

L'édition des génomes chez les animaux: vers une seconde révolution?: éditer des bases sans couper l'ADN

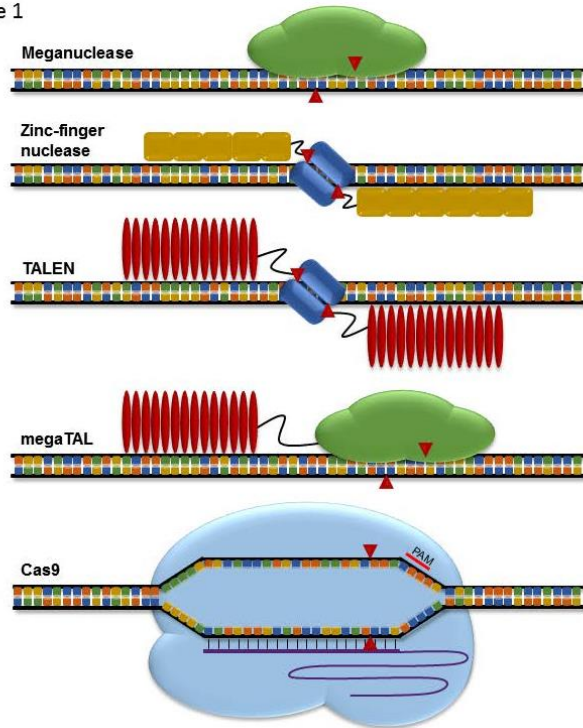
Jean-Stéphane JOLY
Directeur de Recherches INRA
CNRS Gif-sur-Yvette

Equipe CASBAH NEURO-PSI
Infrastructure d'avenir TEFOR

Introduction

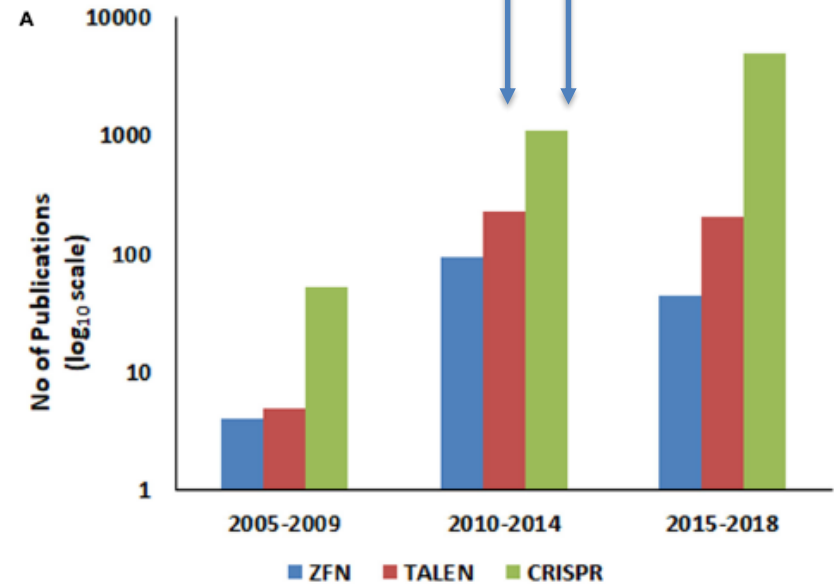
Plusieurs plateformes pour éditer les génomes

Figure 1



Plusieurs plateformes

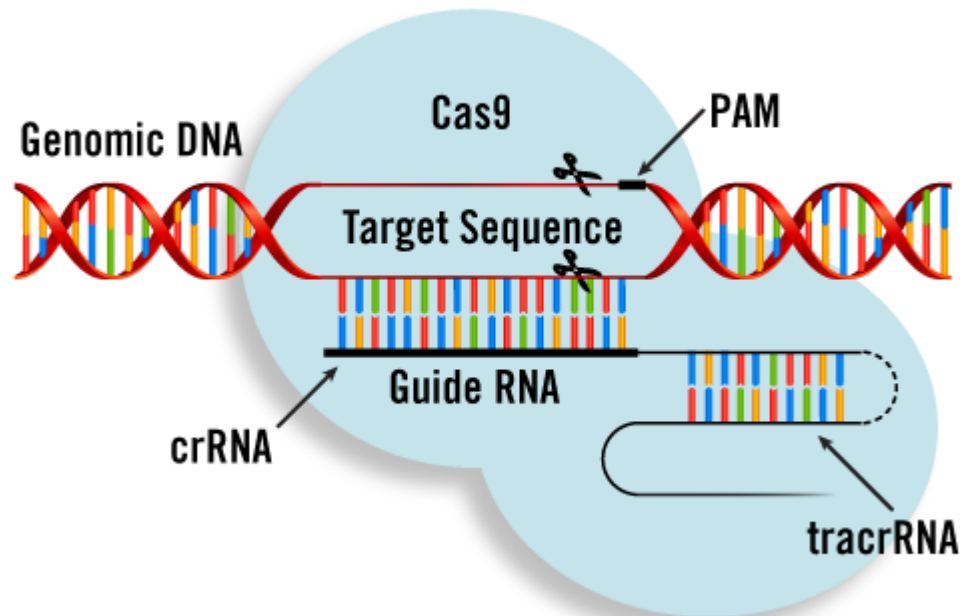
2012 Applis TALEN 2013 Applis CRISPR



Innovation se base sur un socle de recherche fondamentale exploratoire

Explosion de l'utilisation des CRISPRs, simples, efficaces et très médiatiques aux US

Le système Crispr-Cas9



Une incroyable précision

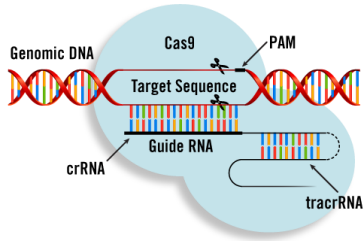
Capable de reconnaître une cible au milieu de 3 milliards de paires de bases

Une personne par mètre carré. Trouve la cible dans un diamètre de 30km (Grand Paris)

Pas des drones, plutôt un bombardement massif mais de bombes qui n'explosent que si elles trouvent leur cible



Pourquoi une coupure si précise?



