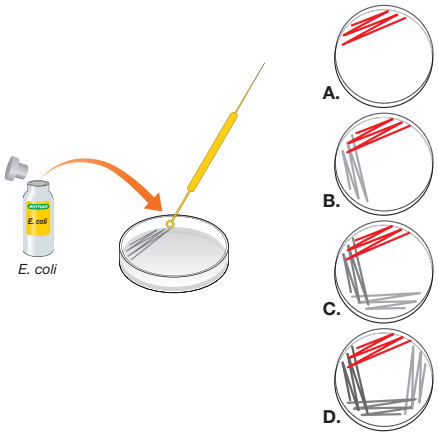


18. Afin de prévenir toute contamination, porter à ébullition le reste du bouillon LB une fois au micro-ondes avec le bouchon desserré; visser le bouchon et conserver à 4 °C.

Ensemencer la boîte d'amorce (starter) par striation et incuber 24 heures avant l'activité 2

19. Avec une anse d'inoculation stérile en matière plastique, déposer par striation les bactéries *E. coli* HB101-pBRKan rehydratées sur huit boîtes IX et huit boîtes IX/ARA.

    Important ! L'utilisation d'une technique de striation adaptée à la production d'une colonie isolée est essentielle à la réussite de l'expérience. Suivez les schémas de striation décrits aux étapes A à D. Commencez par étaler *E. coli* d'un côté à l'autre jusqu'au bord d'un quadrant (A). Tournez la boîte d'un quart de tour. Passez l'anse d'un côté à l'autre plusieurs fois au travers des striations précédentes tout en étendant au quadrant (B) suivant. Répétez l'opération deux fois (C, D).



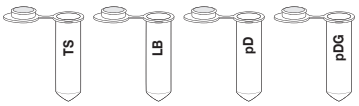
20. Incuber les boîtes d'amorce (starter) à l'envers dans un incubateur à 37 °C pendant 24 heures. Les boîtes doivent rester à l'obscurité dans l'incubateur, sans être enveloppées dans le papier aluminium. Couvrir la porte de l'incubateur d'aluminium peut être une solution.

    Remarque : À défaut, les boîtes d'amorce (starter) peuvent également être incubées à l'envers à température ambiante (20 – 25 °C) et à l'obscurité pendant 72 heures.

Distribuer les solutions avant l'activité 2 et conserver à 4 °C

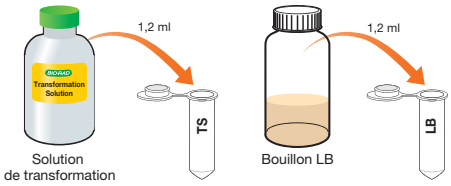
Pour éviter la contamination, ***ne pas distribuer le bouillon LB plus de 3 jours avant l'activité 2.*** Les autres solutions peuvent être distribuées jusqu'à 7 jours avant l'activité 2.

21. Pour chacun des huit postes de travail, étiqueter quatre tubes de 2 ml comme suit : **TS**, **LB**, **pD** et **pDG** (32 tubes au total).



22. Ajouter 1,2 ml de solution de transformation dans chacun des huit tubes **TS**.

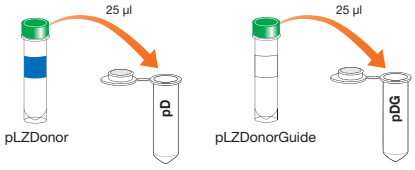
23. Ajouter 1,2 ml de bouillon LB stérile dans chacun des huit tubes **LB**.



24. Centrifuger par impulsions pLZDonor et pLZDonorGuide pour recueillir le liquide au fond des tubes.

25. Ajouter 25 µl de plasmide pLZDonor dans chacun des huit tubes **pD**.

26. Ajouter 25 µl de plasmide pLZDonorGuide dans chacun des huit tubes **pDG**.



27. Conserver toutes les solutions à 4 °C jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à l'emploi. Patienter pour permettre à tous les réactifs à l'exception de la solution de transformation (**TS**) d'atteindre la température ambiante avant de laisser les étudiants les utiliser.

Préparer les postes de travail des étudiants le jour de l'activité 2.

Poste de travail de l'étudiant

Matériels	Quantité
Boîte d'amorce (starter) LB fraîche *E. coli* IPTG/X-gal (**IX**)	1
Boîte d'amorce (starter) LB fraîche *E. coli* IPTG/X-gal/ARA (**IX/ARA**)	1
Boîtes LB IPTG/X-gal/spectinomycine (**IX/SPT**)	4
Bouillon nutritif LB (**LB**)	1,2 ml
Solution de transformation (**TS**) sur glace	1,2 ml
Plasmide pLZDonor (**pD**), 80 ng/µl	25 µl
Plasmide pLZDonorGuide (**pDG**), 80 ng/µl	25 µl
Micropipette et pointes à volume réglable de 100 – 1 000 µl (recommandé)	1
Micropipette et pointes à volume réglable de 20 – 200 µl	1
Micropipette et pointes à volume réglable de 2 – 20 µl	1
Micro-tube, 2,0 ml	4
Anse d'inoculation jaune	8
Bain d'eau glacée avec glace pilée	1
Marqueur indélébile	1
Mousses de flottaison (pour bain sec)	1
Portoir (recommandé)	1
Contenant à déchets	1

Poste de travail de base

Matériels	Quantité
Bain-marie ou bain à sec (trous remplis d'eau) à 60 °C	1
Incubateur ou incubateur-agitateur avec plateau à 37 °C (recommandé)	1
Ruban adhésif de laboratoire	

Informations préalables destinées à l'enseignant

Le système Out of the Blue CRISPR/Cas9

Le gène *lacZ* et le criblage bleu-blanc

Dans cette activité, les étudiants utiliseront la technologie CRISPR/Cas9 pour perturber le gène *lacZ*, une opération qui se produit naturellement dans le chromosome de la souche bactérienne *E. coli* HB101-pBRKan, utilisée dans cette trousse. Un gène de l'opéron*lac* de la bactérie, le gène *lacZ,* code l'enzyme β-galactosidase (β-gal), permettant à *E. coli* d'hydroliser le lactose. L'enzyme β-gal peut également hydroliser un analogue incolore du lactose, X-gal, qui produit un pigment bleu. La présence de colonies bleues ou blanches indique visuellement que l'édition du gène *lacZ* a réussi : les bactéries dotées d'un gène *lacZ* fonctionnel virent au bleu lorsqu'elles sont cultivés dans un milieu contenant X-gal; les bactéries porteuses d'un gène *lacZ* perturbé et dysfonctionnel restent blanches (Fig. 1).

