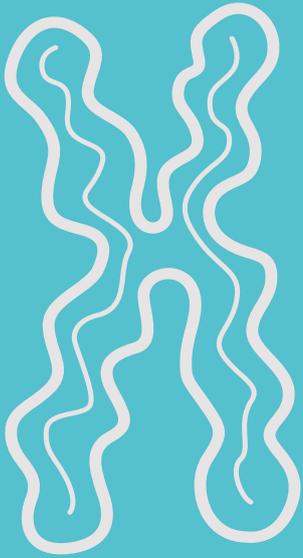

UN COUP D'OEIL
DES CHERCHEURS
SUR L'ACTUALITÉ
SCIENTIFIQUE

break'd!



FÉVRIER
2018

N.
03

GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

N. 03
FÉVRIER
2018

GÉNÉTIQUE
MOLÉCULAIRE

PRÉFACE

LA RIGUEUR SCIENTIFIQUE POUR DECRIRE
LES NOUVELLES
DÉCOUVERTES

p.1

ÉDITORIAL

LA GÉNÉTIQUE
MOLÉCULAIRE
MET LE CAP SUR
LA MÉDECINE
PERSONNALISÉE

p.2

BREAK #1

PIRATER
LE MÉTABOLISME
DU TRYPTOPHANE
PERMETTRAIT
DE CONTRER
LA NEURODÉGÉ-
NÉRESCENCE

p.4

BREAK #2

NOUVEAU TRAITEMENT
CONTRE LES MALADIES
HÉRÉDITAIRES
CAUSANT LA CECITE

p.6

BREAK #3

MODIFIER
PRÉCISÉMENT
LES GÈNES AVEC
DES BLOCS DE LEGO

p.8

BREAK #4

LUTTER CONTRE
LA MALARIA

p.10

ACTIVITÉ BIOUTILS

LE CLONAGE D'UN GÈNE

p.12

LA RIGUEUR SCIENTIFIQUE POUR DECRIRE LES NOUVELLES DÉCOUVERTES

Chères enseignantes,
chers enseignants,

Au nom du comité de rédaction, je suis sincèrement heureux de vous proposer la nouvelle édition de «*break'd!*», un mini-magazine bimestriel conçu pour vous soutenir dans l'enseignement de la biologie expérimentale moderne.

Selon le même format que les deux précédentes éditions, ce mini-magazine explorera certaines publications expliquées par les scientifiques ayant effectué eux-mêmes la recherche. Comme pour les éditions précédentes, le domaine a été choisi en fonction du programme scolaire, grâce aux contributions d'enseignants locaux. Dans cette édition, les articles font partie du domaine de la génétique moléculaire, avec un accent particulier sur l'une des plus grandes découvertes dans le domaine: l'outil de modification génétique CRISPR/Cas9.



Article mentionné dans **62** revues de presse, **7** publications Google+, **3** sources politiques, **11** pages Facebook, **4** pages Wikipedia, **195** messages sur Twitter, **1** lien Reddit, **2** vidéos, **15** Blogs

Figure 1
Le «Altmetric donut» indique le score et toutes les sources dans lesquelles l'article original a suscité un intérêt (une pondération différente est accordée à chaque source). L'exemple présenté ici montre toutes les données relatives à l'article original du break «Lutter contre la malaria».

Comme tous les articles décrits dans «*break'd!*», ceux-ci ont été sélectionnés non seulement pour leur importance dans le domaine scientifique, mais aussi pour l'attention qu'ils génèrent auprès du grand public. Ce critère nous permet de vous proposer des articles qui ont représenté (ou représentent encore) un sujet de discussion aussi bien dans l'environnement scolaire que dans la société.

Pour ce faire, nous utilisons le score Altmetric (www.altmetric.com) comme référence. Le score Altmetric est une mesure indépendante adoptée par la plupart des éditeurs scientifiques pour mettre en évidence et quantifier l'intérêt suscité par leurs articles (par exemple les médias, les blogs, la radio, les réseaux sociaux, etc.). L'impact de chaque publication académique publiée est mesuré et le score relatif est fourni à toute personne intéressée.

Par exemple, la plateforme TheScienceBreaker a publié en 2016 un *break* intitulé «Lutter contre la résistance aux antibiotiques: un nouvel espoir du sol» qui décrit l'article scientifique avec le score Altmetric le plus élevé de 2015 (2875). De même, l'article original de l'un des 4 *breaks* de l'édition actuelle de «*break'd!*» («Lutter contre la malaria») a obtenu un score Altmetric de 733 (voir Figure 1).

Par conséquent, en étant à la fois pertinent scientifiquement mais aussi intéressant pour le public, chaque *break* présenté dans le magazine met en avant un thème scientifique pouvant servir de base à la mise en place d'un véritable dialogue sur la biologie expérimentale moderne.

Ne manquez pas non plus le prochain numéro de «*break'd!*» - la première des deux éditions sur la microbiologie - qui paraîtra en avril 2018 et se concentrera sur le microbiote humain.
Bonne lecture!

