

**VWR Tour 2019**  
**Nantes**



**Pr Christian Siatka**

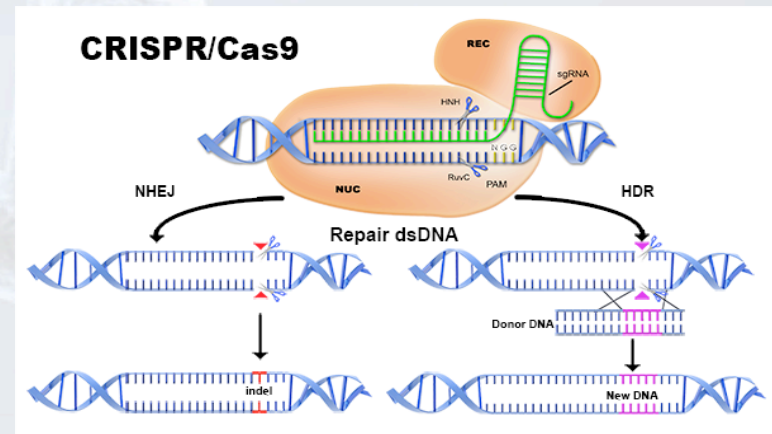
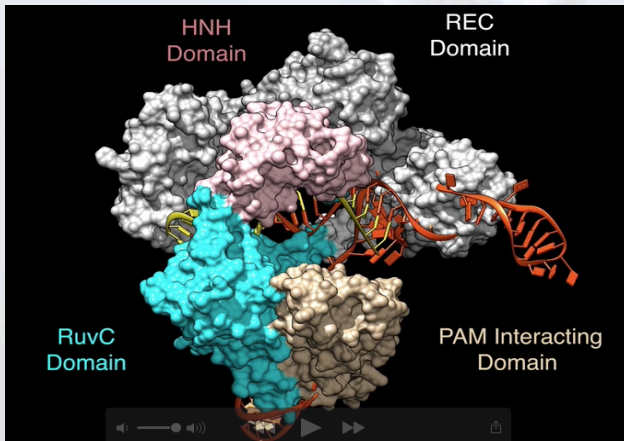
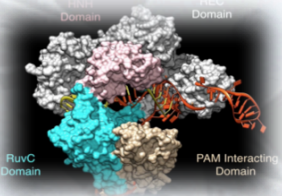
**Directeur Général de L'École de l'ADN**

**[siatka@ecole-adn.fr](mailto:siatka@ecole-adn.fr)**

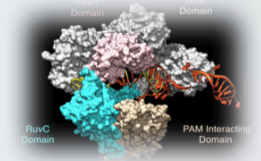
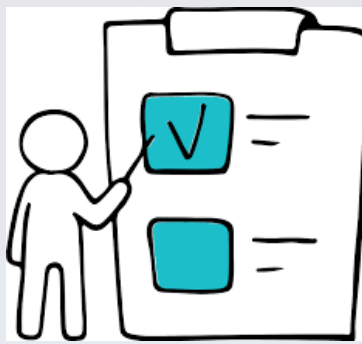


# STRATÉGIES DE SCREENING GÉNOMIQUE

## POST GÉNOME EDITING







- Stratégies de génome editing
- Screening dans vos expériences
  - Stratégies
  - Les solutions proposées



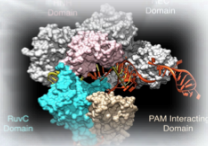
## « genome editing »

GEEN, pour « *genome editing with engineered nucleases* »

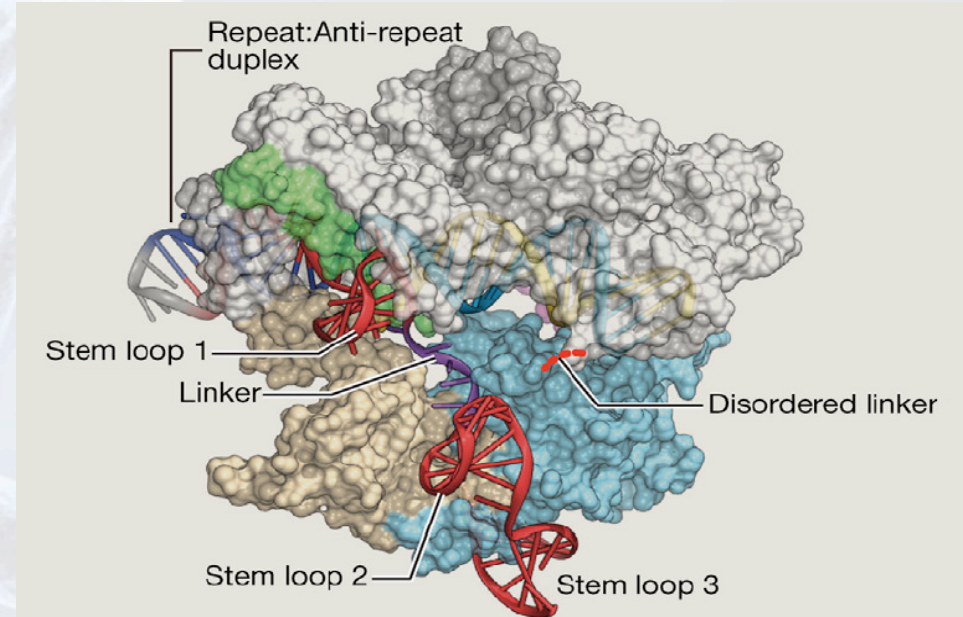
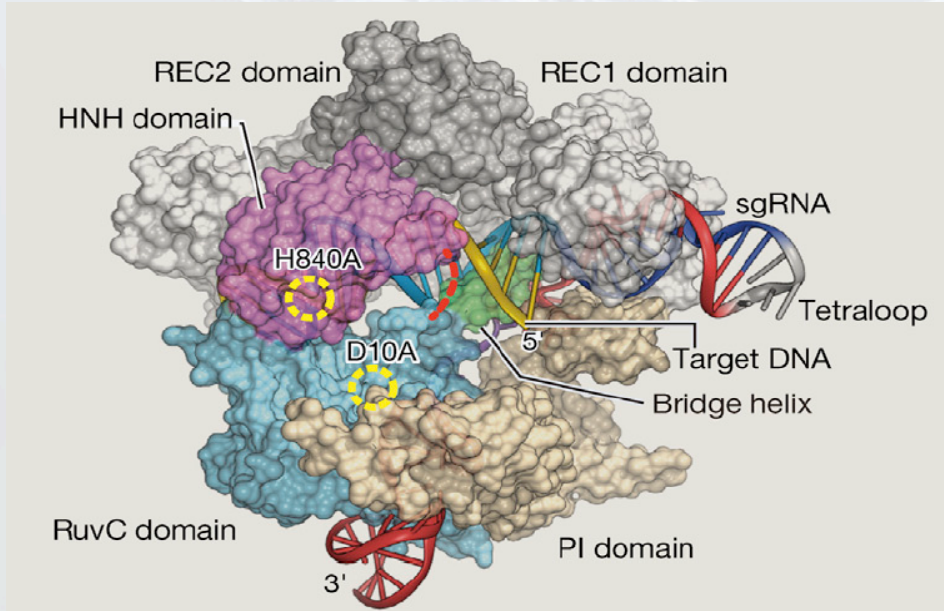
- ensemble de techniques de manipulations du génome
- « *réécriture du matériel génétique* », appliquée à tous les êtres vivants





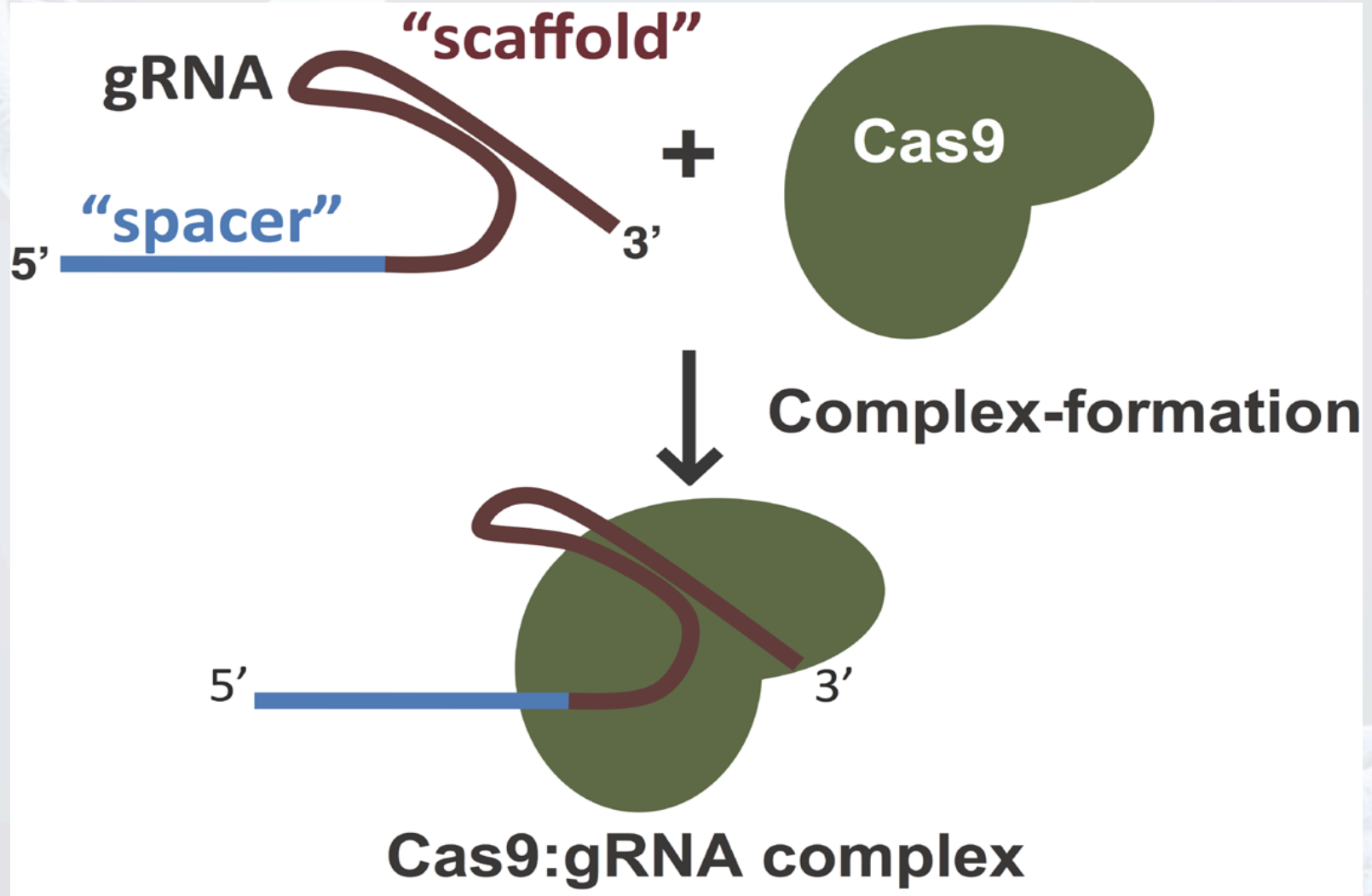
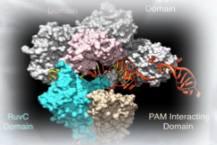


# CRISPR/Cas9



Patrick D. Hsu Cell [Volume 157, Issue 6](#), p1262–1278, 5 June 2014

# Simple et complexe !!!

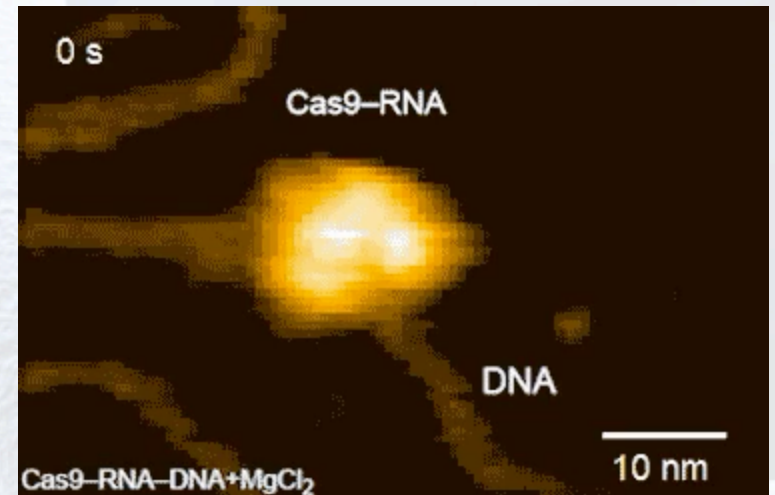
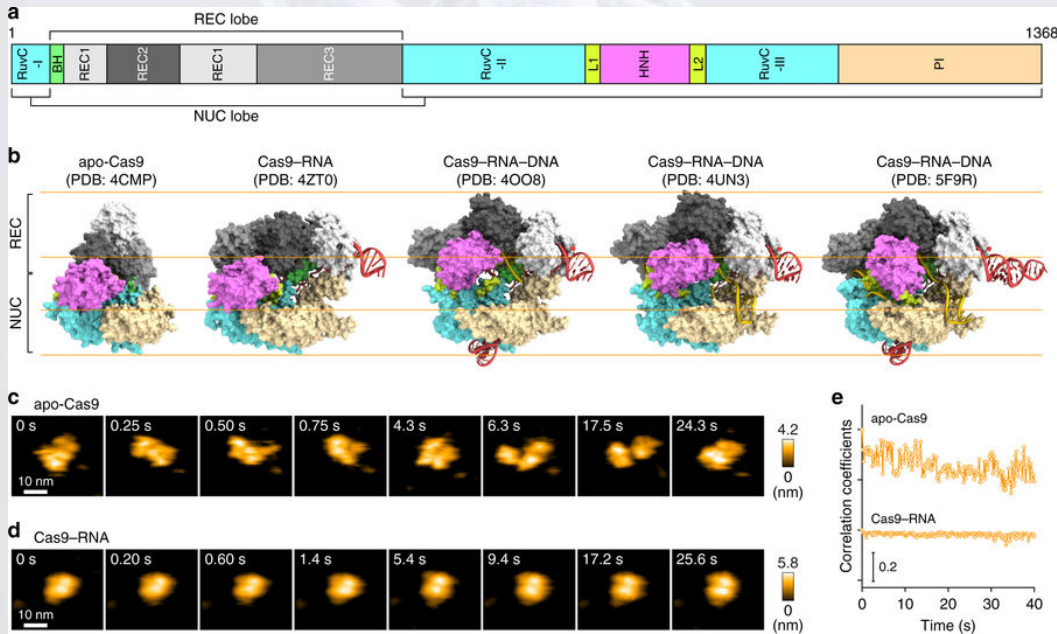




# Le clivage de l'ADN par CRISPR/Cas9

## Le clivage observé en Microscopie en Force Atomique

Mikihiro Shibata et Al. *Nature Communications* 8, Article number: 1430 (2017) doi:10.1038/s41467-017-01466-8