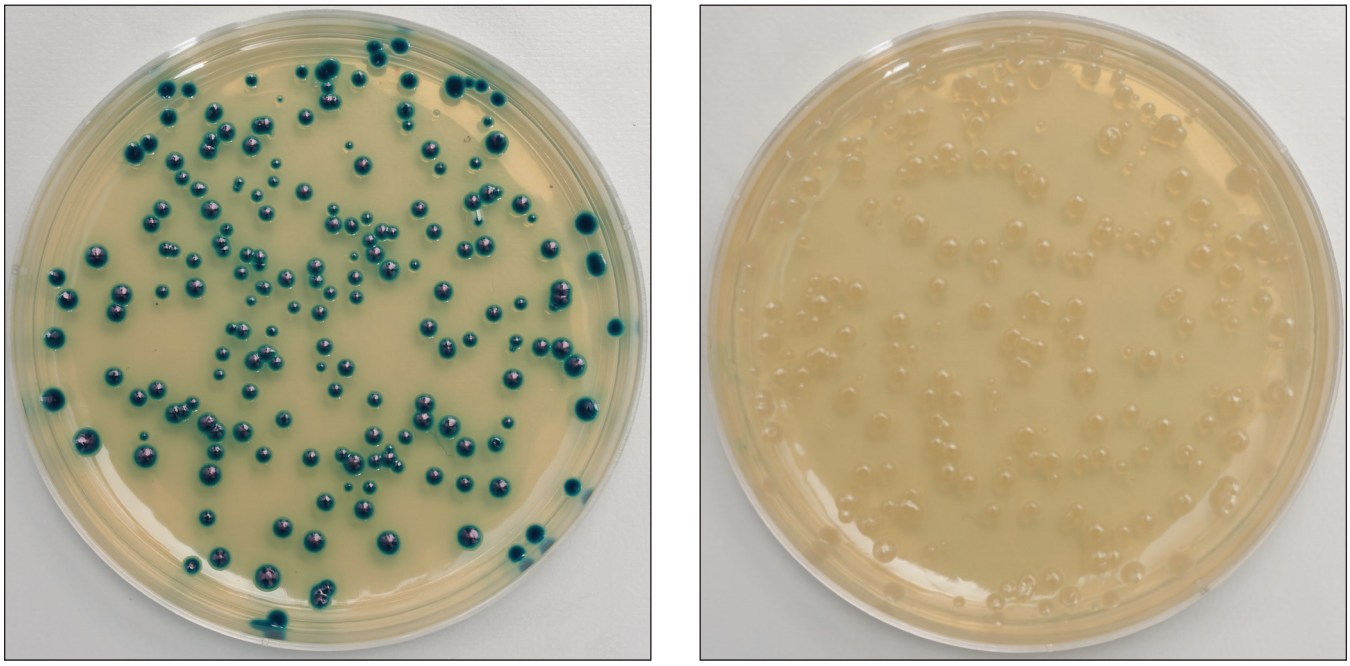


Fig. 1. Bactéries *E. coli* ensemencées sur un milieu X-gal. Les bactéries dotées d'un gène *lacZ* fonctionnels sont bleues (à gauche). Les bactéries dotées d'un gène *lacZ* perturbé et dysfonctionnel restent blanches (à droite).

Coupures d'ADN induites par CRISPR/Cas

La caractéristique distinctive des CRISPR est l'utilisation des protéines associées à CRISPR, également appelées protéines Cas, pour cibler des séquences spécifiques d'ADN. La protéine Cas9 correspond à l'endonucléase bactérienne généralement utilisée par les technologies CRISPR, bien que de nombreuses autres aient été identifiées et développées depuis la découverte du mécanisme. La protéine Cas9 peut être programmée pour couper l'ADN bicaténaire à un endroit recherché bien spécifique. Ce site visé est déterminé par une courte molécule d'ARN, appelée ARN guide, qui forme un complexe avec la protéine Cas9.

Le mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue

Une fois que la protéine Cas9 a coupé un chromosome, celui-ci doit être réparé sinon la bactérie meurt. Les bactéries utilisées dans cette activité n'ont pas intrinsèquement la capacité de réparer les coupures d'ADN, mais elles ont été conçues pour exprimer les enzymes nécessaires au processus de réparation cellulaire appelé réparation par recombinaison homologue (abrégée en HDR). Les gènes qui encodent la voie de réparation sont contrôlés par un promoteur inductible de l'arabinose. Pour réparer une coupure d'ADN, le mécanisme de réparation par recombinaison homologue requiert une matrice d'ADN donneur homologue aux séquences de nucléotides bordant l'endroit de la coupure. La matrice d'ADN donneur est fournie sur les plasmides inclus dans cette trousse (voir ci-dessous).

La souche *E. coli* HB101-pBRKan

Les bactéries incluses dans cette trousse, de la souche HB101-pBRKan, ont été conçues pour exprimer l'enzyme Cas9. Elles portent un plasmide contenant lui-même des gènes de réparation par recombinaison homologue (HDR) contrôlés par un promoteur inductible de l'arabinose. Ce plasmide porte un gène de résistance à la kanamycine, qui sert de marqueur de sélection.

L'ARN guide simple brin (ARNsg) et la matrice d'ADN donneur

Les étudiants transformeront la souche *E. coli* HB101-pBRKan à l'aide d'un ou de deux plasmides, contenant chacun un gène de résistance à la spectinomycine :

- pLZDonor — (contrôle) contient une séquence matrice d'ADN donneur que le mécanisme HDR utilisera pour réparer la coupure double brin de l'ADN. La séquence donneur comprend un codon stop qui s'insère dans l'ADN et désactive la fonction du gène *lacZ.*
- pLZDonorGuide — contient à la fois la séquence matrice d'ADN donneur du pLZDonor et une séquence qui code pour l'ARN guide simple brin (ARNsg). Après la transcription, l'ARN guide simple brin guide la protéine Cas9 vers le site de coupure du gène *lacZ.*

La séquence matrice donneur contient un codon stop qui interrompt la traduction du gène *lacZ*. Les bactéries qui ont subi une modification génétique à l'aide de cette matrice d'ADN donneur n'exprimeront pas de β-gal fonctionnel mais continueront de croître en colonies blanches. Les bactéries dont l'ADN chromosomique a subi une coupure double brin et qui sont dépourvues de mécanisme de réparation mourront.

Interaction entre les composants

Dans ces activités, d'autres additifs sont utilisés pour aboutir aux différents résultats de l'expérience (Tableau 3).

- Toutes les boîtes contiennent de la kanamycine, un antibiotique qui fait office de marqueur de sélection pour la souche *E. coli* HB101-pBRKan.
- Toutes les boîtes contiennent de l'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) et X-gal (5-bromo-4-chloroindol-3-yl-β-D-galactopyranoside) pour le criblage bleu/blanc. L'IPTG est un analogue non-métabolisable qui induit la production de l'opéron *lac*, y compris le gène *lacZ* qui code le l'enzyme β-gal.
- L'arabinose induit la production d'enzymes de réparation par recombinaison homologue. Les étudiants peuvent être amenés à se demander pourquoi les boîtes utilisées dans cette expérience (IX/SPT) ne contiennent pas d'arabinose. Étant donné que l'ensemble du processus d'édition du gène, y compris la réparation par recombinaison homologue, a lieu avant même que les étudiants ensemencent les échantillons de bactéries, l'arabinose n'est pas nécessaire.
- Boîtes contenant de la spectinomycine qui sélectionne les bactéries transformées par pLZDonor ou pLZDonorGuide.

Tableau 3. Additifs pour boîtes d'amorce (starter) et de gélose LB de l'expérience

Nom de la boîte	**Kanamycine*** Marqueur de sélection pour la souche bactérienne	**IPTG** Induit la synthèse de β-gal	**X-gal** Hydrolysé par β-gal pour produire un pigment bleu	**Arabinose** Induit la synthèse de système HDR	**Spectinomycine** Marqueur de sélection pour pLZDonor et pLZDonorGuide
IX	✔	✔	✔		
IX/ARA	✔	✔	✔	✔	
IX/SPT	✔	✔	✔		✔

*** Important !** Toutes les boîtes utilisées dans cette activité contiennent de la kanamycine (K), un antibiotique utilisé pour isoler la souche bactérienne. Pour simplifier l'activité, « K » et kanamycine ne figurent pas dans les textes ni sur les étiquettes des matériels destinés aux étudiants. Si vous préférez aborder la question du rôle de kanamycine avec vos étudiants, remplacez les étiquettes IX par des étiquettes KIX et expliquez votre intention.