— Massimo Caine, coordinateur du projet
BiOutils & TheScienceBreaker

LA GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE MET LE CAP SUR LA MÉDECINE PERSONNALISÉE

Chacun de nous est défini par notre ADN, une longue hélice formée par deux brins de séquences de 4 lettres chimiques appelés nucléotides. Cet ADN constitue notre information génétique, organisée en gènes, et elle se trouve dans le noyau de chacune des cellules de notre corps. De nombreuses maladies ont une composante génétique, c'est à dire qu'elles résultent d'un ou plusieurs changements dans la séquence des nucléotides à un endroit précis de l'ADN. L'endroit de l'ADN altéré, ou muté, est différent selon les maladies génétiques.

Le rêve de la médecine à l'ère de la biologie moléculaire est de pouvoir identifier les mutations du génome responsables des maladies génétiques et les réparer. Nous ne souhaitons plus seulement soigner ou maîtriser les symptômes des maladies, mais nous avons désormais l'ambition de les corriger définitivement. Longtemps perçu comme irréel, ce rêve de la thérapie génique et médecine personnalisée devient toujours plus tangible grâce aux immenses progrès technologiques de ces dernières décennies. Une première étape vers la réalisation de ce rêve a été la capacité de séquencer entièrement le génome humain et apprendre à le séquencer de façon efficace, avec un coût raisonnable. Le premier génome eucaryote (désigne une cellule avec un noyau) à avoir été séquencé entièrement en 1996 fut celui d'un unicellulaire, la levure *Saccharomyces cerevisiae* (13 millions de lettres). Cinq ans plus tard, en 2001, nous avons obtenu la première séquence d'un génome humain, environ 400 fois plus long (3 milliards de lettres). Aujourd'hui nos machines permettent de séquencer un génome humain en 1 heure. Le prix est passé de 300'000 dollars en 2006 pour un génome humain à la promesse actuelle de pouvoir le faire pour seulement 100 dollars. Connaître la séquence de l'ADN d'un individu porteur de maladie génétique ne suffit pas à définir ce qui, dans son code génétique, pourrait être responsable de sa maladie. En effet, chacun de nous a une séquence d'ADN sensiblement différente et ces différences sont pour la plupart silencieuses, sans conséquence sur notre santé. Ainsi, une deuxième étape importante pour la thérapie génique est d'identifier quelles lettres de la séquence d'ADN

distinguent l'individu sain de l'individu malade. Ceci exige en premier lieu de comprendre la fonction associée aux différents fragments d'ADN et c'est le travail de la génétique moléculaire. Cela implique de pouvoir comparer deux individus génétiquement identiques sauf dans une séquence d'ADN d'intérêt, afin de conclure que la différence phénotypique des deux individus est la conséquence de l'altération de cette séquence précise. Ceci a longtemps été possible seulement avec des organismes eucaryotes modèles comme la levure bourgeonnante qui a la capacité de remplacer une séquence d'ADN dans son génome par une séquence d'ADN introduite dans la cellule. Ceci se fait par un mécanisme qui s'appelle recombinaison homologue. La levure est un organisme eucaryote comme l'homme. Ainsi pendant plusieurs décennies nous avons beaucoup appris sur la fonction des gènes de levure et par extension sur la fonction de gènes homologues chez l'homme. Cependant le génome humain est beaucoup plus complexe que le génome de levure et c'est un organisme pluricellulaire qui a un programme de développement complexe. Il y a beaucoup de fonctions humaines, définies par les séquences d'ADN, qui n'existent pas et n'ont pas d'équivalent chez la levure. De ce fait d'autres organismes modèles pluricellulaires sont utilisés. Un exemple notoire est la mouche *Drosophila*. Parfois les organismes modèles sont utilisés pour comprendre les maladies même quand ils ne sont pas eux mêmes porteurs. On leur introduit un gène muté humain, puis on évalue dans cet organisme comment on peut modifier la maladie, soit par des suppléments alimentaires, soit par la génétique. Dans le premier article de cette édition de «break'd!» (voir *break* #1) on voit comment les chercheurs ont réalisé que l'adjonction de tryptophane dans le régime, ou la délétion de gènes particuliers de la mouche qui ont des homologues chez l'homme, peuvent changer l'évolution de la neuro-dégénérescence provoquée par l'introduction de gènes mutants responsables de différentes maladies neuro-dégénératives humaines. La réelle étape clé pour réaliser la thérapie génique a été la mise au point des outils technologies qui nous

permettent d'aller éditer le génome humain de façon ciblée et précise. La méthode mise au point fait appel à CRISPR/Cas9 dont le principe est d'envoyer dans le noyau une machine qui fonctionne comme des ciseaux moléculaires et coupe le double brin d'ADN à un endroit bien précis du génome sur une séquence de 3 lettres bien précises.

