

LA REVOLUTION DE L'EDITION DES GENOMES CHEZ LES ANIMAUX: ATTENTES ET CRAINTES

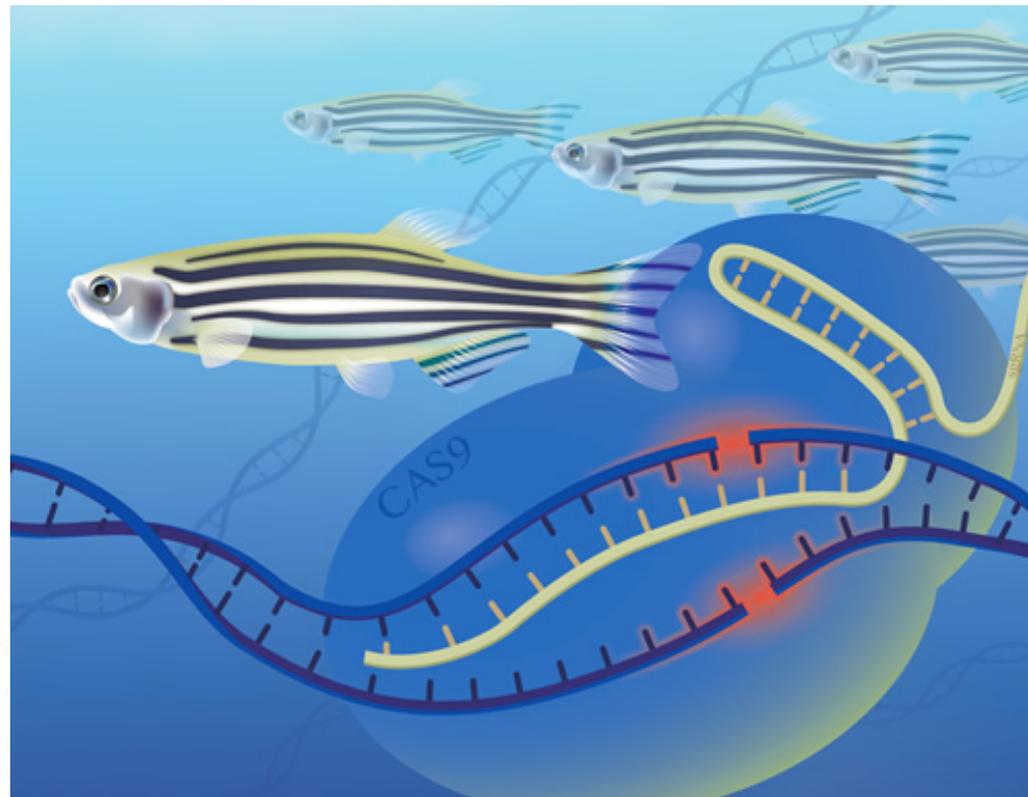


JEAN-STEPHANE JOLY



**Directeur Recherches INRA
Chef d'équipe CNRS**

Coordinateur réseau d'animation EFOR et infrastructure d'avenir TEFOR



EFOR et TEFOR

The EFOR network <http://efor.net>



Data on 70 model species
Contacts to specialists
Annual meetings

(15 scientific communities in parallel)

Contact: *Johanna Djian-Zaouche*
djian@tefor.net

The TEFOR infrastructure <http://tefor.net>



Services and ressources
for zebrafish and Drosophila
(CRISPR, 3D imaging after clarification,
Adult fish infection and live imaging)

Contact: *Johanna Djian-Zaouche*
djian@tefor.net

CONTACT JOHANNA DJIAN-ZAOUCHE

DJIAN@TEFOR.NET

┆ 2 Mai 2017 : La révolution de l' édition du génome

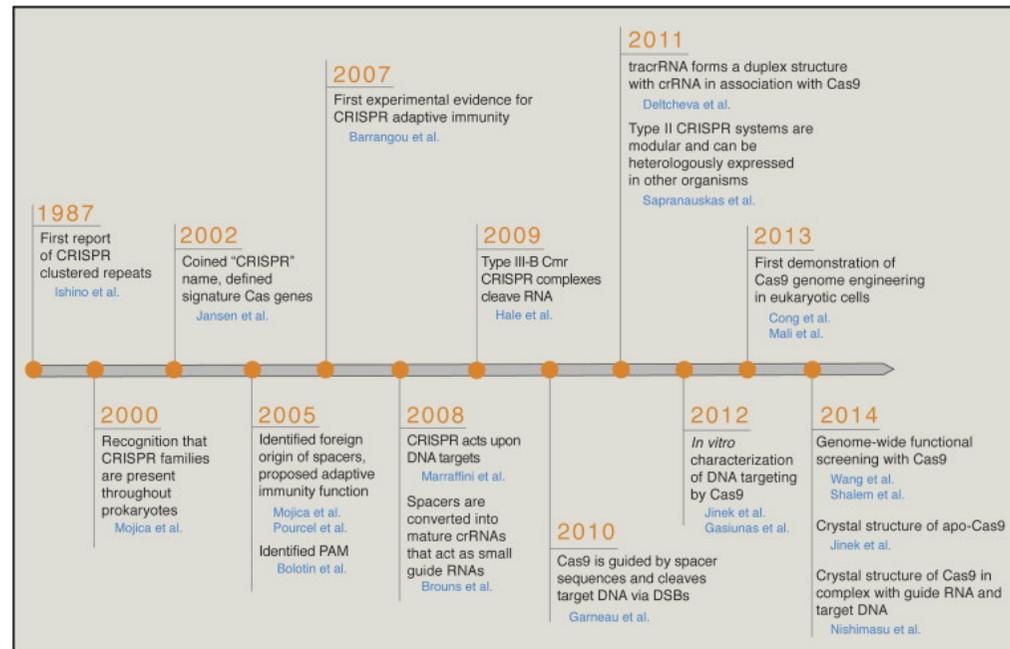
- › 4 sessions:
- Végétaux
- Mammifères
- Applications à grande échelle
- Éthique (table ronde)