Sélection au cours de l'évolution par les bactéries pour se défendre contre les phages

Liaison à une petite séquence de 2 pb

Puis lecture et interrogation de l'ADN

Se décroche si erreur

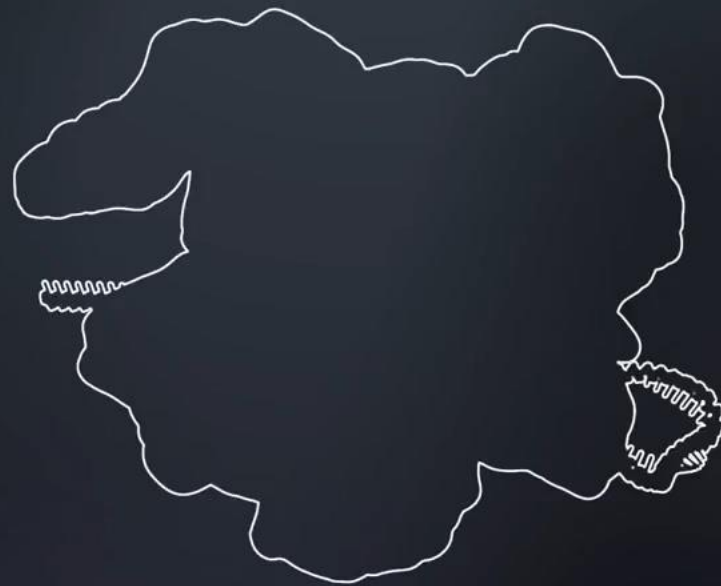
Ne coupe que si les 17-20pb sont exactes

[Biophys J.](#) 2017 Oct 3;113(7):1416-1424. doi: 10.1016/j.bpj.2017.08.013.

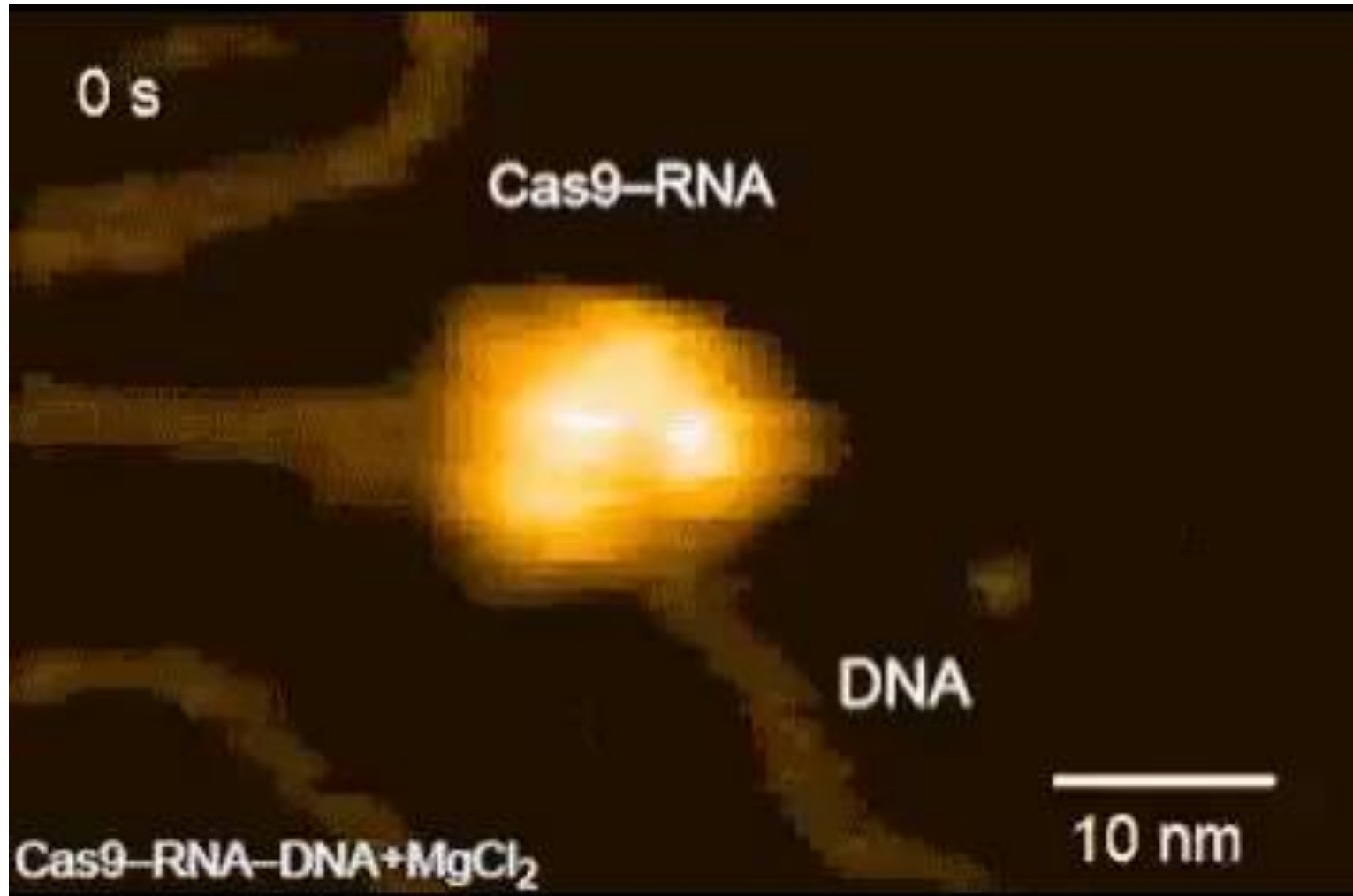
Mechanism of Genome Interrogation: How CRISPR RNA-Guided Cas9 Proteins Locate Specific Targets on DNA.

[Shvets AA](#)¹, [Kolomeisky AB](#)².

Couper



Voir la coupure!



De premiers doutes sur la précision Article rétracté dix mois plus tard!

Nat Methods. 2017 May 30; 14(6): 547–548. doi:10.1038/nmeth.4293.

Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing *in vivo*

Kellie A Schaefer^{1,2,8}, Wen-Hsuan Wu^{3,4,8}, Diana F Colgan¹, Stephen H Tsang^{3,4}, Alexander G Bassuk^{5,6}, and Vinit B Mahajan^{1,7}

¹Omic Laboratory, Stanford University, Palo Alto, California, USA

Nature Methods retracted the publication by Schaefer et al., released exactly 10 months ago, which claimed to have observed numerous unexpected (off-target) mutations after a CRISPR-Cas9 experiment *in vivo*, in mice.

If true, that observation would have negatively impacted on the safety of CRISPR-Cas9 applications, particularly in biomedicine, as those aiming to develop innovative gene therapies. The most plausible explanation for the original findings were the underlying genetic differences between control and experimental mice, in principle derived from the same genetic background, but in reality selected from unrelated, and hence, genetically different, mouse colonies.

