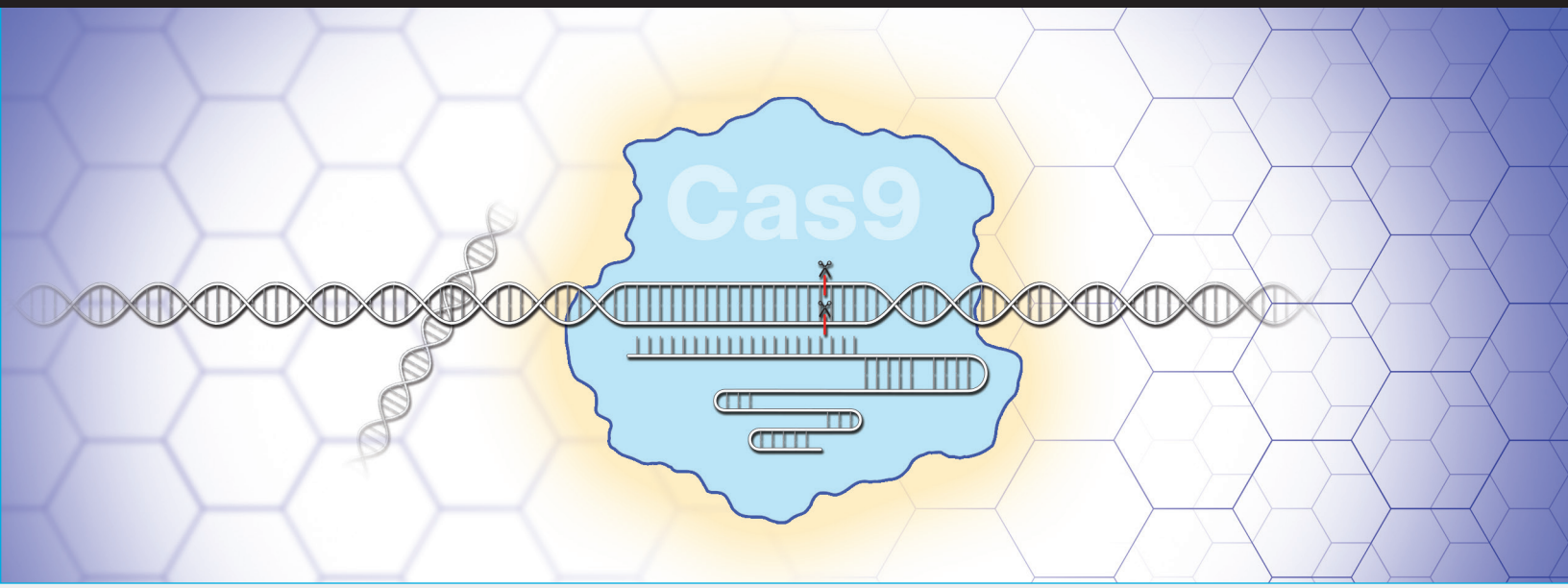
BIO-RAD Explorer



Out of the Blue CRISPR Kit

N° de référence 12012608EDU

Guide de l'étudiant

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.

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.

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

BIO-RAD

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Activité 1

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

Qu'est-ce que l'édition du génome CRISPR/Cas9?

Dans les décennies qui ont suivi la découverte des enzymes de restriction, les chercheurs ont mis au jour de nombreux outils et techniques moléculaires qui ont largement permis d'étendre nos capacités en matière de génie génétique. L'un des développements récents les plus captivants est le système CRISPR/Cas9 (CRISPR). CRISPR tire son nom du système naturel qui permet aux microbes de se défendre face à une attaque virale. Les « Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats » (CRISPR), en anglais, sont des séquences du génome de certains procaryotes qui conservent la mémoire d'infections virales. Avec les protéines associées (Cas), les bactéries utilisent ces séquences pour reconnaître et inactiver les virus concernés lors d'une nouvelle infection (voir Fig. 1). Les scientifiques ont adapté ce système pour l'utiliser en génie génétique.

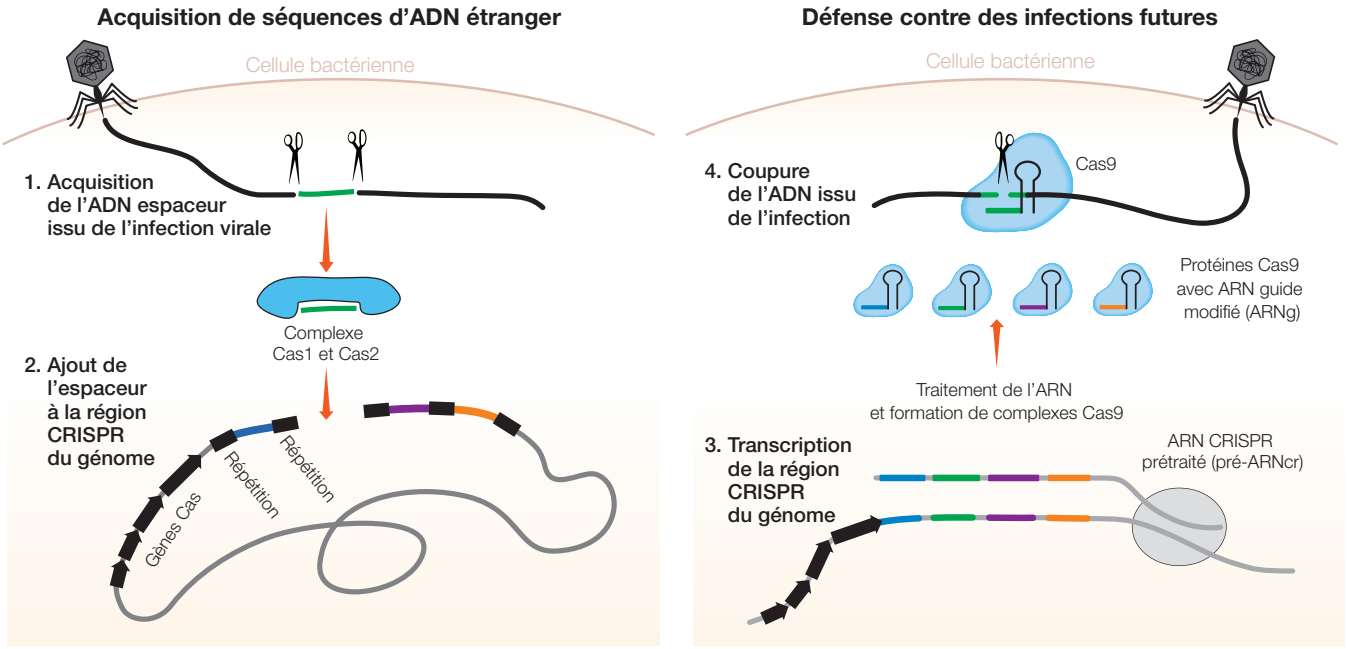


Fig. 1. Le système de défense microbien CRISPR/Cas9. 1. Les enzymes Cas1 et Cas2 du microbe reconnaissent l'ADN étranger et coupe un fragment; 2. Les enzymes Cas1 et Cas2 insèrent le fragment d'ADN dans la région CRISPR de son propre génome en tant qu'espaceur; 3. Une séquence de l'espaceur est transcrite puis liée à une protéine Cas9; 4. Lorsqu'une nouvelle infection par le même virus survient, le complexe CRISPR/Cas9 est capable de reconnaître la séquence d'ADN exogène et de la couper afin d'endiguer le développement de l'infection concernée.

CRISPR/Cas9 n'est pas le premier outil d'édition du génome programmable, ni nécessairement le plus précis. D'autres outils d'édition du génome, tels que les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs) ou les nucléases à doigts de zinc, sont également programmables et précis, mais sont très chers et complexes à utiliser. Ce qui rend CRISPR/Cas9 si performant, c'est sa mise en œuvre à la fois précise et facile.

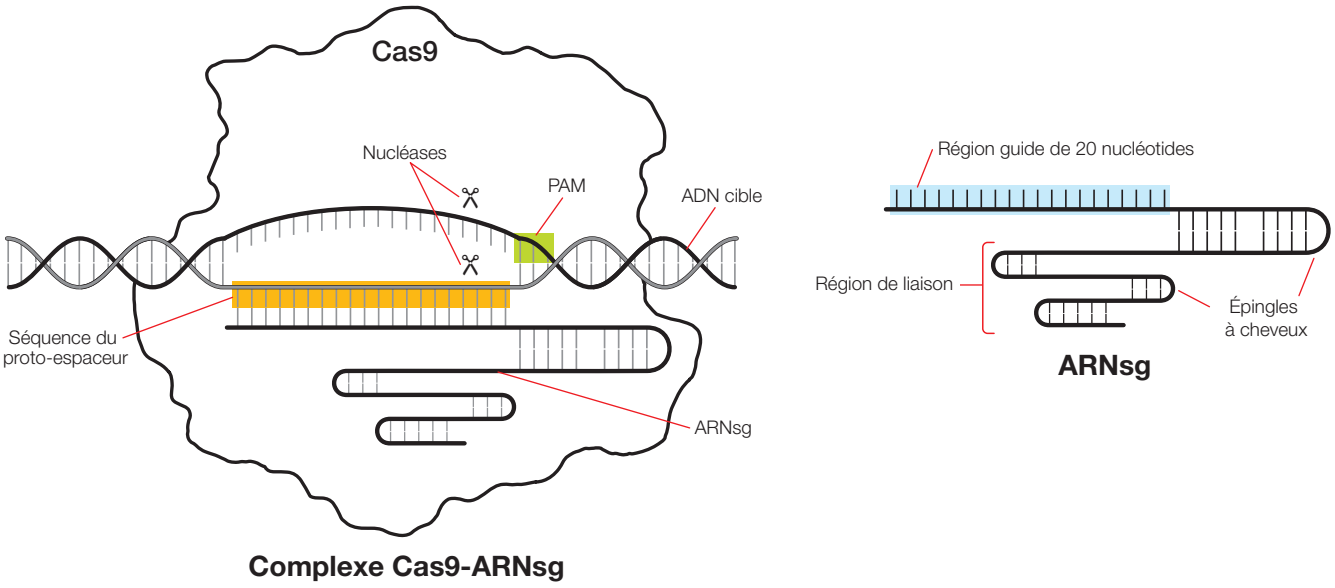
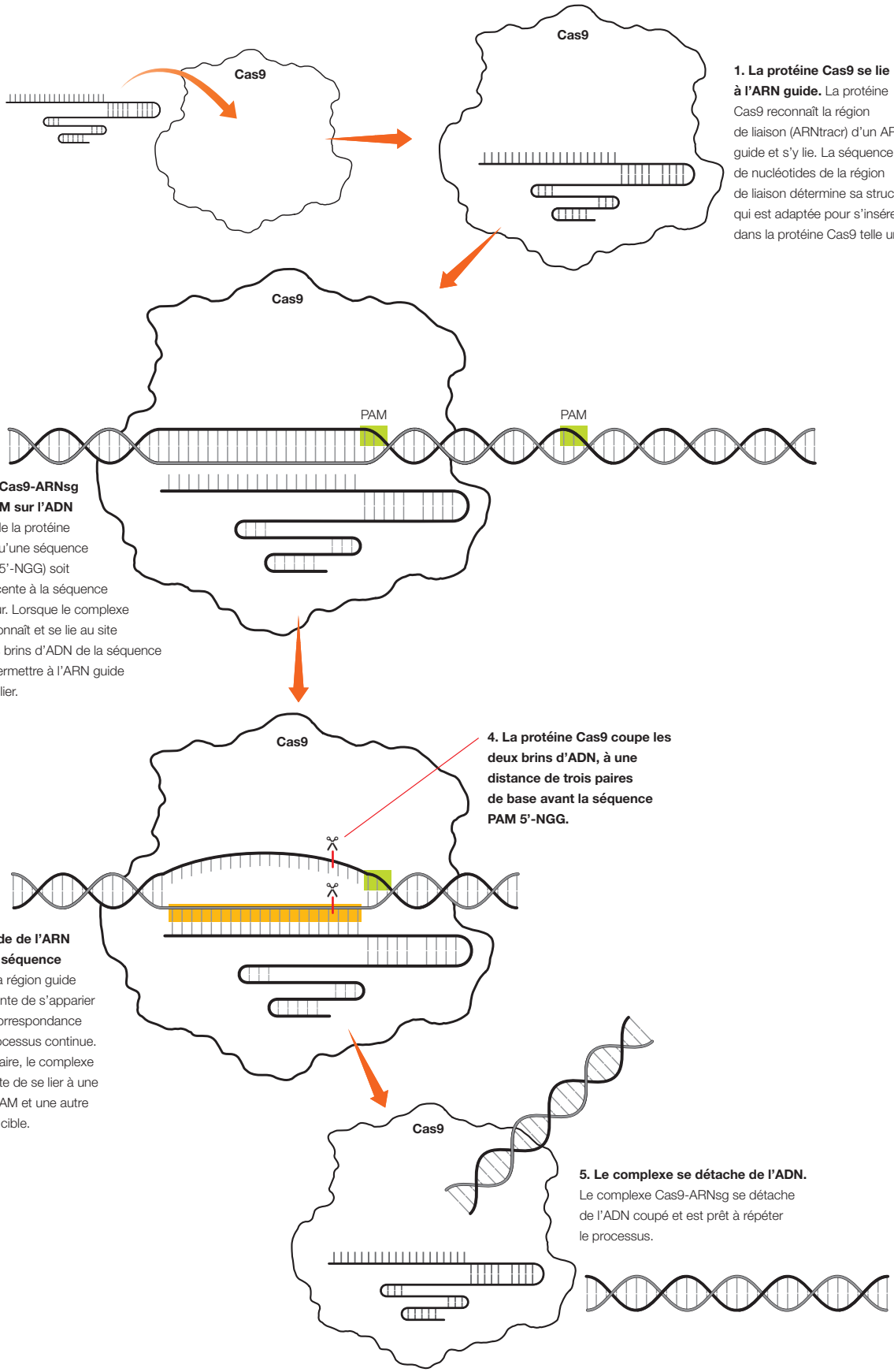