Les étudiants commenceront leur activité avec des bactéries cultivées sur deux boîtes d'amorce (starter) différentes (**IX** et **IX/Ara**).

- Toutes les bactéries expriment la protéine Cas9.
- Les bactéries cultivées dans les boîtes **IX** n'expriment pas les enzymes nécessaires à la réparation par recombinaison homologue (système de réparation désactivé).
- Les bactéries cultivées dans les boîtes **IX/ARA** expriment les enzymes nécessaires à la réparation par recombinaison homologue (système de réparation activé).

Les bactéries des deux boîtes d'amorce (starter) seront transformées par pLZDonor ou pLZDonorGuide (voir Fig. 2).

- Les bactéries transformées par pLZDonor ne disposeront pas de l'ARN guide simple brin (ARNsg) nécessaire pour guider la coupure du gène *lacZ* par la protéine Cas9. Par conséquent, l'édition du gène n'aura pas lieu, et tous les produits de la transformation seront bleus, que le système de réparation soit actif ou non.
- Les bactéries transformées par pLZDonorGuide disposeront à la fois de l'ARN guide simple brin et de la matrice d'ADN donneur.
  - Si le système de réparation n'est pas exprimé (en l'absence d'arabinose), la coupure induite par Cas9 se produira mais la réparation de l'ADN n'aura pas lieu et les cellules mourront. Aucune croissance bactérienne ne pourra être observée.
  - Si le système de réparation s'exprime (en présence d'arabinose), la coupure induite par Cas9 aura lieu et le mécanisme de réparation par recombinaison homologue utilisera la matrice d'ADN donneur fournie par pLZDonorGuide pour ponter la coupure et introduire un codon stop dans le gène *lacZ*. Les produits de la transformation seront blancs.
- La coupure induite par la protéine Cas9 et les processus de réparation commenceront immédiatement après la transformation. Ces processus seront, pour la plupart, terminés avant l'ensemencement des boîtes **IX/SPT**.
- La spectinomycine du milieu gélosé **IX/SPT** isole les bactéries transformées.

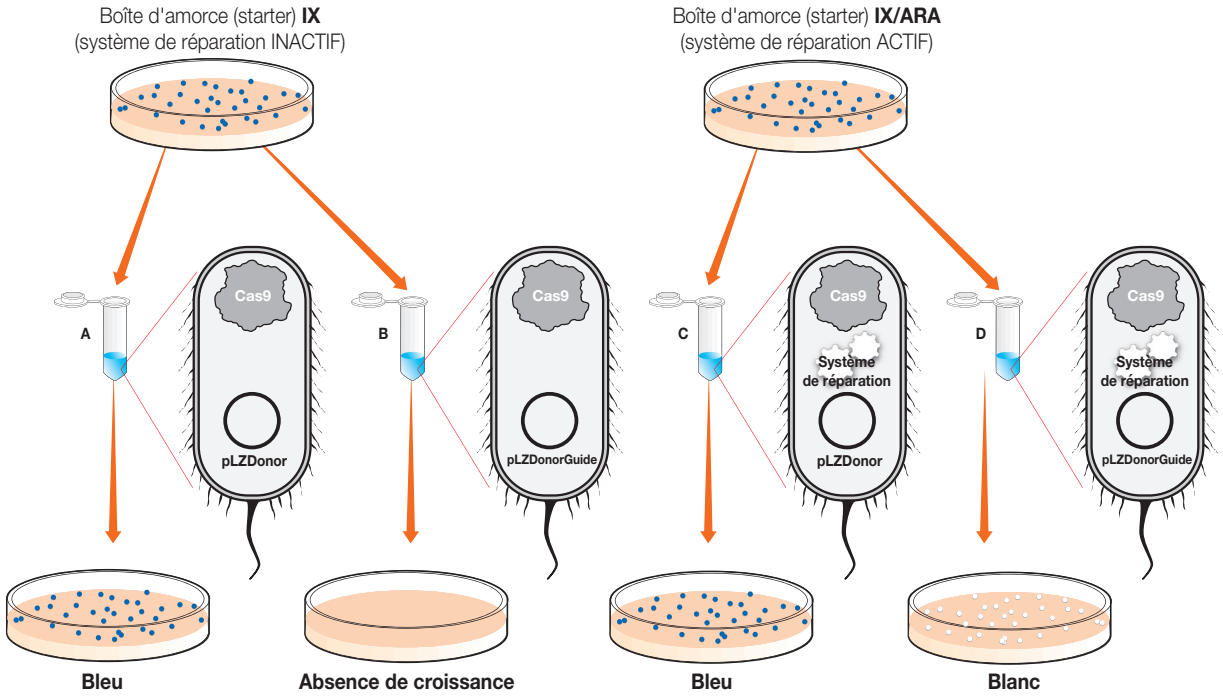


Fig. 2. Transformations réalisées dans cette activité. Illustration des résultats attendus.

Activité 1

Introduction à la technologie d'édition du génome CRISP/Cas9

Les activités de cette trousse se concentrent sur le processus d'édition du génome par CRISPR/Cas9 et fournissent aux étudiants quelques explications sur le système de défense adaptatif des bactéries duquel il est issu. Utilisez d'autres informations fournies dans ce guide, une vidéo, un article ou des instructions pour présenter ces concepts selon les besoins de vos étudiants. Des ressources complémentaires sont énumérées dans les annexes.

Objectifs : Les étudiants sont à même de comprendre les étapes de la coupure de l'ADN guidé par la protéine Cas9 et de prévoir le site de coupure sur une séquence d'ARN guide simple brin (ARNsg) donnée. Les étudiants savent utiliser des modèles mathématiques pour expliquer la spécificité relative des enzymes de restriction et de la protéine Cas9 pour couper l'ADN.

	Astuces et remarques pour l'enseignement
Partie 1. Simulation du mécanisme moléculaire de la coupure de l'ADN par Cas9	• Cette activité est conçue pour la plupart des étudiants • Les étudiants devront utiliser ARNsg 1 et DNA Strip 1 • La séquence d'ADN dans cette activité est un fragment du gène *lacZ* chromosomique *d'*E. coli • Possibilité d'évaluation didactique : Contrôler la précision des sites de coupure préconisés par les étudiants et discuter de toute interprétation erronée décelée. • Option : Fournir une séquence d'ADN d'un gène notoire et une séquence d'ARNsg de votre choix. Demander aux étudiants de prévoir le site de coupure.
Partie 2. Définition de la région Région d'un ARNsg	• Les étudiants devront utiliser ARNsg 2 et DNA Strip 2 • Possibilité d'évaluation didactique : Contrôler la précision des séquences d'ARN guide (ARNsg) prévues par les étudiants et discuter de toute interprétation erronée que vous décelez. Consultez le Guide des réponses de l'enseignant inclus dans la trousse pour identifier la bonne séquence d'ARNsg. • Option : Fournir une séquence d'ADN plus longue d'un gène notable et demander aux étudiants d'écrire une séquence d'ARN guide simple brin capable d'initier une coupure au sein de la séquence d'ADN fournie.
Partie 3. Comparaison de la spécificité des outils de coupure de l'ADN	• Les questions posées dans cette partie demandent aux étudiants de partir du principe que le génome humain correspond à une séquence aléatoire des bases A, T, C et G. En réalité, le génome humain est composé de nombreuses séquences de nucléotides qui se répètent. • Discutez l'impact potentiel des séquences répétées, comme les paralogues, les orthologues et les répétitions *Alu*, sur la spécificité de la technologie CRISPR/Cas9. • Possibilité d'évaluation didactique : Contrôler les calculs et les interprétations des étudiants. Consultez le Guide des réponses de l'enseignant inclus dans cette trousse.
Partie 4. Conception de la matrice d'ADN donneur en vue de la réparation de l'ADN	• Dans vos échanges avec les étudiants, insistez sur la différence entre la réparation d'un gène, qui consiste à réparer la séquence d'un gène pour le rendre fonctionnel, et la réparation de l'ADN, qui consiste à réparer les coupures moléculaires de l'ADN. • Possibilité d'évaluation didactique : demander aux étudiants de présenter leurs brins de matrice d'ADN donneur avant de les coller aux fragments d'ADN coupé. Demander à d'autres étudiants de contrôler • Option : Demander aux étudiants de trouver la séquence complète du gène *lacZ* à l'aide de la base de donnés NCBI et de proposer une séquence d'ARN guide simple brin et une séquence matrice d'ADN donneur permettant d'insérer un codon stop dans la séquence.