# Les avantages de CRISPR/Cas9

- Programmable
- Spécifique
- Précis
- Rapide
- Efficace

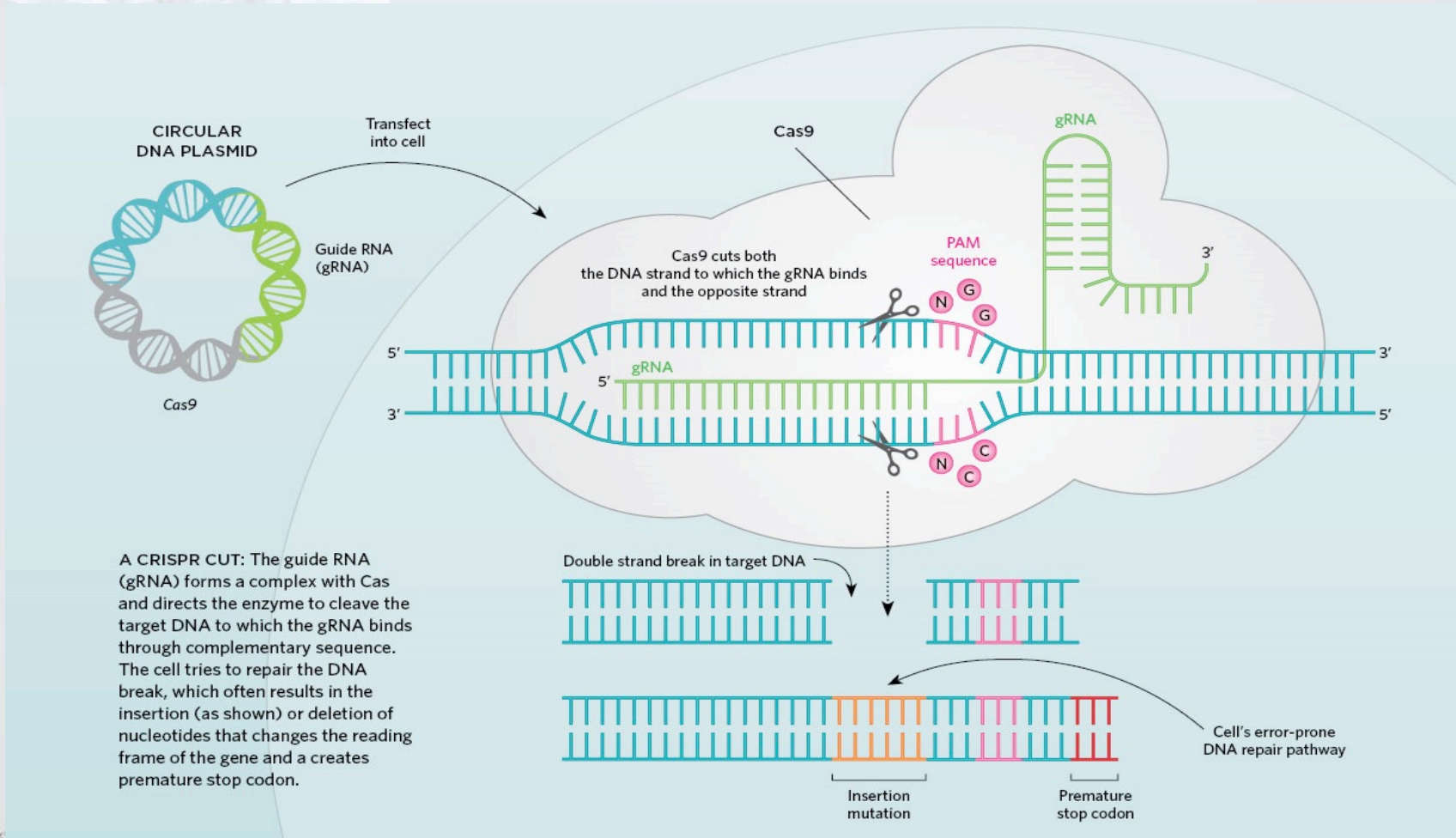
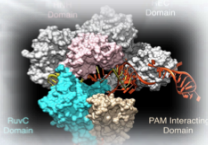
**Everything**  
should be  
made as  
**simple**  
as possible  
but no simpler  
*Albert Einstein*

**Bref : « simple »**





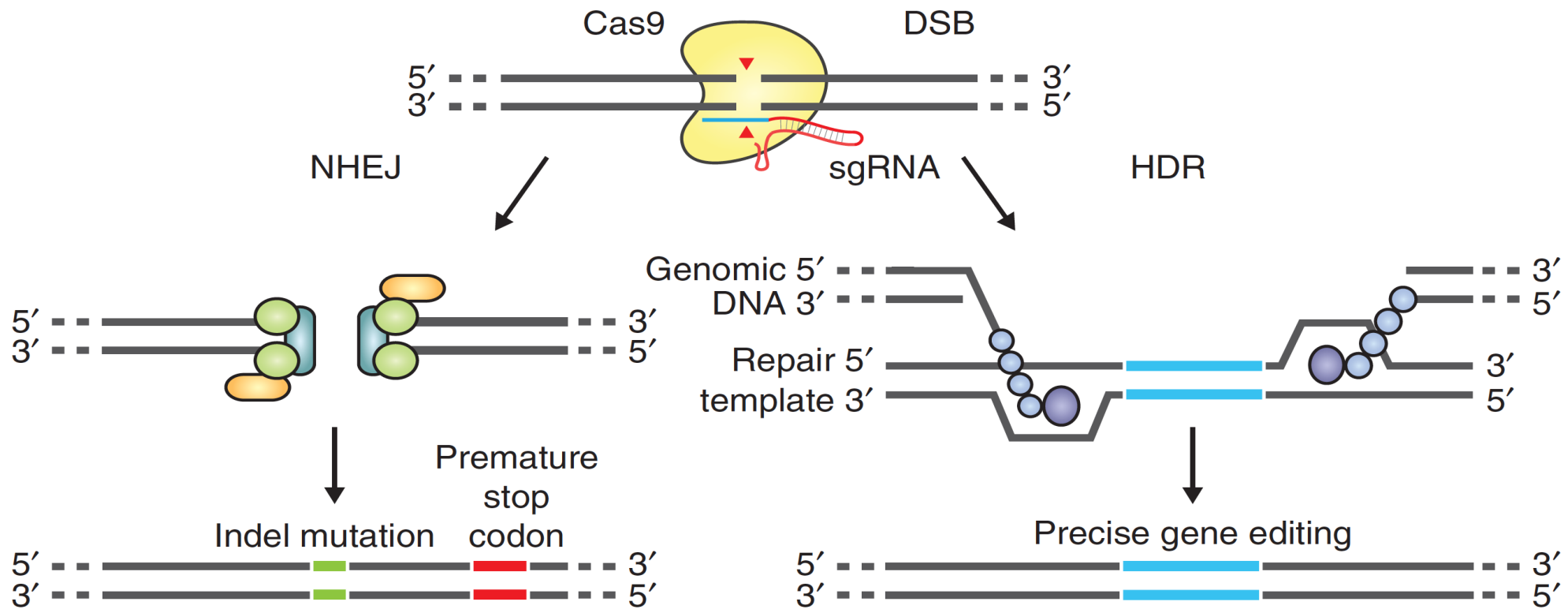
# Simple et complexe !!!



# CRISPR

## dans vos expériences

Il faut gérer la « coupure »  
Et donc sa réparation !







# Les problèmes rencontrés



## Le problème de spécificité « Hors cible »    Off target « problème relatif »

L'édition du génome par CRISPR / cas9 peut entraîner des changements indésirables dans les sites non-cibles, par mismatch du guide

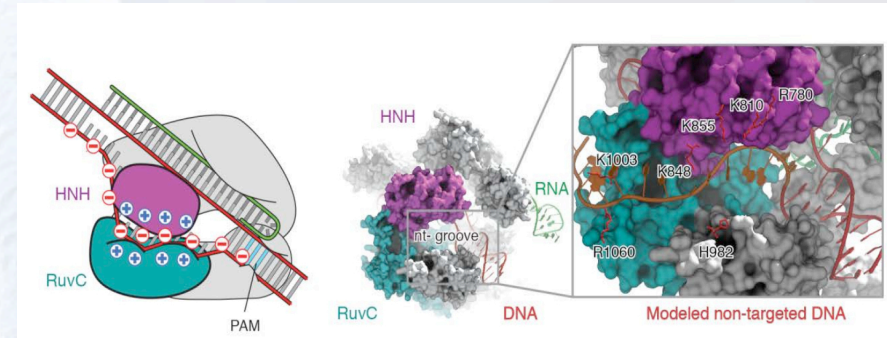
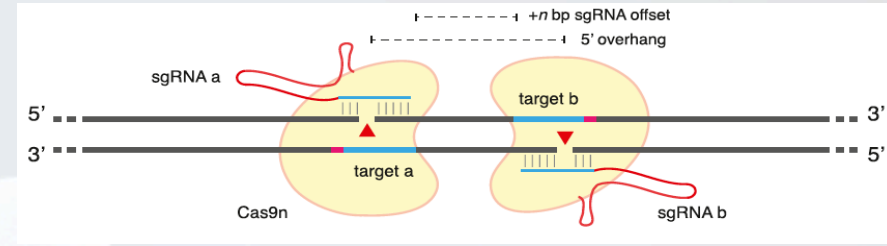


# « Ingénierie de pointe ! »

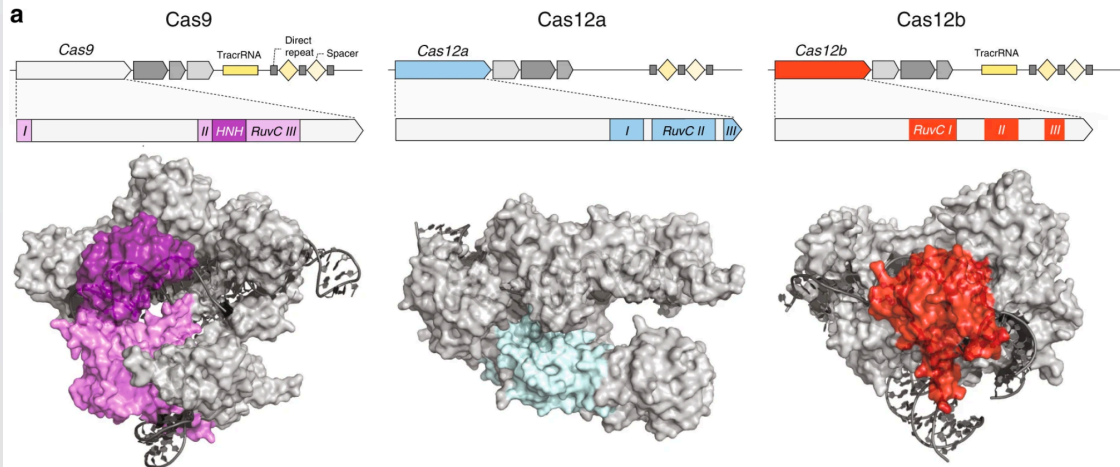


## Le problème « Hors cible » : quelques solutions

- Cas9-nickase (Cas9n) (D10A ou H840A)
- SpCas9-HF1 (Hifi) (N497A, R661A, Q695A, Q926A)
- Cas12 ou Cpf1