Fig. 2. Anatomie de la protéine Cas9 et de l'ARN guide simple brin.

Le système CRISPR/Cas9 est composé des éléments suivants (voir Fig. 2) :

- **L'enzyme Cas9 (Cas9)** — Une endonucléase bactérienne capable de couper le brin d'ADN à double hélice à un endroit spécifique d'une grande séquence de reconnaissance ou à un site recherché. La séquence de reconnaissance Cas9 comprend une séquence de 20 nucléotides appelée le proto-espaceur, qui est déterminée par l'ARN guide lié à l'enzyme.
- **L'ARN guide simple brin (ARNsg)** — Une forme modifiée de l'ARN guide qui forme un complexe avec l'enzyme Cas9. L'ARN guide simple brin est une fusion d'environ 100 nucléotides de deux régions qui se présentent naturellement comme des ARN distincts :
  - La région guide – Partie de l'ARN CRISPR ou ARNcr, une séquence de 20 nucléotides complémentaire de la séquence d'ADN recherchée qui définit l'endroit auquel l'enzyme Cas9 doit couper. Les scientifiques peuvent facilement adapter cette séquence à la cible visée.
  - La région de liaison — Appelée ARN CRISPR transactivateur ou ARNtracr, une région formant une structure en épingles à cheveux (en forme d'échafaudage) qui s'accroche fermement dans une faille de la protéine Cas9. La séquence de cette région est généralement la même pour tous les ARN guides simple brin.
- **Le motif de reconnaissance du proto-espaceur (Protospacer Adjacent Motif, PAM)** — Un motif de séquence situé immédiatement après la séquence du proto-espaceur dans la séquence de reconnaissance Cas9, et qui est nécessaire pour que l'enzyme Cas9 soit fonctionnelle. L'enzyme Cas9 reconnaît la séquence PAM 5'-NGG où N peut être n'importe quel nucléotide (A, T, C ou G). Lorsque l'enzyme Cas9 se lie à la séquence PAM, elle sépare les brins d'ADN de la séquence adjacente pour permettre à l'ARN guide simple brin de se lier. Si l'ARN guide simple brin est complémentaire de cette séquence, l'enzyme Cas9 coupe l'ADN.



1. La protéine Cas9 se lie à l'ARN guide. La protéine Cas9 reconnaît la région de liaison (ARNtracr) d'un ARN guide et s'y lie. La séquence de nucléotides de la région de liaison détermine sa structure, qui est adaptée pour s'insérer dans la protéine Cas9 telle une clé.

2. Le complexe Cas9-ARNsg se lie au site PAM sur l'ADN cible. La liaison de la protéine Cas9 nécessite qu'une séquence PAM particulière (5'-NGG) soit directement adjacente à la séquence du proto-espaceur. Lorsque le complexe Cas9-ARNsg reconnaît et se lie au site PAM, il sépare les brins d'ADN de la séquence adjacente pour permettre à l'ARN guide simple brin de se lier.

3. La région guide de l'ARN guide se lie à la séquence d'ADN ciblée. La région guide de l'ARN guide tente de s'apparier à l'ADN. Si une correspondance est trouvée, le processus continue. Dans le cas contraire, le complexe se détache et tente de se lier à une autre séquence PAM et une autre séquence d'ADN cible.

4. La protéine Cas9 coupe les deux brins d'ADN, à une distance de trois paires de base avant la séquence PAM 5'-NGG.

5. Le complexe se détache de l'ADN. Le complexe Cas9-ARNsg se détache de l'ADN coupé et est prêt à répéter le processus.

Fig. 3. Les étapes de la reconnaissance d'ADN et de la coupure par Cas9.

Partie 1. Simulation du mécanisme moléculaire de la coupure de l'ADN par Cas9

Utilisez un modèle papier pour parcourir les différentes étapes de coupure de l'ADN par CRISPR/Cas9 à l'aide d'une séquence du gène *lacZ* qui code l'enzyme β-galactosidase. Le gène *lacZ* fait partie de l'opéron lac, un ensemble de gènes permettant aux bactéries de se nourrir du lactose, un sucre présent dans le lait. Les séquences d'ADN et d'ARN guide simple brin du modèle papier correspondent à celles utilisées dans l'activité 2 Travaux de laboratoire d'édition du gène *lacZ* par CRISPR.

1. ***Découpez les bandes d'ARN guide simple brin et d'ADN. La protéine Cas9 peut être laissée sur la feuille.***
2. ***Servez-vous des étapes indiquées sur la figure 3 pour reproduire le mécanisme CRISPR/Cas9 :***
   a. La protéine Cas9 se lie à l'ARN guide simple brin : placer l'ARN guide simple brin 1 sur l'image de la protéine Cas9 et l'aligner avec les lignes pointillées.
   b. Le complexe Cas9-ARNsg se lie au site PAM. Placer la bande d'ADN 1 sur la bande qui traverse le modèle Cas9. Glisser la bande d'ADN jusqu'à ce que le carré PAM sur la protéine Cas9 corresponde à une séquence PAM (5^{I}-NGG) sur l'ADN.
   c. La région guide de l'ARN guide simple brin se lie à la séquence d'ADN recherchée. Vérifier si la séquence d'ADN est complémentaire à la séquence d'ARN guide simple brin (U correspond à A, C correspondant à G). Si oui, continuer et passer aux étapes suivantes. Sinon, répéter les étapes 2.b et 2.c avec un nouveau site PAM.
   d. La protéine Cas9 coupe les deux brins d'ADN : Les symboles de ciseaux indiquent où Cas9 coupe les brins d'ADN. Avec un crayon, tracer une ligne verticale sur les deux brins à cet endroit.
3. ***Vérifiez que l'endroit choisi pour couper les brins est correct, puis coupez la bande d'ADN 1 à cet endroit avec des ciseaux. Conservez les morceaux de bande d'ADN 1 pour les réutiliser à la partie 4.***

Questions thématiques

A. De combien de nucléotides est composée la région guide de l'ARN guide simple brin?

B. L'ARN guide simple brin se lie-t-il au PAM?

C. Où la protéine Cas9 coupe-t-elle l'ADN recherché par rapport à la séquence du proto-espaceur?

Partie 2. Conception de la région guide d'un ARN guide simple brin

Si la technologie CRISPR est si performante, c'est parce que la séquence d'ADN ciblée est contrôlée par un ARN guide simple brin pouvant être spécifiquement adapté à cette dernière. Dans cette activité, vous adapterez la région guide de l'ARN guide simple brin à l'endroit où le gène *lacZ* doit être coupé. La bande d'ADN 2 représente une séquence d'ADN du gène *lacZ* que vous souhaitez modifier.

1. ***À l'aide de l'ARN guide simple brin et de la bande d'ADN 2 et en vous référant aux étapes suivies dans la partie 1, déterminez la séquence nécessaire de la région guide de l'ARN guide simple brin pour que la protéine Cas9 vienne couper la bande d'ADN 2 au niveau de la ligne pointillée rouge.***
2. ***Écrivez les lettres correspondant aux nucléotides (A, U, C, G) de cette séquence dans les espaces situés sur l'ARN guide simple brin 2.***
3. ***Reprenez les étapes de coupure de l'ADN par Cas9 pour vérifier que la séquence saisie sur l'ARN guide simple brin 2 est correcte.***
4. ***Notez la séquence finale ci-dessous ou dans un cahier.***

Séquence de la région guide de l'ARN guide simple brin

Questions thématiques

A. ***Décrivez par des phrases complètes comment le fait qu'une séquence PAM soit nécessaire influence la flexibilité de l'édition du génome par le système CRISPR/Cas9.***

B. ***Décrivez par des phrases complètes comment vous procéderiez pour identifier un site de coupure d'ADN visé par CRISPR/Cas9 et concevoir un ARN guide simple brin.***

Partie 3. Comparaison de la spécificité des outils de coupure d'ADN

La flexibilité et la spécificité de la technologie CRISPR/Cas9 permettent un grand pas en avant en matière d'édition du génome. Les premiers « ciseaux » à ADN étaient des enzymes de restriction, qui coupent l'ADN au niveau de séquences prédéfinies, en général de 4 à 8 paires de bases. Par exemple, EcoRI, une enzyme de restriction présente dans *E. coli*, coupera l'ADN double brin à chaque séquence GAATTC. Si EcoRI était ajoutée à un échantillon contenant l'intégralité du génome humain, il pourrait couper à chaque séquence GAATTC.

Il est possible de calculer la probabilité qu'une séquence de nucléotides donnée, telle que GAATTC, apparaisse au sein d'une séquence plus large. Le tableau 1 ci-dessous montre le calcul des probabilités de trouver des séquences d'une certaine longueur. Ces calculs sont basés sur l'hypothèse selon laquelle les séquences d'ADN sont entièrement aléatoires et que la position de chaque nucléotide a la même probabilité d'être A, T, C ou G. Utilisez le tableau pour répondre aux questions suivantes.

Tableau 1. Calcul des probabilités de trouver une séquence donnée.

Séquence	Séquence Longueur	Calcul de probabilité	Occurrence attendue dans une séquence de la longueur du génome humain (3 234 830 000 bases)
A	1	$¼ = (1/4)^1 = 0,25$	808707500
AC	2	$¼*¼ = (1/4)^2 = 0,0625$	202176875
GAATTC (EcoRI)	6	$¼*¼*¼*¼*¼*¼ = (1/4)^6 = 2,44 \times 10^{-4}$	789753
NNNN…	n	$¼*¼*¼*...= (1/4)^n$	$(1/4)^n * 3\ 234\ 830\ 000$

Questions thématiques

A. Quelle est la probabilité qu'une base quelconque d'une séquence soit une adénine (A)? Combien de fois pensez-vous trouver des adénines dans le génome humain?

B. Quelle est la probabilité de trouver une séquence particulière à deux bases? Combien de fois pensez-vous trouver cette séquence dans le génome humain?

C. Combien de fois pensez-vous trouver un site de coupure EcoRI dans un fragment d'ADN composé d'un million de paires de bases?

D. Combien de fois pensez-vous trouver une séquence de 20 paires de bases spécifique dans le génome humain?

E. Rédigez une équation complète pour calculer l'occurrence prévue d'une séquence de longueur n au sein d'un fragment d'ADN de longueur X.