Ces ciseaux utilisent une séquence de lettres identiques à celles du brin d'ADN que l'on veut couper à côté du site de coupure, comme adresse pour les ciseaux. Ensuite on peut laisser la cellule réparer la coupure en recollant les deux brins. Ceci se fait de façon assez imprécise et le résultat est que le gène qui se trouvait au site de coupure est en général détruit. Les ciseaux de ce système s'appellent Cas9 et l'outil d'adressage CRISPR, aussi appelé guide. Dans le deuxième article de cette édition de «*break'd!*» (voir *break* #2) les chercheurs se sont attaqués aux dystrophies de la cornée. Souvent la maladie résulte d'une seule mutation, une seule lettre modifiée dans le code d'ADN d'un seul gène, provenant d'un seul des deux parents. La maladie apparaît malgré la présence d'une copie du gène normal provenant de l'autre parent. On appelle ceci une mutation dominante. L'art des chercheurs a été de s'assurer que le système CRISPR/Cas9 soit capable de cibler seulement et spécifiquement la copie malade du gène. En enlevant le gène malade, on permet au gène sain de s'exprimer et la maladie est guérie. La clé de cette réussite a été de comprendre que si la mutation se trouvait sur la séquence de 3 lettres détectée par les ciseaux moléculaires, alors les ciseaux distinguaient la copie malade de la copie normale. Dans de nombreux cas, une maladie ne s'exprime que quand les deux copies d'un gène sont mutantes. Dans ces cas, on doit réparer la mutation sur une copie de gène pour redonner au patient une copie du gène sans mutation. Les chercheurs ont donc développé le système CRISPR/Cas9 en lui ajoutant un morceau d'ADN linéaire portant la séquence de lettres désirée pour réparer la coupure. Bien que le système marche, il ne donne le résultat escompté qu'à un pourcentage limité. En effet, cette réparation est en compétition avec le système de la cellule qui va simplement recoller les bouts d'ADN cassés de façon imparfaite. La compétition est en défaveur de la réparation par l'ADN fourni qui doit réussir à arriver au site de la coupure de façon indépendante à CRISPR/Cas9. Dans le troisième article de ce «*break'd!*» les auteurs ont voulu améliorer l'adressage du morceau d'ADN pour augmenter ses chances d'insertion au site de coupure (voir *break* #3). Ils ont imaginé attacher cette séquence d'ADN à CRISPR/Cas9 pour que tous les composants nécessaires au changement de la séquence mutante arrivent en même temps. L'idée a été de construire une parti-

cule qui contient aussi bien CRISPR/Cas9 que le morceau d'ADN, tenus ensemble par une association qu'on peut comparer à un bouton pression. Avec ce nouveau système nous avons maintenant un outil qui permet plus efficacement de couper un gène mutant pour le détruire et de le remplacer par un morceau d'ADN sain. L'immense potentiel de ce nouvel outil moléculaire a déclenché un raz de marée d'idées au-delà de la guérison des maladies génétiques. Dans le quatrième article de cette édition de «*break'd!*» (voir *break* #4) les chercheurs ont imaginé son utilisation pour cibler les populations de moustiques porteurs du parasite responsable de la malaria et ralentir voire arrêter leur prolifération. L'idée a été de trouver des gènes essentiels pour la fertilité des moustiques, puis d'insérer grâce à CRISPR/Cas9 un gène conducteur (gène qui force sa transmission à la descendance et défie les lois mendéliennes) à la place du gène de fertilité. Dès que ce gène conducteur est transmis à un moustique, il va forcer son insertion dans l'autre copie normale du même gène et ainsi sera transmis à tous les descendants. Les chercheurs ont combiné cela à une autre astuce leur permettant de s'assurer qu'à chaque génération de plus en plus de moustiques devenaient stériles, porteurs de la mutation. Le système CRISPR/Cas9 est sans conteste une étape clé vers la réalisation de la thérapie génique. Cependant il reste des barrières importantes à ne pas sous-estimer. Réussir à envoyer la machine d'édition du génome dans les cellules dans lesquelles on souhaite agir en est une. Si la cornée présentée dans le deuxième article de ce «*break'd!*» est une cible relativement facile, parce qu'accessible et sans système immunitaire agressif qui élimine les corps étrangers, la plupart des tissus de notre corps n'ont pas ces mêmes accès facilités. Mais CRISPR/Cas9 a mis le vent aux poupes et le navire déchire les flots vers la médecine personnalisée. On peut imaginer qu'à terme ce seront des considérations économiques plutôt que scientifiques qui freineront les réalisations.