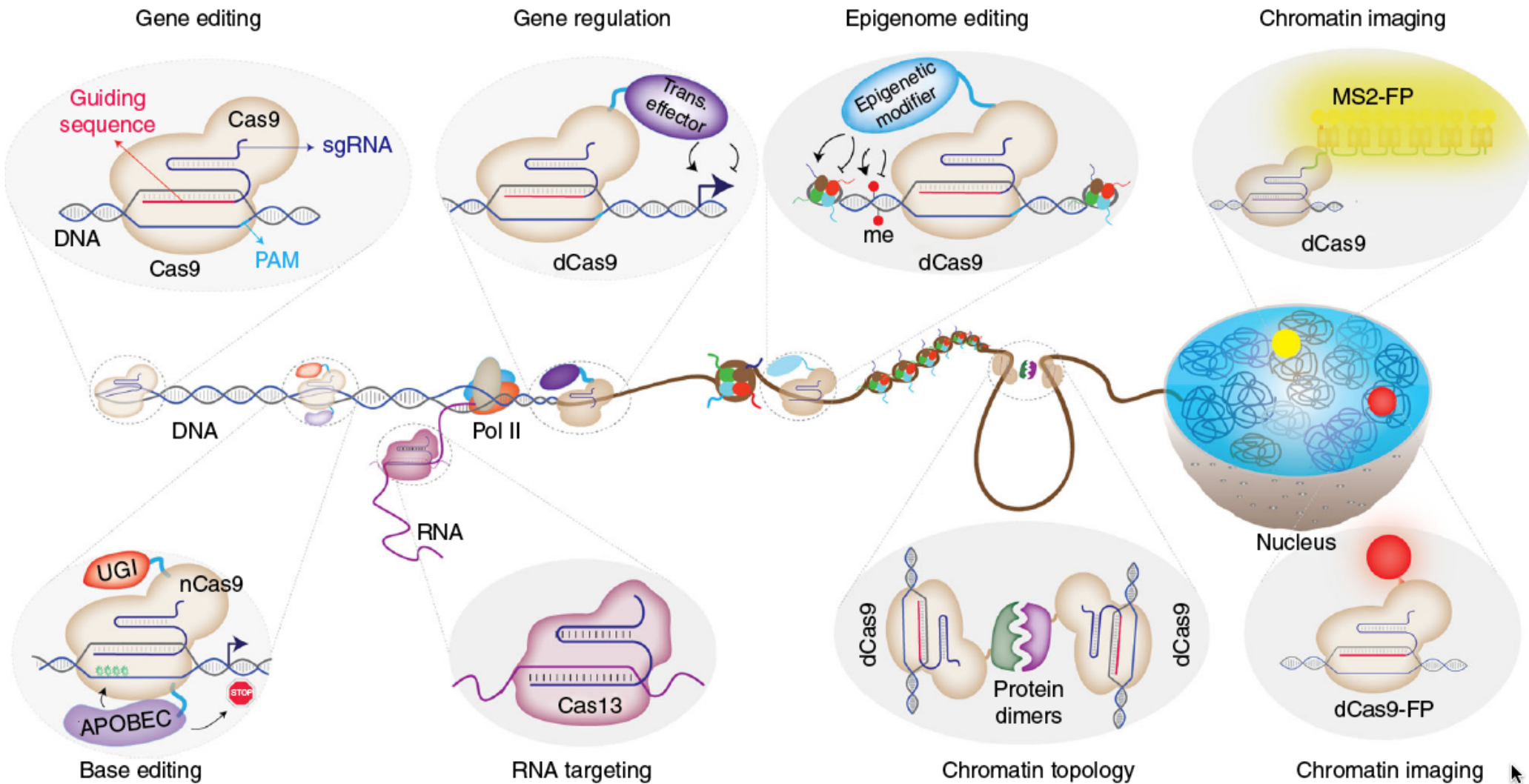


From: Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing





# Un aperçu des stratégies potentielles de CRISPR/Cas



# CRISPR dans vos expériences



**Ce n'est que le début du travail !!!**



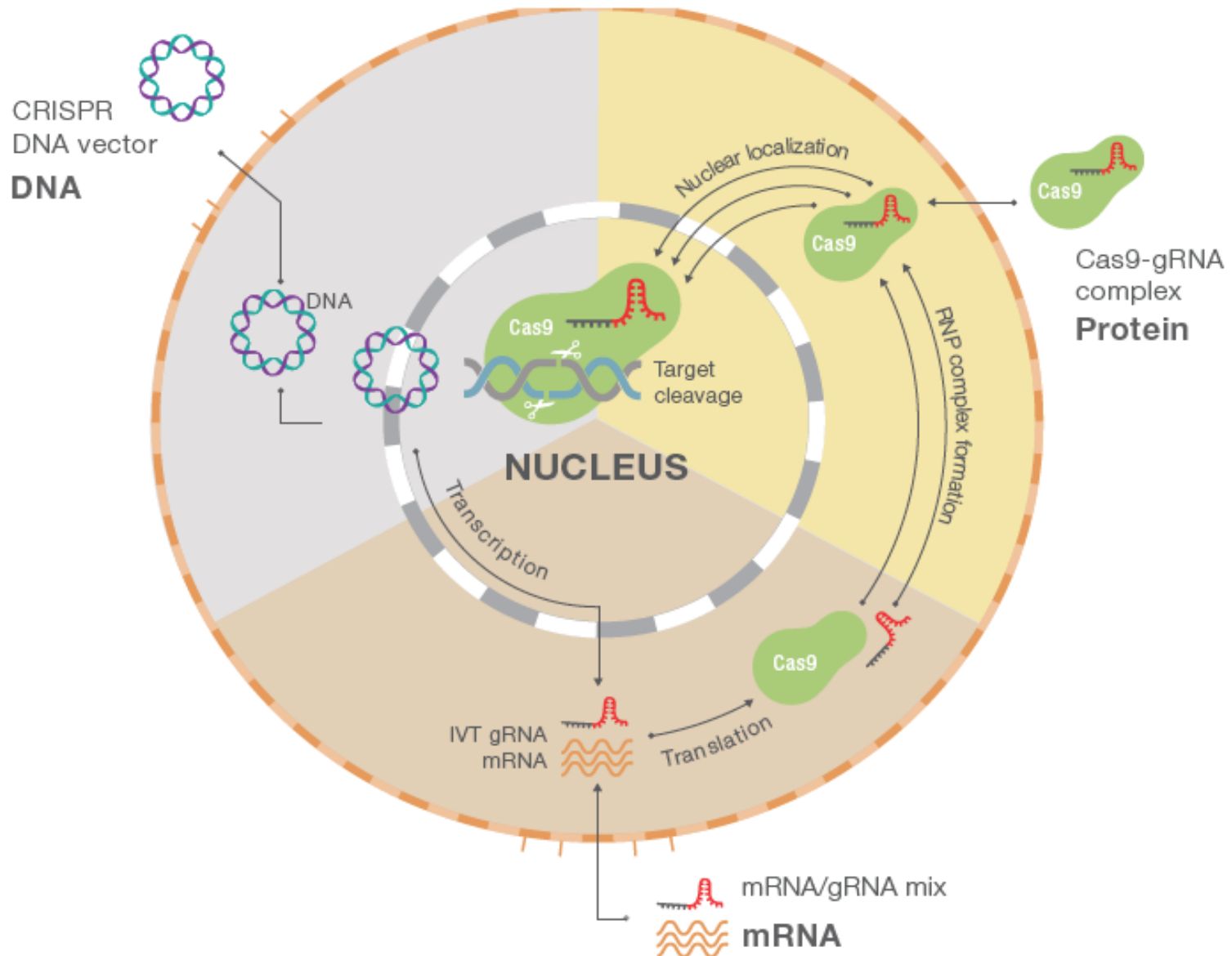


# Stratégies générales



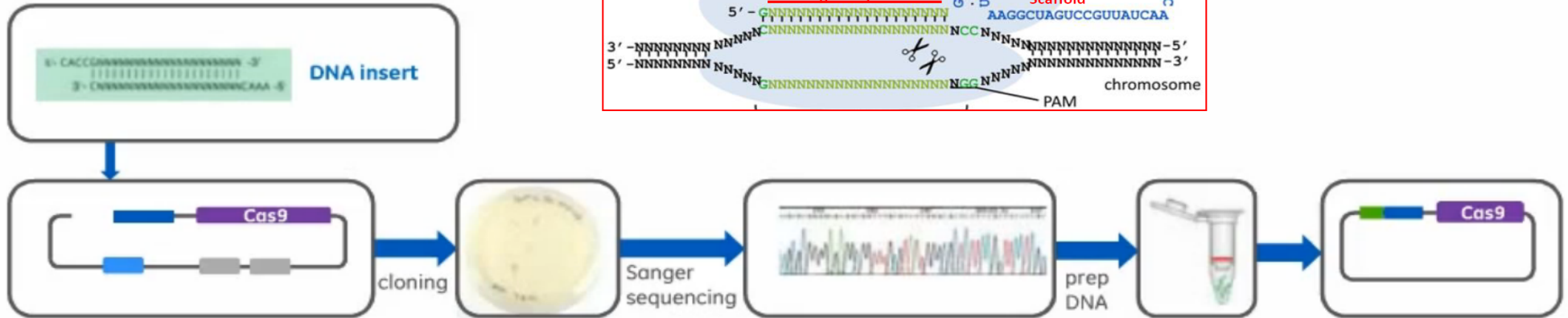
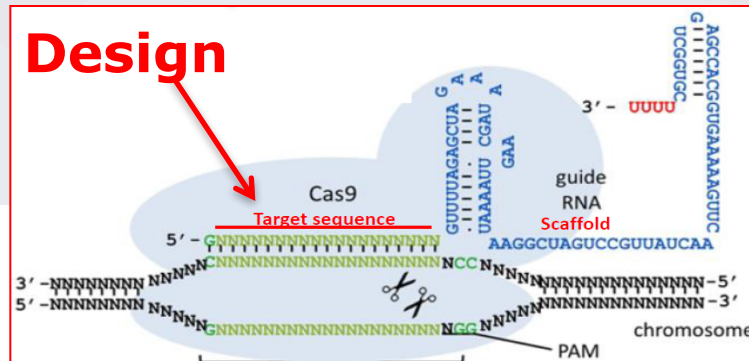


# Stratégies d'expression CRISPR



# Expressions de gRNA et de Cas9

## Etape 1: Design

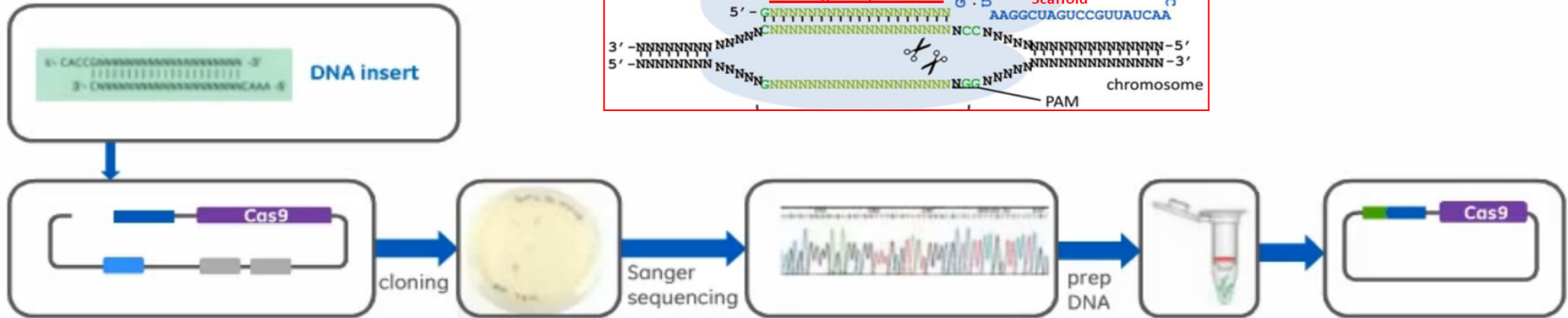
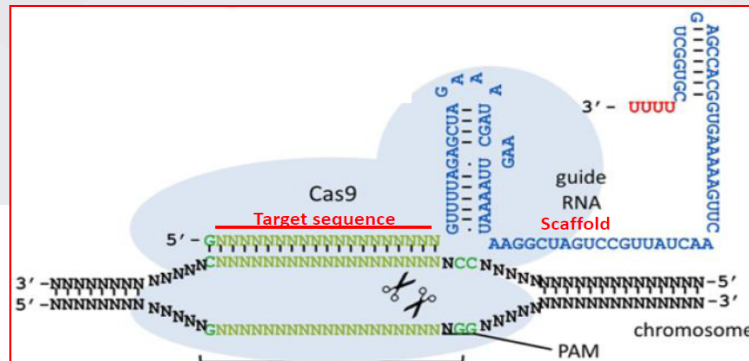


1. Design et sélection de séquences cibles (algorithmes)
2. Synthèse des oligos DNA insert
3. Cloner dans un vecteur d'expression **CRISPR/Cas9**
4. Séquençage
5. Purification de plasmides