F. Sur la base de preuves mathématiques, expliquez pourquoi la technologie d'édition du génome par CRISPR/Cas9, qui utilise une séquence recherchée de 20 paires de bases, est plus spécifique que des enzymes de restriction classiques.

G. Développez trois arguments expliquant pourquoi la technologie CRISPR/Cas9 peut se révéler plus utile pour la thérapie génique et/ou la recherche que d'autres outils de coupure de gènes.

H. En réalité, la séquence ADN du génome humain n'est PAS aléatoire. Certaines séquences, dont de très longues séquences, se répètent de nombreuses fois dans l'ensemble du génome humain. Développez deux arguments expliquant pourquoi cela complique l'utilisation de la technologie d'édition du génome par CRISPR chez l'homme.

Partie 4. Conception de la matrice d'ADN donneur en vue de la réparation d'ADN

Le système CRISPR/Cas9 est capable de localiser une séquence spécifique au sein d'un génome constitué de milliards de paires de bases et de couper à un endroit précis dans cette séquence. Comment les scientifiques et les chercheurs utilisent-ils la spécificité du système CRISPR/Cas9 pour obtenir une édition ciblée d'un gène?

Si l'ADN chromosomique d'une cellule bactérienne subit une coupure, la cellule mourra si elle n'est pas capable de réparer la coupure. Mais les bactéries ont développé des mécanismes permettant de réparer les coupures d'ADN double brin, qui autrement entraîneraient la mort de la cellule. La réparation de l'ADN est possible de deux façons (voir Fig. 4) :

- **Par jonction d'extrémités non homologues** — Les enzymes ressoudent les extrémités des deux brins coupés. Cette méthode engendre le risque de créer ou de supprimer aléatoirement une ou plusieurs bases et donc de causer des mutations qui peuvent perturber le fonctionnement ou l'expression du gène qui a été coupé.
- **Par réparation par recombinaison homologue** — Les enzymes réparent la coupure au moyen de la matrice d'ADN donneur. Les chercheurs conçoivent la matrice d'ADN donneur, lequel peut inclure une séquence souhaitée, bordée à ces deux extrémités de « bras d'homologie » qui correspondent à la séquence en amont et en aval de la coupure. Un brin d'ADN complémentaire est créé lors de la réparation.

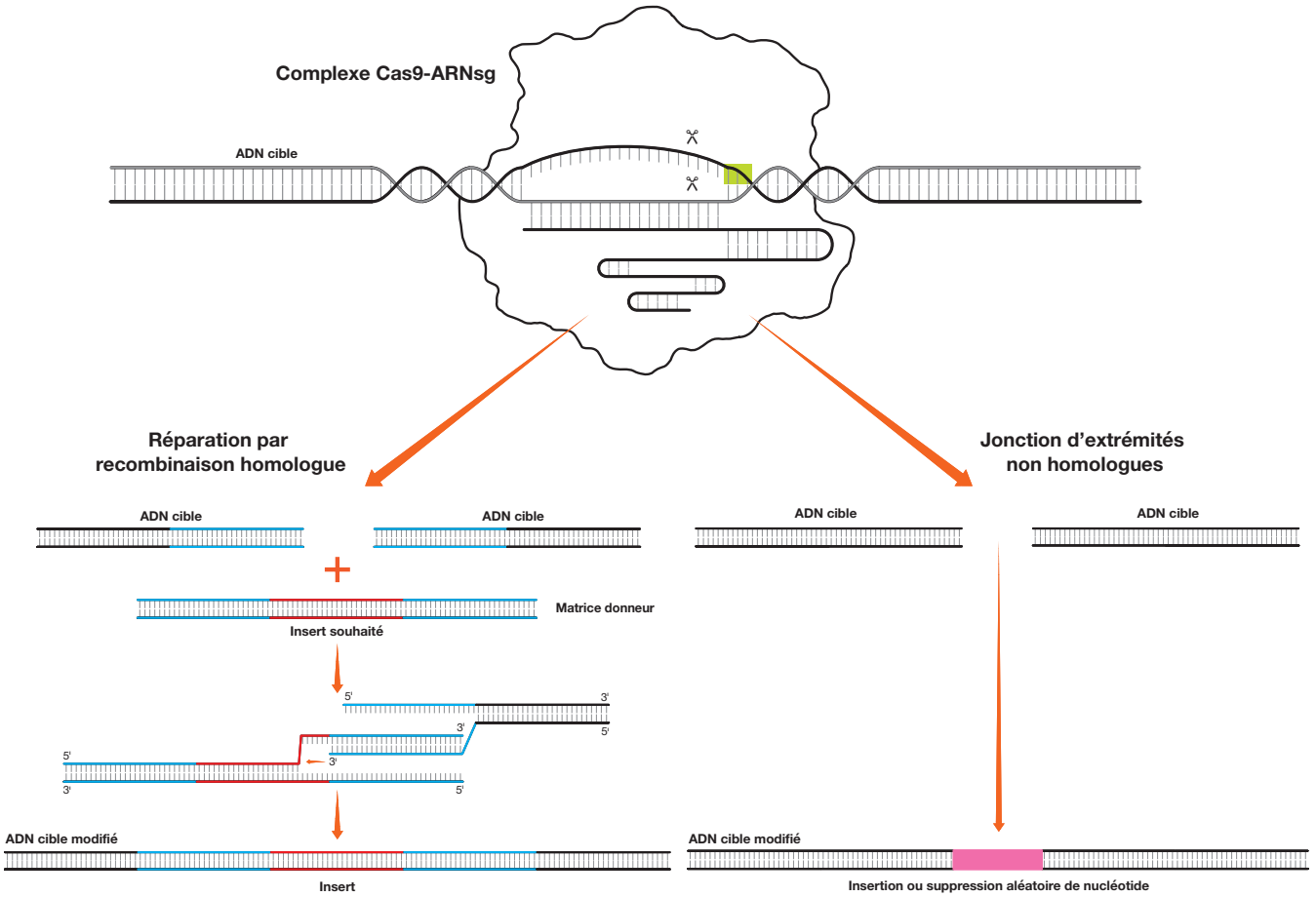


Fig. 4. Réparation d'ADN par recombinaison homologue (HDR) et jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).

Les bras d'homologie utilisés dans la réparation par recombinaison homologue peuvent être composés de centaines de paires de bases voire plus. Pour simplifier, vous simulerez dans cette activité une réparation par recombinaison homologue au moyen de bras d'homologie bien plus courts, de 15 paires de bases. Vous devrez concevoir une séquence de la matrice d'ADN donneur pouvant être utilisée pour introduire un segment d'ADN sur le site de coupure que vous avez créé dans la bande d'ADN 1.

1. ***Récupérez les deux morceaux de bande d'ADN 1. Si ce n'est pas déjà fait, coupez la bande au niveau du site de coupure défini à l'activité 1.***
2. ***Découpez la bande de la matrice d'ADN donneur et une bande d'ADN vierge.***
3. ***La zone grisée représente une séquence d'insertion ADN non spécifique. Dans les cases vides de chaque côté de la zone grisée et sur les deux brins, notez les séquences de 15 paires de bases qui correspondent aux séquences de nucléotides de chaque côté du site de coupure de la bande d'ADN 1. Ces séquences de 15 paires de bases constituent les bras d'homologie.***
4. ***Une matrice ADN donneur complète est désormais disponible.***
5. ***Avec des ciseaux, coupez les extrémités en trop de la bande de la matrice donneur.***
6. ***Placez les morceaux de la bande d'ADN 1 directement sur les séquences de nucléotides de la bande de la matrice donneur de façon à ce que les bras d'homologie soient alignés et que seule la séquence d'insertion soit visible. Assemblez les morceaux à l'aide de ruban adhésif.***
7. ***Un morceau d'ADN édité est désormais disponible.***

Utilisez la bande d'ADN vierge et le reste des morceaux du modèle papier pour concevoir des séquences de la matrice donneur dotées de bras d'homologie de 15 paires de bases qui induiront les changements suivants sur la bande d'ADN 1 à l'aide de l'ARN guide 1. Vous devrez inclure toute séquence d'insertion nécessaire ainsi que les séquences des bras d'homologie. Notez les séquences finales dans le tableau ci-dessous. Soulignez les sections correspondant aux bras d'homologie.

Changement souhaité	Séquence de la matrice d'ADN donneur
Décalage du cadre de lecture	
Insertion d'un site de restriction EcoRI	

Questions thématiques

A. Décrivez les deux avantages possibles de la méthode de réparation par recombinaison homologue par rapport à la méthode de jonction d'extrémités non homologues dans le cadre d'une expérience d'édition du génome.

B. Décrivez les deux avantages possibles de la méthode de jonction d'extrémités non homologues par rapport à la méthode de réparation par recombinaison homologue dans le cadre d'une expérience d'édition du génome.

C. Expliquez comment la technologie CRISPR/Cas9 associée à la méthode de réparation par recombinaison homologue peut être utilisée pour modifier un seul et unique nucléotide, pour changer par exemple un T en un A.

D. En plus d'insérer ou de remplacer des séquences, il est possible d'utiliser la méthode de réparation par recombinaison homologue pour supprimer de courtes séquences à proximité d'un site de coupure. Réfléchissez à la manière dont la séquence de la matrice d'ADN donneur pourrait être conçue pour permettre la suppression d'une séquence et décrivez-la. Si nécessaire, appuyez-vous sur des ressources externes sur la réparation par recombinaison homologue.

Activité 2

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

Dans cette activité, vous utiliserez le système CRISPR/Cas9 pour couper l'ADN chromosomique bactérien dans le gène *lacZ*, lequel code l'enzyme β-galactosidase (β-gal). Le gène *lacZ* fait partie de l'opéron *lac*, un ensemble de gènes permettant aux bactéries de se nourrir du lactose, un glucide présent dans le lait. β-gal clive également le composant incolore X-gal en deux parties, dont l'une prendra une coloration bleu foncé. Si β-gal est exprimée par des bactéries en présence de X-gal, elles deviennent bleues. Pendant des décennies, les biologistes moléculaires ont utilisé le gène *lacZ* comme cible pour l'insertion de séquences d'ADN, car la couleur de la colonie bactérienne indique la réussite ou non de la modification du gène. Vous utiliserez cette technique de criblage bleu-blanc comme indicateur visuel pour savoir si l'édition du gène *lacZ* a réussi.

Contexte

Édition du génome

L'édition d'un gène se déroule en deux étapes : Couper les deux brins d'ADN à l'endroit souhaité puis diriger la réparation de l'ADN pour produire la modification souhaitée dans la séquence. Si l'ADN chromosomique d'une cellule bactérienne subit une coupure, la cellule mourra si elle n'est pas capable de réparer la coupure. Comme nous l'avons vu dans l'activité précédente, les cellules sont capables de réparer les coupures double brin dans l'ADN de plusieurs façons :

- **Par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)** — Des protéines spécifiques ressoudent les extrémités des deux brins coupés. Cette méthode engendre le risque de créer ou de supprimer aléatoirement une ou plusieurs bases et donc de causer des mutations qui peuvent perturber le fonctionnement ou l'expression du gène qui a été coupé.
- **Par réparation par recombinaison homologue (HDR)** — Les enzymes réparent la coupure au moyen de la matrice d'ADN donneur, nécessaire à la réparation par recombinaison homologue. Les chercheurs conçoivent la matrice d'ADN donneur, qui peut inclure une séquence souhaitée, bordée à ces deux extrémités de « bras d'homologie » qui correspondent à la séquence en amont et en aval de la coupure. Un brin d'ADN complémentaire est créé lors de la réparation.

Dans cette activité, vous utiliserez CRISPR/Cas9 pour couper l'ADN chromosomique bactérien à un endroit spécifique dans le gène *lacZ*. Vous mettrez à profit la capacité de réparation par recombinaison homologue des cellules pour effectuer une modification dans la séquence du gène *lacZ*. Pour ce faire, vous fournirez aux cellules de grandes quantités de la matrice d'ADN donneur, qui inclut un insert avec un codon d'arrêt qui désactivera la fonction du gène.