Activité 2

Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR

Objectif : Les étudiants procèdent à l'édition d'un gène chromosomique et comprennent les résultats d'une expérience CRISPR/Cas9.

	Astuces et remarques pour l'enseignement
Partie 1. Répondre aux questions préalables aux travaux de laboratoire	• Toutes les boîtes utilisées dans cette activité contiennent de la kanamycine, utilisée comme marqueur de sélection pour la souche bactérienne utilisée dans cette trousse. Pour simplifier, « K » et kanamycine ne figurent pas dans les textes ni sur les étiquettes des matériels destinés aux étudiants. Si vous préférez aborder la question du rôle de la kanamycine avec vos étudiants, remplacez les étiquettes IX par des étiquettes KIX pendant vos préparatifs. • L'édition de gène proposée dans cette activité se fait au niveau chromosomique; elle est presque complète lorsque les étudiants strient leurs boîtes et procèdent à l'incubation de leurs échantillons. La préparation des boîtes et l'incubation permettent la formation de colonies et l'apparition d'un phénotype visible. • Les étudiants peuvent se demander pourquoi l'arabinose n'est pas nécessaire dans les boîtes de l'expérience. L'arabinose est nécessaire pour la réparation de l'ADN qui commence immédiatement après la transformation. Une fois la coupure dans le chromosome de la bactérie réparée, le mécanisme de réparation n'est plus nécessaire. Toutes les cellules filles issues de la formation des colonies porteront l'édition chromosomique, la protéine Cas9 ne pourra donc pas opérer de nouvelles coupure. • Possibilité d'évaluation didactique : Avant que les étudiants ne passent à la partie 2, vérifiez leurs réponses en vous basant sur les tableaux 3 et 4 du Guide de l'enseignant pour déceler les interprétations erronées.
Partie 2. Exécution du protocole d'édition du gène	• Avant l'étape du choc thermique, les étudiants doivent impérativement laisser leurs échantillons sur la glace à tout moment sauf pour le transfert actif des solutions. • Si vous souhaitez poursuivre avec la trousse complémentaire Out of the Blue Genotyping Extension, les étudiants devront conserver leurs boîtes de culture bactérienne. Visitez le site **bio-rad.com/outoftheblue** ou consultez le Guide de l'enseignant Out of the Blue Genotyping Extension pour plus d'informations. • Si vos étudiants n'analysent pas leurs boîtes immédiatement après incubation, celles-ci peuvent être conservées au réfrigérateur (4 °C) pendant deux semaines au maximum jusqu'à l'analyse.
Partie 3. Réponses aux questions postérieures aux travaux de laboratoire	• Aucune colonie ne doit croître sur la boîte B car les bactéries sont pourvues de la protéine Cas9 active et d'un ARN guide, mais ne peuvent pas exprimer le système de réparation de l'ADN puisque la culture est dénuée d'arabinose. Dans de rares cas, les étudiants pourront observer quelques colonies blanches croître sur les boîtes B. Ces bactéries ont probablement fait l'objet d'un phénomène rare de suppression, où certaines portions du gène *lacZ* ont été supprimées tout en laissant l'ADN chromosomique intact. • Le système d'édition du génome par CRISPR/Cas9 dans cette trousse est très efficace, mais pas totalement performant. Certains étudiants pourront observer des colonies bleues croître sur la boîte D; celles-ci proviennent de bactéries porteuses de gènes *lacZ* non modifiés. • Option : Si vous poursuivez l'expérience avec l'activité complémentaire de génotypage, demander aux étudiants d'analyser le génotype d'une colonie qui a subi un phénomène de suppression. • Possibilité d'évaluation didactique : Demander aux étudiants d'expliquer les rôles des IPTG, de X-gal et de la spectinomycine dans cette expérience. • Possibilité d'évaluation didactique : Demander aux étudiants de prévoir la couleur attendue de la colonie bactérienne s'ils cultivent un échantillon sur les boîtes contenant de l'IPTG et X-gal, mais pas de spectinomycine.

Activité de synthèse

Identification et analyse bio-informatique des sites recherchés par la protéine Cas9

Objectif : Les étudiants découvrent les applications médicales de la technologie CRISPR et explorent les facteurs qui influencent les risques de coupure hors site dans les applications thérapeutiques. Les étudiants approfondissent leurs compétences dans la technique d'alignement BLAST et revoient les connaissances de base nécessaires à la réalisation de l'expérience CRISPR.

Introduction

Les risques potentiels d'effets hors site sont un sujet majeur dans les discussions éthiques autour de la technologie d'édition du génome par CRISPR. Le choix des sites de coupure et la séquence d'ARN guide nécessaire joue un rôle crucial dans les risques liés aux coupures hors site. Les étudiants qui découvrent la technologie CRISPR peuvent ne pas reconnaître immédiatement ces limites ni savoir apprécier la nécessité d'une évaluation des risques durant la conception et le développement d'une thérapie génique. Dans cette activité, vos étudiants utiliseront la technologie d'alignement BLAST pour évaluer les sites de coupure potentiels visés par la protéine Cas9 dans un gène d'importance thérapeutique, sur la base des risques liés à des effets hors site.

Les résultats de cette activité sont d'ordre qualitatif et ont pour objectif de mener les étudiants vers des questions pertinentes sur les risques réels associés aux applications CRISPR, sans y répondre. Il n'y a pas de bonnes réponses dans cette activité, seulement des arguments bien étayés. Elle offre aux étudiants la possibilité d'explorer, d'essayer, d'échouer et de réessayer d'atteindre un objectif défini.

Remarques sur la conception de l'activité et ses limites

Dans la réalité, évaluer les effets potentiels hors site sur des séquences d'ARN guide est une opération complexe. Il existe de nombreux outils gratuits proposés en ligne permettant d'aider les scientifiques à trouver et à classer des séquences d'ARN guide potentielles, mais leurs algorithmes et leurs critères de classification sont complexes et/ou propriétaires. Dans cette activité, les étudiants utilisent la technologie BLAST pour s'entraîner à utiliser une technologie d'une si grande importance, mais aussi parce que cette technologie permet de représenter concrètement des séquences hors site. Même si cette activité ne suit pas les méthodes de travail généralement utilisées par les scientifiques, elle permet aux étudiants de tenir compte de certains éléments conceptuels de base.