A PROPOS DE L'AUTEUR:

Nom

Martine Collart

Position

Professeure ordinaire

Institution

Université de Genève
Genève, Suisse

PIRATER LE MÉTABOLISME DU TRYPTOPHANE PERMETTRAIT DE CONTRER LA NEURODÉGÉNÉRESCENCE

4

L'avoine, les pruneaux, le thon, le lait, le poulet, le pain, les cacahuètes et le chocolat sont des aliments fabuleux qui enrichissent nos plats quotidiens. Mais en plus de leurs propriétés gustatives, ce sont également des sources importantes de tryptophane. Le tryptophane est un acide aminé utilisé par les cellules comme bloc de construction pour la synthèse de protéines, ou comme précurseur dans diverses voies métaboliques. La sérotonine – qui agit comme stabilisateur naturel de notre humeur – est par exemple produite à partir du tryptophane absorbé dans notre alimentation. Cependant, la grande majorité du tryptophane ingéré est utilisé dans un processus métabolique appelé voie de la kynurénine. Les produits finaux de ce procédé servent notamment de filtre ultraviolet (UV) pour nos yeux, protégeant la rétine des dommages créés par les UV, et sont également utilisés par les cellules dans une diversité d'autres réactions fondamentales. Plus intéressant, plusieurs produits intermédiaires (métabolites) de la voie de la kynurénine peuvent avoir des effets néfastes ou à l'inverse protecteurs pour les cellules nerveuses. En effet, cette voie métabolique peut être divisée en une partie «néfaste» ou toxique au cours de laquelle sont produits la 3-hydroxykynurenine et l'acide quinolinique ; et une partie «bénéfique» ou protectrice qui produit l'acide kynurénique (KYNA).

Les troubles neurodégénératifs sont un terme générique regroupant plusieurs pathologies humaines caractérisées par une dégénérescence progressive des neurones, aboutissant finalement à leur mort, dans certaines régions particulières du cerveau. Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington – pour lesquelles il n'existe pas de traitement – sont quelques exemples de ces pathologies. Bien que les patients atteints de ces maladies présentent des signes cliniques spécifiques, toutes sont caractérisées par des niveaux anormaux de certains métabolites de la voie de la kynurénine. En effet, alors qu'en cas de bonne santé un équilibre est maintenu entre les «mauvais» et «bons» métabolites, un déséquilibre vers

la production de métabolites néfastes est observé dans le cerveau des patients atteints. Cette observation soulève des questions intéressantes: est-il possible d'intervenir pour diminuer la production de «mauvais» métabolites et augmenter les niveaux de «bons» métabolites? Ceci pourrait-il constituer une piste thérapeutique pour traiter ces maladies dévastatrices?

Nous avons besoin d'un modèle simple mais fiable pour étudier cette question et la mouche *Drosophila melanogaster* constitue un système robuste utilisé depuis de nombreuses décennies pour étudier différents processus cellulaires pertinents pour les maladies humaines. Fait intéressant, les drosophiles ne développent pas de maladies neurodégénératives, mais celles-ci peuvent la plupart du temps être artificiellement reproduites par insertion des gènes humains défectueux dans le génome des mouches et utilisation d'outils génétiques et moléculaires appropriés.

Nous nous sommes intéressés à la façon dont l'alimentation pouvait améliorer la santé de drosophiles présentant les symptômes de la maladie de Huntington. Nous avons constaté qu'un régime enrichi en tryptophane les protégeait de la dégénérescence neuronale en modifiant le métabolisme de la kynurénine vers la production du «bon» métabolite qu'est le KYNA. De même, une amélioration des symptômes liés à la maladie de Huntington a été observée après augmentation de la concentration de l'enzyme responsable de la production de KYNA. Le «bon» métabolite peut donc contrecarrer les effets des «mauvais», empêcher les cellules de mourir et ainsi améliorer la santé des mouches.

Est-il possible d'augmenter le niveau du métabolite protecteur dans les mouches d'une autre manière? Nous avons démontré que l'inhibition de deux enzymes clé de cette voie, appelées TDO et KMO, permettait d'obtenir cet effet. Cette modification provoque la réversion de plusieurs symptômes, non seulement dans le modèle de la maladie de Hun-

tington, mais aussi dans les modèles des maladies d'Alzheimer et de Parkinson. En outre, les médicaments bloquant les activités TDO et KMO réduisent la mort neuronale ainsi que d'autres symptômes présentés par ces modèles de mouches.

La population mondiale vivant de plus en plus longtemps, le nombre de personnes atteintes de ces troubles neurodégénératifs est malheureusement en constante augmentation. Ces résultats intéressants démontrent que la modulation de la voie de la kynurénine constitue une piste thérapeutique prometteuse pour la conception et le développement de médicaments qui pourraient retarder l'apparition et réduire les symptômes dans de nombreux troubles neurodégénératifs.