Le gène lacZ *et le criblage bleu-blanc*

Gène de l'opéron *lac*, *lacZ* code une enzyme appelée β-galactosidase (β-gal), qui catalyse l'hydrolyse du lactose, un glucide, en ses sucres constitutifs. La β-gal peut également hydrolyser un analogue du sucre appelé X-gal, produisant ainsi un pigment bleu. Les bactéries qui expriment l'enzyme β-gal fonctionnelle virent au bleu lorsqu'elles se développent en présence de X-gal (voir Fig. 5).

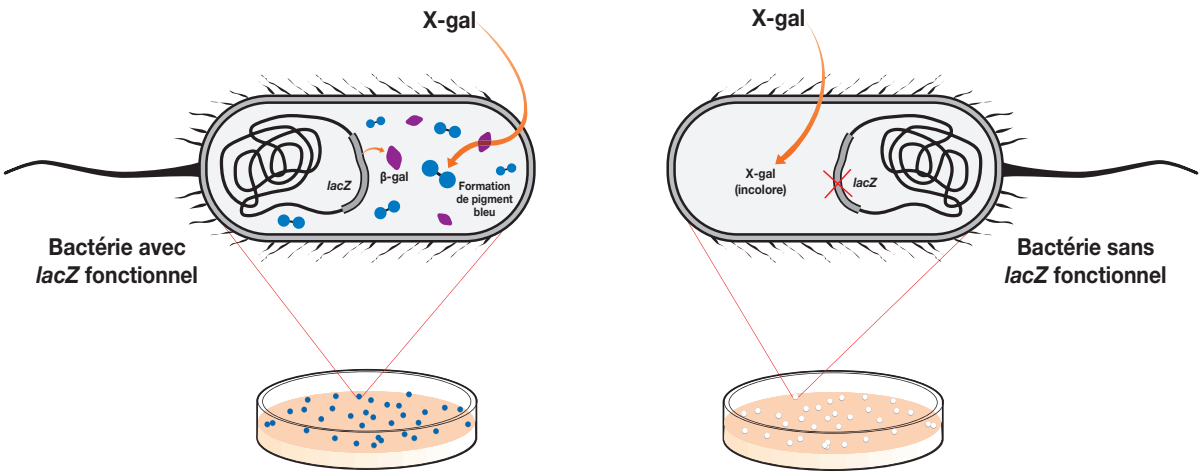


Fig. 5 La fonction du gène *lacZ* dans le criblage bleu-blanc.

Dans la nature, le lactose induit l'expression de l'opéron *lac*. Mais comme l'opéron *lac* permet aux bactéries de se nourrir du lactose lui-même, elles le consomment, ce qui stoppe l'expression du gène. Par conséquent, pour induire une expression continue du gène *lacZ*, les scientifiques utilisent un analogue du lactose non hydrolysable appelé IPTG dans le milieu de culture pour induire la synthèse de l'enzyme β-gal.

Les bactéries *E. coli*

La souche bactérienne dont vous disposerez pour commencer cette expérience, *E. coli* HB101-pBRKan, possède naturellement un gène *lacZ* fonctionnel. Cette souche particulière a également été modifiée pour exprimer Cas9, et possède un plasmide qui porte les gènes permettant la réparation par recombinaison homologue. Chez ces bactéries, l'expression du système de réparation de l'ADN par recombinaison homologue est contrôlée par un promoteur inductible de l'arabinose. Lorsque les bactéries sont exposées à l'arabinose, elles expriment ou « activent » le mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Ce n'est qu'à ce moment-là que les cellules bactériennes peuvent utiliser la matrice d'ADN donneur pour réparer les coupures double brin. Comme de nombreuses souches de laboratoire d'*E. coli*, les bactéries sont modifiées de façon à ne pas pouvoir effectuer de jonction d'extrémités non homologues, et ce pour des raisons de sécurité.

Les cellules qui ont été exposées à l'arabinose conserveront les enzymes nécessaires à la réparation par recombinaison homologue même si elles sont transférées dans une boîte sans arabinose. Leurs cellules filles, par contre, ne produiront pas les enzymes de réparation par recombinaison homologue sans être exposées à l'arabinose.

Plasmides

Les bactéries ne produisent normalement pas l'ARN guide simple brin et la matrice d'ADN donneur nécessaires à l'édition du gène *lacZ*. Vous introduirez l'ARN guide simple brin et/ou la matrice d'ADN donneur en transformant les bactéries au moyen d'un des deux plasmides suivants :

- pLZDonor — (contrôle) comprend une séquence de la matrice d'ADN donneur que le mécanisme de réparation par recombinaison homologue utilisera pour réparer la coupure double brin de l'ADN. La matrice d'ADN donneur inclut une séquence d'insertion qui sera introduite dans le gène *lacZ* et qui désactivera sa fonction.
- pLZDonorGuide — contient à la fois la séquence de la matrice d'ADN donneur du pLZDonor et une séquence qui code pour l'ARN guide simple brin. Après la transcription, l'ARN guide simple brin (ARNsg) guide la protéine Cas9 vers le site de coupure du gène *lacZ.*

Ces deux plasmides portent également un gène qui confère une résistance à l'antibiotique spectinomycine (SPT).

Partie 1. Répondre aux questions préalables aux travaux de laboratoire

Tableau 2. Caractéristiques de la boîte d'amorce (starter).

Boîte d'amorce (starter)	Additifs	Couleur de la colonie bactérienne	Enzyme Cas9	Système de réparation de l'ADN	ARNsg	Matrice d'ADN donneur
IX	IPTG, X-gal	Bleu	+	Inactif	–	–
IX/ARA	IPTG, X-gal, arabinose	Bleu	+	Actif	–	–

A. À partir des informations contenues dans le tableau 2, expliquez avec des phrases complètes pourquoi les colonies bactériennes sont de couleur bleue sur les boîtes d'amorce (starter).

B. Si les bactéries sur les boîtes d'amorce (starter) n'avaient PAS de gène* lacZ *fonctionnel, de quelle couleur seraient ces colonies?

C. Expliquez comment les différences entre les boîtes d'amorce (starter) IX et IX/ARA peuvent influencer l'édition du génome dans l'activité en laboratoire.

Le tableau 3 répertorie les 4 échantillons expérimentaux (A, B, C et D) avec lesquels vous travaillerez ainsi que leurs conditions de culture. Pendant l'activité, chaque échantillon sera transformé au moyen des plasmides indiqués dans la colonne « Plasmides ».

Tableau 3. Échantillons expérimentaux.

Échantillon	Source bactérienne	Plasmides	Enzyme Cas9	Système de réparation de l'ADN	ARNsg	Matrice d'ADN donneur	Changement attendu du gène *lacZ*
A	**IX**	pLZDonor	+	Inactif			
B	**IX**	pLZDonorGuide	+	Inactif			
C	**IX/ARA**	pLZDonor	+	Actif			
D	**IX/ARA**	pLZDonorGuide	+	Actif			

D. En tenant compte du plasmide qui sera ajouté à chaque échantillon, complétez les colonnes « ARN guide simple brin » et « Matrice ADN donneur » en écrivant « + » ou « – » pour indiquer quels composants ces bactéries posséderont.

E. Notez les changements susceptibles de survenir au niveau du gène* lacZ *pendant l'activité en laboratoire pour chaque échantillon. Notez vos réponses dans le tableau 3.

Après la transformation, chaque échantillon sera réparti sur une boîte de gélose LB contenant des additifs et sera incubé en vue du développement de colonies.

Tableau 4. Cultures bactériennes en boîte.

Boîte	Additifs	Croissance attendue? (oui/non)	Couleur des colonies (si croissance)
A	IPTG, X-gal, spectinomycine		
B	IPTG, X-gal, spectinomycine		
C	IPTG, X-gal, spectinomycine		
D	IPTG, X-gal, spectinomycine		

F. À partir des réponses données aux questions précédentes, complétez le tableau 4 en indiquant si une croissance bactérienne est susceptible de survenir pour chaque boîte.

Partie 2. Réaliser de l'édition du gène

Poste de travail de l'étudiant

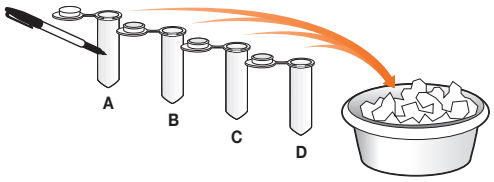
Matériel	Quantité
Boîte d'amorce (starter) LB fraîche *E. coli* IPTG/X-gal (**IX**)	1
Boîte d'amorce (starter) LB fraîche *E. coli* IPTG/X-gal/ARA (**IX/ARA**)	1
Boîtes LB IPTG/X-gal/spectinomycine (**IX/SPT**)	4
Bouillon nutritif LB (**LB**)	1,2 ml
Solution de transformation (**TS**) sur glace	1,5 ml
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
Microtube, 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

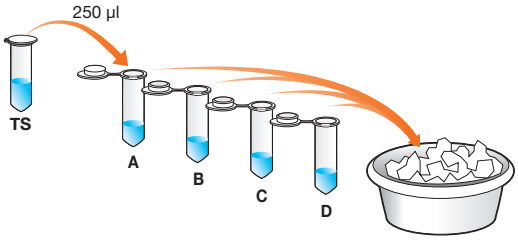
Matériel	Quantité
Bain-marie ou bain sec (trous remplis d'eau) à 60 °C	1
Incubateur ou incubateur-agitateur avec plateau à 37 °C (recommandé)	1
Ruban adhésif de laboratoire	

Protocole

1. ***Marquer quatre tubes de microcentrifugeuse de 2,0 ml avec les lettres A à D et les placer sur de la glace.***

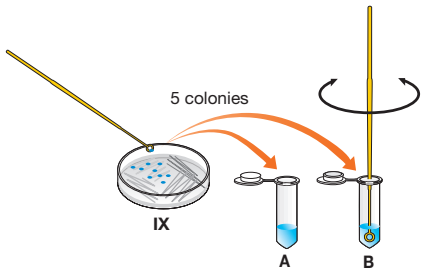


2. ***Ajouter 250 µl de solution de transformation glacée (TS) dans chaque tube. Replacer les tubes sur la glace.***



3. ***À l'aide d'une anse d'inoculation neuve, prélever cinq colonies de la boîte IPTG/X-gal (IX).***

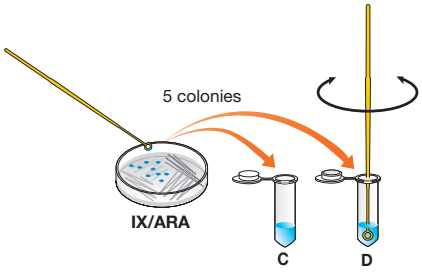
   Remuer l'anse dans le tube A pendant au moins 1 minute jusqu'à ce que toutes les bactéries soient dispersées dans la solution. <u>Aucune bactérie ne doit rester sur l'anse</u>. Remettre immédiatement le tube sur la glace.



4. ***Répéter l'étape 3 pour le tube B avec une nouvelle anse.***

5. ***À l'aide d'une nouvelle anse, prélever 5 colonies de la boîte IPTG/X-gal/ara (IX/ARA).***

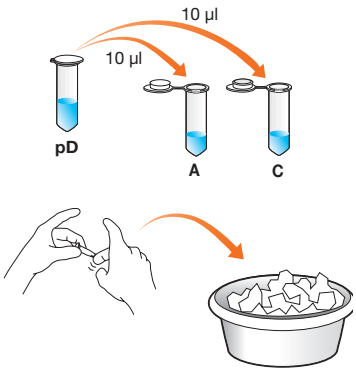
   Remuer l'anse dans le tube C pendant au moins 1 minute jusqu'à ce que toutes les bactéries soient dispersées dans la solution. <u>Aucune bactérie ne doit rester sur l'anse.</u> Remettre immédiatement le tube sur la glace.



6. ***Répéter l'étape 5 pour le tube D avec une nouvelle anse.***

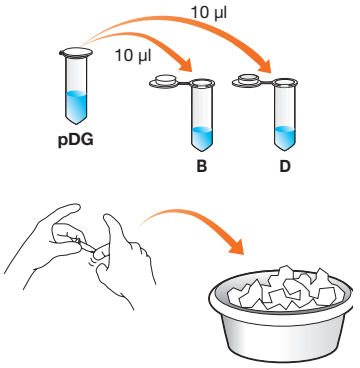
7. ***Avec une nouvelle pointe de pipette, ajouter 10 µl de plasmide pLZDonor (pD) dans le tube A. Fermer le tube, tapoter trois fois pour mélanger puis le placer sur la glace.***

   Avec une nouvelle pointe de pipette, répéter l'opération pour le tube C.