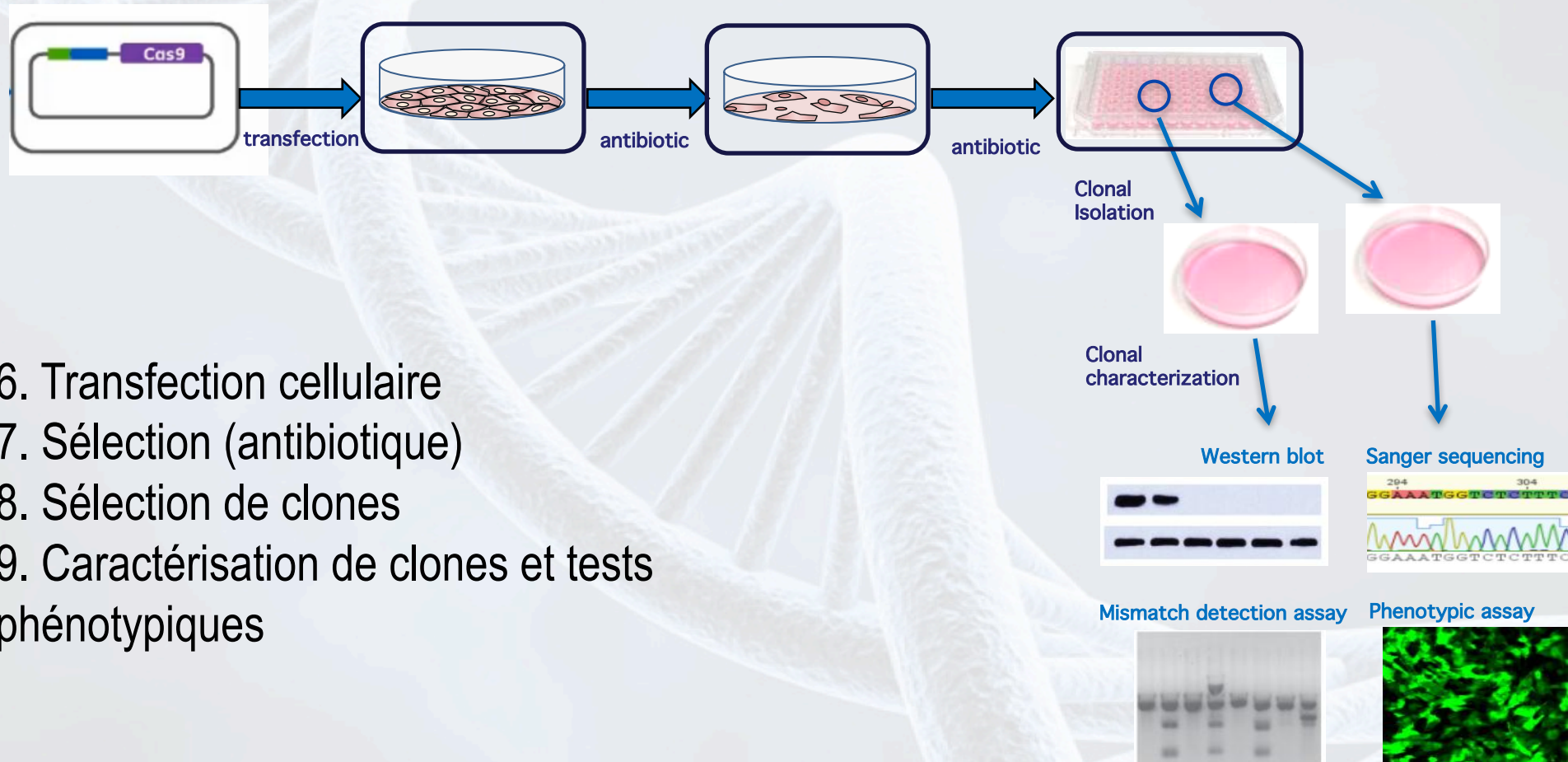


# Stratégie CRISPR - workflow-1



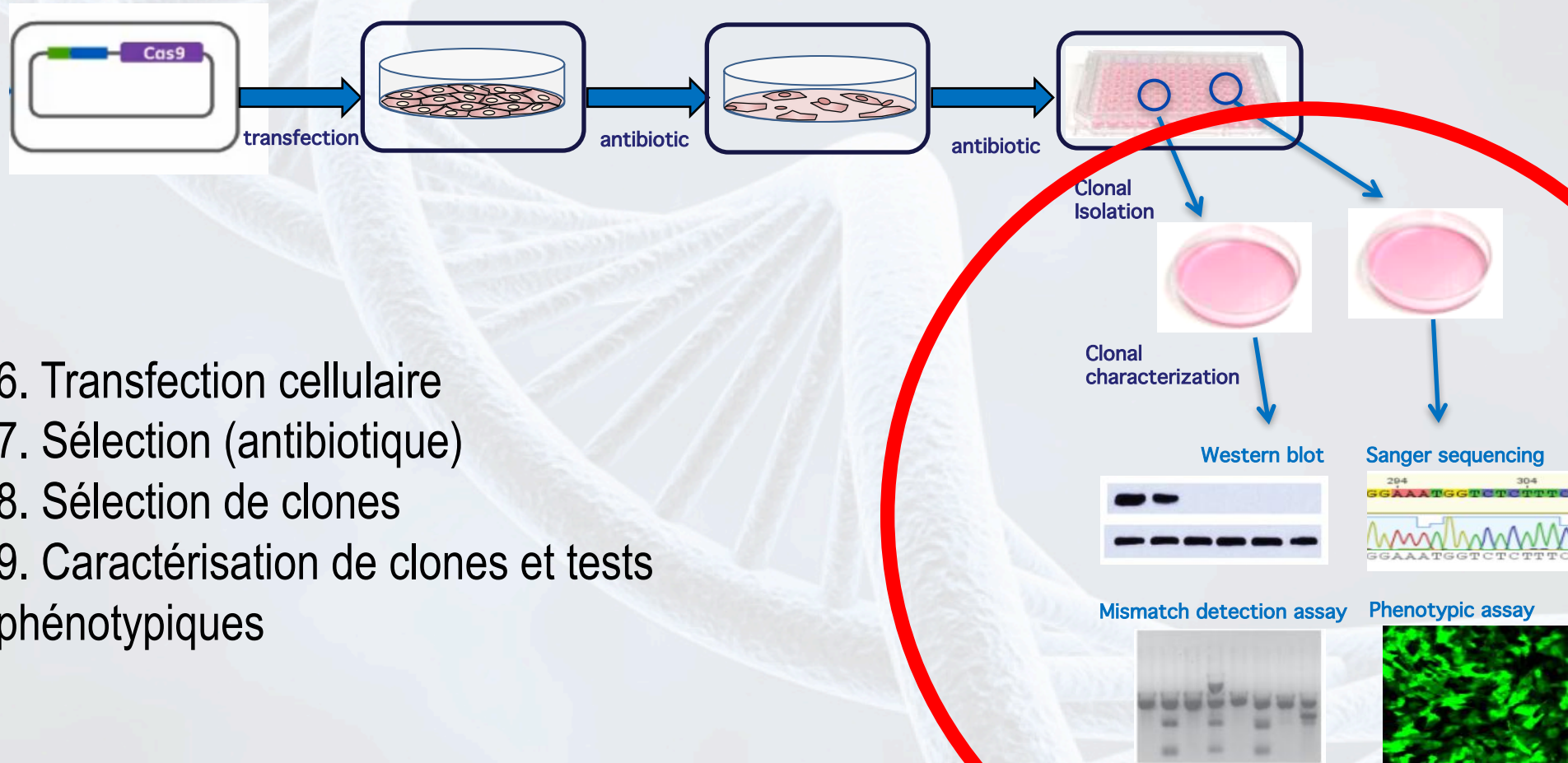
1. Design et sélection de séquences cibles (algorithmes)
2. Synthèse des oligos DNA insert
3. Cloner dans un vecteur d'expression **CRISPR/Cas**
4. Séquençage
5. Purification de plasmides

# Stratégie CRISPR - workflow-2



6. Transfection cellulaire
7. Sélection (antibiotique)
8. Sélection de clones
9. Caractérisation de clones et tests phénotypiques

# Stratégie CRISPR - workflow-2

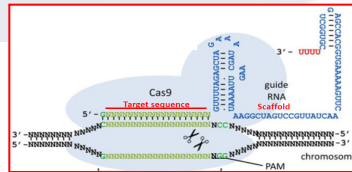




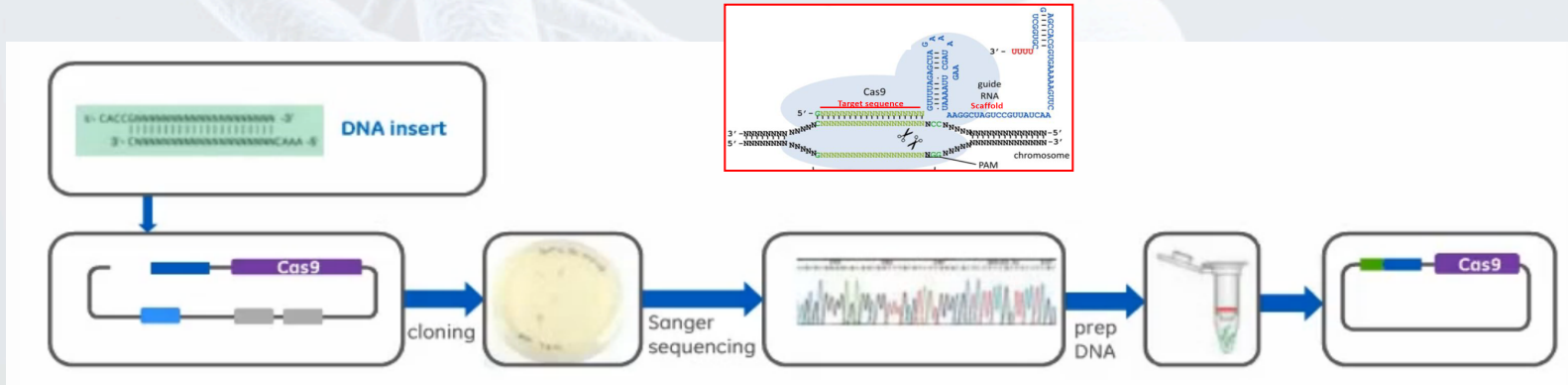


Attention ce n'est qu'un petit outil  
dans un « workflow très complexe »

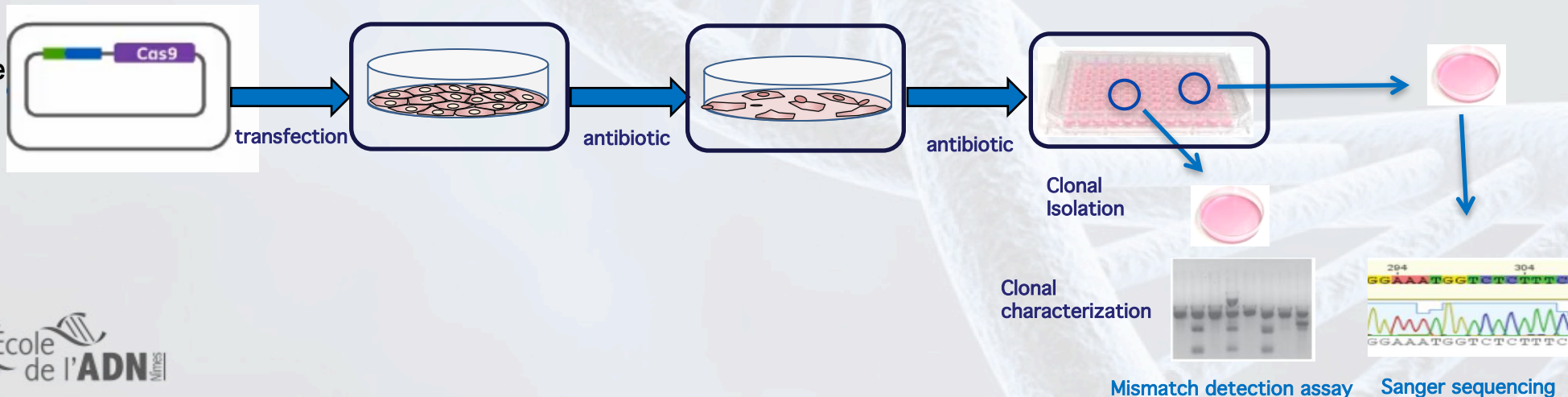
# CRISPR dans « vos expériences »



1<sup>er</sup>



2<sup>eme</sup>







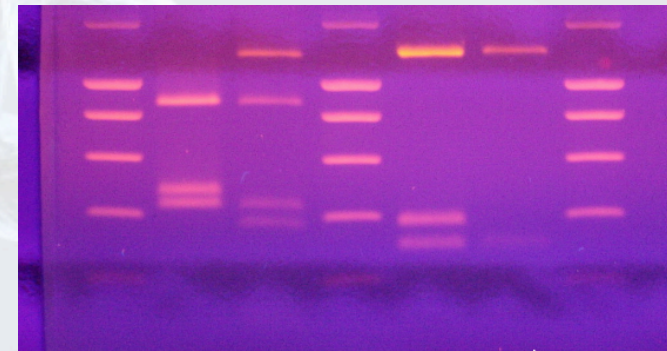
# validation de guides in vitro

## 3. Evaluation fonctionnelle in vitro avec de la Cas9 purifiée

- Amplicon Incubation 45 min à 37 ° C
- ARN guide
- Cas9 purifiée



## 4. Résultats par électrophorèse



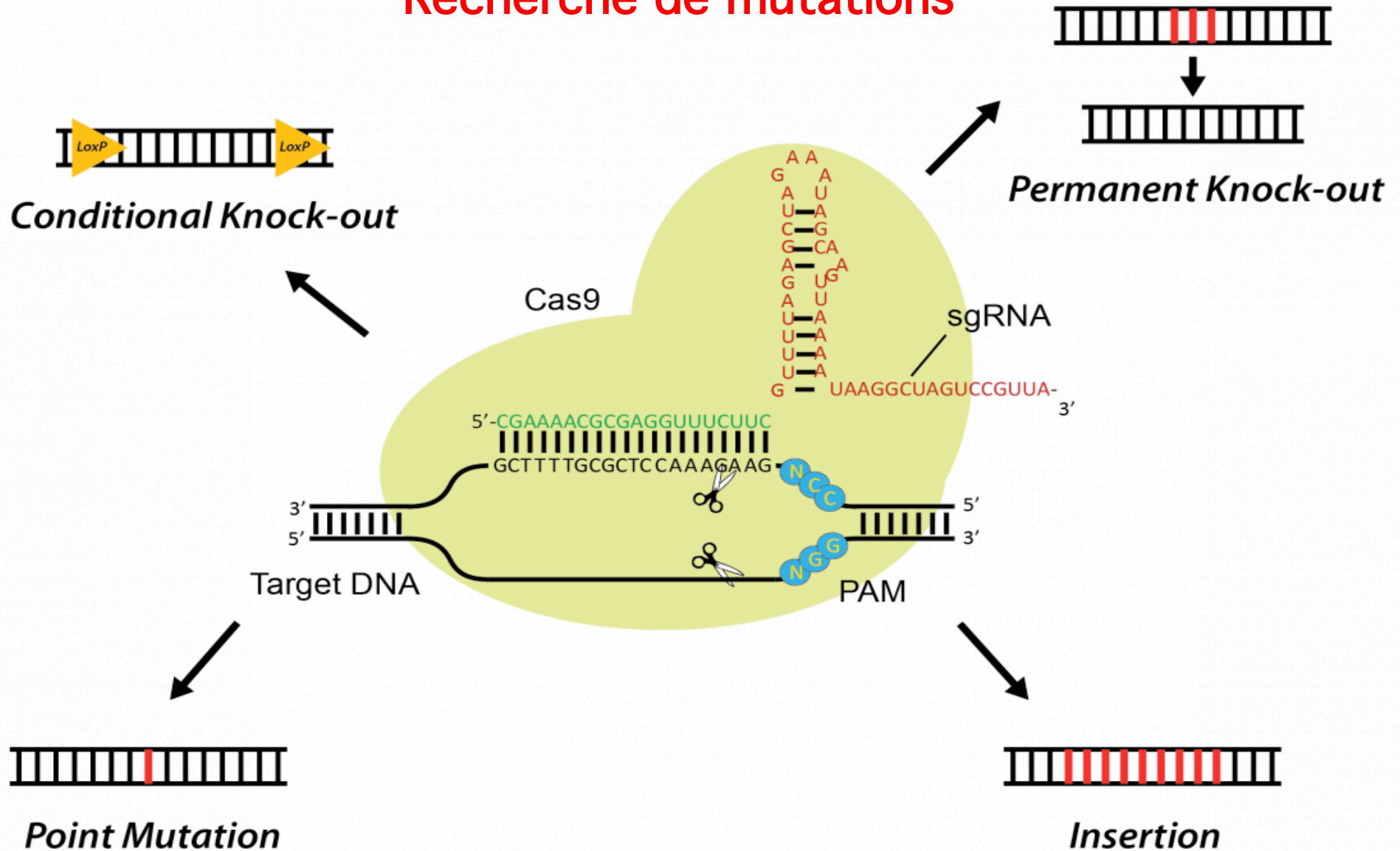




# Screening des résultats



# Recherche de mutations



# Recherche de mutations

1<sup>er</sup> intention

Screening de cellules :

Analyse de cellules éditées par une matrice CRISPR/Cas

Analyse phénotypique et/ou biochimique

2<sup>eme</sup> intention

Recherche d'Indel

PCR et ses dérivés qPCR et dPCR

3<sup>eme</sup> intention

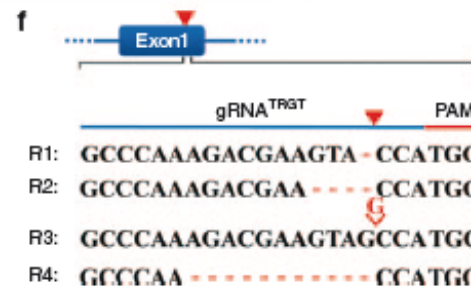
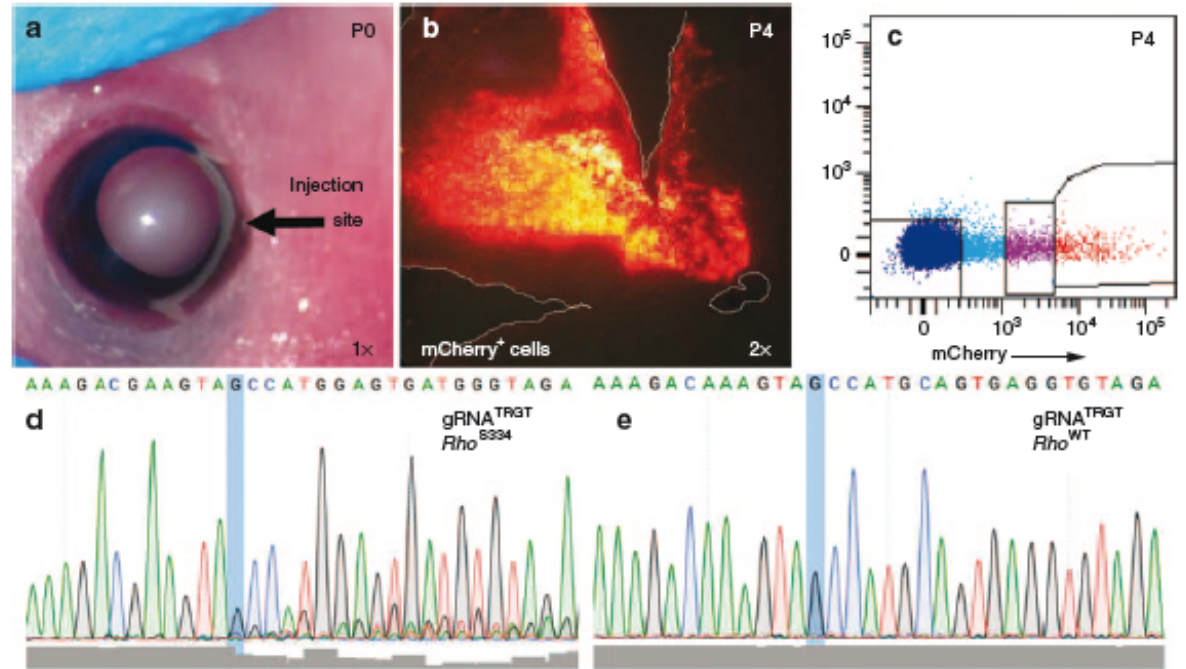
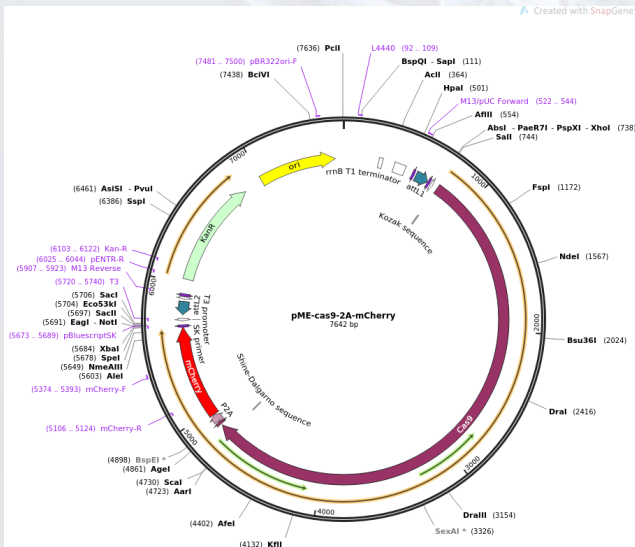
Séquençage incontournable !