A PROPOS DE L'AUTEUR:

Nom

Carlo Breda

Position

Chercheur postdoctoral

Institution

**Université de Leicester
Leicester, UK**



Ce texte est une traduction du break «Hacking the tryptophan metabolic process to reduce neurodegeneration» écrit à l'origine par Carlo Breda et publié sur TheScienceBreaker (<https://doi.org/10.25250/thescbr.brk045>). Ce texte est mis à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons CC BY-SA 4.0



NOUVEAU TRAITEMENT CONTRE LES MALADIES HÉRÉDITAIRES CAUSANT LA CECITE

La cornée est comme une fenêtre à l'avant de l'œil par laquelle passe la lumière et qui nous permet de voir clairement. Les dystrophies cornéennes, qui entraînent une perte de cette transparence essentielle, sont un groupe de maladies oculaires héréditaires entraînant la cécité et pour lesquelles il n'existe pas de traitement. Ces maladies s'aggravent tout au long de la vie jusqu'à ce que la vue soit totalement perdue. Les soins médicaux, permettent, au mieux, de réduire l'inconfort et la douleur, mais la seule option thérapeutique disponible est la greffe de cornée qui n'est proposée que lorsque la vision est presque déjà perdue. La chirurgie de transplantation échoue souvent en raison d'une récurrence de la maladie.

6 Notre groupe, en collaboration avec le groupe d'Andrew Nesbit de l'Université d'Ulster en Irlande du Nord, développe une approche novatrice pour traiter ces maladies avant que la vision ne soit perdue. Nous utilisons une nouvelle technique de modification génétique qui permet de corriger l'erreur dans l'ADN des cellules oculaires du patient.

On peut imaginer l'ADN comme un long brin d'informations codées par un langage composé de 4 lettres (appelées nucléotides). L'information est stockée dans des tronçons d'ADN appelés «gènes» qui sont composés d'une séquence précise de ces «lettres». Les patients atteints de ce type de maladies oculaires héréditaires n'ont souvent qu'une seule erreur de lettre dans une copie d'un de leurs 25'000 gènes.

Souvenez-vous que l'on reçoit une copie d'un gène de notre mère et l'autre copie de notre père. Dans le cas présent, le gène d'un parent fonctionne parfaitement bien, mais la copie qui provient de l'autre parent est endommagée et prioritaire sur la copie normale: on dit qu'elle est dominante. Ces types de maladies sont appelées maladies héréditaires dominantes et elles peuvent toucher diverses parties du corps, pas seulement nos yeux.

Le but de notre recherche est de supprimer la copie endommagée, en ne laissant que la copie normale, ce qui restaure la vision chez ces patients. La même approche, une fois mise au point, peut être appliquée à d'autres maladies ayant un profil héréditaire dominant similaire, comme la maladie de Huntington et la neurofibromatose.

Nous le faisons à l'aide d'un outil moléculaire prometteur, appelé CRISPR/Cas9, qui fait de l'édition de gènes une véritable réussite dans le domaine médical. CRISPR/Cas9 agit comme une paire de ciseaux moléculaires qui peuvent être guidés très précisément pour couper à un endroit exact parmi les 3 milliards de lettres qui composent l'ADN de nos cellules.

Pour ce faire, la protéine CRISPR/Cas9, modifiée par génie génétique, se déplace le long des molécules d'ADN en les scannant jusqu'à ce qu'elle trouve une courte séquence signal de 3 lettres à laquelle elle se lie. Elle examine ensuite les 18-20 lettres adjacentes pour voir si elles correspondent à la séquence qu'elle est supposée rechercher. Si la protéine CRISPR/Cas9 i) trouve le bon signal de 3 lettres et ii) trouve la séquence adjacente correspondante, alors les ciseaux moléculaires coupent l'ADN - dans notre cas le mauvais gène.

Nous avons pu utiliser ce système pour amener ces ciseaux moléculaires à couper le gène responsable de la dystrophie cornéenne d'un patient. Il a toutefois fallu nous assurer que les ciseaux ne coupent que le gène contenant l'erreur et pas le bon gène.

Pour la majorité des dystrophies cornéennes, la différence entre la copie endommagée et la copie fonctionnelle du gène n'est que d'une seule lettre. Kathleen Christie, une chercheuse-doctorante, a effectué des expériences pour déterminer si CRISPR/Cas9 pouvait faire la différence entre le gène endommagé et le bon gène. De plus, elle a cherché à déterminer si ce changement de lettre unique pouvait être trouvé plus efficacement dans i) la sé-

quence signal de 3 lettres ou ii) la séquence «guide» adjacente de 18-20 lettres présentée aux ciseaux moléculaires.

Etonnamment, nous avons constaté que si le changement de lettre se produisait dans la séquence «guide» de 18-20 lettres présentées aux ciseaux moléculaires, la technique de thérapie génique ne pouvait pas faire la différence entre les copies endommagées et non endommagées du gène. Par conséquent, elle ne pourrait jamais être utilisée en clinique. Par contre, si le changement de lettre (la mutation à l'origine de la maladie) était présent dans la séquence signal détectée par les ciseaux moléculaires, alors une différenciation complète était possible.

Étant donné que les maladies causées par une mutation de l'ADN ne sont pas toutes provoquées par un changement de lettre situé dans la séquence signal, l'approche utilisée dans ces recherches devra être élargie pour s'assurer que la copie endommagée est toujours bien ciblée. Cette nouvelle approche de correction génétique offre une option de traitement unique et permanente qui permettra de restaurer la vision chez ces patients. Il est important de signaler que nos équipes de recherche sont les premières à obtenir la preuve de concept chez des animaux vivants.