- La technologie d'alignement BLAST touche à ses limites dans le traitement de séquences courtes et privilégie les séquences à alignement nucléique séquentiel face aux séquences présentant des irrégularités intermittentes ou des interruptions d'alignement. En conséquence, la recherche par BLAST risque d'ignorer certaines séquences présentant un potentiel élevé d'être hors site.
- La technologie BLAST ne sait pas utiliser correctement un nucléotide de substitution, N, dans la recherche de séquences courtes de nucléotides. L'algorithme ignore tous les nucléotides après le N, incluant dans notre cas la séquence PAM.
- Pour être complète, la recherche doit inclure les séquences de proto-espaceurs des quatre combinaisons de motifs PAM (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG et 5'-GGG). Puisque le système BLAST n'est pas en mesure de traiter correctement le nucléotide de substitution N dans une séquence très simple, quatre recherches BLAST différentes, une pour chacun des motifs PAM, sont nécessaires pour évaluer avec fiabilité le potentiel hors site d'une séquence cible possible. Cette activité a été simplifiée pour permettre de l'intégrer dans l'horaire de la classe, si bien que les étudiants n'utiliseront qu'une seule séquence.
- La base de données de référence du génome humain, que les étudiants utilisent durant cette activité, ne contient que des séquences de gènes. Par conséquent, tous les résultats porteront sur des séquences de gènes permettant aux étudiants de sous-évaluer l'impact biologique potentiel d'une coupure hors site. Aucune coupure hors site en dehors du gène ne pourra être trouvée et l'interprétation sera d'autant plus facile pour les étudiants.
- Pour approfondir davantage, demander aux étudiants d'élaborer une liste des exigences conceptuelles destinée au développement d'un outil logiciel de conception d'un ARNsg.

	Astuces et remarques pour l'enseignement
Partie 1. Identification et catégorisation des séquences recherchées	• Faites des groupes d'étudiants et donnez à chaque groupe une fiche d'information sur une pathologie (pathologie coronarienne, drépanocytose ou fibrose kystique). • Les séquences de gène de la trousse ont une taille limitée pour réduire le nombre de sites recherchés potentiels. • Tous sites recherchés potentiels doivent être composés de 23 nucléotides (séquence proto-espaceur plus un PAM à l'extrémité 3') et rédigés comme une séquence simple brin 5' à 3'. • Rappelez aux étudiants de la séquence guide de l'ARN guide simple brin est complémentaire de la séquence recherchée. En sélectionnant un site cible, la séquence d'ARNsg est également spécifiée. Par conséquent, « concevoir » la région guide d'un ARN guide simple brin revient pour l'essentiel à sélectionner un site cible spécifique.
Partie 2. Exécution de la technologie BLAST Identifier les séquences hors site	• Les séquences recherchées dans la technologie BLAST doivent être rédigées de 5' à 3' mais peuvent provenir de l'un des deux brins d'ADN. • Les étudiants utilisent la technologie d'alignement BLAST pour identifier des séquences d'ADN hors site qui correspondent en tout ou partie avec leur séquence d'ADN candidate. La recherche ne porte pas sur des séquences d'ARN. • Option : S'il y a plusieurs étudiants dans un groupe, demandez à chaque membre du groupe d'interroger leurs séquences candidates avec l'une des quatre séquence PAM (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG et 5'-GGG). Consultez les remarques sur la conception de l'activité et ses limites.
Partie 3. Évaluation des des séquences recherchées	• Il se peut que les étudiants trouvent des numéros d'accession avec de longues séquences qui contiennent plusieurs gènes indépendants, dotés chacun de son propre numéro d'accession. Dans les faits, ces gènes sont dupliqués dans la banque de données. Pour simplifier, la meilleure option pour les étudiants serait d'ignorer ces grandes séquences lors de l'analyse des résultats. Exemple : NG_000007.3 est un fragment long d'ADN contenant cinq gènes de globine incluant *HBB*, distinctement compris dans NG_059281.1 • Pour approfondir, les étudiants peuvent réfléchir aux points suivants : – Y a-t-il une séquence cible hors site adjacente à la séquence PAM dans la bonne orientation? – Combien de séquences hors site potentielles concordent parfaitement avec la séquence recherchée? – Combien de séquences hors site potentielles concordent au moins à 80 % avec la séquence recherchée? (ou un autre pourcentage) – L'emplacement et le motif de non-concordance entre une séquence hors site potentielle et une séquence recherchée (éloignée ou proche de la séquence PAM). • Les critères avancés par les étudiants doivent répondre à deux aspects du risque de cible hors site : le niveau de risque de couper hors site et le nombre de cibles hors site pour un site recherché donné.

Annexe A

Débat structuré entre étudiants sur l'édition du génome par CRISPR

Les perspectives apportées par le système d'édition du génome CRISPR en médecine, dans l'agriculture et pour l'environnement n'ont d'égales que ses abus potentiels. Même si les débats sur l'éthique du génie génétique ne sont pas nouveaux, la précision accrue et la plus grande facilité d'utilisation de la technologie CRISPR par rapport aux autres technologies suscitent une fois de plus des préoccupations sur ses applications. Proposer aux étudiants d'en débattre est une bonne manière de leur faire prendre part aux préoccupations sur la technologie CRISPR et leur permettra de mieux comprendre les faits scientifiques.

Éléments clés du débat

- À quel stade le risque d'une édition hors site non intentionnelle l'emporte-t-il sur le potentiel de guérir ou de traiter une maladie débilitante?
- Faut-il autoriser la thérapie génique germinale par CRISPR? Ces modifications auraient le pouvoir d'éliminer les maladies génétiques, mais pourraient-elles entraîner des conséquences non souhaitées pour la population?
- Si la technologie CRISPR peut être utilisée pour éradiquer une maladie, faut-il également l'utiliser dans le cadre de l'amélioration génétique (couleur des yeux, capacités cognitives ou sportives, taille)?
- Qui devra décider d'autoriser ou d'interdire ses modifications génétiques?

Jour 1 — Introduire le sujet

1. Trouvez un article récent qui décrit un cas particulier d'utilisation de la technologie d'édition du génome par CRISPR. Choisissez un article qui explique les techniques spécifiques utilisées.

2. Divisez aléatoirement la classe en deux groupes, l'un sera le défenseur de l'utilisation de la technologie d'édition du génome par CRISPR et l'autre le détracteur.

3. Expliquez le format du débat et demandez à chacun des groupes de choisir un chef de file.

Jours 2 à 5 — Travaux de recherche des étudiants

4. Donnez l'article à vos étudiants. Demandez-leur de faire des recherches complémentaires sur le cas traité et de reporter leurs résultats dans la fiche Pour/Contre fournie en page 22. Vous pouvez également leur demander de faire ce travail à la maison.

5. Demandez aux équipes de compiler les résultats de recherche de tous les membres.

6. Laissez aux équipes le temps de rédiger une argumentation d'ouverture pendant 4 min et désignez un porte-parole.

Jour 6 – Débat

Tableau 4. Format du débat.