# Screening de cellules

1<sup>er</sup> intention

Analyse phénotypique et/ou biochimique

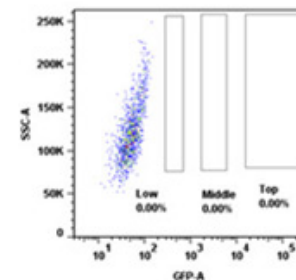
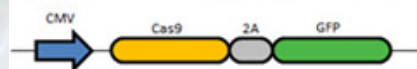
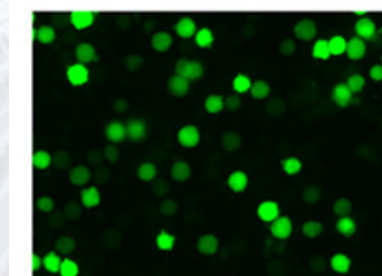
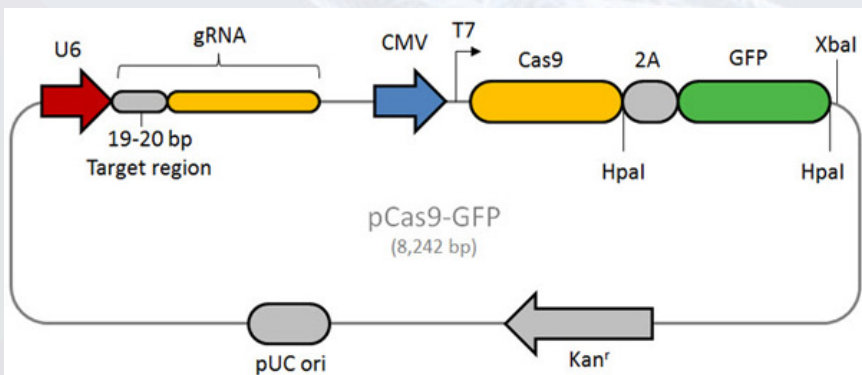


[www.moleculartherapy.org](http://www.moleculartherapy.org) vol.  
24 no. 3, 556–563 mar.  
2016

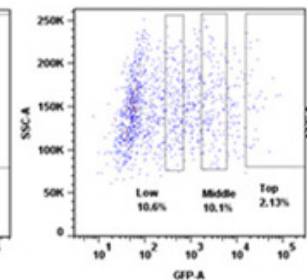
# Screening de cellules

1<sup>er</sup> intention

Analyse phénotypique et/ou biochimique



Control K562 cells



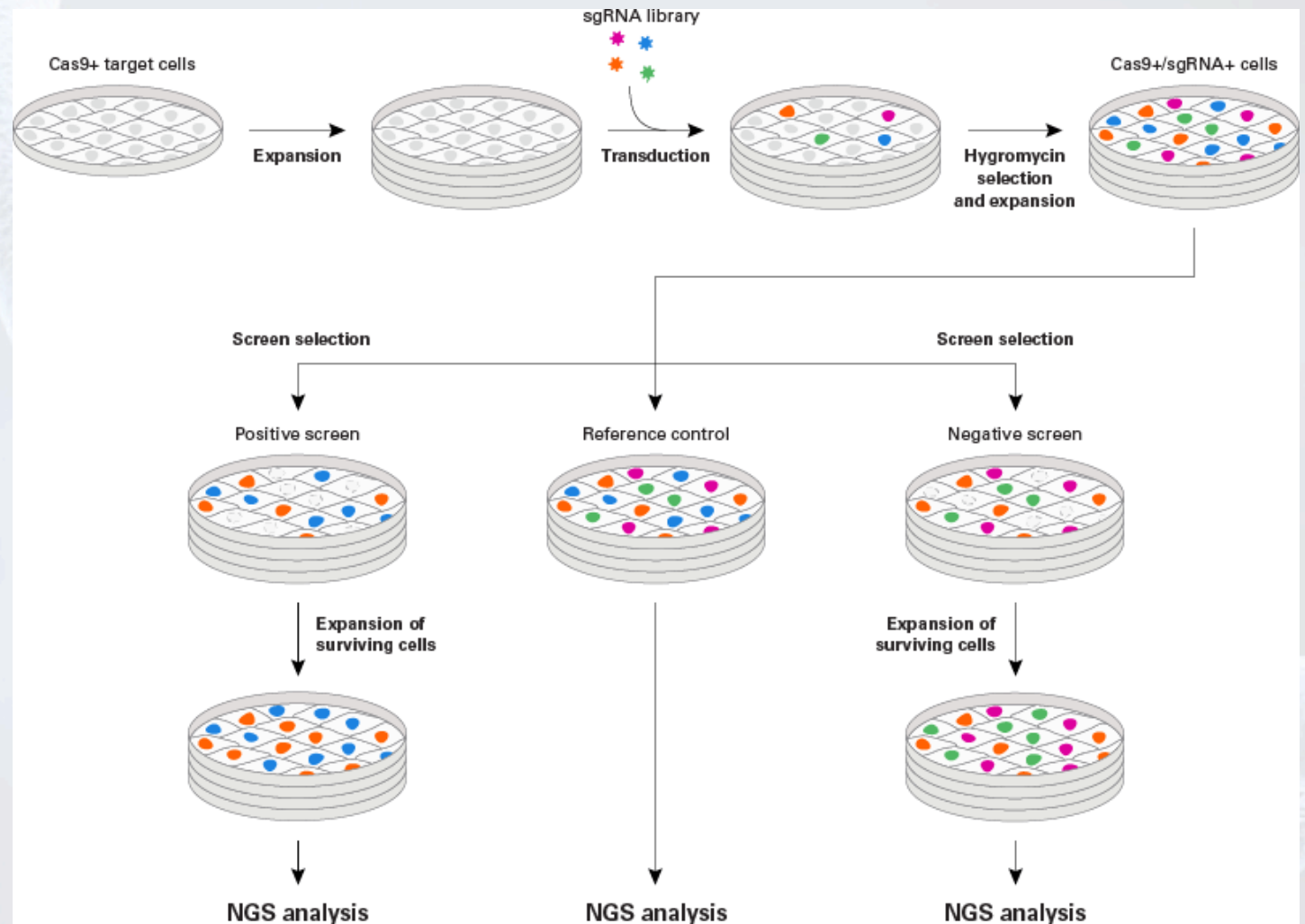
Kras-U6gRNA-Cas9-GFP

A CRISPR/Cas-GFP Vector for Rapid Expression Verification and Enrichment of Genome Edited Cells  
*Merck strategies*

# Recherche de mutations

1<sup>er</sup> intention

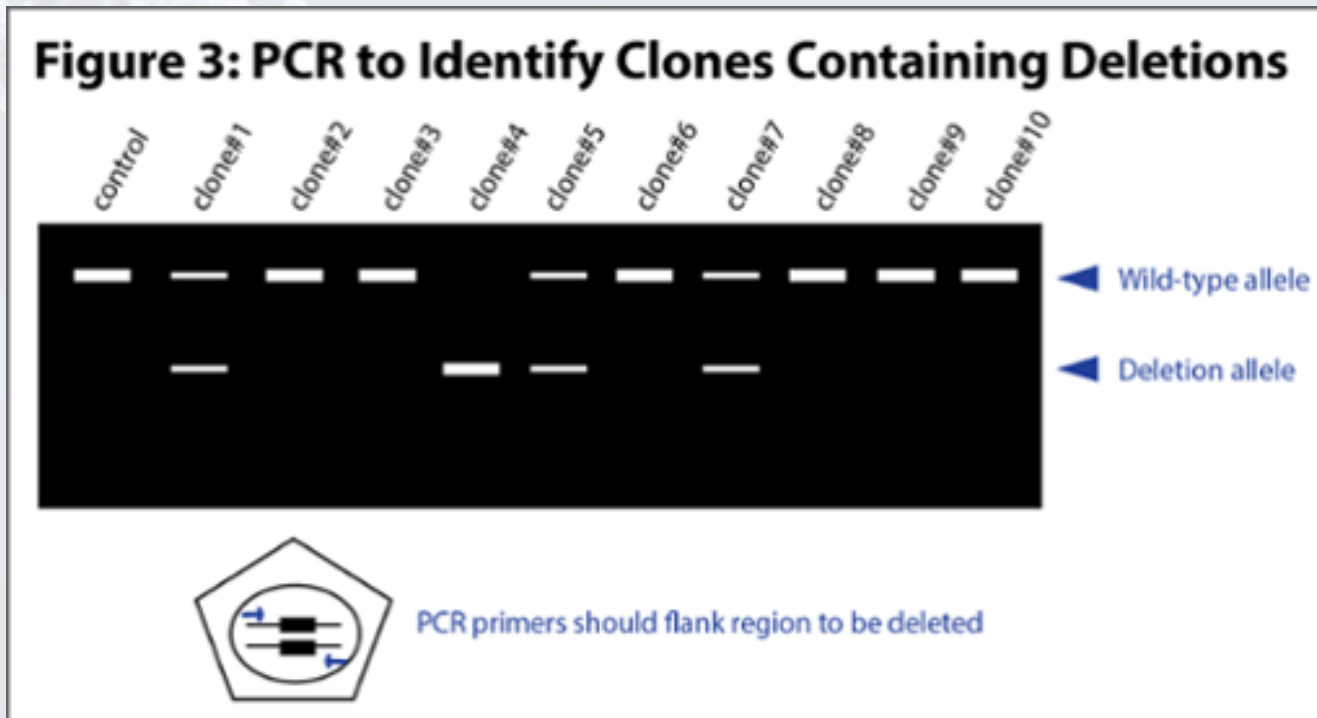
Analyse phénotypique et/ou biochimique



Doench, J.G. *et al.*  
Optimized sgRNA design  
to maximize activity and  
minimize off-target  
effects of CRISPR-Cas9.  
Nat. Biotechnol. 34,  
184–191 (2016).



# Process de screening



# Process de screening: recherche homo/hétérozygotes

## Mismatch detection essay : Surveyor™ ou T7E

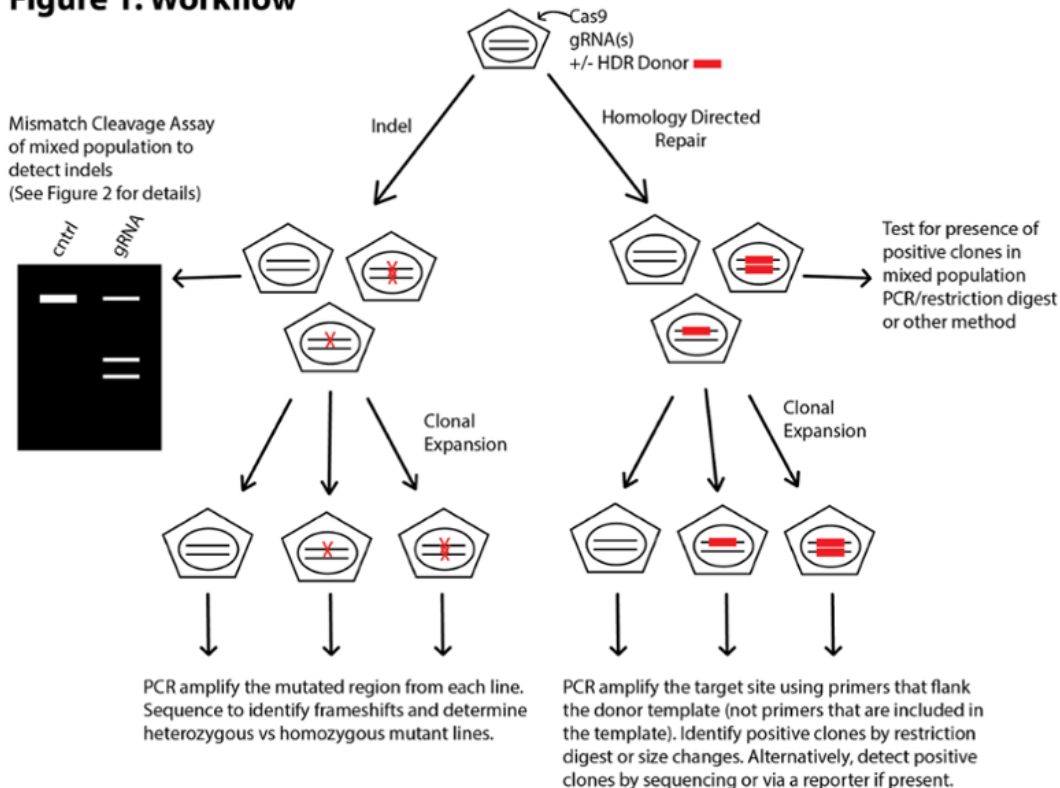
La première étape du processus de validation consiste à évaluer rapidement si un nombre significatif de cellules a été modifié.