Commentaire de Luis Montoliu , réseau ARRIGE

Genome Biology

RESEARCH

Open Access



Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR

Maximilian Haeussler^{1*}, Kai Schöning², Hélène Eckert³, Alexis Eschstruth⁴, Joffrey Mianne⁵, Jean-Baptiste Renaud⁶, Sylvie Schneider-Maunoury⁴, Alena Shkumatava³, Lydia Teboul⁵, Jim Kent¹, Jean-Stephane Joly⁶ and Jean-Paul Concordet^{7*}

OUTIL CRISPOR
tefor.net/crispor

> 100 000 requêtes
(80% USA)

➤ 5000 utilisateurs

> ENVIRON 200
espèces



Home

Crispor

News

Events

Partners

Contacts

CRISPOR is a program that helps design, evaluate and clone guide sequences for the CRISPR/Cas9 system.

Wondering which score is best for you? Have a look at the [CRISPOR paper](#) (and email us any questions)

Step 1

Enter a single reference sequence, < 1000 bp, typically an exon

Clear Box - Reset to default

ctttccttggccccacctgcccgcgcgcgcccgcccttcaggcccttaaggaactcggccgcgcggaaatggccacgg
ggggggggcgctggctgcctcaaccgcgcgcgcgttatcttgagccacagtgatgatgatattgcgcgccttcctt
ggccacacacggcttccgcgcgtatgcacacggccgscctctgcgcggccacagcatgcccccggacctcttccctccatgc
ggggccgcc

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11908-12378. Positions to avoid
can be marked with N, e.g. for SNPs.

Step 2

Select a genome

Note: we have pre-calculated all human exon guides.

Human sapiens - Human - UCSC Ref. 2009 (GRCh37/hg19)
[Missing a genome?](#) Send us [email](#)

Step 3

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

NGG - Streptococcus Pyogenes

SUBMIT

Des lignes directrices à partir de profils de coupure *in vitro*

Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq

Daesik Kim,^{1,2} Sojung Kim,^{1,2} Sunghyun Kim,¹ Jeongbin Park,³ and Jin-Soo Kim^{1,2}

Genome Research

26:406–415

www.genome.org

Une méthode pour analyser 11 CRISPRs-Cas9 simultanément *in vitro*

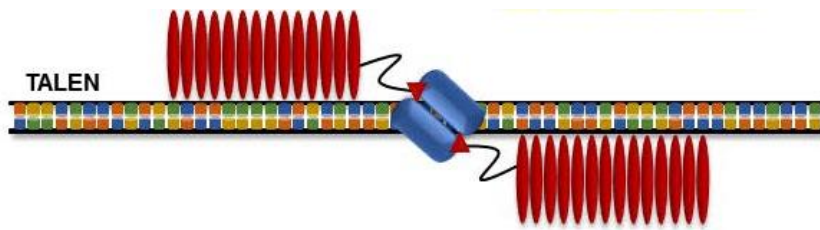
964 sites analyses

Sites “Off-target” non identifiés par d’autres méthodes. Fréquence d’indel inférieure à 0.1%

Ce travail (et d’autres par exemple Circle-Seq) permet de mieux définir les protocoles pour éviter les off-targets (par exemple une longueur de 20 nucléotides pour le guide)

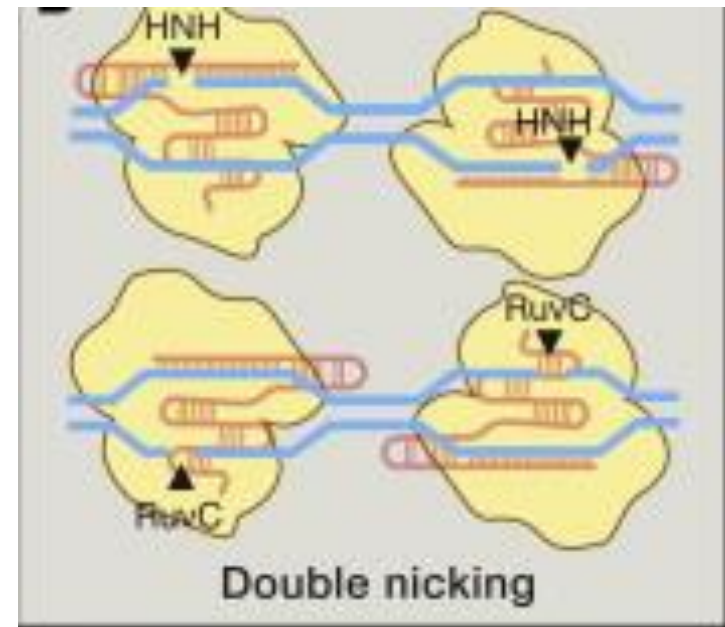
Des Cas9 de plus en plus précises

Augmenter la longueur de reconnaissance de l'ADN



Les TALENs plus précises?

Collectis



CRISPRs tête-bêche
Coupure simple brin

Des CRISPRs de plus en plus précises

De nouvelles CRISPRs par évolution dirigée

DOI: 10.1038/s41467-018-05477-x

OPEN

Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity

Jungjoon K. Lee¹, Euihwan Jeong^{2,3}, Joonsun Lee¹, Minhee Jung¹, Eunji Shin¹, Young-hoon Kim¹, Kangin Lee¹, Inyoung Jung¹, Daesik Kim³, Seokjoong Kim¹ & Jin-Soo Kim^{2,3}

Directed evolution approach in *E. coli* to obtain Sniper-Cas9, which shows high specificities without killing on-target activities in human cells. Unlike other engineered Cas9 variants, Sniper-Cas9 shows WT-level on-target activities with extended or truncated sgRNAs with further reduced off-target activities and works well in a preassembled ribonucleoprotein (RNP) format to allow DNA-free genome editing.

Ou en est-on?

Un point très important, exprimer transitoirement

Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration

Kyoungmi Kim,^{1,6} Sung Wook Park,^{2,3,6} Jin Hyoung Kim,³ Seung Hwan Lee,¹
Daesik Kim,^{1,4} Taeyoung Koo,¹ Kwang-eun Kim,^{1,4} Jeong Hun Kim,^{2,3,5}
and Jin-Soo Kim^{1,4}

27:419–426 Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISSN 1088-9051/17; www.genome.org

Genome Research
www.genome.org

In vitro et in vivo une administration de protéine donne de meilleurs résultats
La dégradation est rapide d'où un échappement à la réponse immunitaire

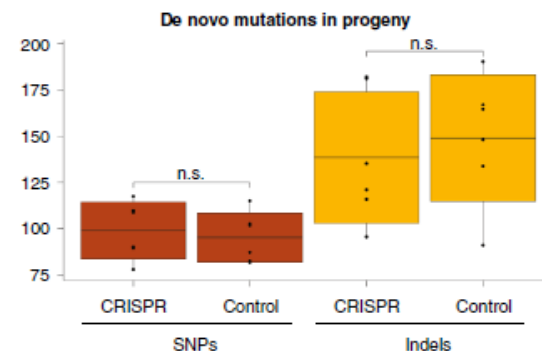
Et d'excellents résultats concernant les off-targets

42 sites identifiés en Digenome-Seq in vitro, aucun indel identifié

ET EN ANIMAL?