┆ 3 Mai 2017 : Ateliers par espèces modèles

- › Animaux : Primates Non Humains, Xénopes, Poissons modèles, Métazoaires marins
- › Végétaux : céréales et/ou fruits charnus, algues
- › Animaux de rente ?, Autres communautés ?

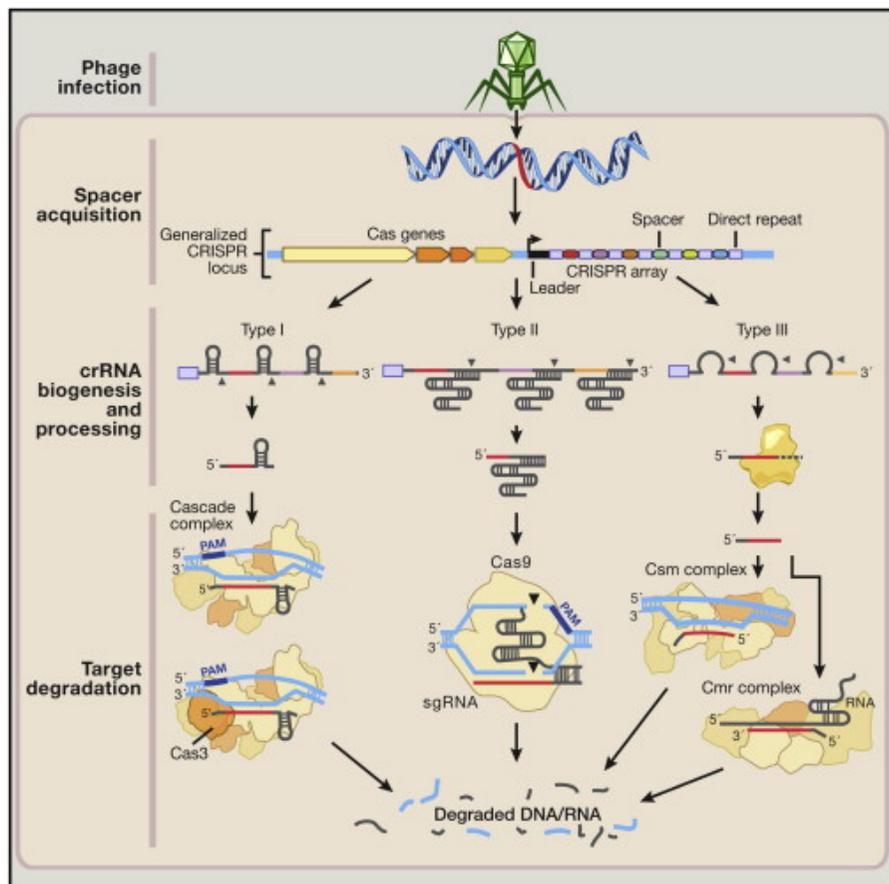
Crispr

(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)



- Premiers travaux il y a 30 ans. Nom âgé de 15 années
- Seulement quatre années de recherches applicatives intenses depuis les papiers de Charpentier et Doudna (Science 2012, in vitro) , et de Zhang (Cell, in vivo, 2013)
- Versions antérieures: Zinc-finger and talen oubliées du grand public, alors que TALENs très précises et utiles en particulier en application biomédicale.

Crispr: Un cas d'évolution Lamarckienne!!



Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering

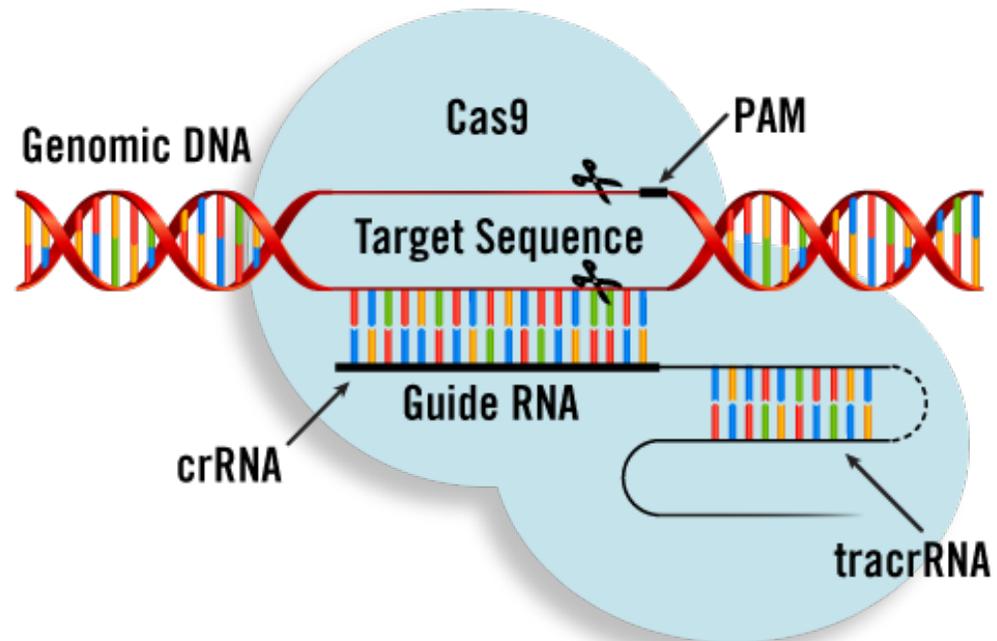
Patrick D. Hsu,^{1,2,3} Eric S. Lander,¹ and Feng Zhang^{1,2,*}

1262 Cell 157, June 5, 2014

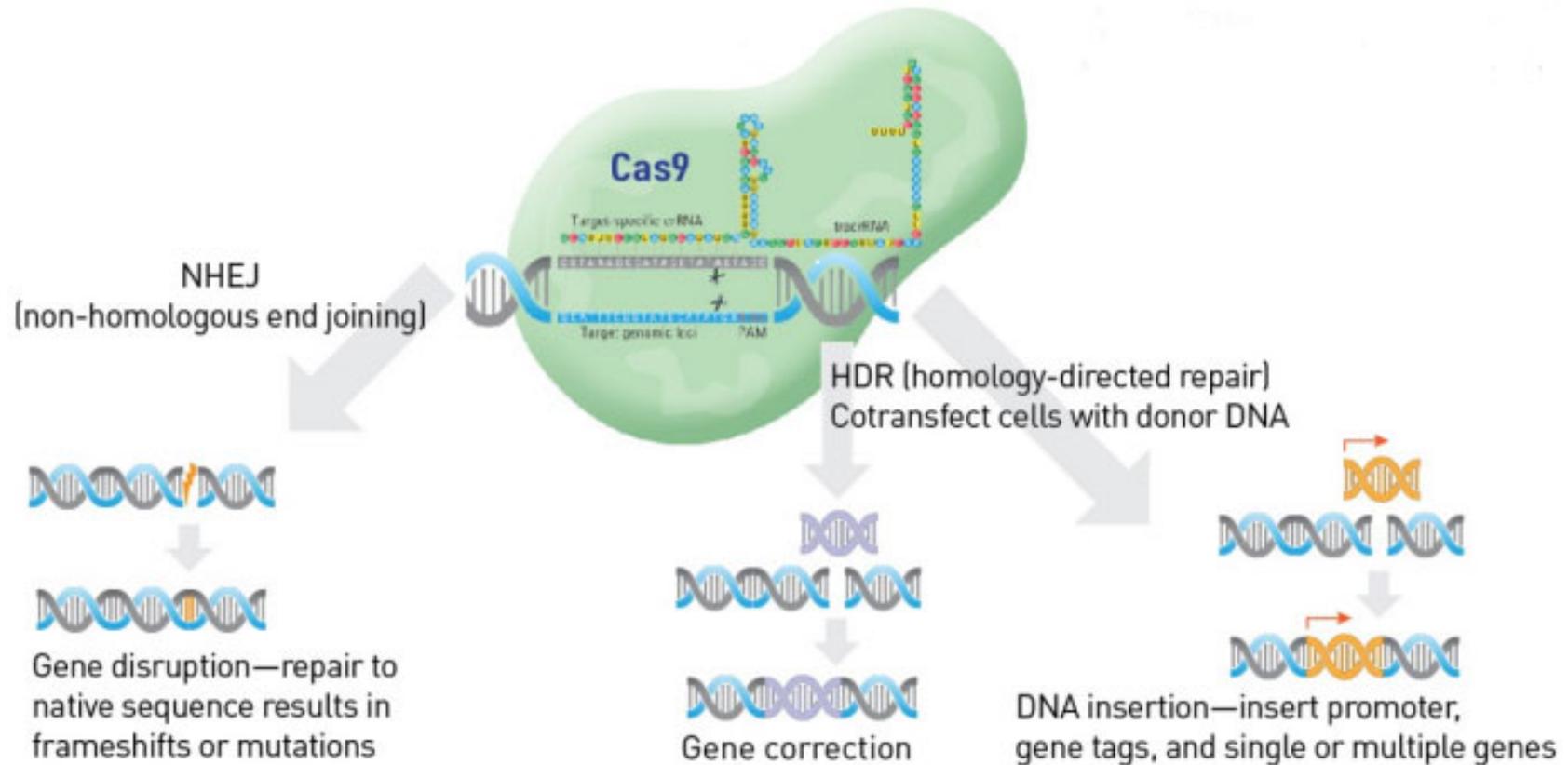
Le cas CRISPR, mutations « ready-made » et évolution lamarckienne d'un système immunitaire adaptatif