8. ***Avec une nouvelle pointe de pipette, ajouter 10 µl de plasmide pLZDonorGuide (pDG) dans le tube B. Fermer le tube, tapoter trois fois pour mélanger puis le placer sur la glace.***

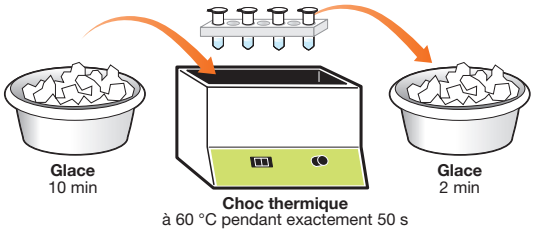
   Avec une nouvelle pointe de pipette, répéter l'opération pour le tube D.



9. ***Incuber sur la glace pendant au moins 10 minutes.***

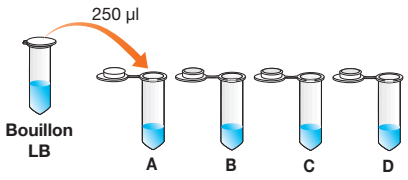
10. ***Retirer les tubes de la glace pour les placer dans un bain-marie ou un bain sec.***

    Soumettre les tubes à un choc thermique à 60 °C pendant exactement 50 secondes. Veiller à ce que le bas des tubes soit en contact avec l'eau.



11. ***Replacer immédiatement les tubes sur la glace pendant 2 minutes, avant de les transférer dans un portoir.***

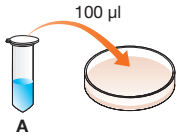
12. ***Avec une nouvelle pointe de pipette, ajouter 250 µl de bouillon nutritif à chaque tube. Fermer chaque tube et tapoter doucement trois fois pour mélanger. Les laisser reposer à température ambiante pendant 20 minutes à toute une nuit.***



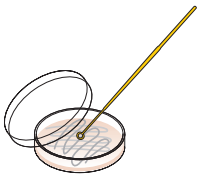
Arrêter. ***Demandez à l'enseignant s'il faut procéder à l'analyse maintenant ou le lendemain.***

13. ***Près des bords, marquer la face inférieure de quatre boîtes IX/SPT avec les lettres A à D. Apposer son paraphe et la date.***

14. ***Tapoter doucement le tube A pour remettre les bactéries en suspension. Avec une nouvelle pointe de pipette, transférer 100 µl de l'échantillon A sur la boîte A.***

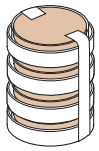


15. ***À l'aide d'une nouvelle anse d'inoculation, répartir uniformément le liquide sur la boîte A. Tourner la boîte plusieurs fois durant l'opération. Attention à ne pas percer ni perforer la surface gélosée.***



16. ***Avec à chaque fois une nouvelle pointe de pipette et une nouvelle anse d'inoculation, répéter les étapes 14 et 15 pour les échantillons B à D.***

17. ***Fermer les boîtes, les empiler avec du ruban adhésif et les étiqueter. Retourner les boîtes et les incuber à 37 °C pendant 24 heures ou à température ambiante pendant 2 à 3 jours.***



18. ***Après incubation, vérifier la coloration des boîtes. S'il n'est pas possible de distinguer les colonies bleues et blanches, mettre les boîtes au réfrigérateur à 4 °C pendant 1 à 5 jour(s) jusqu'à ce que la différence de couleur soit bien visible.***

Dénombrement des colonies et analyse des résultats

Comptez le nombre de colonies bleues et blanches présentes sur les boîtes et en prendre note dans le tableau 5. Avec un marqueur indélébile, dessinez sur la face inférieure de la boîte un point sous chaque colonie comptée. S'il y a trop de colonies sur une boîte pour les compter, divisez la boîte en quatre et comptez les colonies en suivant les étapes 19 et 20.

19. ***Sur la face inférieure de chaque boîte, utiliser une règle et un marqueur indélébile pour diviser la boîte en quadrants de même taille.***

20. Compter le nombre de colonies bleues et blanches présentes dans un quadrant. Avec un marqueur indélébile, dessiner sur la face inférieure de la boîte un point sous chaque colonie comptée. Multiplier le nombre de colonies relevées sur un quadrant par quatre et notez le résultat dans le tableau 5.

Répéter l'opération pour chaque boîte.

Important !
Avant de poursuivre, demandez à l'enseignant s'il faut conserver les boîtes pour une utilisation ultérieure lors de l'activité d'analyse des génotypes.

Tableau 5 Données de dénombrement des colonies.

Boîte	Nombre de colonies bleues	Nombre de colonies blanches	Nombre total de colonies	Pourcentage de colonies blanches (nombre de colonies blanches / nombre total)	Comparaison avec les données attendues
A					
B					
C					
D					

21. Calculer le nombre total de colonies pour chaque boîte et noter les résultats dans le tableau 5.

22. Pour chaque boîte, calculer le pourcentage du nombre total de colonies qui sont de couleur blanche.

23. Comparer les résultats avec les prévisions faites dans le tableau 4. Noter et décrire les concordances ou les différences constatées dans le tableau 5. Pour chaque différence, fournir une explication.

Partie 3. Répondre aux questions postérieures aux travaux de laboratoire

A. Expliquez comment la couleur des colonies peut être utilisée pour démontrer l'état du gène lacZ *dans la bactérie.*

B. Quelles boîtes apportent la preuve que le gène lacZ *a été coupé par la protéine Cas9?*

C. Parmi les boîtes apportant la preuve que le gène lacZ *a été coupé par la protéine Cas9, lesquelles montrent également la preuve que la coupure d'ADN a été réparée? À noter que la réparation de l'ADN ne signifie pas la restauration de la fonction d'un gène.*

D. Qu'arrive-t-il à une bactérie dont la coupure double brin de l'ADN n'est pas réparée?

E. Il est possible que l'une de vos boîtes ait peu de colonies, voire aucune. En vous appuyant sur les preuves issues de vos résultats, expliquez pourquoi les colonies ne se sont pas développées. Décrivez également le raisonnement expliquant pourquoi ces preuves soutiennent votre argumentation.

F. Si vous obtenez des résultats inattendus, dressez-en la liste ici et formulez une hypothèse expliquant comment ils sont survenus.

G. Décrivez au moins deux autres expériences qui permettraient de vérifier que la bactérie a subi une édition de gène chromosomique.

Activité de synthèse

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

La capacité du système CRISPR/Cas9 à éditer un génome de façon précise et permanente présente des implications majeures pour le traitement des maladies. Certaines maladies, telles que les maladies coronariennes, la drépanocytose et la mucoviscidose sont causées par des mutations génétiques. Un traitement basé sur la technologie CRISPR d'édition de l'ADN génomique au sein des cellules peut permettre de corriger ces mutations.

Si ce type de traitement est prometteur, il n'est pas aussi précis qu'il puisse paraître. Comme pour tout traitement, il existe des risques qui doivent être analysés et compris avant de pouvoir procéder à des tests sur l'être humain. Par exemple, une coupure hors site occasionnant la modification d'un gène ou d'une séquence ADN autre que celui ou celle visé(e) peut avoir des conséquences directes sur un organisme. Il n'est pas possible d'éliminer complètement ce type de risques, mais leurs probabilités et les conditions dans lesquelles ils pourraient survenir doivent être évaluées.

L'une des premières étapes pour la conception d'un traitement basé sur la technologie CRISPR consiste à identifier une stratégie d'édition du génome et à sélectionner le site de coupure par Cas9 visé. Dans cette activité, vous rechercherez la base génétique d'une maladie et déterminerez pour celle-ci une stratégie d'édition du génome basée sur CRISPR, à savoir remplacer, insérer ou supprimer une séquence. Vous identifierez ensuite les sites de coupure par Cas9 potentiels et utiliserez la technique d'alignement BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) développée par le NCBI (National Center for Bioinformatics Information, qui dépend des NIH, National Institutes of Health) pour rechercher des séquences similaires dans le génome humain. à l'aide de ces informations, vous analyserez les risques de coupure hors site des sites de coupure potentiels afin d'identifier le site le plus prometteur pour un traitement par CRISPR.

Partie 1. Identification et énumération des séquences recherchées

1. ***Lire les informations générales relatives à la maladie pour laquelle effectuer les recherches.***
   Échangez avec les membres du groupe pour répondre aux éventuelles questions qui en découlent.
2. ***Analyser la séquence d'ADN fournie et identifier les séquences recherchées potentielles pour la protéine Cas9.***
   Tenez compte des informations suivantes :
   - Un site visé par la protéine Cas9 inclut une séquence de proto-espaceur de 20 nucléotides suivie d'une séquence PAM appropriée (5'-NGG) dans la direction 5' à 3'. Par conséquent, une séquence recherchée possède 23 nucléotides.
   - La recherche préalable de séquences PAM peut permettre d'accélérer le processus.
   - Les séquences recherchées peuvent se trouver sur l'un des deux brins d'ADN, mais toujours dans la direction 5' à 3'.
3. ***Sélectionner de 2 à 4 séquences recherchées potentielles à analyser.***
   Notez chaque séquence dans le tableau ci-dessous, en respectant l'ordre suivant pour les nommer : abréviation du nom du gène-paraphe-numéro. Par exemple, GENE9-TRP-1.

Nom de la séquence recherchée	Numéro de position du premier nucléotide	Numéro de position du dernier nucléotide	Séquence recherchée de 23 nucléotides, 5' à 3'

Partie 2. Utilisation de la technique d'alignement BLAST pour identifier les séquences hors site

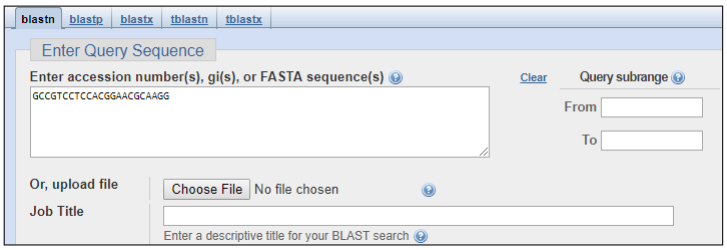
Une même séquence partielle ou complète ciblée par Cas9 peut parfois se retrouver dans un autre endroit du génome humain, avec le risque que l'ARN guide simple brin conçu pour une telle séquence guide la protéine Cas9 vers des sites de coupure erronés. Vous utiliserez le logiciel de bio-informatique BLAST pour trouver les gènes dont les séquences correspondent partiellement ou entièrement aux sites ciblés que vous avez sélectionnés précédemment.

1. ***Préparer un tableau de résultats.***
   Utilisez le tableau de résultats bio-informatiques fourni dans le guide de l'étudiant ou le reproduire dans un tableur.

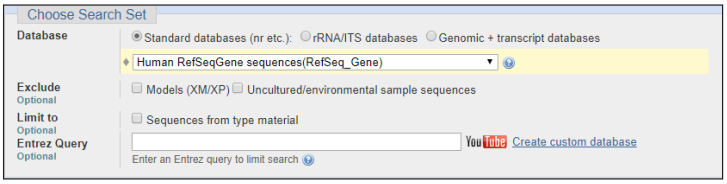
2. ***Effectuer une recherche avec l'outil BLAST.***
   L'interface de l'outil BLAST est mise à jour régulièrement. Les instructions et captures d'écran ci-dessous peuvent donc varier légèrement par rapport à la dernière utilisation sur le site.

   2.1. Se rendre sur blast.ncbi.nlm.nih.gov. Ce site est uniquement disponible en anglais. des traductions ont été fournies entre crochets pour plus de clarté.

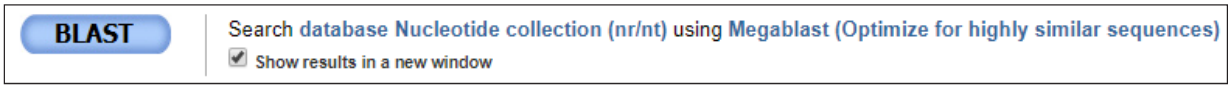
   2.2. Cliquer sur Nucleotide BLAST. Copier la séquence recherchée à partir du tableau et la coller dans la section Enter Query Sequence [Saisir une séquence à rechercher].