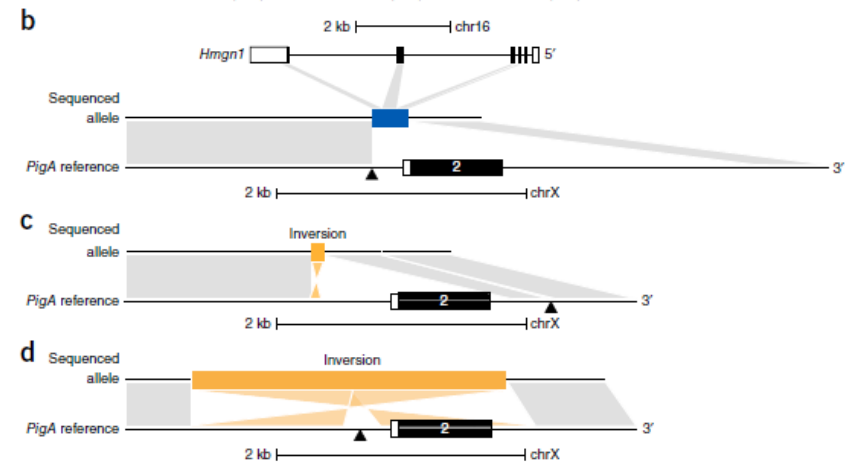
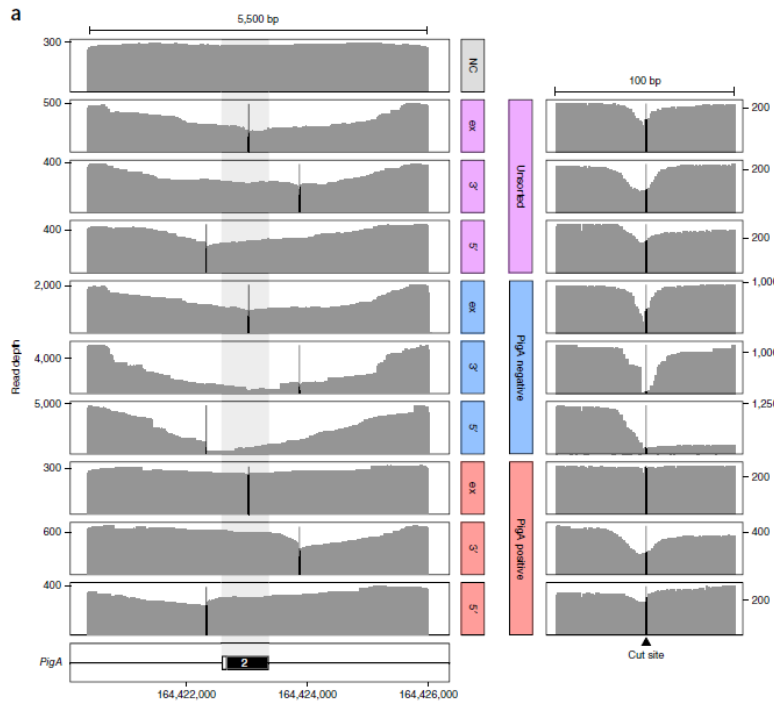
Mutation frequency is not increased in CRISPR–Cas9-edited mice

NATURE METHODS | VOL 15 | OCTOBER 2018 | 755–758 |



Les off-targets ne sont donc pas « le » problème En revanche les cassures entraînent de larges remaniements

Loci pig A hémizygote (chr y) en cellules ES



Attention aux applications ex vivo chez l'homme

Repair of double-strand breaks induced by
CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex
rearrangements

NATURE BIOTECHNOLOGY ADVANCE ONLINE PUBLICATION

Michael Kosicki, Kärt Tomberg & Allan Bradley

Les off-targets ne sont pas le problème

Un effet global: p53 jette un froid sur les applications ex vivo

- Deux études ont montré qu'une simple cassure double brin induit par CRISPR / Cas9 conduit à une toxicité cellulaire dépendante de p53, allant de l'apoptose manifeste dans les hPSC à l'arrêt du cycle cellulaire dans une lignée cellulaire épithéliale de rétine humaine immortalisée (RPE1)
- Cela peut causer un désavantage prolifératif dans les cellules dans une mesure qui empêche l'efficacité du HDR.
- Un impact considérable non seulement au sein de la communauté scientifique, mais également une sensibilisation accrue du public aux effets néfastes potentiels de l'édition du génome, notamment la dépréciation de la valeur marchande de plusieurs sociétés de biotechnologie développant l'édition de génome à des fins d'applications cliniques
- Une conclusion mal interprétée de ces travaux: pas de sélection de p53 muté (et donc risque de cancer non évident) mais plutôt une surexpression transitoire de p53
- D'autres outils d'édition moins enclins à induire cette réaction? On sait que Cas9 reste lié à l'ADN et induit une résistance à la réparation par recombinaison
- Effet sur l'animal susceptible d'être moins problématique

p53 activation: a checkpoint for precision genome editing?

Conti and Di Micco *Genome Medicine* (2018) 10:66
<https://doi.org/10.1186/s13073-018-0578-6>