Ce texte est une traduction du break «Towards personalised allele-specific CRISPR gene editing to treat autosomal dominant disorders» écrit à l'origine par Tara Moore et publié sur TheScienceBreaker (<https://doi.org/10.25250/thescbr.brk081>). Ce texte est mis à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons CC BY-SA 4.0

A PROPOS DES AUTEURS:

Nom

Tara Moore, PhD

Position

Professeure

Institution

**Université d'Ulster
Ulster, UK**

MODIFIER PRÉCISÉMENT LES GÈNES AVEC DES BLOCS DE LEGO

8

L'ADN est l'élément central de la vie telle que nous la connaissons. On peut l'imaginer comme un long double brin hélicoïdal, composé de séquences d'informations écrites avec quatre «lettres» chimiques appelées nucléotides. Des séquences de lettres spécifiques délimitent des portions d'ADN appelées gènes, qui sont utilisés par la cellule comme références pour décoder l'information contenue dans l'ADN lui-même. La modification génétique, précisément l'acte moléculaire de modifier ces séquences d'ADN, a le potentiel de révolutionner le domaine de la médecine personnalisée. De nombreux problèmes de santé complexes comme la sclérose latérale amyotrophique, l'obésité et la maladie d'Alzheimer ont une composante génétique. La possibilité de corriger ces anomalies pourrait grandement améliorer la qualité de vie de nombreux patients et constituer un nouveau modèle de traitement, qui se ferait en une seule fois plutôt que d'avoir des prescriptions de médicaments à vie.

La modification du génome commence généralement par la création d'une rupture dans le brin d'ADN. Une fois que le brin est cassé, il peut alors être réparé par les mécanismes cellulaires au moyen de deux processus principaux appelés jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) et réparation dirigée par homologie (HDR). Dans la majorité des cas, la NHEJ est utilisée par la cellule pour réparer les cassures. Dans la NHEJ, les brins sont rattachés par tous les moyens possibles en ajoutant et en soustrayant des fragments d'ADN jusqu'à ce qu'une correspondance soit faite. Comme il s'agit d'un mécanisme d'essai et d'erreur, la NHEJ peut modifier la séquence originale parce qu'elle cause de nouvelles mutations indésirables dans le génome. Ces mutations indésirables peuvent mener à toutes sortes de défis pour l'environnement cellulaire, conduisant dans certains cas à la formation de maladies (par exemple, le cancer).

Le second mécanisme de réparation, la HDR, utilise un fragment précis d'ADN comme colle moléculaire pour lier les brins cassés entre eux et agir comme

un modèle pour corriger (ou modifier avec précision dans le cas de la modification de gènes) le génome avec la séquence désirée. Ce processus est souvent appelé chirurgie du génome. La possibilité de favoriser la HDR au détriment de la NHEJ a des implications majeures pour l'adoption de thérapies d'édition du génome en clinique.

Les progrès techniques récents dans le domaine de la modification du génome utilisent une technique révolutionnaire appelée CRISPR/Cas9. Dans ce système, deux composants sont nécessaires pour l'édition: un seul brin d'ARN appelé «ARN guide court» (ARNsg) utilisé pour trouver le gène à modifier dans la séquence d'ADN et un composant protéique, Cas9, qui fonctionne comme une paire de ciseaux moléculaires. Afin de favoriser la chirurgie du génome, un brin d'ADN donneur, qui sera utilisé comme modèle pendant la HDR, doit également être présent. Alors que les deux composantes du CRISPR (Cas9 et ARNsg) peuvent être combinées pour former un complexe plus grand à l'extérieur de la cellule, le brin d'ADN donneur/modèle doit être transporté indépendamment dans la cellule et localisé à l'endroit de la cassure.

Afin de favoriser une chirurgie précise du génome (HDR), nous avons pensé qu'il pourrait être avantageux de créer un système où nous pourrions attacher la machinerie d'édition du génome (Cas9 et ARNsg) avec l'ADN donneur, comme un ensemble de Legos. Ainsi, tout le matériel nécessaire à l'édition du gène serait introduit simultanément dans la cellule et localisé sur le gène à éditer.