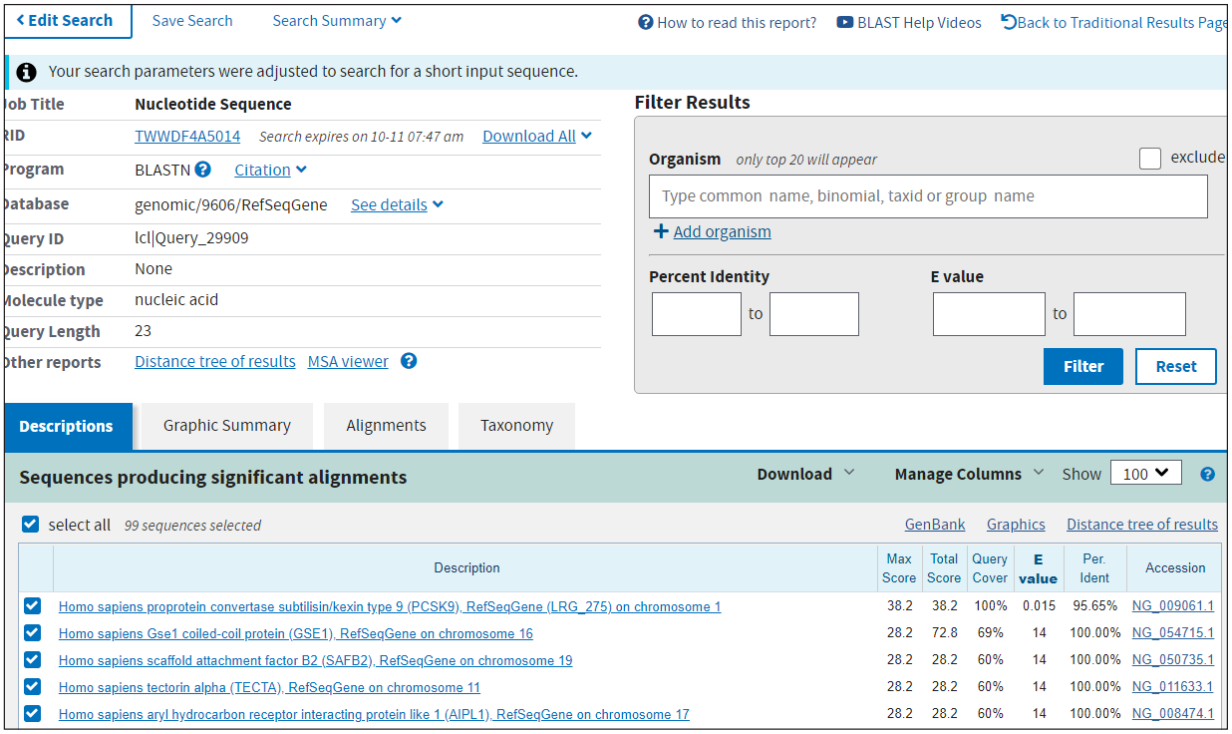
   2.3. Dans Choose Search Set > Database [Choisir un ensemble de recherche > Base de données], sélectionner Human RefSeqGene sequences [Séquences RefSeqGene humain] (RefSeq_Gene).



*2.4. Sélectionner **Show results in a new window [Afficher les résultats dans une nouvelle fenêtre]** et cliquer sur **BLAST**.*



2.5. La recherche BLAST peut prendre quelques minutes selon le volume d'utilisation du serveur. Une fois terminée, un écran similaire à celui figurant ci-dessous apparaît.

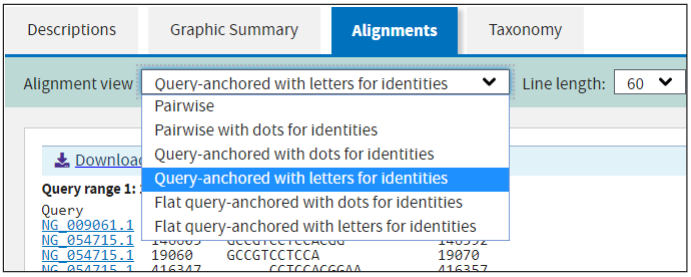


3. Parcourir les résultats de la recherche BLAST.

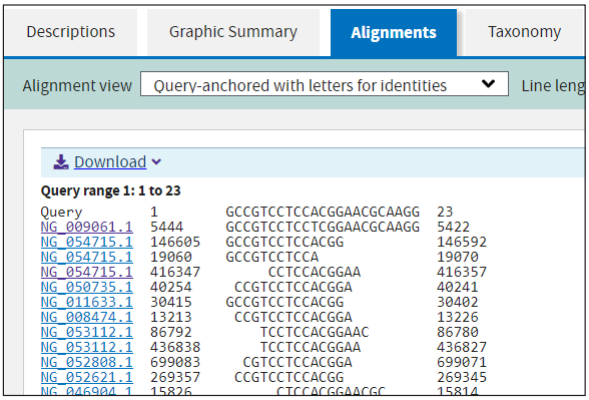
3.1. L'un des premiers résultats doit présenter une correspondance parfaite avec la recherche pour le gène sur lequel le travail se fait. Cliquer sur le lien de la description et parcourir les informations indiquées. Retourner ensuite à la page des résultats.

3.2. Cliquer sur les autres liens dans la liste de résultats pour s'orienter dans les informations fournies. Retourner ensuite à la page des résultats.

3.3. Sélectionner toutes les séquences (select all), cliquer pour ouvrir l'onglet ***Alignments*** *[Alignements], puis sélectionner* ***Alignment view > Query-anchored with letters for identities [Vue alignement > Recherche des identités par lettre].***



3.4. Parcourir les informations de la séquence.



a. La séquence (recherche) apparaît en haut de la liste des résultats pour pouvoir s'y référer plus facilement. Les autres lignes affichent des séquences de nucléotides de gènes présentant une correspondance partielle ou complète avec la séquence sur laquelle porte la recherche.

b. Les liens situés à gauche sont les numéros d'identification des gènes de référence. Chaque gène dans la base de données possède un numéro d'identification propre.

c. À droite de chaque numéro d'identification se trouve la position de départ de la séquence d'alignement, suivie de la séquence et du numéro du nucléotide à la position finale. La plupart des séquences d'alignement ne correspondront pas à la longueur totale de la séquence recherchée.

3.5. L'un des premiers résultats doit présenter une correspondance parfaite avec la recherche effectuée et se trouver dans le gène sur lequel le travail se fait. Cliquer sur le numéro d'identification. Vérifier que les informations indiquées pour cette correspondance sont correctes (qu'elles correspondent au gène sur lequel se fait le travail). Si elles ne correspondent pas totalement, vérifier que la séquence recherchée est correcte.

4. Noter les résultats.

4.1. Dans le tableau de résultats bio-informatiques, reporter cinq résultats d'alignement (ou autant que possible s'il en existe moins de cinq) dont les séquences incluent la séquence PAM 5^{l}-NGG alignée avec celle de la séquence recherchée, avec N étant n'importe quel nucléotide. Utiliser le lien du numéro d'identification pour récupérer des informations complémentaires et compléter le tableau. Un même numéro d'identification peut donner plusieurs résultats.

4.2. Mettre en évidence toutes les correspondances d'alignement exactes trouvées dans des gènes autres que celui visé.

4.3. Encercler la ou les séquence(s) d'alignement les plus longues qui sont différentes de la cible visée.

5. Répéter les étapes 2 à 4 pour chacune des séquences recherchées.

Questions thématiques

A. Pourquoi peut-il y avoir plusieurs résultats pour un même numéro d'identification?

B. Comment expliquez-vous qu'un alignement avec une concordance parfaite puisse donner un site de coupure erroné?

C. La présence de correspondances d'alignement indique-t-elle un risque plus ou moins élevé de coupure hors site?

Partie 3. Évaluation des séquences recherchées potentielles

Comme la séquence d'ARN guide simple brin détermine l'endroit où la protéine Cas9 coupe l'ADN, celle-ci est susceptible de couper l'ADN partout où elle reconnaît une séquence complémentaire, même dans des endroits qui ne sont pas souhaités. Il s'agit alors de coupures dites hors site. Différentes expériences ont montré que la protéine Cas9 coupe parfois l'ADN même lorsque la séquence de l'ARN guide simple brin et la séquence d'ADN ne correspondent pas entièrement. Cela signifie que les séquences d'ADN ne présentant qu'une concordance partielle avec l'ARN guide simple brin peuvent potentiellement constituer des sites de coupure erronés, bien que la séquence PAM soit toujours requise. En général, plus ces différences sont nombreuses entre la séquence d'ADN et l'ARN guide simple brin, moins la protéine Cas9 est susceptible de procéder à une coupure.

1. ***Présentez trois critères qui pourraient être utilisés pour classer les sites recherchés potentiels selon leur degré de sécurité pour un usage thérapeutique. Pour sélectionner ces critères, utilisez les résultats d'alignement obtenus à partir de la recherche BLAST ainsi que les informations issues des différentes lectures précédentes et des questions thématiques. Pour chaque critère, expliquez comment celui-ci aidera à évaluer un site recherché potentiel.***

2. ***À l'aide des critères établis à la question précédente, évaluez et classez les sites recherchés potentiels sélectionnés dans la partie 1, étape 3. Sur la base de l'évaluation, expliquez quel site recherché potentiel constitue la meilleure option pour l'application thérapeutique actuelle et détaillez le raisonnement.***

Questions thématiques

A. Si vous deviez poursuivre l'évaluation des sites recherchés potentiels à utiliser dans le cadre d'un traitement, nommez deux autres éléments d'information ou expériences qui vous aideraient.

B. Quels problèmes de santé pourrait causer une coupure hors site par CRISPR/Cas9?

C. Comment estimeriez-vous que le risque d'une coupure hors site dans le cadre d'un traitement par CRISPR/Cas9 est suffisamment faible pour être considéré comme sûr?

D. Les coupures hors site doivent-elles être prises en compte pour les expériences CRISPR non thérapeutiques en laboratoire? Expliquez pourquoi.

E. Pensez-vous que l'évaluation des risques de coupure hors site doit être effectuée de la même manière pour les traitements par CRISPR et les expériences CRISPR en laboratoire?

Coronaropathie

Contexte

Responsables chaque année de plus de 17 millions de décès, les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde. La coronaropathie, ou maladie coronarienne, est un type de maladie cardiovasculaire qui provoque le rétrécissement des vaisseaux sanguins situés près du cœur en raison de l'accumulation de plaques d'athérome et qui cause chaque année le décès de près de 8 millions de personnes. Il a été démontré que la réduction du cholestérol à lipoprotéines de basse densité (LDL) permettait de réduire efficacement le risque de maladie coronarienne. Les récepteurs des LDL (LDLR) du foie éliminent les LDL du plasma sanguin. Cependant, les niveaux de LDLR sont eux-mêmes réduits par la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), une protéase à sérine qui se lie aux récepteurs et les dégrade (voir Fig. 6). Les personnes présentant des mutations au niveau du gène *PCSK9* possèdent généralement un taux plus faible de cholestérol LDL, probablement parce qu'ils possèdent un niveau plus élevé de récepteurs de LDL.

Stratégie thérapeutique d'édition du génome

Le recours au traitement par édition du génome vise à réduire ou à éliminer la fonction de l'enzyme PCSK9. L'une des stratégies consiste à perturber le gène en réalisant une coupure dans l'exon 1 pour permettre une jonction d'extrémités non homologues. Cette stratégie permettrait de diminuer le niveau d'enzyme PCSK9 fonctionnelle dans le foie, pour amoindrir la dégradation des récepteurs de LDL et permettre ainsi une élimination plus efficace du cholestérol LDL du sang.