[Didier Casane et al. Medecine sciences: M/S 32\(6\):640-645](#)

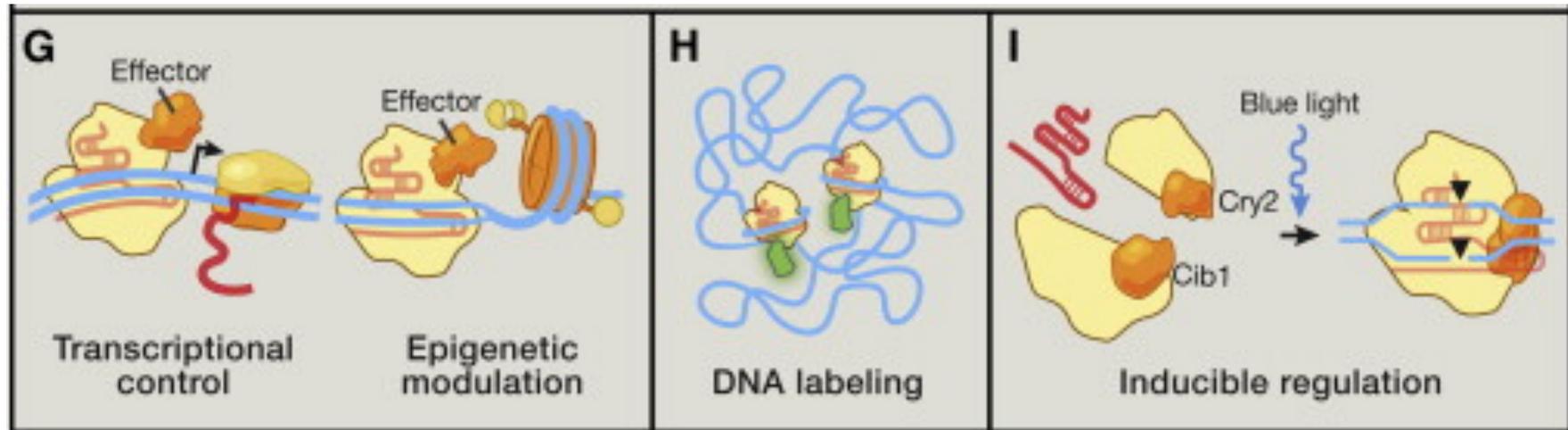
Le système Crispr-Cas9



Les trois grands types de modifications à la suite d'une coupure



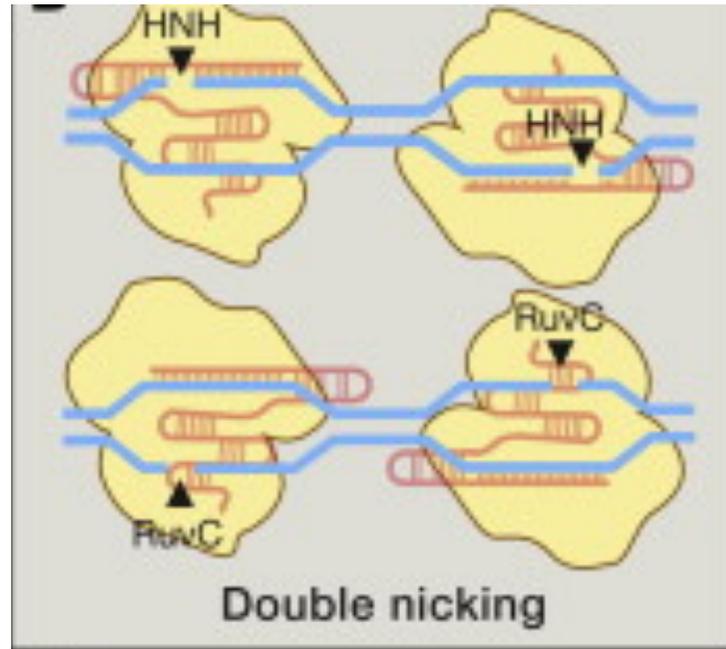
Autres applications que la coupure



- Contrôle transcriptionnel
- Modulation épigénétique
- Marquages nucléaires
- Coupure inducible par la lumière

Recherches actuelles I

Comment améliorer la spécificité?