Applications



Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering

Patrick D. Hsu,^{1,2,3} Eric S. Lander,¹ and Feng Zhang^{1,2,*}

1262 Cell 157, June 5, 2014



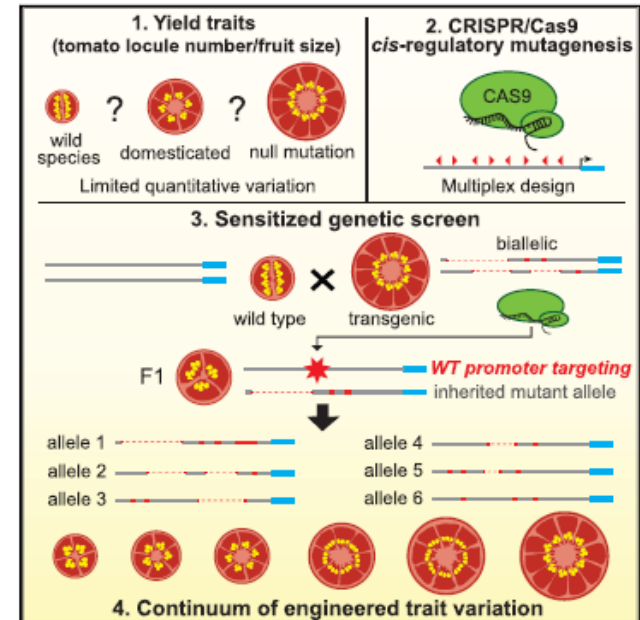
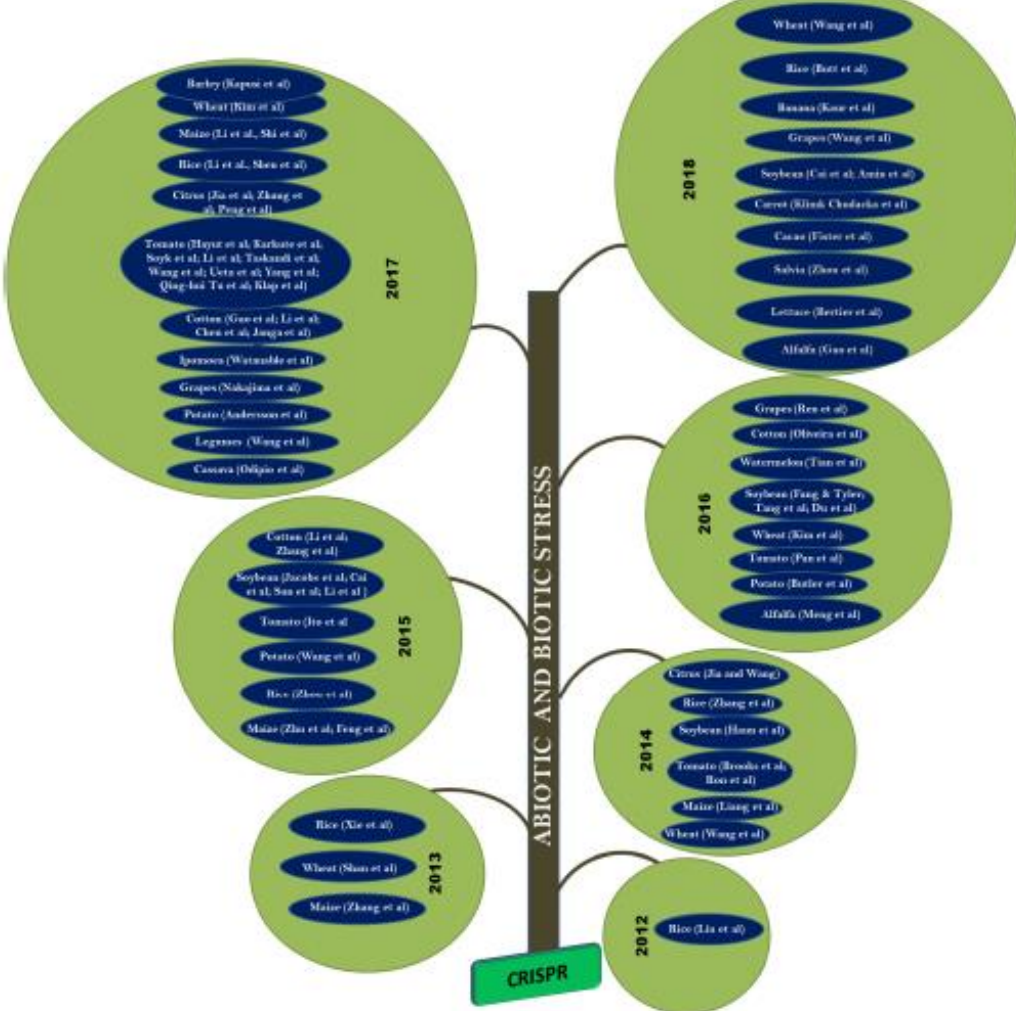
Welcome to the CRISPR zoo

Birds and bees are just the beginning for a burgeoning [technology](#).

[Sara Reardon](#)

Nature Mars 2016

Les plantes montrent la voie



Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing

Daniel Rodríguez-Leal,
Zachary H. Lemmon, Jarrett Man,
Madeline E. Bartlett, Zachary B. Lippman
Cell 171, 470–480, October 5, 2017

1: Lemmon ZH, Reem NT, Dalrymple J, Soyk S, Swartwood KE, Rodriguez-Leal D, Van Eck J, Lippman ZB.
Rapid improvement of domestication traits in an orphan crop by genome editing.
Nat Plants. 2018 Oct;4(10):766-770.

2: Zsögön A, Čermák T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weinl S, Freschi L, Voytas DF, Kudla J, Peres LEP.
De novo domestication of wild tomato using genome editing. Nat Biotechnol. 2018 Oct 1. doi: 10.1038/nbt.4272.

3: Li T, Yang X, Yu Y, Si X, Zhai X, Zhang H, Dong W, Gao C, Xu C.
Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. Nat Biotechnol. 2018 Oct 1. doi: 10.1038/nbt.4273.

L'enjeu majeur: la mutagenèse ponctuelle chez les animaux (comme chez les plantes)

Aussi bien en agronomie qu'en recherche biomédicale ou fondamentale,
des besoins convergents en mutagenèse ponctuelle

En effet, variants a priori plus acceptables que l'introduction d'ADN exogène

En agronomie, par exemple introgresser d'une à l'autre des caractères d'intérêt

En biomédical,
caractériser les variations pathogéniques génomiques humaines ,
obtenir des modèles animaux de maladies,
comprendre les mécanismes physiopathologiques.

Et aussi poursuivre l'exploration fondamentale de la vie!