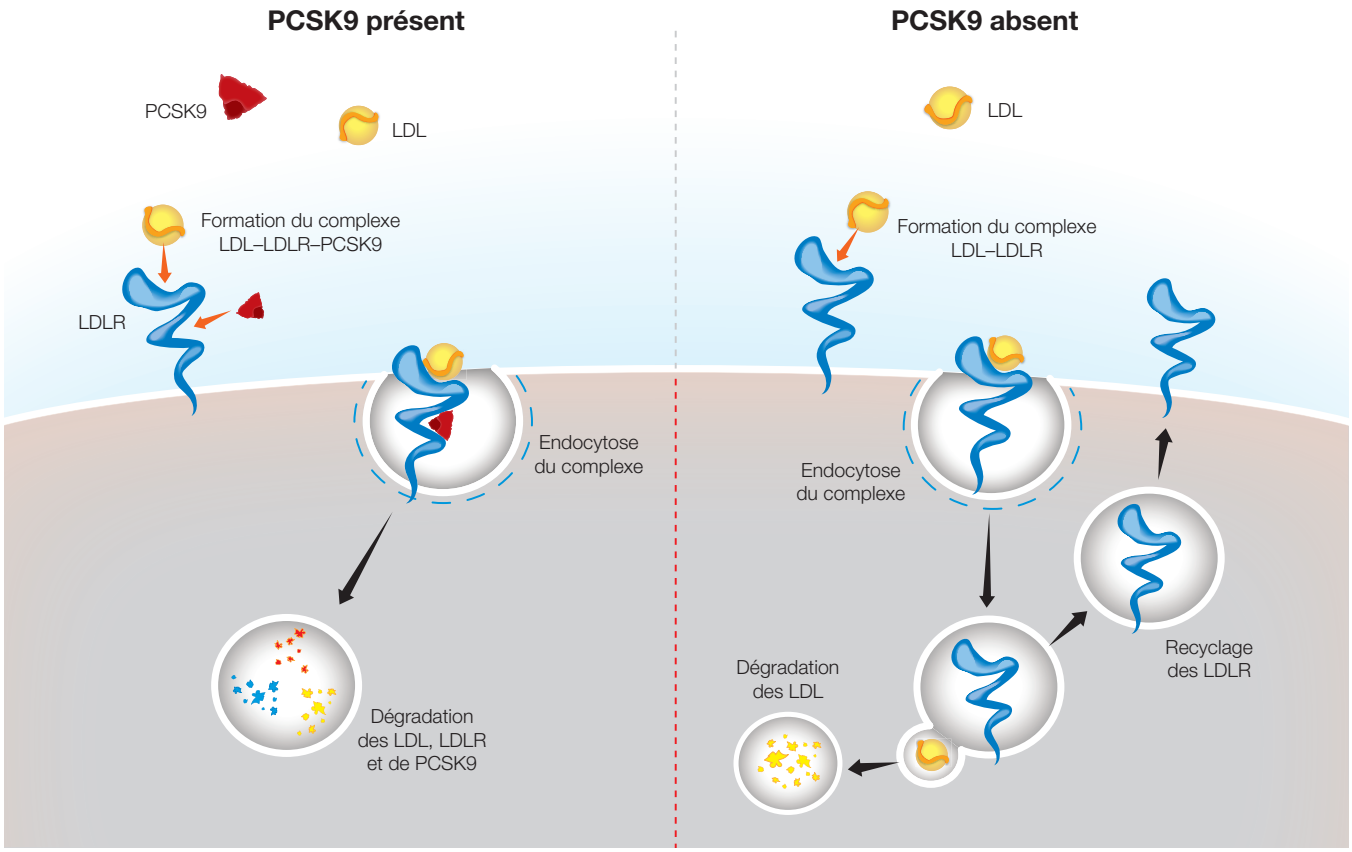


Fig. 6. Dégradation des LDL en présence et en l'absence de PCSK9.

Questions thématiques

A. Décrivez comment la perturbation de l'enzyme **PCSK9** *est susceptible de perturber l'expression du gène. Dessinez un modèle qui illustre votre description.*

B. Décrivez deux avantages et deux inconvénients potentiels de l'administration d'un tel traitement au niveau des cellules du foie uniquement.

C. Cette stratégie d'édition du génome constitue-t-elle un exemple de remplacement, d'insertion ou de suppression d'une séquence?

Informations sur la séquence du gène *PCSK9*

Numéro d'identification du gène : ***NG_009061.1***
Référence du gène : ***Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 9***
Abréviation du gène : **PCSK9**

La séquence ci-dessous est un extrait de l'exon 1 du gène *PCSK9*, de la position des nucléotides 5387 à 5446.

```
5387 5'-GGACGAGGACGGCGACTACGAGGAGCTGGTGCTAGCCTTGCGTTCCGAGGAGGACGGCCT-3' 5446
     3'-CCTGCTCCTGCCGCTGATGCTCCTCGACCACGATCGGAACGCAAGGCACCTCCTGCCGGA-5'
```

Anémie falciforme

Contexte

L'anémie falciforme, également appelée drépanocytose, est une maladie du sang héréditaire qui entraîne une déformation des globules rouges en forme de faucille, ce qui accroît le risque de caillots sanguins. Lorsque l'on s'érafle le genou ou se coupe le doigt, des caillots de sang se forment à l'extérieur pour former une croûte sur la blessure et favoriser ainsi la cicatrisation. Mais lorsque des caillots de sang se forment à l'intérieur, ceux-ci peuvent obstruer des vaisseaux sanguins et causer des douleurs, voire la mort. Près de 100 000 personnes meurent chaque année de complications dues à la drépanocytose.

L'anémie falciforme est causée par le polymorphisme d'un seul nucléotide (PSN) dans le gène de l'hémoglobine B *(HBB)*, appelé rs334. Les personnes homozygotes pour l'adénine au niveau de la mutation rs334 produisent une hémoglobine normale tandis que les personnes homozygotes pour la thymine produisent une hémoglobine falciforme et sont porteurs de la maladie. Les individus hétérozygotes ne présentent aucun symptôme de la maladie et ont une résistance accrue au paludisme, ce qui augmente leur capacité d'évolution dans les régions où le paludisme est courant.

Stratégie thérapeutique d'édition du génome

Le recours à l'édition du génome pour le traitement de l'anémie falciforme vise à permettre l'expression de l'hémoglobine non falciforme fonctionnelle. Les globules rouges, lesquels contiennent l'hémoglobine, sont issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (voir Fig. 7). L'une des stratégies de thérapie génique potentielles consiste à recueillir des cellules souches hématopoïétiques d'un patient, à éditer le gène *HBB* contenu dans ces cellules puis à réintroduire ces dernières dans le corps du patient. Utiliser les propres cellules du patient réduit considérablement le risque de rejet par son propre système immunitaire. La technologie d'édition du génome par CRISPR est utilisée pour remplacer la thymine par l'adénine au niveau de la mutation rs334 en effectuant une coupure près du PSN et en introduisant la séquence correcte au moyen de la méthode de réparation par recombinaison homologue (HDR).

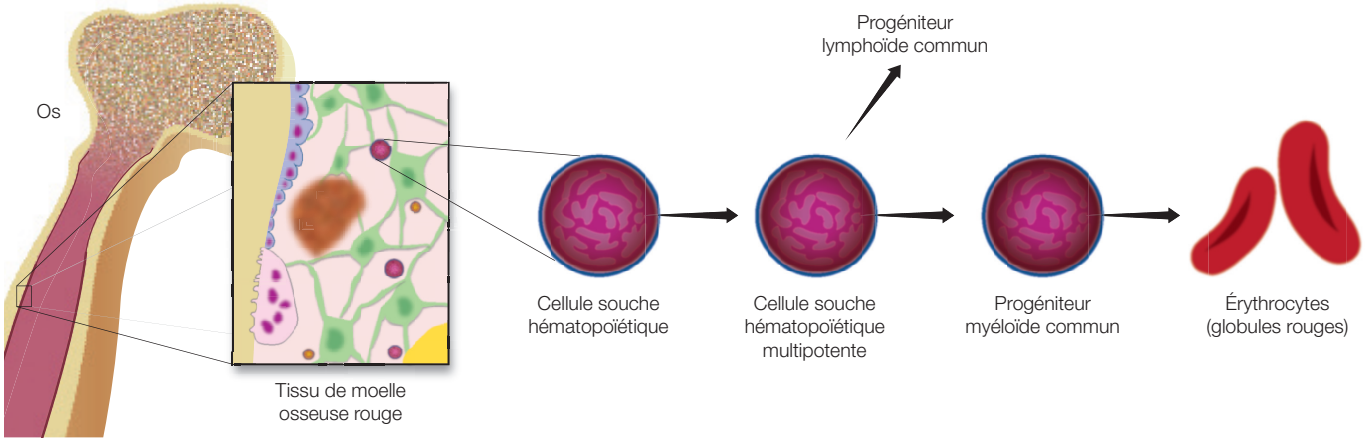


Fig. 7. Différenciation des cellules souches hématopoïétiques en globules rouges.

Questions thématiques

A. Dans le cadre de la stratégie d'édition du génome décrite précédemment, pourquoi éditer uniquement l'ADN des cellules souches hématopoïétiques?

B. Quelles autres cellules pourraient être éditées pour atteindre des résultats similaires? Présentez deux avantages et deux inconvénients potentiels que présenterait la modification de ces cellules par rapport aux cellules hématopoïétiques.

C. Cette stratégie d'édition du génome constitue-t-elle un exemple de remplacement, d'insertion ou de suppression d'une séquence?

Informations sur la séquence du gène *HBB*

Numéro d'identification du gène : ***NG_059281.1***
Référence du gène : ***Homo sapiens hemoglobin subunit beta* (HBB), *RefSeqGene sur le chromosome 11***
Abréviation du gène : **HBB**

La séquence ci-dessous est un extrait du gène *HBB*, de la position des nucléotides 5053 à 5106, avec la mutation rs334 identifiée en gras par un astérisque.

```
                          *
5053  5'-GGTGCATCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGT-3'  5106
      3'-CCACGTAGACTGAGGACACCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCCCGTTCCA-5'
```

Fibrose kystique

Contexte

La fibrose kystique est une maladie autosomique récessive qui affecte les poumons, le pancréas et l'intestin grêle. Cette maladie affecte près de 70 000 personnes dans le monde. Elle cause l'accumulation de mucus visqueux dans ces organes et entraîne fréquemment des infections pulmonaires graves. Si elle n'est pas traitée, l'espérance de vie n'excède pas 20 ans. La maladie est causée par des mutations du gène *CFTR* (régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose) sur le chromosome 7, dont la plus fréquente consiste en la délétion (sans décalage du cadre de lecture) de trois paires de bases dans l'exon 11 qui code la phénylalanine (position 508). La protéine *CFTR* transporte les ions chlorures à travers la membrane des cellules, un processus essentiel pour une élimination efficace du mucus des voies respiratoires (voir Fig. 8). Cette mutation en position 508 altère la production normale de CFTR.

Stratégie thérapeutique d'édition du génome

Le recours à l'édition du génome pour le traitement de la fibrose kystique vise à corriger le gène *CFTR* dans les cellules souches épithéliales des poumons. Un médicament serait administré par inhalation pour cibler les poumons, et la modification aurait ainsi lieu *in vivo*. La technologie CRISPR pourrait ici être utilisée pour réaliser une coupure dans l'exon 11 à proximité de la mutation en position 508 du gène *CFTR* et pour ensuite utiliser la recombinaison homologue initiée par CRISPR pour remplacer la mutation par une version saine du gène.