- Comment éliminer les « Off-targets »?
- Exemple: deux nickases tête-bêches
- Espoir: CRISPR de nouvelles espèces
- En pratique: logiciels de prédiction dédiés

Haeussler et al. *Genome Biology* (2016) 17:148
DOI 10.1186/s13059-016-1012-2

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 Schönig², Hélène Eckert³, Alexis Eschstruth⁴, Joffrey Mianné⁵, Jean-Baptiste Renaud⁶, Sylvie Schneider-Maunoury⁴, Alena Shkumatava³, Lydia Teboul⁵, Jim Kent¹, Jean-Stephane Joly⁶ and Jean-Paul Concordet^{7*}

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 genomic sequence, < 1000 bp, typically an exon

[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

```
cttccttgtcccaatctgggcgcgccgccccctggcgcctaaaggactggcgcgccggaagtggccagg  
gccccggcgacctcggtcacagcgccggctattctcgagctcacatgGATGATGATATCGCCGCTCTGTC  
GTCGACAAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTTCGCGGGCGACGATGCCCCCGGGCGTCTTCCCTCCATCGT  
GGGGCGCC
```

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](#).

Homo sapiens - Human - UCSC Feb. 2009 (GRCh37/hg19) 

Missing a genome? Send us [email](#)

Step 3

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

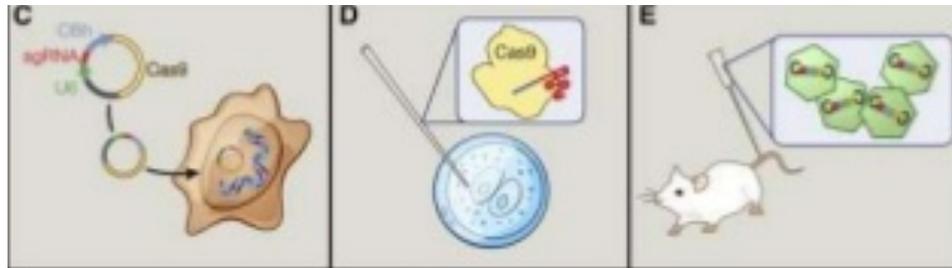
NGG - Streptococcus Pyogenes 

SUBMIT

OUTIL CRISPOR
tefor.net/crispor

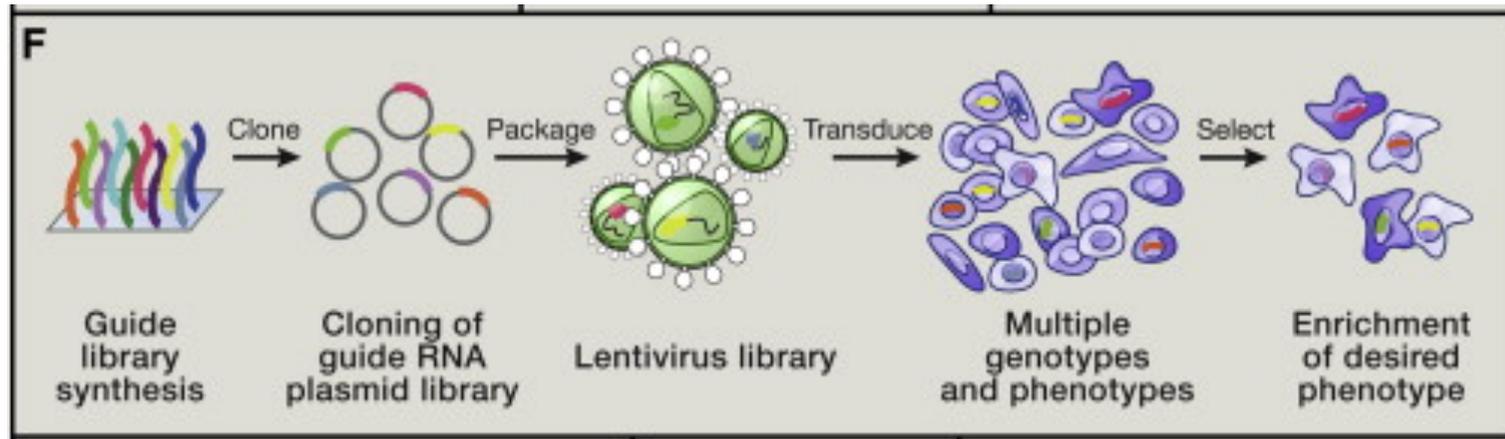
- › 50 000 requêtes
- › 1500 utilisateurs
- › 150 espèces