Section	Temps alloué	Connaissances préalables
Argumentation d'ouverture	4 min	Les promoteurs présentent leur argumentation d'ouverture pour étayer leur affirmation
Pause	2 min	Les détracteurs compilent une liste de questions pour mettre en évidence les failles dans l'argumentaire des promoteurs
Questions	2 min	Les détracteurs posent leurs questions
Argumentation d'ouverture	4 min	Les détracteurs présentent leur argumentation d'ouverture pour réfuter le sujet
Pause	2 min	Les promoteurs compilent une liste de questions pour mettre en évidence les failles dans l'argumentaire des détracteurs
Questions	2 min	Les promoteurs posent leurs questions
Réfutation	2 min	Les promoteurs présentent les réponses aux questions des détracteurs
Réfutation	2 min	Les détracteurs présentent les réponses aux questions des promoteurs
Argumentation de clôture	3 min	Points de vue contradictoires
Argumentation de clôture	3 min	Points de vue à l'appui

Rubrique de notation

	4	3	2	1
Argumentation d'ouverture	Arguments éloquents, très organisés, recherchés et bien présentés	Arguments bien organisés, bien recherchés et bien présentés	Arguments moyennement organisés, recherchés et présentés	Manque d'organisation, des recherches partiellement justes, failles dans la présentation
Questions	Questions réfléchies, qui soulèvent des interrogations légitimes, étayées par des recherches et très bien formulées	Questions moyennement réfléchies, qui soulèvent quelques questions, bien présentées	Questions non basées sur les recherches, sans poser des interrogations légitimes, présentation défaillante	Questions hors sujet, n'abordent aucune interrogation légitime, présentation mal formulée
Réfutation	Les étudiants ont utilisé des données issues de leurs recherches et des conclusions pour réfuter directement les questions	Les étudiants ont utilisé des données issues de leurs recherches et des conclusions pour réfuter en partie les questions	Les étudiants ont utilisé des données issues de leurs recherches et conclusions de manière inadéquate pour réfuter les questions	Les étudiants n'ont pas réfuté les questions
Argumentation de clôture	Argumentation de clôture éloquente, très bien organisée, arguments recherchés et bien présentés	Argumentation de clôture bien organisée, arguments recherchés et bien présentés	Argumentation de clôture partiellement organisée, arguments recherchés et bien présentés	Argumentation de clôture peu organisée avec des recherches partiellement correctes, présentation mal formulée
Travail en équipe (selon l'évaluation des autres membres de l'équipe)	S'est beaucoup investi et a participé au travail en équipe	S'est investi et a participé au travail en équipe	A participé sporadiquement, a contribué un peu à l'équipe	Participation sporadique, a apporté peu d'aide à l'équipe

Fiche de données Pour/Contre

Dressez la liste des avantages de l'utilisation de la technologie d'édition du génome par CRISPR mentionnés dans l'article (en incluant des références).

Dressez la liste des conséquences néfastes de l'utilisation de la technologie d'édition du génome par CRISPR mentionnées dans l'article (en incluant des références).

Notez les informations issues de vos recherches susceptibles de réfuter les arguments avancés par le groupe opposé. Incluez ces éléments dans l'argumentation d'ouverture et de clôture du débat.

Annexe B

CRISPR/Cas9 et le système de défense microbien

Les animaux sont dotés de systèmes immunitaires complexes impliquant les activités coordonnées de différents types de cellules, d'organes et de systèmes de signalement pour reconnaître et répondre à des infections actives. Les chercheurs ont découvert tout récemment que les procaryotes, les bactéries et les archées disposent également d'une forme d'immunité adaptative qui leur permet de détecter et de répondre aux infections virales : le système CRISPR/Cas.

Certains génomes procaryotes contiennent de courtes séquences palindromiques répétées de nombreuses fois et entrecoupées de séquences « espaceur » uniques. Ces séquences récurrentes sont appelées les « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats », abrégé par CRISPR, ou courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées en français. Chaque répétition palindromique est suivie par de courts segments d'ADN espaceur qui correspondent aux séquences d'ADN trouvées dans le génome des bactériophages (virus connus pour infecter les bactéries). Des groupements de gènes associés à CRISPR (Cas) se trouvent également à côté des séquences CRISPR; ces gènes Cas codent pour des enzymes qui coupent l'ADN à des endroits précis, à l'image de ciseaux moléculaires.

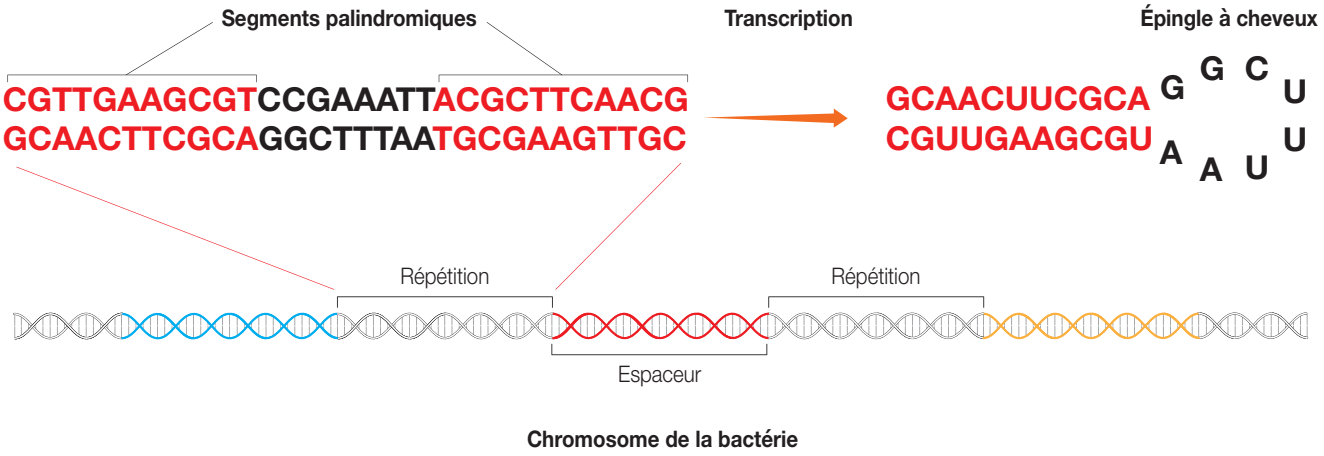


Fig. 3. Une région du patrimoine génétique bactérien doté de CRISPR. Les génomes des procaryotes contiennent des groupements de répétitions palindromiques. Ces répétitions sont séparées (à intervalles réguliers) de courts segments d'ADN espaceur. Ces segments CRISPR s'accompagnent de groupements de gènes associés à CRISPR (les Cas) qui codent pour les enzymes Cas responsables de la coupure de l'ADN. Dans une répétition palindromique, la séquence de nucléotides est identique dans les deux directions et l'ARN qui résulte de la transcription présente une structure en épingle à cheveux multiple.

En 2007, les chercheurs ont regroupé ces singularités pour démontrer que les CRISPR et les gènes Cas interagissent pour former une réponse immunitaire en trois phases à l'invasion par les bactériophages (Barrangou et al. 2007) (Fig. 4) :

- **Coupure et capture** — Lorsque les bactéries sont infectées par un virus, elles utilisent des composants de leur système CRISPR pour couper l'ADN viral qui les envahit et insérer des fragments de cet ADN (appelés espaceurs) dans leur propre génome; ces fragments font alors office de « mémoire » de l'infection.
- **Veille** — Les bactéries transcrivent les espaceurs en ARN capable de se lier aux enzymes Cas pour former un complexe. Ces complexes recherchent dans la cellule toute séquence d'ADN complémentaire à l'ARN transcrit.
- **Défense** — S'il rencontre un ADN (viral) complémentaire, le complexe ARN espaceur-Cas s'y lie et coupe l'ADN viral pour l'empêcher de se répliquer. L'infection virale est donc interrompue.