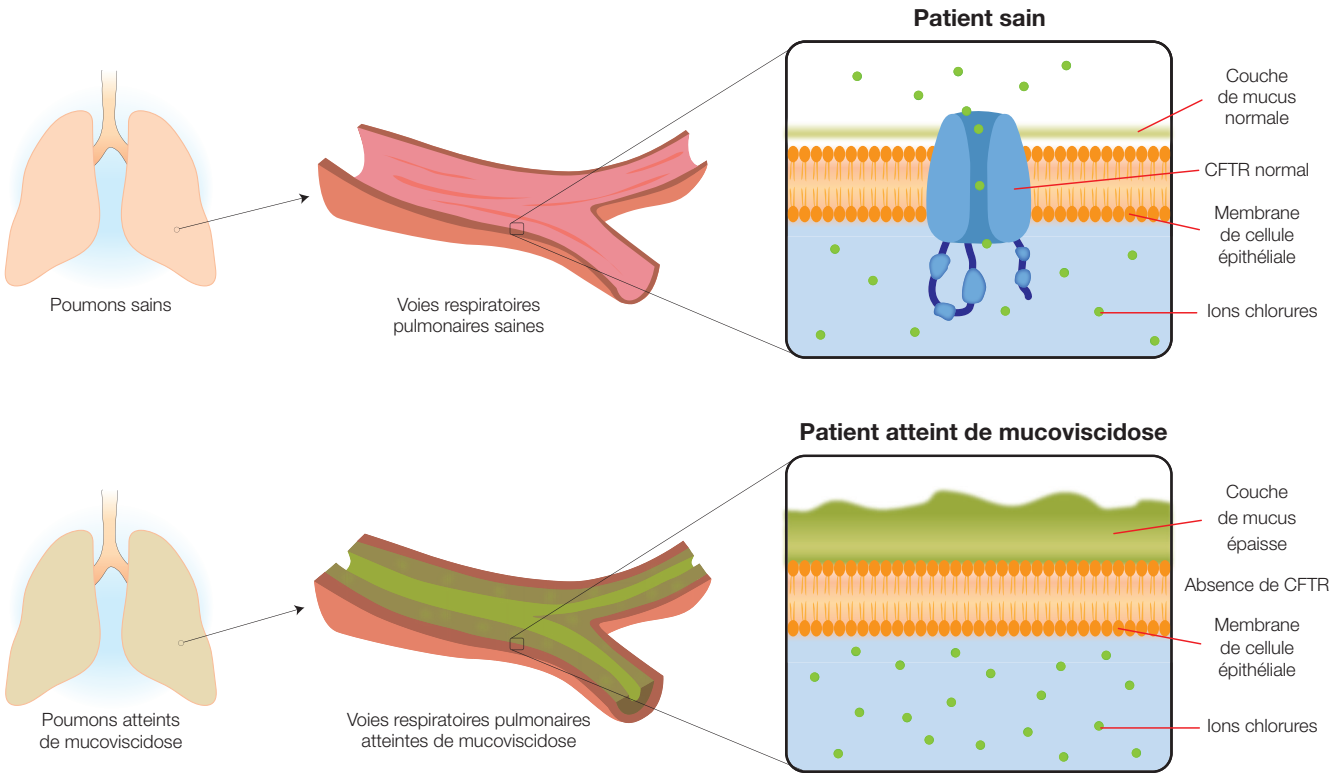


Fig. 8. Les couches de mucus dans les voies respiratoires pulmonaires chez les patients sains et les patients atteints de fibrose kystique.

Questions thématiques

A. Décrivez comment l'édition du gène **CFTR** *est susceptible de perturber son expression. Dessinez un modèle qui illustre votre description.*

B. Décrivez deux avantages et deux inconvénients potentiels de traiter la fibrose kystique par édition du génome par inhalation plutôt que par voie orale, par injection ou par une autre méthode.

C. Cette stratégie d'édition du génome constitue-t-elle un exemple de remplacement, d'insertion ou de suppression d'une séquence?

Informations sur la séquence du gène *CFTR*

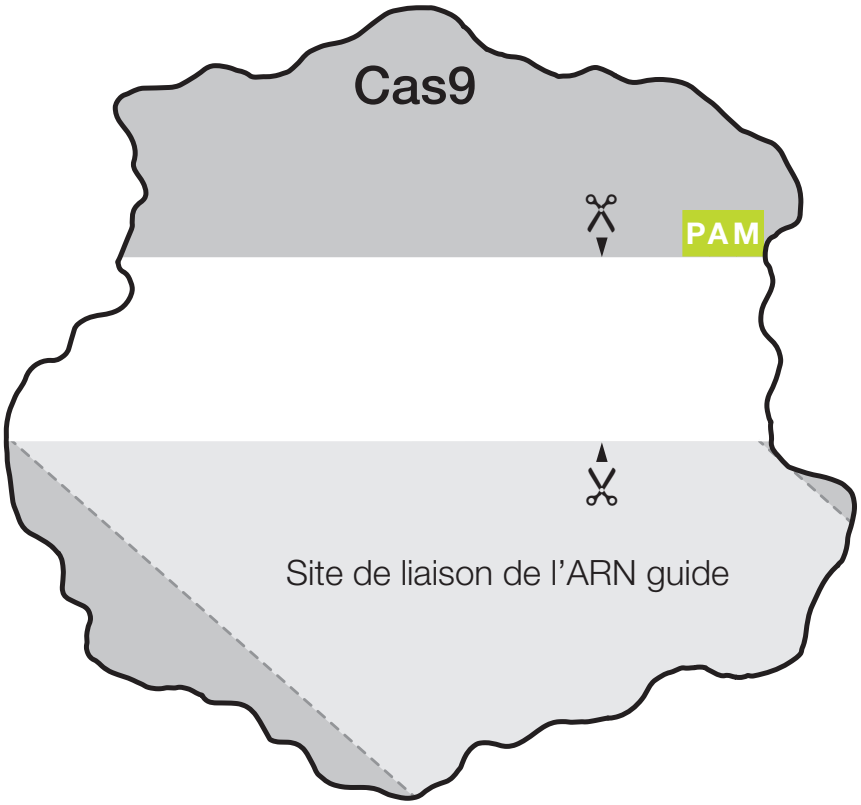
Numéro d'identification du gène :	***NG_016465.4***
Référence du gène :	***Homo sapiens CF transmembrane conductance regulator*** **(CFTR)**
Abréviation du gène :	**CFTR**

La séquence ci-dessous est un extrait de l'exon 11 du gène CFTR, de la position de nucléotides 98756 à 98815, avec la mutation des trois paires de bases identifiée en gras par des astérisques.

```
                                                          ***
98756  5'-TTCTGTTCTCAGTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGT-3'  98815
       3'-AAGACAAGAGTCAAAAGGACCTAATACGGACCGTGGTAATTTCTTTTATAGTAGAAACCA-5'
```

Nom de la séquence recherchée	Séquence recherchée (5' à 3')	Numéro d'identification du gène du résultat	Nom du gène (abréviation)	Séquence d'alignement (5' à 3')	Numéro du nucléotide de départ	Numéro du nucléotide de fin	Longueur	La séquence d'alignement comprend-elle une séquence PAM correcte? (oui/non)	Nombre de différences

3' – AGTCCAGTTTAAGTCTGCCGTTTGCTGACAGGACCGGCATTGGCTCGGTGGGCAACGTGGTGTCTAC – 5'
3' – GTAGACACCACGTTGCCCGCGACCCAGCCAATGCCGGTCCTGTCAGGCAAACGGCAGACTTAAACTGGACT– 5'
BANDE D'ADN 2
3' – AGTCCAGTTTAAGTCTGCCGTTTGCTGACAGGACCGGCATTGGCTCGGTGGGCAACGTGGTGTCTAC – 5'
3' – GTAGACACCACGTTGCCCGCGACCCAGCCAATGCCGGTCCTGTCAGGCAAACGGCAGACTTAAACTGGACT– 5'
BANDE D'ADN 1
3' – 5'
ADN VIERGE
5' – 3'
3' – 5'
ADN VIERGE
5' – 3'
3' – 5'
ADN VIERGE
5' – 3'
3' – 5'
MATRICE D'ADN DONNEUR
5' – 3'
ARNsg 2
AACGGGCGCUGGGUCGGUUA
ARNsg 1


Cas9
PAM
Site de liaison de l’ARN guide

Glossaire

Promoteur inductible de l'arabinose — Promoteur présent naturellement dans les systèmes bactériens et utilisé dans de nombreux plasmides d'expression pour permettre la régulation de l'expression d'un gène ciblé : l'expression est induite en présence d'arabinose et réprimée en son absence.

Cas9 — « CRISPR-associated protein 9 » (Cas9) en anglais, cette endonucléase est capable de couper le brin d'ADN à double hélice à un endroit spécifique d'une grande séquence de reconnaissance ou à un site recherchée. Elle est impliquée dans la défense naturelle de certains procaryotes contre les virus à ADN et est largement utilisée dans les applications de génie génétique pour couper l'ADN à des endroits spécifiés par un ARN guide (ARNg).

CRISPR — « Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats » en anglais; il s'agit de séquences du génome de certains procaryotes qui conservent la mémoire d'infections virales. Avec les protéines associées (Cas), les bactéries utilisent ces séquences pour reconnaître et inactiver les virus concernés lors d'une nouvelle infection. Les scientifiques ont adapté ce système pour l'utiliser en génie génétique.

Matrice d'ADN donneur — Une séquence modifiée d'ADN nécessaire pour la réparation par recombinaison homologue dans les applications d'édition du génome par CRISPR; peut inclure une séquence souhaitée, bordée à ses deux extrémités de « bras d'homologie » qui correspondent à la séquence avant et après la coupure.

β-galactosidase — Codée par le gène *lacZ*, cette enzyme hydrolyse les hydrates de carbone contenant du galactose, dont le lactose. Elle clive également le composant incolore *X-gal* en deux parties, dont l'une prendra une coloration bleu foncé.

ARN guide — Courte séquence d'ARN non codante qui se lie à la protéine Cas9 et aux séquences complémentaires de la séquence d'ADN recherchée où Cas9 exécute son activité endonucléase pour couper les brins d'ADN ciblés.

Région guide — Partie de l'ARN CRISPR ou ARNcr, une séquence de 20 nucléotides de l'ARN guide simple brin complémentaire de la séquence d'ADN recherchée que l'enzyme Cas9 doit couper. Les scientifiques peuvent facilement adapter cette séquence à la cible visée.

Réparation par recombinaison homologue (HDR) — Mécanisme de réparation de l'ADN où des protéines spécifiques réparent une coupure d'ADN double brin au moyen de la matrice d'ADN donneur.

Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) — Un analogue non-métabolisable du lactose, qui induit la transcription de l'opéron lac.

lacZ — Portion de l'opéron *lac* dans la bactérie *E. coli*, ce gène encode l'enzyme β-galactosidase. Pendant des décennies, les biologistes moléculaires ont utilisé le gène *lacZ* comme site cible pour l'insertion de séquences d'ADN, car la couleur de la colonie bactérienne indique la réussite ou non de l'insertion.

Jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) — Mécanisme de réparation de l'ADN où des protéines spécifiques ressoudent les extrémités des deux brins d'ADN coupés. Cette méthode engendre le risque de créer ou de supprimer aléatoirement une ou plusieurs bases et donc de perturber la fonction ou l'expression du gène.

Proto-espaceur — Séquence d'ADN ciblée pour être coupée par le système CRISPR.

Motif de reconnaissance du proto-espaceur (PAM) — Motif de séquence situé immédiatement après la séquence du proto-espaceur dans la séquence de reconnaissance Cas9, et qui est nécessaire pour que l'enzyme Cas9 soit fonctionnelle. Cas9 reconnaît la séquence PAM 5'-NGG où N peut être n'importe quel nucléotide (A, T, C ou G). Lorsque l'enzyme Cas9 se lie à la séquence PAM, elle sépare les brins d'ADN de la séquence adjacente pour permettre à l'ARN guide simple brin de se lier. Si l'ARN guide simple brin est complémentaire de cette séquence, l'enzyme Cas9 coupe l'ADN.

Région de liaison — Appelée ARN CRISPR transactivateur ou ARNtracr, cette région qui forme une structure en épingles à cheveux (en forme d'échafaudage) s'accrochant fermement dans une faille de la protéine Cas9. La séquence de cette région est généralement la même pour tous les ARN guides simple brin.

ARN guide simple brin (ARNsg) — Forme modifiée de l'ARN guide qui forme un complexe avec l'enzyme Cas9; fusion d'environ 100 nucléotides de deux régions qui se présentent naturellement comme des ARN guide distincts : la région guide (ARNcr) et la région de liaison (ARNtracr).

X-gal — 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, un composé du galactose lié à un noyau indole substitué. Hydrolisé par la β-galactosidase, il produit un pigment bleu insoluble et peut être utilisé dans les cultures bactériennes pour indiquer la présence de β-galactosidase active.

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*

10000122376 Ver C FR *22-0526 0822 Sig 0122*