Récemment la mutation des gènes Hox chez l'anémone de mer
nous renseigne sur l'origine de l'axe AP chez les bilatériens (Arendt, Science)

La très efficace recombinaison homologue par injection dans l'œuf chez les rongeurs

Application of long single-stranded DNA donors in genome editing: generation and validation of mouse mutants



Gemma F. Codner^{1†}, Joffrey Mianné^{1†}, Adam Caulder¹, Jorik Loeffler¹, Rachel Fell¹, Ruairidh King¹, Alasdair J. Allan¹, Matthew Mackenzie¹, Fran J. Pike¹, Christopher V. McCabe¹, Skevoulla Christou¹, Sam Joynson¹, Marie Hutchison¹, Michelle E. Stewart¹, Saumya Kumar², Michelle M. Simon², Lorraine Agius³, Quentin M. Anstee³, Kirill E. Volynski⁴, Dimitri M. Kullmann⁴, Sara Wells¹ and Lydia Teboul^{1*} 

MS	Donor type	Guide ID(s)	Donor ID	Embryos transferred	F ₀ biopsied (birth rate)	F ₀ with:					
						Mutation	Correct mutation	SM only	SM only and rearranged	NHEJ alleles	Random integration
1	ssODN	20	Gckrdonor_20	80	12 (15%)	0	0	0	0	0	n.d.
2	ssODN	3	Gckrdonor_2	80	21 (26%)	12	0	2	2	9	n.d.
3	ssODN	3	Gckrdonor_2	70	13 (19%)	4	0	0	0	4	n.d.
4	ssODN	3	Gckrdonor_2	135	18 (13%)	9	0	2	1	7	n.d.
5	ssODN	3	Gckrdonor_2	42	10 (23%)	3	0	0	0	3	n.d.
6	ssODN	3	Gckrdonor_3	121	8 (7%)	5	0	1	1	3	n.d.
7	ssODN	3	Gckrdonor_3	112	8 (7%)	3	0	0	0	3	n.d.
1	lssDNA	5.2, 3.1	Gckr_P446L_lss	210	22 (10%)	14	8	1	2	7	0/2

Sur neuf projets, 7 donnent l'allèle désiré,

mais trois produisent des indels, des mutations ponctuelles. Intégration aléatoire d'ADN dans quatre projets détectées en comptant les copies

La très efficace recombinaison homologue par injection dans l'œuf chez les rongeurs

Application of long single-stranded DNA donors in genome editing: generation and validation of mouse mutants



Gemma F. Codner^{1†}, Joffrey Mianné^{1†}, Adam Caulder¹, Jorik Loeffler¹, Rachel Fell¹, Ruairidh King¹, Alasdair J. Allan¹, Matthew Mackenzie¹, Fran J. Pike¹, Christopher V. McCabe¹, Skevoulla Christou¹, Sam Joynson¹, Marie Hutchison¹, Michelle E. Stewart¹, Saumya Kumar², Michelle M. Simon², Lorraine Agius³, Quentin M. Anstee³, Kirill E. Volynski⁴, Dimitri M. Kullmann⁴, Sara Wells¹ and Lydia Teboul^{1*}

MS	Donor type	Guide ID(s)	Donor ID	Embryos transferred	F ₀ biopsied (birth rate)	F ₀ with:					
						Mutation	Correct mutation	SM only	SM only and rearranged	NHEJ alleles	Random integration
1	ssODN	20	Gckrdonor_20	80	12 (15%)	0	0	0	0	0	n.d.
2	ssODN	3	Gckrdonor_2	80	21 (26%)	12	0	2	2	9	n.d.
3	ssODN	3	Gckrdonor_2	70	13 (19%)	4	0	0	0	4	n.d.
4	ssODN	3	Gckrdonor_2	135	18 (13%)	9	0	2	1	7	n.d.
5	ssODN	3	Gckrdonor_2	42	10 (23%)	3	0	0	0	3	n.d.
6	ssODN	3	Gckrdonor_3	121	8 (7%)	5	0	1	1	3	n.d.
7	ssODN	3	Gckrdonor_3	112	8 (7%)	3	0	0	0	3	n.d.
1	lssDNA	5.2, 3.1	Gckr_P446L_lss	210	22 (10%)	14	8	1	2	7	0/2

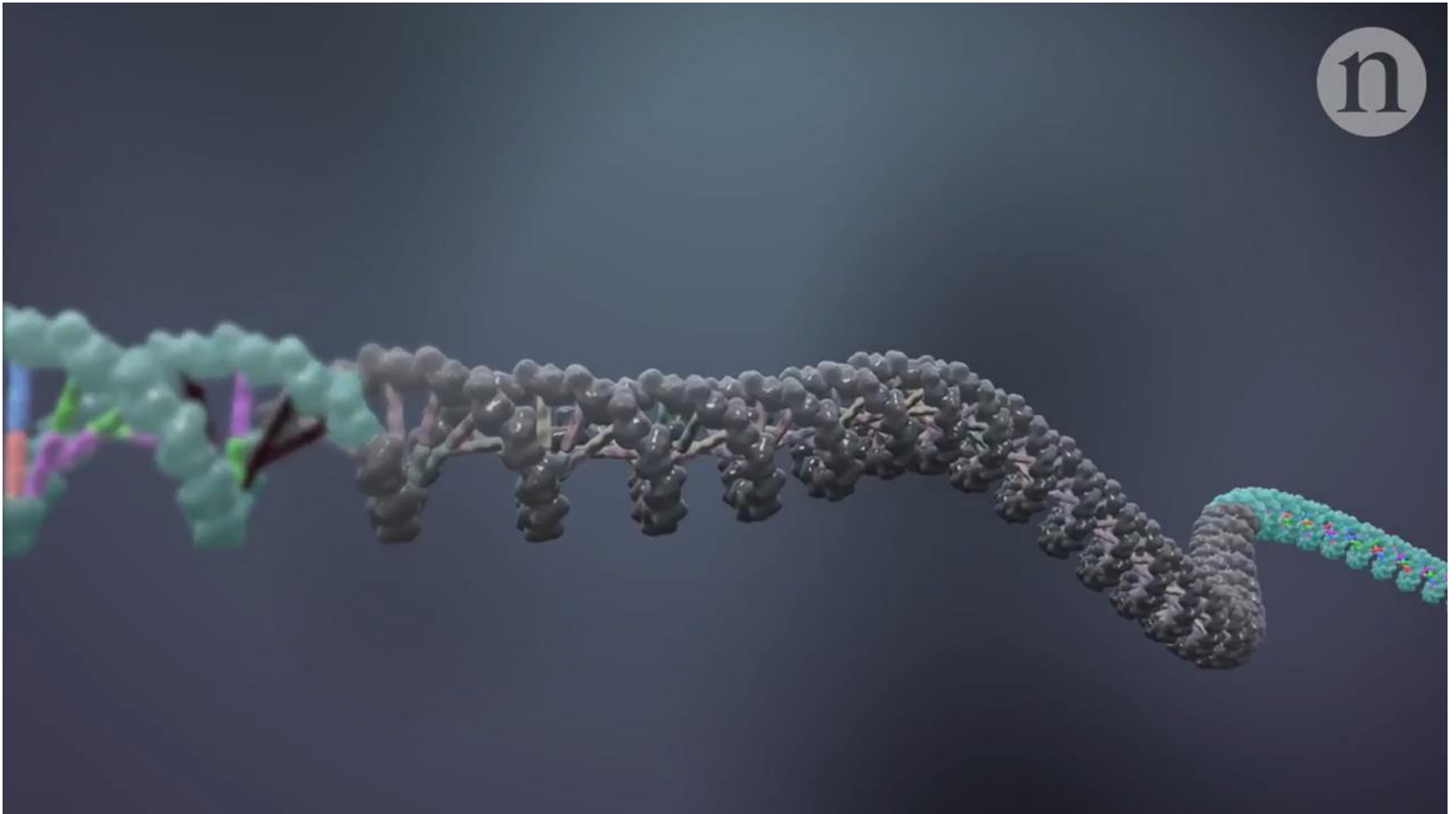
Sur neuf projets, 7 donnent l'allèle désiré,

mais trois produisent des indels, des mutations ponctuelles. Intégration aléatoire d'ADN dans quatre projets détectées en comptant les copies