Pour construire cet ensemble de Legos, nous avons d'abord modifié le composant ARNsg de la machinerie CRISPR. Cette modification nous a permis d'incorporer une deuxième protéine, la streptavidine, et de former un complexe plus grand pouvant servir de bloc de construction central. Nous avons choisi la streptavidine, car cette protéine est capable de se lier à une molécule appelée biotine (également connue sous le nom de vitamine B7). La biotine

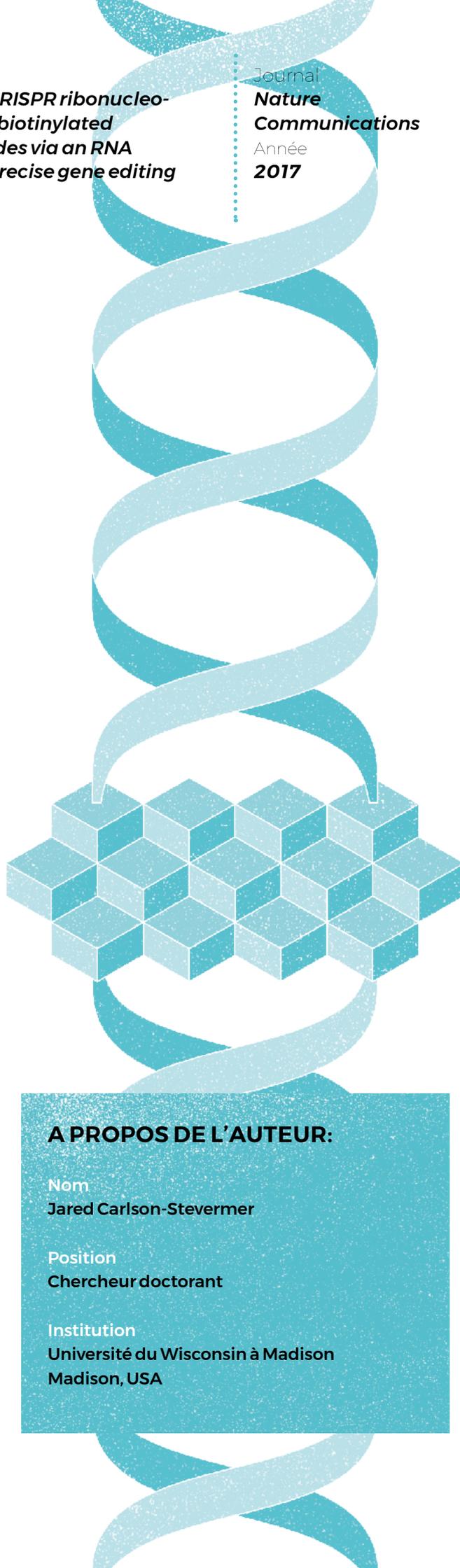
peut être fixée sur de nombreuses molécules biologiques différentes comme l'ADN, d'autres protéines ou des marqueurs fluorescents. Grâce aux propriétés de la streptavidine et de la biotine, nous pouvons coupler un complexe de cas9-streptavidine avec n'importe quelle molécule «biotinylée» et construire un système d'édition de gènes plus grand, en incorporant des composants au besoin.

Dans ces expériences, nous avons attaché une molécule de biotine à l'ADN modèle pour le coupler directement à la machinerie d'édition du génome. Après l'introduction de ce complexe dans les cellules, nous avons constaté que la proportion de chirurgies précises du génome avait été augmentée en moyenne de 10 fois par rapport aux modifications imprécises, inversant ainsi l'équilibre entre ces deux processus. Nous avons également attaché des marqueurs fluorescents au complexe, ce qui a permis de sélectionner, au sein d'une population, les cellules dans lesquelles la modification a réussi.

En résumé, nous avons été en mesure de créer un outil similaire à des Legos, dans lequel différents composants peuvent être attachés à la machinerie d'édition du génome afin de permettre une chirurgie précise du génome. Avec des développements ultérieurs, cet outil pourrait nous aider à surmonter certains des obstacles à l'introduction des techniques de modification du génome dans le domaine clinique et mener à un panel de nouvelles thérapies.



Ce texte est une traduction du break «Lego blocks for precise gene editing» écrit à l'origine par Jared Carlson-Stevermer et publié sur TheScienceBreaker (<https://doi.org/10.25250/thescbr.brk082>). Ce texte est mis à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons CC BY-SA 4.0



A PROPOS DE L'AUTEUR:

Nom

Jared Carlson-Stevermer

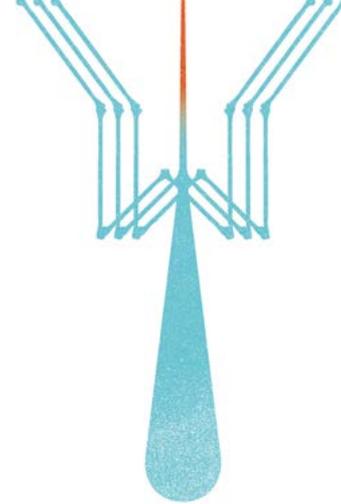
Position

Chercheur doctorant

Institution

**Université du Wisconsin à Madison
Madison, USA**

LUTTER CONTRE LA MALARIA



Les moustiques sont les animaux les plus mortels sur terre. Ils ont fait plus de victimes que toutes les guerres et les épidémies réunies. En effet, ils propagent des maladies invalidantes comme la malaria (ou paludisme), qui touche plus de 200 millions de personnes chaque année. Malgré un effort considérable pour lutter contre cette maladie au cours des deux dernières décennies, il est peu probable que nous éradiquions complètement le paludisme sans de nouvelles actions. Les scientifiques se tournent maintenant vers les outils du génie génétique pour trouver de nouvelles solutions.