1) Pour les indels, ceci est visualisé en utilisant un test de clivage de mésappariement (Mismatch detection essay Surveyor™ ou T7E

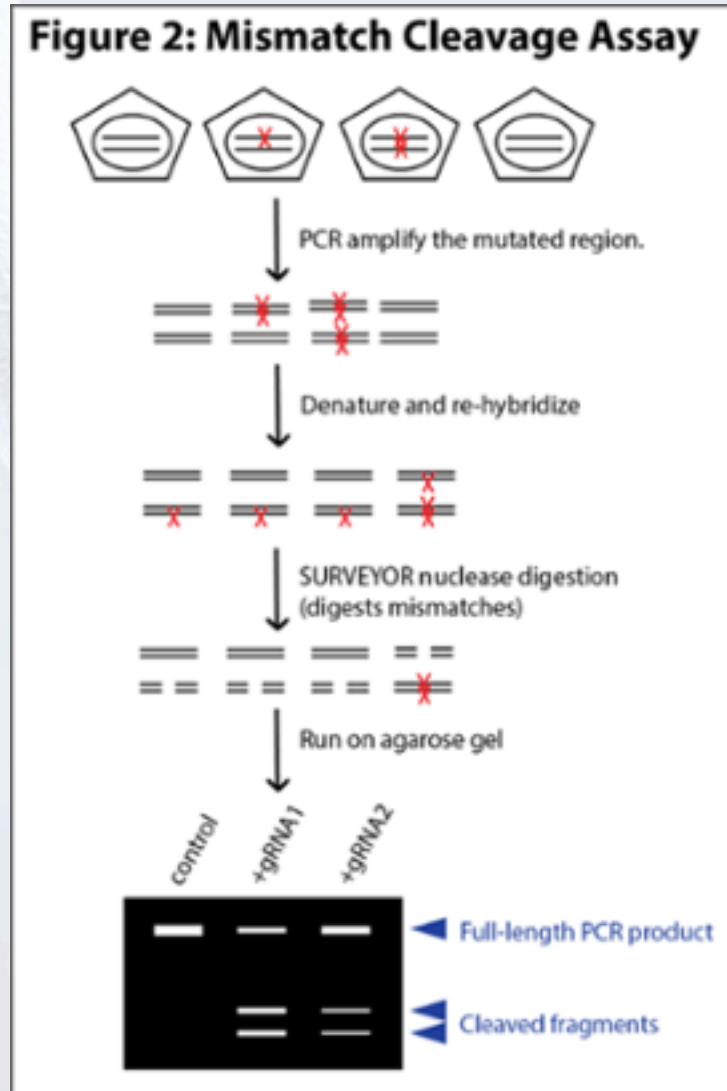
2) Pour HDR, ceci est souvent visualisé par une modification du schéma de restriction sur le site d'intérêt ou via la lecture d'un reporter.

3) Pour les délétions ceci est visualisé par une diminution de la taille d'un produit de PCR produit par les amorces flanquant la région à supprimer.

**Figure 1: Workflow**

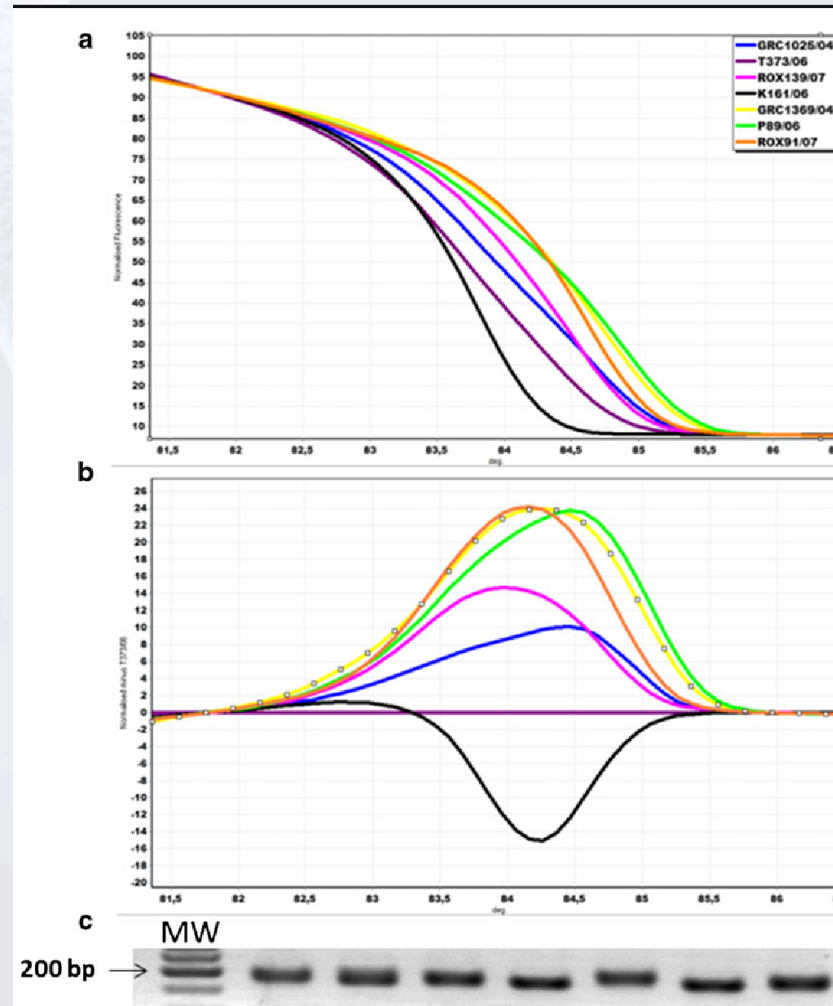


# Process de screening: recherche homo/hétérozygotes

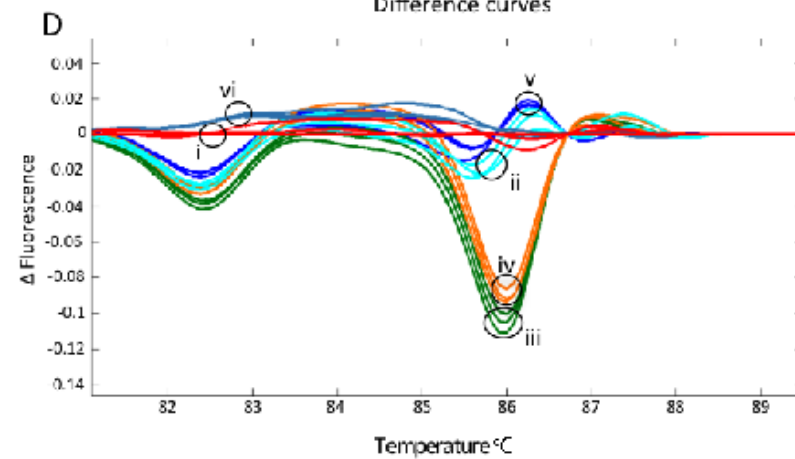
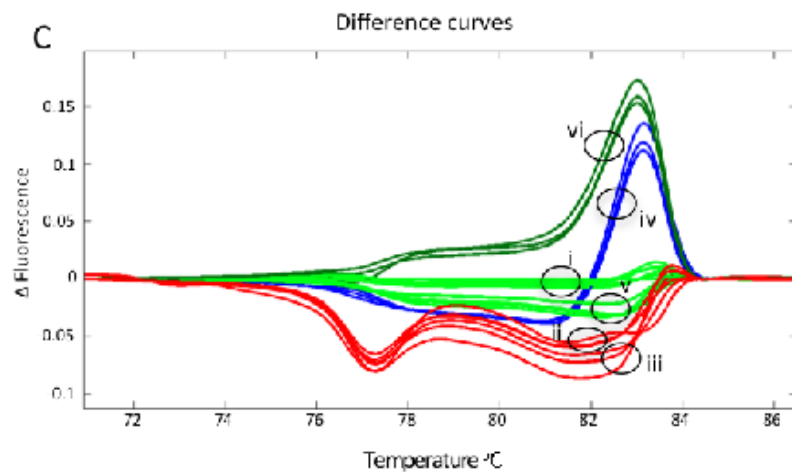
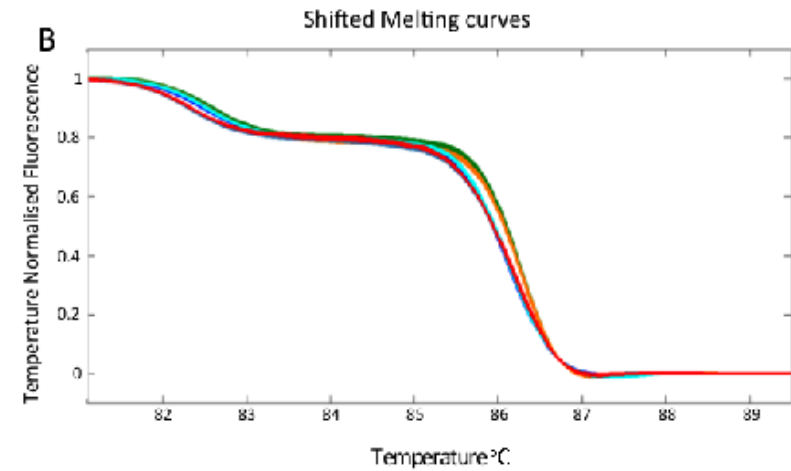
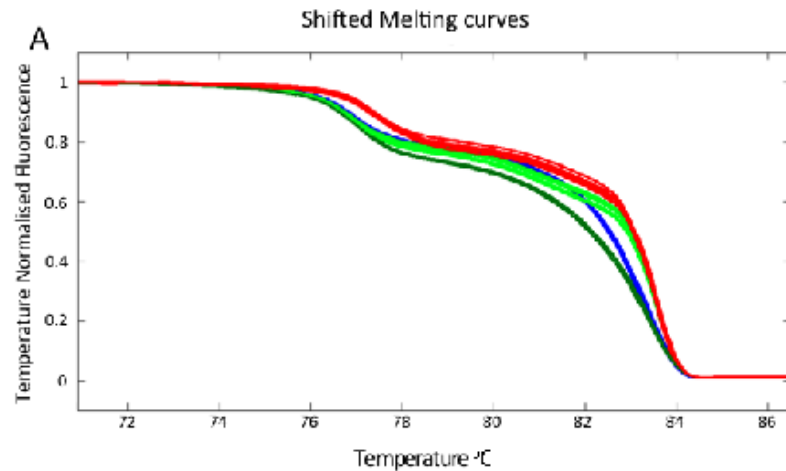




# High Resolution Melting Analysis (HRM ou HRMA)

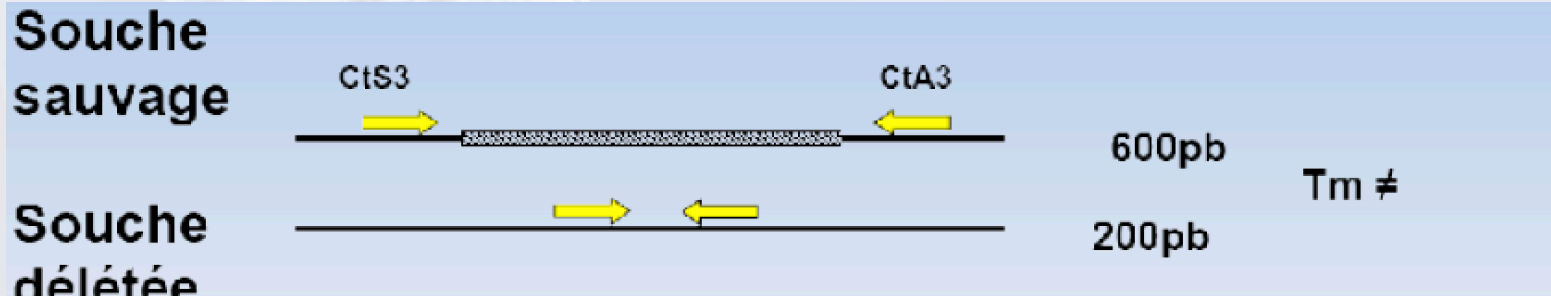


## High Resolution Melting Analysis (HRM ou HRMA)



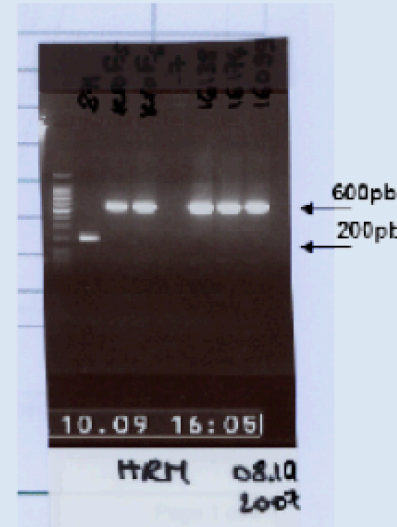
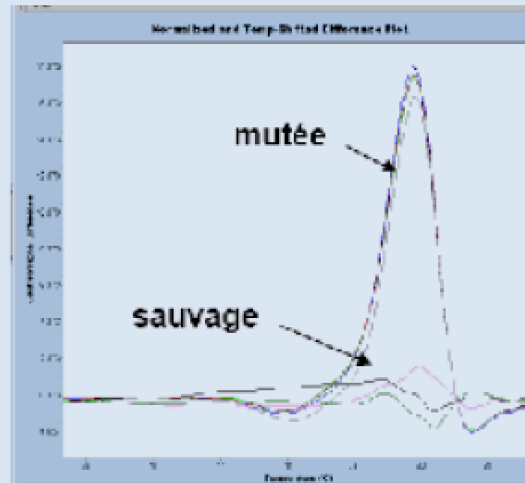
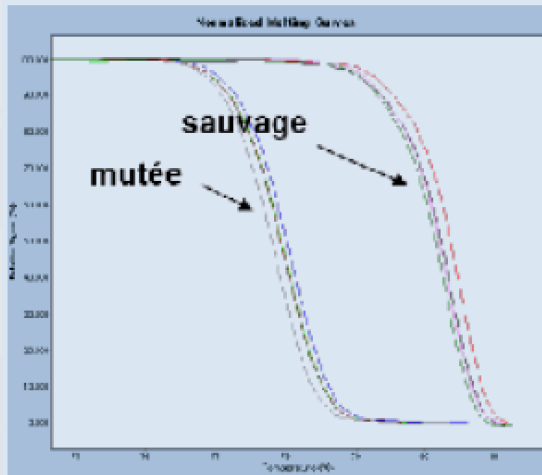
# Process de screening: recherche homo/hétérozygotes

Génotypage : détection d'insertion / délétions



Avantages :

- Rapides
- fiable
- Adapté aux grandes séries



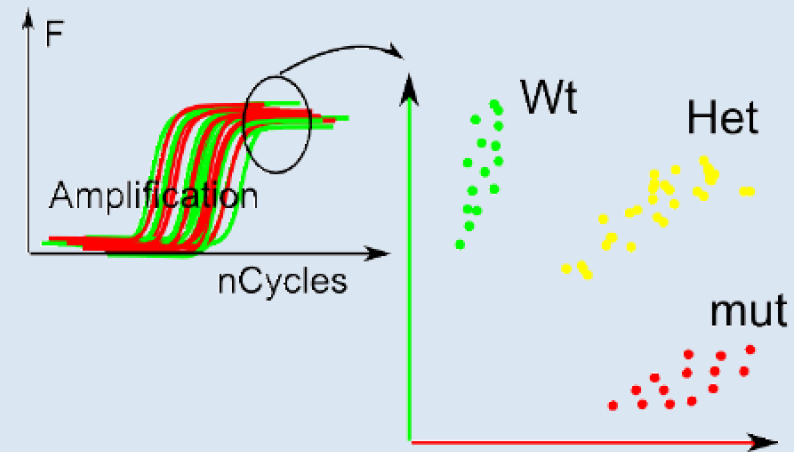
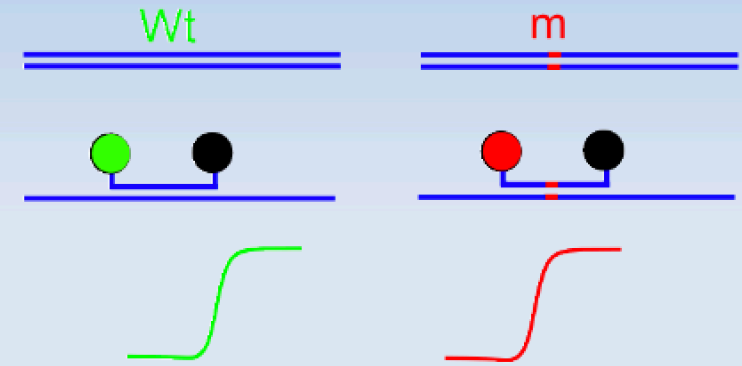