La seconde révolution de l'édition des
génomés?:

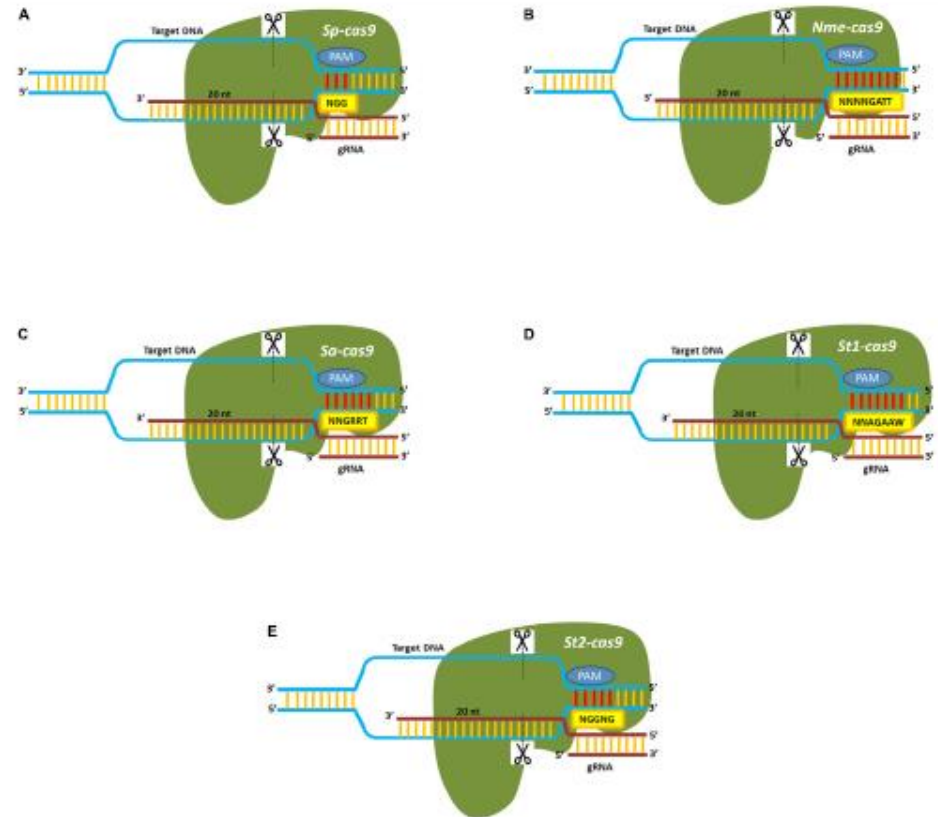
Editer des bases sans couper l'ADN
avec les déaminases

Editer les bases



Avant: le foisonnement des CRISPRs

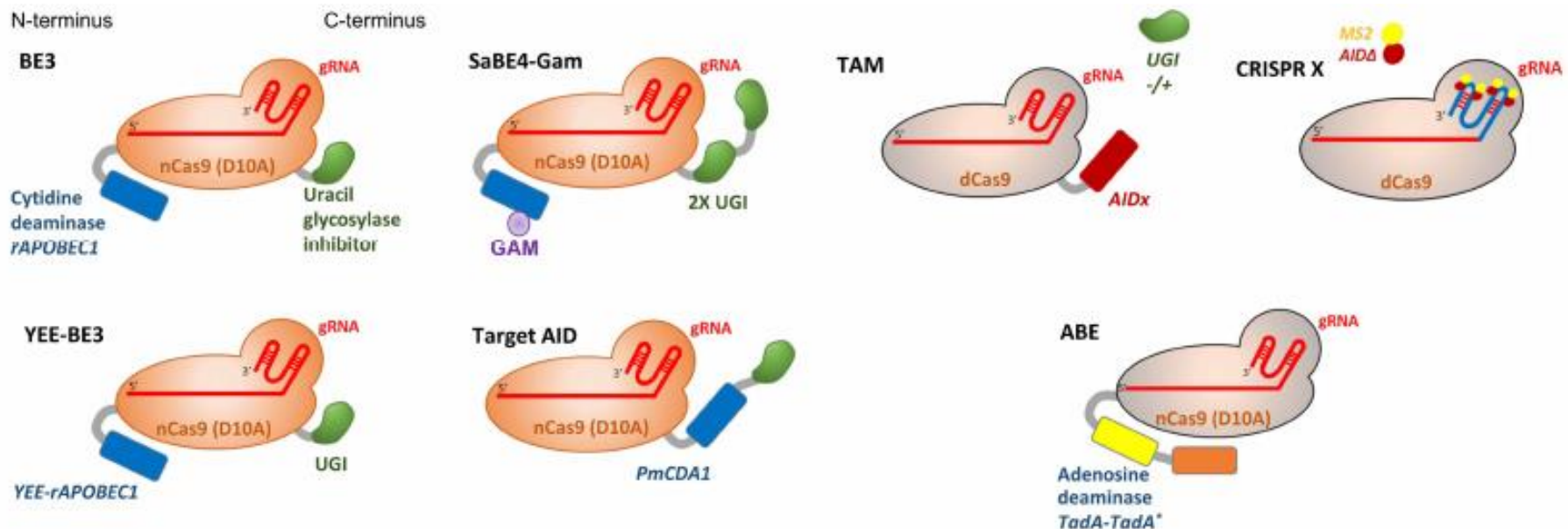
- Différentes cas9 (différents PAM)
- Mais pas seulement cpf1 (autre type de Cas) permet une utilisation à large échelle par multiplexage dans un seul guide