Avec ce système, les bactéries peuvent retenir des séquences de nombreux virus pour créer une « bibliothèque ». Étant donné que la séquence CRISPR fait partie de l'ADN, elle est transmise de génération en génération et la bibliothèque s'agrandit au fil du temps.

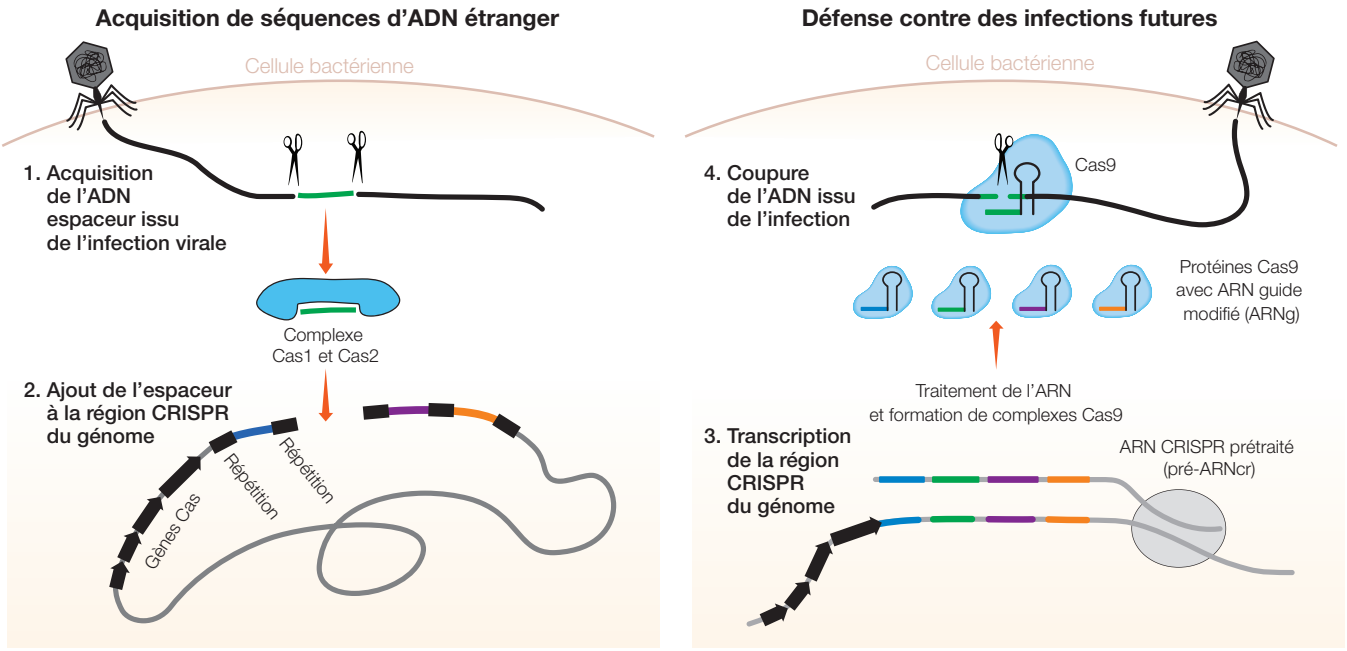


Fig. 4. Le système de défense microbien CRISPR/Cas9. 1. Les enzymes Cas1-Cas2 du microbe détecte l'ADN étranger et en coupe un segment. **2**. Les enzymes Cas1-Cas2 insèrent un fragment d'ADN qui agira en guise d'espaceur au niveau de la région CRISPR de son propre génome. **3**. Une séquence de l'espaceur est transcrite puis liée à la protéine Cas9. **4**. En cas de réinfection par le même agent infectieux, le complexe CRISPR/Cas9 détectera la séquence d'ADN étranger et la coupera pour interrompre l'évolution de l'infection.

Annexe C

Instructions relatives à la préparation des boîtes de gélose LB pour petits micro-ondes

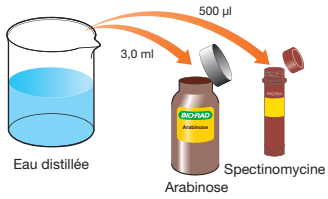
Si le micro-ondes ne peut pas contenir de flacon d'un litre, suivez ces instructions et utilisez des flacons de 500 ml dans le micro-ondes pour préparer les boîtes de gélose LB. Les autres étapes de préparation restent inchangées.

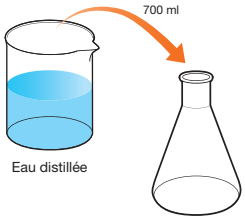
1. Étiqueter un flacon de 500 ml **KIX** et deux flacons de 500 ml **KIX/SPT**.

2. Ajouter 3,0 ml d'eau distillée ou désionisée dans le flacon d'arabinose. Faire tourbillonner ou mélanger par pipetage pendant environ 30 s pour initier la dissolution. Faire tourbillonner brièvement ou mélanger par intervalles de quelques minutes jusqu'à dissolution complète. La dissolution complète de l'arabinose peut prendre plus de 10 min.

3. Ajouter 500 µl d'eau distillée dans le flacon de spectinomycine. Faire tourbillonner ou Faire tourbillonner ou mélanger par pipetage jusqu'à dissolution.

4. Ajouter 700 ml d'eau distillée ou désionisée dans un flacon vide d'une capacité d'un litre.

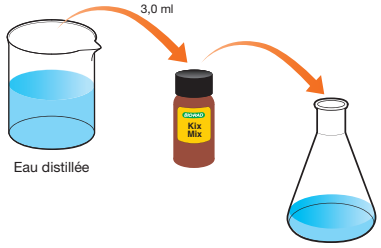




5. Ajouter 3,0 ml d'eau distillée dans le flacon KIX Mix, refermer le flacon et mélanger pendant 5 s. Verser la bouillie KIX Mix dans le flacon de 1 l.

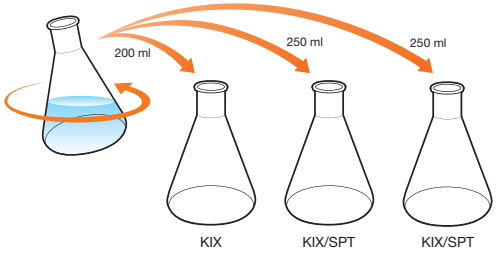
   Consigne de sécurité ! Le mélange KIX Mix contient de la kanamycine, de l'IPTG et de l'X-gal qui sont des produits dangereux lorsqu'ils sont inhalés. Ne retirez pas la poudre KIX Mix de son contenant sans y avoir préalablement ajouté de l'eau.

   Remarque : Il est possible que KIX Mix ne se dissolve pas complètement et que des grumeaux se forment.

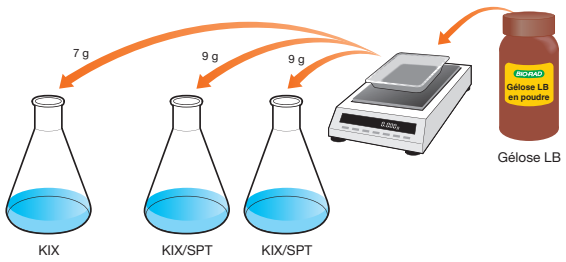


6. Répéter l'étape 5 au moins deux fois pour rincer totalement le flacon KIX Mix. Vérifier le flacon pour s'assurer que tous les contenus ont été transférés dans le flacon.