Recherches actuelles II: injection, vectorisation



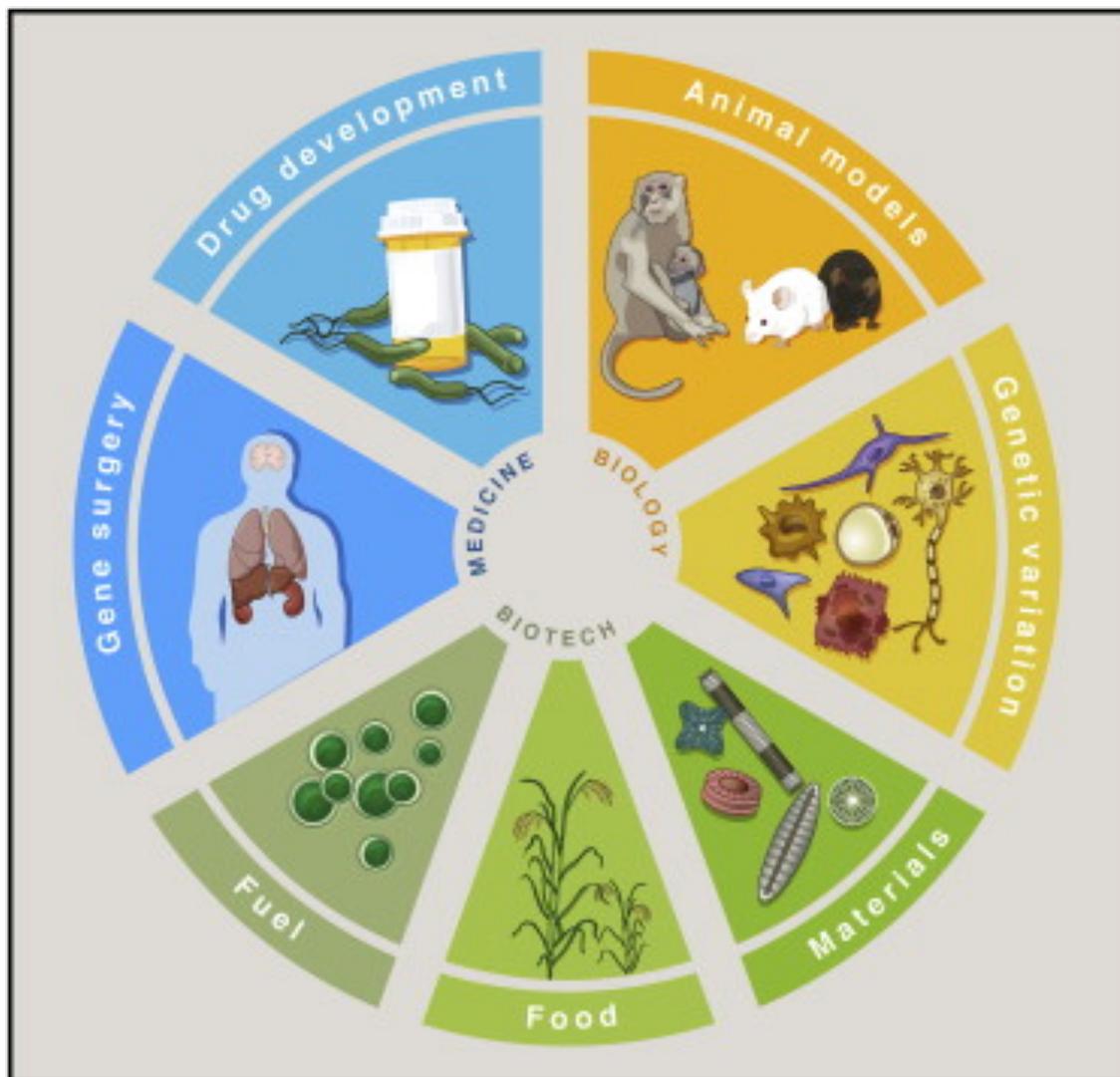
- Comment faire pénétrer le système CRISPR-Cas9 dans les différents types de cellules?
- Plasmide exprimant tous les composants du système
- Injection de protéines
- Vecteur, par exemple lentivirus

Recherche actuelles III: Utilisation à grande échelle



- Cribles « forward » en cellules à l'échelle du génome (N. Sanjana, équipe F. Zhang)
- Cribles de familles de gènes à échelle moyenne chez le poisson-zèbre (équipe C. Moens)

Des applications dans des domaines très variés



Aujourd'hui:

Focus sur les applications chez les animaux

(dont

l'homme)

Parmi les premiers animaux aux génomes « édités »: souris et poisson-zèbre

Les CRISPRs et le grand public aux USA: une avalanche médiatique

Les CRISPRs sont déjà dans la vie quotidienne des citoyens américains

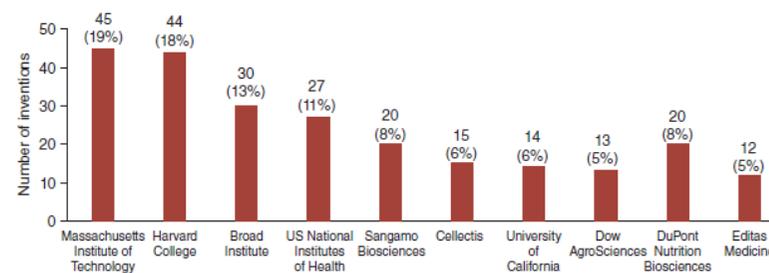
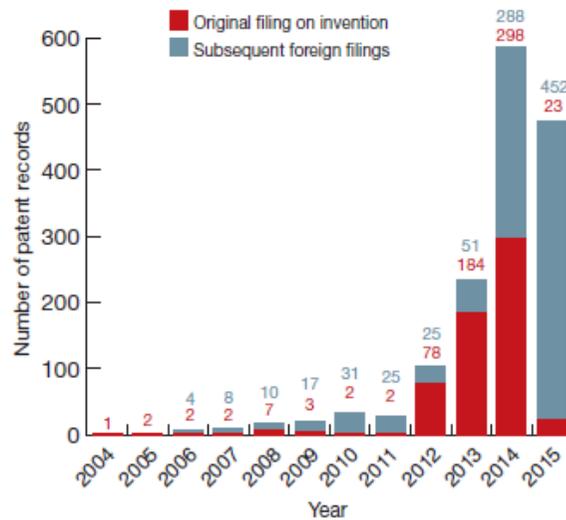