CRISPR for Crop Improvement: An Update Review

Deepa Jaganathan*, Karthikeyan Ramasamy, Gothandapani Sellamuthu, Shilpha Jayabalan and Gayatri Venkataraman*

Et maintenant le foisonnement des déaminases



BE3	YEE-BE3	SaBE4-Gam	Target AID	TAM	CRISPR X	ABE
N ₁₂ to N ₁₆	N ₁₃ to N ₁₅	N ₉ to N ₁₉	N ₁₅ to N ₁₉	N ₁₂ to N ₁₆	- N ₅₀ PAM + N ₅₀	N ₁₄ to N ₁₇

Biochemical Journal (2018) **475** 1955–1964
<https://doi.org/10.1042/BCJ20170793>

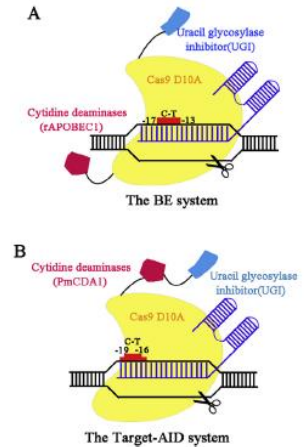
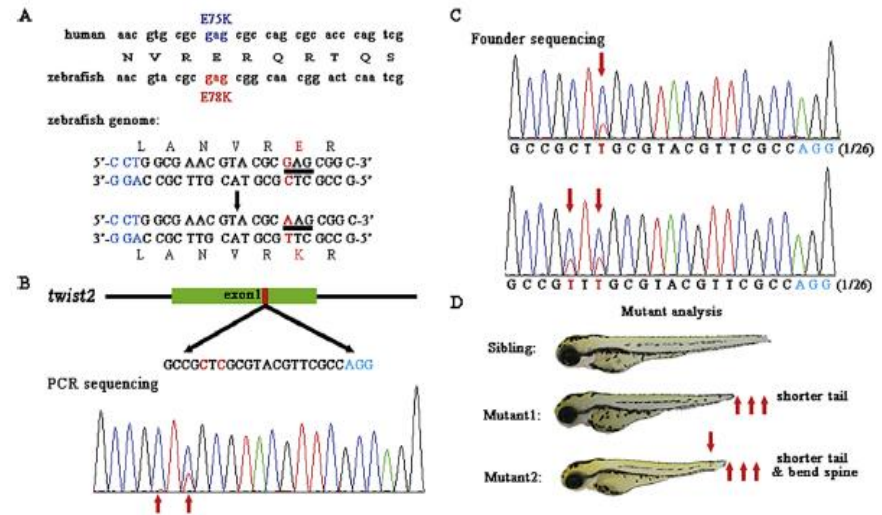


CRISPR base editors: genome editing without double-stranded breaks

Ayman Eid, Sahar Alshareef and Magdy M. Mahfouz

L'exemple du poisson zèbre

- Efficacité de la recombinaison homologue très faible (0-3%) chez cette espèce au développement très rapide et à l'injection cytoplasmique
- Efficacité de transmission à la lignée germinale de 7%
- Phénotype récessif observé dès la F0. Xénope de l'ordre de 20%. Oursin. Bombyx.

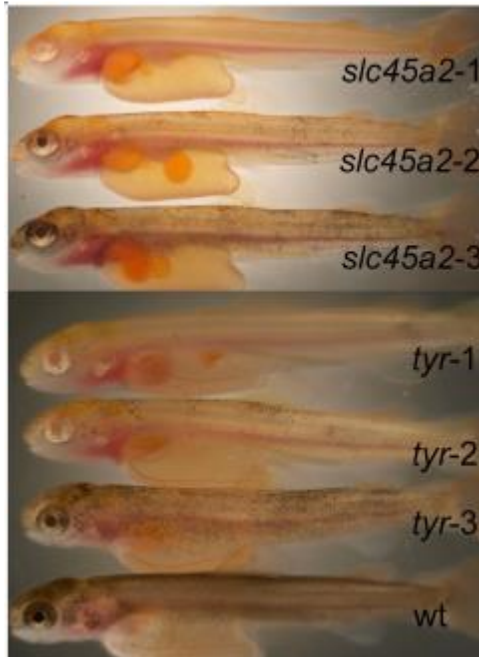


Programmable base editing in zebrafish using a modified CRISPR-Cas9 system

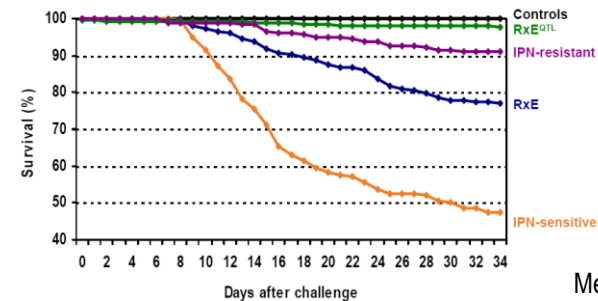
Wei Qin^{a,1}, Xiaochan Lu^{a,1}, Shuo Lin^{a,b,*}



Deux mots sur les applications chez les poissons d'aquaculture



Résistance IPN chez le saumon



Medeiros et al.2009, AJP

Myostatine mutée et double musculature



Fgfr1a et écailles chez la carpe



- Mutation homozygote en F0
➔ Gain potentiel 2 générations

Edvardsen et al 2014, PLoS ONE

Les risques d 'échappement dans l'environnement

- Hors circuits fermés (aujourd'hui pas rentables en grossissement à grande échelle car très énergivores), les échappements de poissons d'aquaculture sont inévitables
- Pas d'évaluation *a priori* des risques possibles – même si sur le saumon GH les essais en milieu naturel simulé Medeiros et al.2009, AJP montrent une baisse de fitness
- Les techniques actuelles de stérilisation (3N) ne sont pas efficaces à 100% (98-99 mais pas 100)

Edition du génome: Muter *dnd* pour faire du poisson stérile non triploïde, pour lutter contre les effets des échappements (en cours sur le saumon à l'IMR Bergen)

Seront-ils plus « acceptables » que les 3N?

Risques, débat éthique et animaux édités

- 1 Echappement dans l'environnement (animaux fluorescents, propagation involontaire d'ADN (« genedrive »))
- 2 Animaux de ferme « augmentés » comme symboles d'une agriculture trop intensive. Nourriture d'animaux édités toxique (frankenfood).
Medeiros et al.2009, AJP
- 3 Relance de l'expérimentation animale. Explosion du nombre de primates et de carnivores qui souffrent. Comment définir et traiter les ph »notypes dommageables?
- 4 Un tremplin pour les modifications de la lignée germinale chez l'homme