7. Agiter la solution pendant 20 s ou jusqu'à ce que la poudre blanche non soluble forme une suspension homogène. Verser sans attendre 200 ml dans le flacon **KIX**. Agiter rapidement la suspension à nouveau et verser sans attendre 250 ml dans chaque flacon **KIX/SPT**.

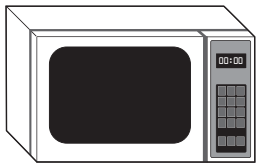


8. Ajouter 7 g de gélose LB en poudre dans le flacon **KIX**. Ajouter 9 g de gélose LB en poudre dans chacun des flacons **KIX/SPT**. Agiter pour mélanger.

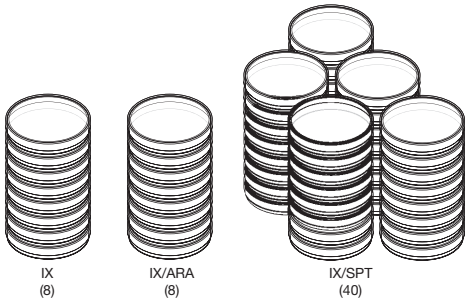


9. Placer chaque flacon au micro-ondes et les porter à ébullition trois fois en veillant à ne pas les surchauffer. Commencer par 3 min puis prolonger par intervalles d'une minute si nécessaire.

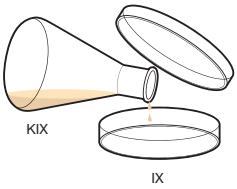
   Remarque : Utilisez une poignée ou un gant pour manipuler le flacon chauffé. Assurez-vous de ne pas faire surchauffer la gélose LB en poudre. Réglez le micro-ondes à faible puissance et surveillez attentivement le chauffage. Laissez la gélose fondue refroidir légèrement avant de mélanger pour éviter qu'elle ne bout.



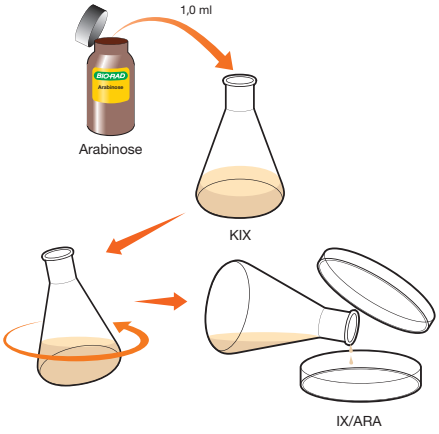
10. Étiqueter huit boîtes **IX**, huit boîtes **IX/ARA** et 40 boîtes **IX/SPT**.



11. Remplir rapidement huit boîtes **IX** d'un tiers à la moitié (~10 ml) de gélose LB fondue étiquetée **KIX**.

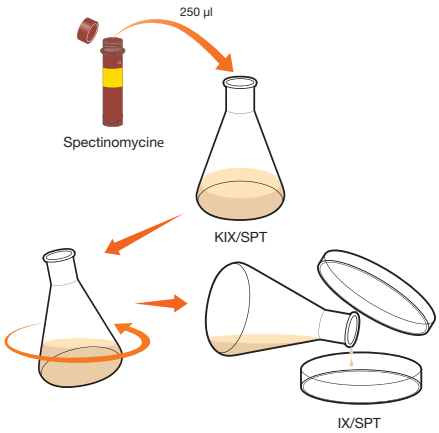


12. Ajouter 1,0 ml d'arabinose déshydratée dans le reste de gélose LB étiquetée **KIX**. Mélanger en agitant et remplir huit boîtes **IX/ARA** d'environ un tiers à la moitié (~10 ml) de gélose fondue.



13. Dès que les flacons **KIX/SPT** ont suffisamment refroidi pour les tenir (env. 50 °C), ajouter 250 µl de spectinomycine réhydratée dans chacun des flacons **KIX/SPT**. Agiter pour mélanger et remplir au moins 40 boîtes **IX/SPT** d'un tiers à la moitié (~10 ml) de gélose LB fondue étiquetée **KIX/SPT**. Les boîtes supplémentaires préparées pourront servir de boîtes de remplacement si nécessaire.

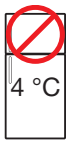
    Remarque : Un excès de chaleur (>60 °C) aura pour effet de détruire la spectinomycine. N'ajoutez pas la spectinomycine avant que le milieu gélosé ait suffisamment refroidi pour être manipulée. À noter : la gélose se solidifiera à environ 27 °C et il conviendra de veiller à préparer les boîtes avant que la gélose ait trop refroidi. Pour éviter un refroidissement trop rapide, placez les flacons dans un bain-marie à 50 °C.



14. Après solidification (~30 min), laisser sécher les boîtes de gélose pendant deux jours à température ambiante, ouvertes et à l'obscurité.

    Remarque : Les additifs **KIX** Mix sont photosensibles, mais les boîtes ne doivent pas être recouvertes lorsqu'elles sèchent. Le séchage des boîtes pendant deux jours améliore la prise des échantillons de transformation liquide pendant le cours.

15. Après le séchage, empiler les boîtes et les envelopper dans du papier aluminium pour les protéger de la lumière, puis dans du plastique ou les remettre dans leur emballage en matière plastique. Conserver les boîtes à l'envers au réfrigérateur à 4 °C. Elles peuvent être conservées de cette manière pendant deux semaines au maximum avant l'utilisation.



Ressources

Visitez le site **bio-rad.com/outoftheblue** pour plus de ressources d'enseignement.

Technologie CRISPR (généralités)

Adli M (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. Nat Commun 9, 1,911.

Barrangou R (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315, 1,709–1,712.

Carroll D (2017). Genome editing: past, present, and future. Yale J Biol Med 90, 653–659.

National Science Foundation (2015). Rewriting genetic information to prevent disease. nsf.gov/discoveries/disc_summ.jsp?cntn_id=134286&org=NSF, accessed October 30, 2019.

Cong L et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems. Science 339, 819–823.

Cribbs AP and Perera SMW (2017). Science and bioethics of CRISPR-Cas9 gene editing: an analysis towards separating facts and fiction. Yale J Biol Med 90, 625–634.

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

Ran FA et al. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc 8, 2,281–2,308.

CRISPR et les pathologies humaines

Anémie falciforme (HBB)

Dever DP et al. (2016). CRISPR/Cas9 β-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. Nature 539, 384–389.

Park SH et al. (2019). Highly efficient editing of the β-globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. Nucleic Acids Res 47, 7,955–7,972.

Coronaropathie (PCSK9)

Ding Q et al. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. Circ Res 115, 488–492.

King A (2018). A CRISPR edit for heart disease. Nature 555, S23–S25.

Fibrose kystique (CFTR)

Firth AL et al. (2015). Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. Cell Reports 12, 1,385–1,390.

Hodges CA and Conlan RA (2019). Delivering on the promise of gene editing for cystic fibrosis. Genes Dis 6, 97–108.

Mentions légales

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc.

Toutes les marques déposées mentionnées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

© 2022 Bio-Rad Laboratories, Inc.

Ce produit n'est pas destiné à l'auto-médication.

BIO-RAD

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 2 3473 4460* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

10000122375 Ver C FR

22-0525 0822 Sig 0122