PRIX MEDIATIQUES
2015 Breakthrough Prize
Marc Zuckerberg Facebook
3 millions dollars



GRANDES SERIES AMERICAINES
Xfiles Arrow series
CRISPR est apporté par les extra-terrestres

Une lutte médiatisée pour les brevets

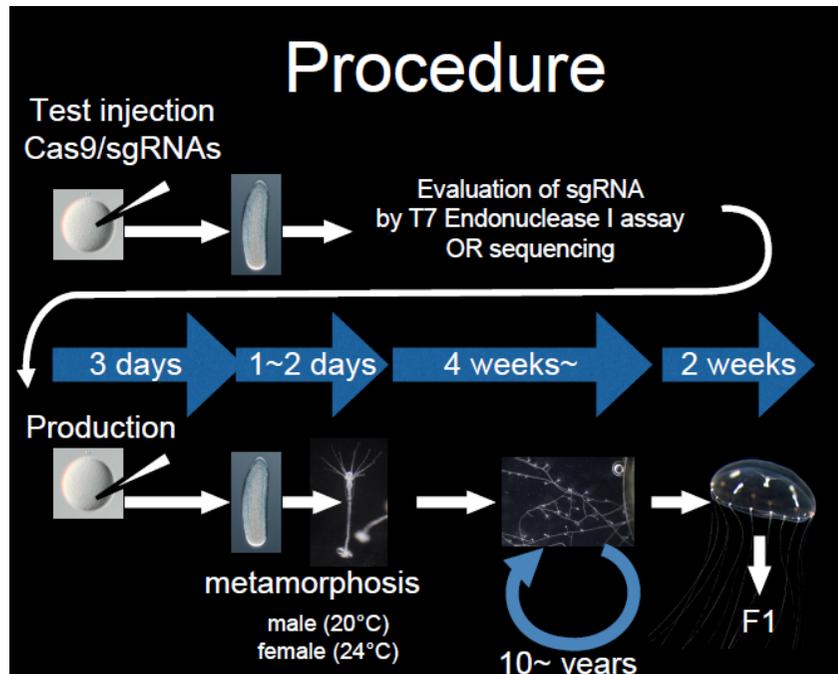


Addgene procure un accès libre aux académiques et fondations
Plus compliqué pour l'agronomie et le biomédical

The emerging patent landscape of CRISPR–Cas gene editing technology

Knut J Egelie, Gregory D Graff, Sabina P Strand & Berit Johansen

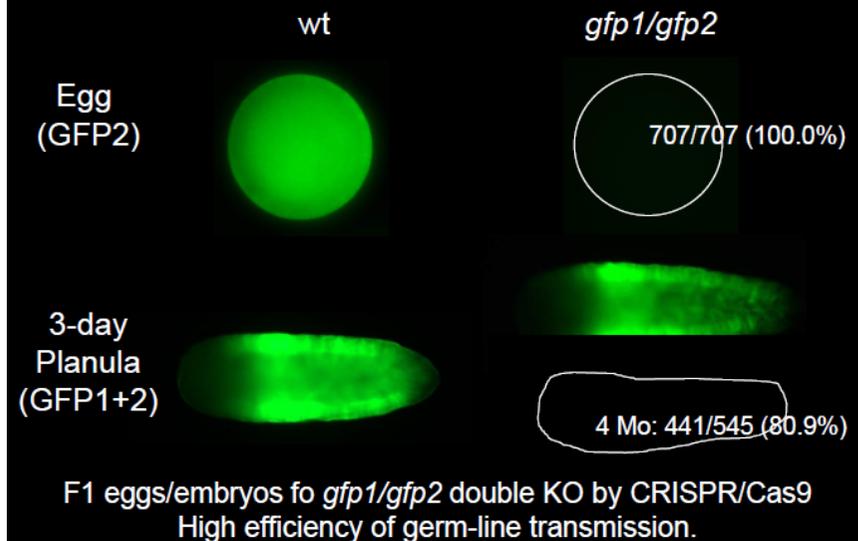
Une révolution pour la recherche fondamentale, par exemple l'évo-dévo. L'exemple de la méduse



Clytia hemisphaerica, an emerging lab model

From *Chronique du plancton*, Noé and Christian Sardet

When CRISPR-Cas9 nucleases clean natural GFP!!



Parameters for gene KO in *Clytia hemisphaerica*

- Inject NLS-Cas9 protein/sgRNA mix into unfertilized eggs.
- Fertilization has to be within 1 hour after ovulation (~800 eggs/hour)
- Expect virtually 100% mutations as observed at 3 days

Courtesy of T. Momose, Villefranche-sur-Mer

L'exploration fonctionnelle des génomes commence maintenant!