## Process de screening: recherche homo/hétérozygotes

Digital PCR – dPCR  
principe

### détection de mutations

Génotypage en point final  
par sondes d'hydrolyse  
allèle-spécifiques

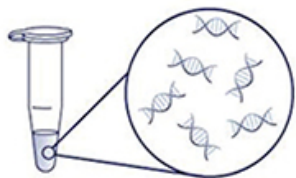


Preparation

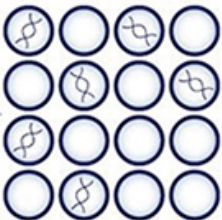
Distribution

PCR reaction

Readout



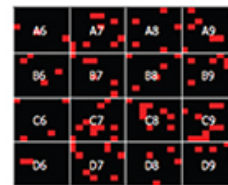
gDNA, cDNA, RNA,  
plasma



Sample partitioned  
into many reactions

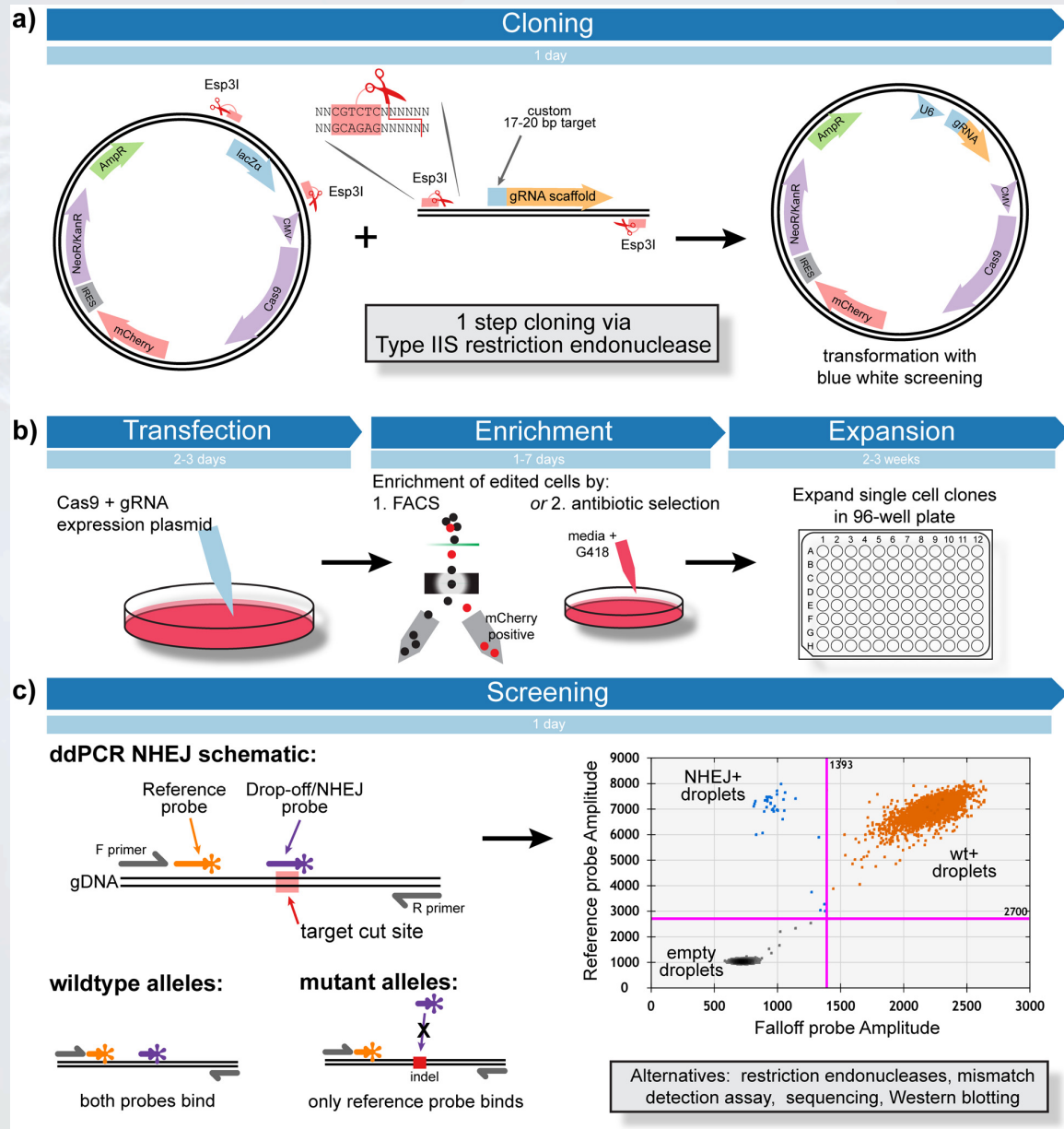


● Positive reactions  
● Negative reactions



Absolute  
quantification

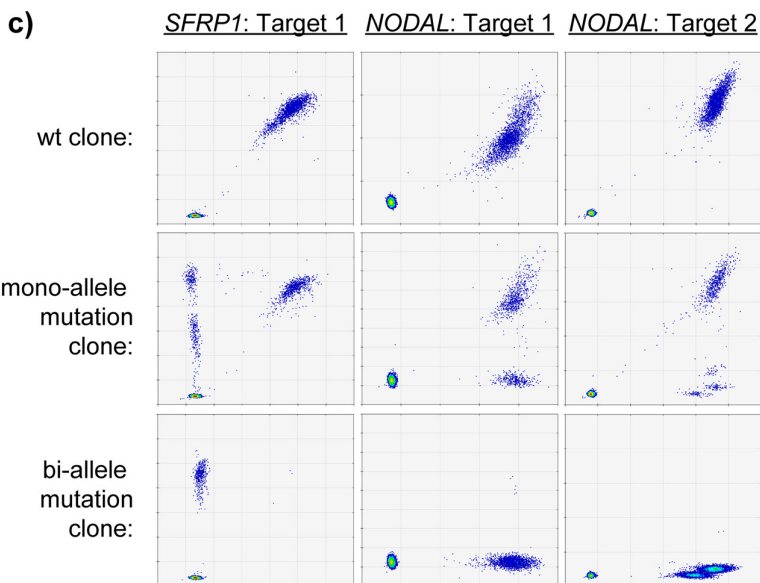
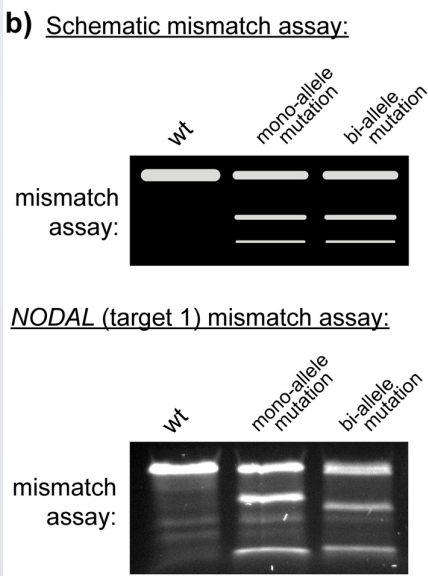
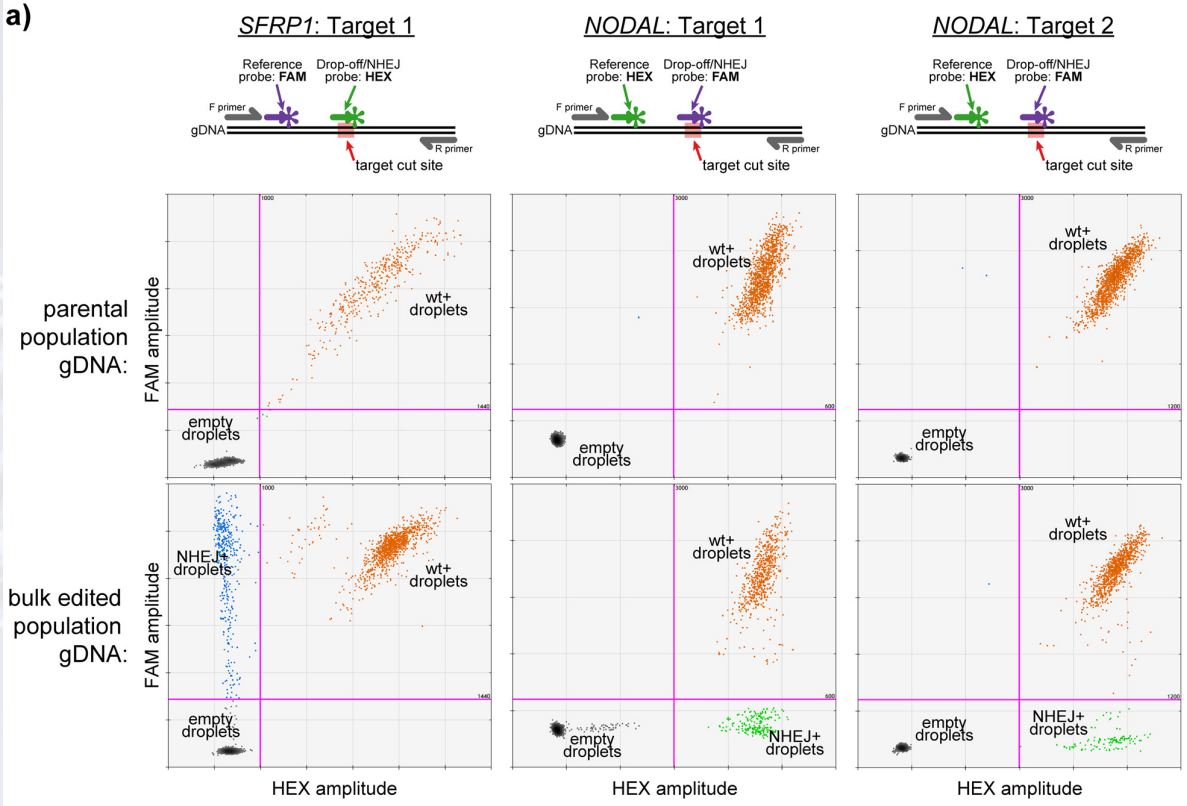
A Digital PCR-Based Method for Efficient and Highly Specific Screening of Genome Edited Cells  
 (Scott D. Findlay et A)  
 IPLoS One. 2016; 11(4)



# 2<sup>eme</sup> intention

A Digital PCR-Based Method for Efficient and Highly Specific Screening of Genome Edited Cells

(Scott D. Findlay et A)  
[IPLoS One](#). 2016; 11(4)

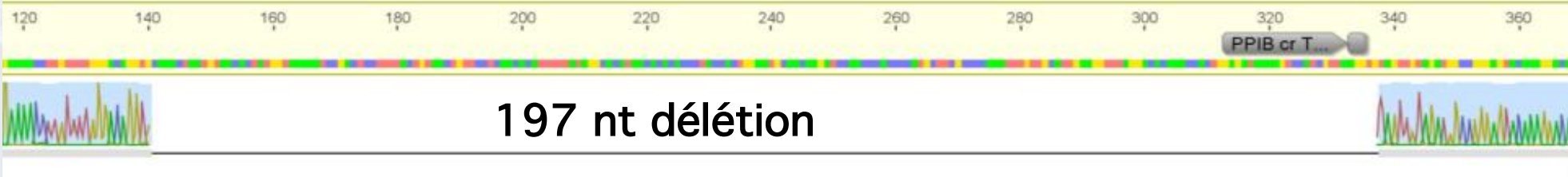




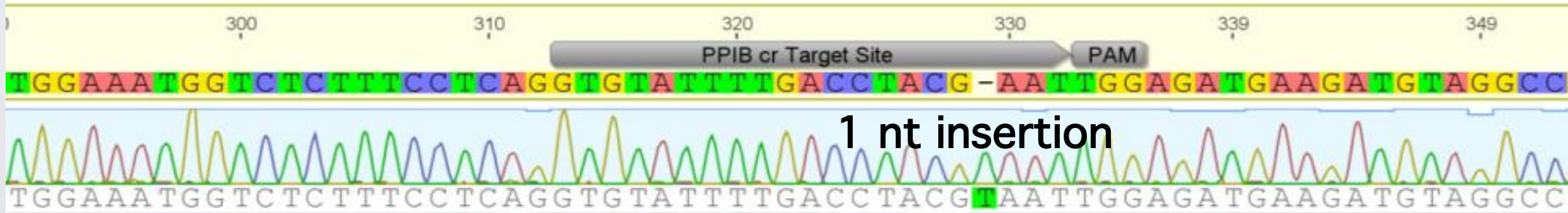
# 3<sup>eme</sup> intention Séquençage : Sangers Sequencing

## Mutations homozygotes

(A)



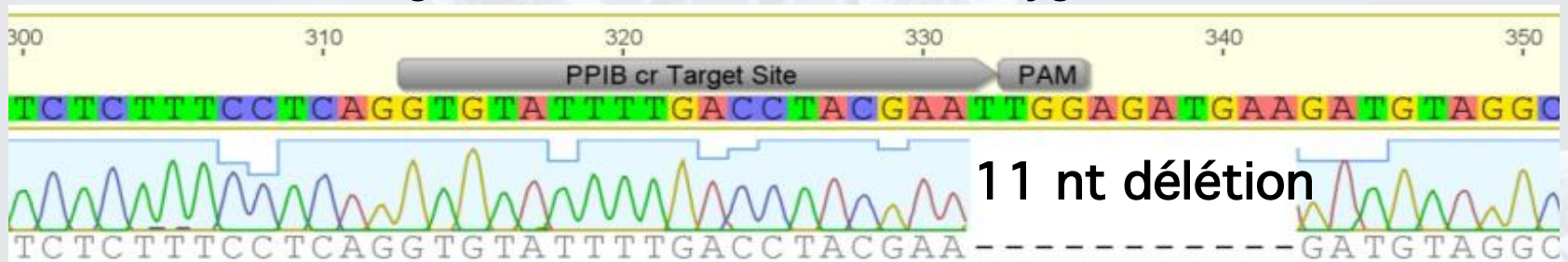
(B)



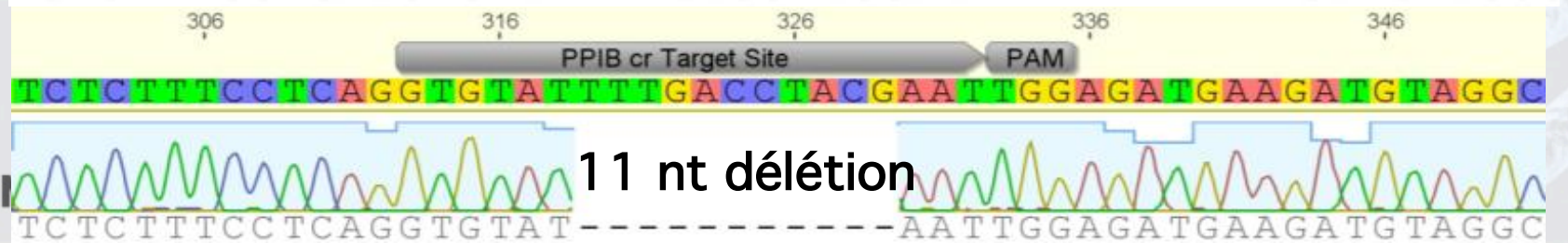
## Lignée avec une mutation hétérozygote

(C)

Allele 1



Allele 2



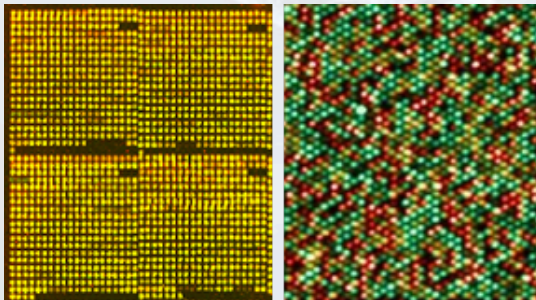
# 3<sup>eme</sup> intention Séquençage : Next Generation Sequencing - NGS

## « Next-Generation Sequencing of Genome-Wide CRISPR Screen »

Methods Mol Biol. 2018 ; 1712: 203–216.

Edwin H. Yau and Tariq M. Rana

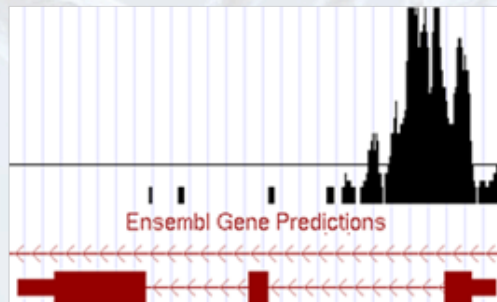
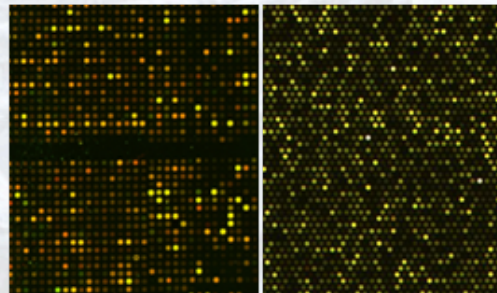
### Genetic variation



```
TCCTTCGGACTCTCGACTCGAACCTTTAGGTG X 1
CTTTCCGACTCTCGACTCGAACCTTTAGGTG X 1
CTTTCCGGCTCTCTCGGCTCGAACCTTTAGGTG X 1
TTTTCGGACTCTCGACTCGAACCTTTAGGTGTA X 2
TTTTCGGACTCTCGGCTCGAACCTTTAGGTGTA X 1
TTTCGGACTCTCGACTCGAACCTTTAGGTGTAA X 2
TCGGACTCTCGACTCGAACCTTTAGGTGTAAA X 3
CGGACTCTCGGCTCGAACCCTTTAGGTGTAAAA X 1
CGGACTCTCGGCTCGAACCTTTAGGTGTAAAA X 1
GGAACCTCGGCTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAG X 1
GACTCTCGGCTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAG X 1
ACTCTCGACTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAGAG X 1
CTCTCGGCTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAGAGA X 1
CTCTCGACTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAGAGA X 1
CTCGACTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAGAGACC X 1
TCGACTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAGAGACCG X 2
TCGGCTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAGAGACCG X 1
CGGCTCGAACCTTTAGGTGTAAAAAGAGACCGA X 1
AGAAAGCCTGAGAGCCGAGCTTGGAAATCCACATTTCTCTGGCTGC
```

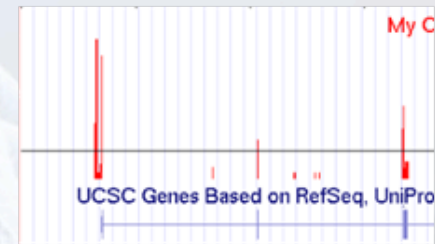
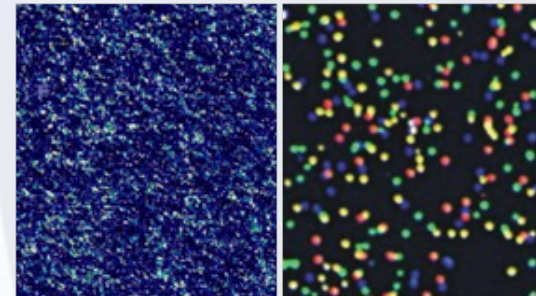
SNPs, loss-of-heterozygosity  
Copy number variants

### Epigenetic variation



DNA methylation  
Chromatin

### Expression variation

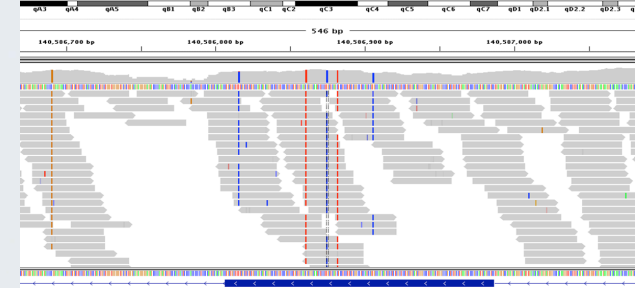


RNA expression  
Gene structure



# 3<sup>eme</sup> intention Séquençage : Next Generation Sequencing - NGS

Les méthodes NGS présentent plusieurs avantages par rapport aux autres méthodes:



- **capables de détecter si tous les allèles d'un gène ont été correctement édités**
- **quels indels ont été générés et si une population de cellules est véritablement monoclonale.**
- **méthodes plus coûteuses et plus compliquées à analyser.**
- **Le séquençage NGS est également une excellente méthode pour étudier les effets non ciblés de la modification CRISPR**



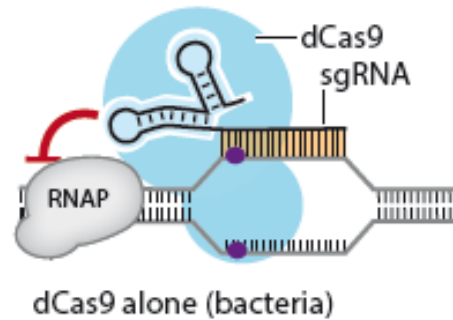
# Ex: Applications du système CRISPR/Cas9

## Interference CRISPR (CRISPRi) et activation CRISPR (CRISPRa)

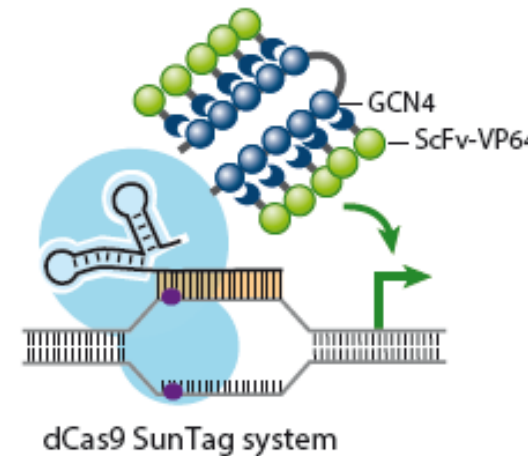
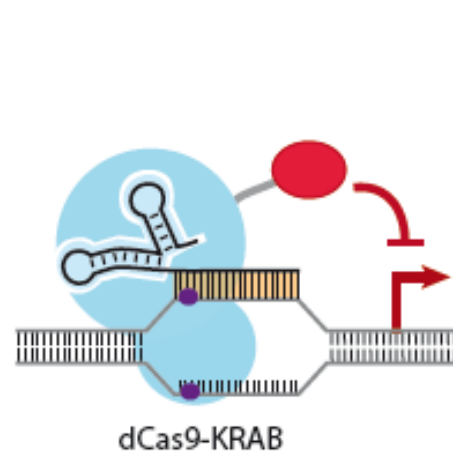
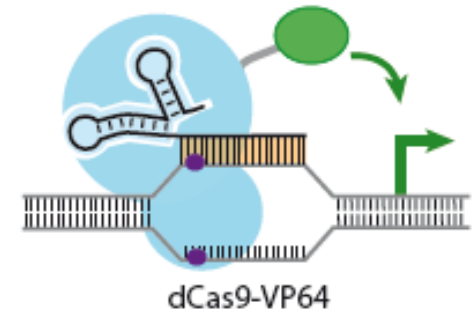
dCAS VP64

dCAS KRAB

a Gene repression (CRISPRi)



b Gene activation (CRISPRa)



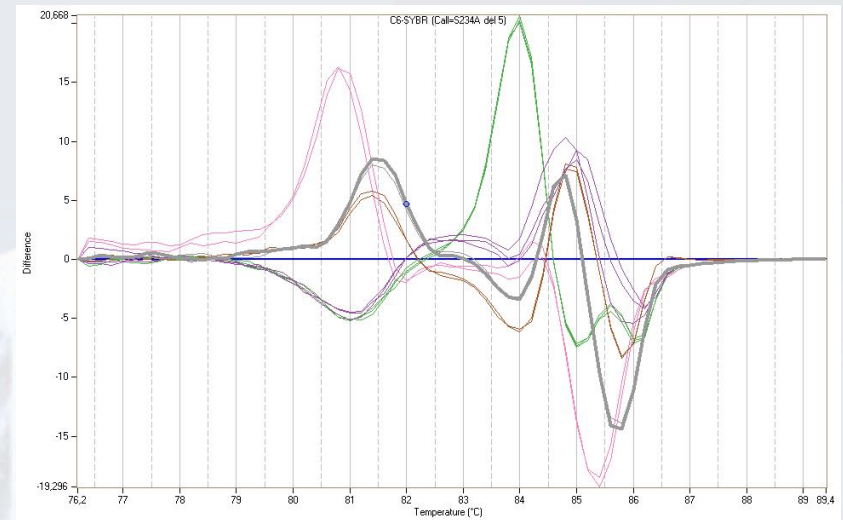
# Solutions proposées

- **Screening de mutants NHEJ ou HDR par HRM High resolution melting**
- **Evaluation de effets CRISPRi/CRISPRa par quantification relative**



# Bilan: des solutions proposées

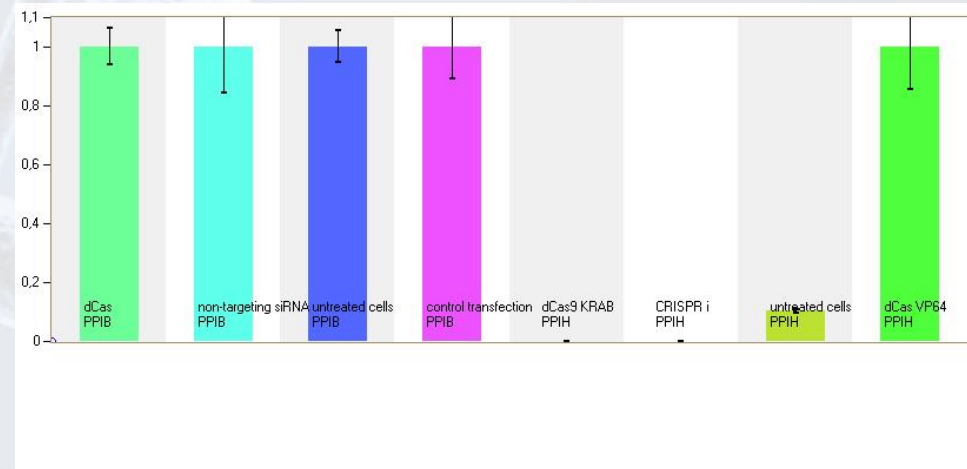
➤ Evaluation des mutants par HRM



➤ Evaluation fonctionnelle par qPCR

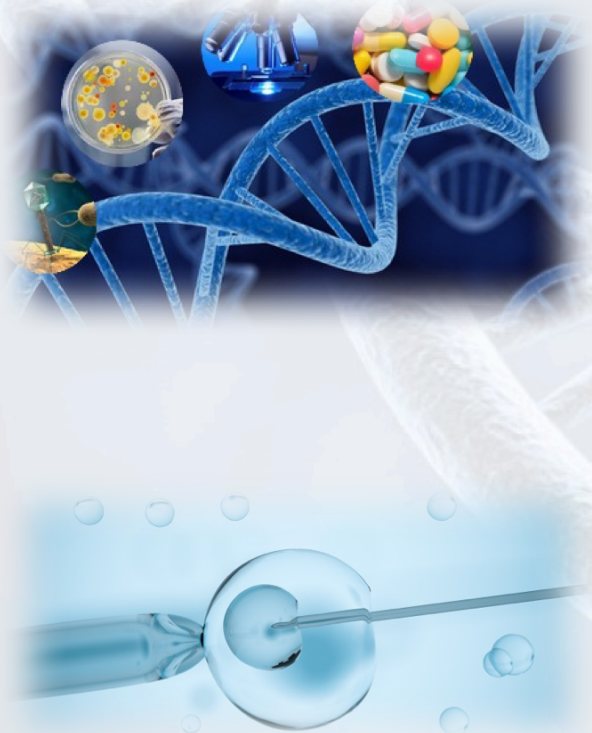
Interférence CRISPR (CRISPRi)

Activation CRISPR (CRISPRa)

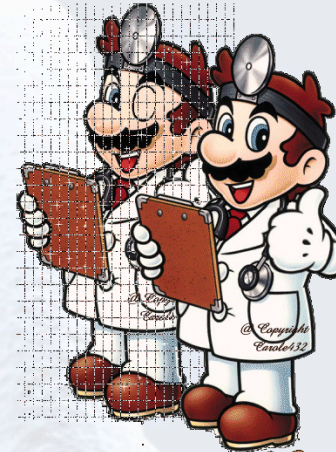




La génétique de demain, n'est pas prévisible !



*Tout est sous*



*contrôle*



**Rappel !!**

**Penser à la mise à jour de votre dossier auprès du  
Ministère de l'Enseignement Supérieur,  
de la Recherche et de l'Innovation**

**MESRI**



*Liberté • Égalité • Fraternité*  
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE  
DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPÉRIEUR,  
DE LA RECHERCHE  
ET DE L'INNOVATION



**TO BE  
CONTINUED...** 