Autre application révolutionnaire, le « gene drive » chez les moustiques

- Gene drive: théorisé dès les années 70, une méthode qui promeut la propagation d'un gène dans une population. Casette auto-propagatrice, nombre d'insertions qui double à chaque génération.
- Pour éliminer ou contrôler des vecteurs de maladie (comme le moustique) qui transmettent le paludisme, la [dengue](#), ou le [zika](#))
- Pour créer ou éliminer des résistances
- Forçage des lois de l'hérédité

[
-



Animaux édités: quelles craintes?

- 1 Echappement dans l'environnement
- 2 Animaux de ferme « augmentés » comme symboles d'une agriculture trop intensive. Nourriture d'animaux édités toxique (frankenfood).
- 3 Relance de l'expérimentation animale. Explosion du nombre de primates et de carnivores
- 4 Tremplin pour les modifications de l'homme

Ethical Issues in Genome Editing using Crispr/Cas9 System

Rodriguez E₋*

*Interdisciplinary Center for Studies on Bioethics, University of Chile, Chile
Journal of Clinical Research & Bioethics*

Echappement ou colonisation de l'environnement

- Craintes:
- Echappement par exemple d'animaux aquatiques fluorescents ou poissons de pisciculture
- Transmission de résistance d'espèce à espèce (maladie de Lyme, souris sur Nantucket et Martin's Vineyard)
- Elimination d'une espèce, conséquences sur la chaîne écologique

[
-

Les aliments d'animaux « édités » dans les assiettes sans autorisation OGM?

Champignons: KO de six gènes codant pour la polyphénol oxidase

Current Biology 26, R903–R912, October 24, 2016



« Whether consumers, especially in Europe, will be equally understanding remains an open question, especially considering the fierce opposition against 20th-century style GMOs? »

Explanations and debates are needed



Les animaux de ferme édités peuvent-ils être «verts»?



- “New products will be more natural than many things they bought before, and can in some cases even support more sustainable farming and reduce cruelty to animals. »

Current Biology 26, R903–R912, October 24, 2016

Les animaux « augmentés »

Peuvent-ils:

- Aller dans nos assiettes? Mutants culard, myostatine
- Limiter la souffrance animale? Bétail sans corne.
- Etre bons pour l'environnement?
- Soutenir une agriculture de précision? Solution durable dans les pays à forte densité

Des organismes modèles primates de plus en plus pertinents

15 June 2016

New Scientist

First monkey genetically engineered to have Parkinson's created



- Singes Marmosset atteints de maladie de Parkinson. Développent la maladie à trois ans. Perdent le sommeil un an avant.
- Recherche limitée en Europe et US
- Crainte des anti-vivisectionnistes: explosion du nombre de primates de laboratoire. En Chine, 4 entreprises , 250 000 marmossets
- Crainte additionnelle: la recherche sur la lignée germinale des primates favorise l'utilisation chez l'homme

De nouvelles thérapies chez l'homme

- CART: cellules T modifiées pour lutter contre le cancer
- Craintes:
- 1 effets immédiats dus à la « vectorisation » en cellules T. Arrêt des essais par une entreprise américaine.
- 2 effets collatéraux (off-targets, etc...)
- 3 Dérive des thérapies sur les embryons ou les produits dérivés d'embryon (cordon ombilical)



CRISPR chez l'homme (lignée germinale), un débat intense: ceux qui ont peur ou doutent



- Lanphier, et al. Nature (Mars 2015) 519,410

“Don’t edit the human germline” .

Embryons humains ne doivent pas être produits.

- **ISSCR appelant à un moratoire** sur les applications cliniques impliquant les modifications de la lignée germinale.

- *Baltimore et al. (Avril 2015) Science 348,6230*

“A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification”

argumentent pour un débat mais pas de moratoire

Commentaire de Pollack “Rational eugenics is still eugenics ».



CRISPR chez l'homme (lignée germinale), Un débat intense: les « pour »



ABCD Plan: Human Germline Modification
In vitro research is permitted ✓
A. Approval and oversight by SCRO required
B. Bioethics training in advance
C. Clarity and transparency: open access pubs
D. Don't extend to *in vivo* applications ✗

- *Georges Church, généticien de Harvard*, argumente pour la méthode ABCD. Se dit transhumaniste avec tout de même un jeu de mot

A Accord (comité existant vu l'urgence, SCRO)

B Formation bioéthique

C Clarté (publication ouverte)

D don't extent. Ne pas faire d'applications *in vivo* pour l'instant. Moratoire

Merci!

- JS JOLY joly@inaf.cnrs-gif.fr

Sciences

SCIENCES

Vidéos

Archéologie

Astronomie

Biologie

Cerveau

Géophysique

Mathématiques

ON
NÉS

Edition du génome : il est urgent de débattre

› Article Le Monde
du 30 mai 2016



› Article Le Figaro
du 5 juillet 2016

› France Inter « Tête au carré » 30 Novembre et 12 Décembre.
Poisson-zèbre.