La malaria est causée par un parasite, *Plasmodium falciparum*, qui a besoin de se développer à la fois chez l'homme et le moustique pour survivre.

10 Si le développement du parasite dans le moustique est rendu impossible, nous pourrions stopper la propagation du paludisme. Les progrès récents du génie génétique ont rendu cela possible en introduisant dans le moustique de nouveaux caractères qui affectent sa propre survie, ou sa capacité à porter le parasite. Le problème n'est plus le processus d'ingénierie, mais la façon de répandre cette modification dans les moustiques sauvages.

Pour expliquer le problème, il faut considérer ce qui arrive à une modification génétique au fil du temps. Toute modification que nous apportons à un chromosome de moustique est héréditaire comme n'importe quel autre gène. Tout comme nous, les moustiques contiennent deux copies de chaque chromosome et chacun de leurs descendants n'hérite que d'une seule des deux copies. Si quelques moustiques modifiés génétiquement étaient relâchés dans la nature, cette modification ne se répandrait pas parce qu'elle ne serait transmise qu'à la moitié de la progéniture.

En 2003, le professeur Austin Burt a proposé une méthode prometteuse pour surmonter ce problème en utilisant ce qu'on appelle le «forçage génétique». Il s'agit de modifications génétiques qui peuvent se propager à travers une population entière en biai-

sant leur propre hérédité. Cela signifie que de telles modifications l'emporteront sur les lois classiques d'hérédité mendélienne. Ce mécanisme est également appelé «Super-Mendélien». En augmentant les chances de transmission, cette technique permet de garantir qu'avec le temps un nombre croissant de moustiques auront acquis la modification.

En nous inspirant de la théorie originale de Burt, nous avons utilisé une paire de ciseaux moléculaires appelés «CRISPR» pour concevoir des gènes capables de forcer leur transmission à travers un mécanisme de copier-coller. Un de ces gènes, édité avec CRISPR, a été inséré dans une région spécifique à l'intérieur d'un chromosome du moustique *Anopheles gambiae* et programmé pour couper son chromosome partenaire non modifié.

Lorsque le chromosome cassé est endommagé, il se répare aussi précisément que possible en utilisant le chromosome partenaire modifié comme modèle, mais en le faisant, il copie involontairement le gène qui a été édité. De cette façon, peu importe laquelle des deux copies chromosomiques est héritée parce que le gène modifié est présent sur les deux. Étonnamment, nous avons vu que nos moustiques passeurs de gènes ont transmis la modification à plus de 99% de leur progéniture !

Dans notre laboratoire, nous avons conçu trois gènes différents capables de rendre les moustiques stériles par cette technique de «forçage». Cela semble bizarre, car il ne devrait pas être possible de répandre les allèles modifiés si les moustiques sont incapables de produire des descendants, non ? Nous y sommes parvenus en programmant les gènes pour qu'ils n'affectent que les moustiques femelles et seulement lorsque les deux parents ont été modifiés. Ainsi, la modification génétique n'a pas d'effet néfaste lorsqu'un seul des parents est porteur, ce qui lui permet de se propager lorsque les moustiques modifiés s'accouplent à ceux qui vivent dans la nature. Pour vérifier cette hypothèse, les moustiques porteurs de l'un des trois gènes ont été relâchés dans une cage de moustiques non modifiés et leur

reproduction a été suivie au fil du temps. A chaque génération, de plus en plus de moustiques étaient porteurs de la modification, montrant pour la première fois qu'un gène peut être conçu pour envahir la population naturelle d'insectes dangereux.

Si les moustiques porteurs de cette modification génétique sont relâchés dans la nature, on estime qu'ils pourraient se propager dans toute une population en l'espace de 20 à 30 générations. Comme les moustiques se reproduisent très rapidement, cela pourrait ne prendre que quelques années en partant d'un petit nombre d'insectes libérés. Le gène modifié s'insérant dans un nombre croissant de moustiques, l'accouplement entre deux porteurs de la modification deviendra de plus en plus fréquent et entraînera l'apparition de moustiques femelles stériles. Cela entraînera un effondrement de la population et réduira potentiellement le nombre de moustiques à l'origine de piqûres, en deçà du seuil critique nécessaire pour favoriser la transmission continue du paludisme.

Un problème crucial pour lutter contre la malaria est de fournir des interventions efficaces à ceux qui en ont le plus besoin. Avec la technique de forçage génétique, les moustiques font eux-mêmes le travail. Cette intervention autosuffisante, spécifique aux espèces et effective à long terme pourrait être utilisée pour renforcer les stratégies de lutte actuelles comme les moustiquaires, les insecticides et les vaccins en développement. Le forçage génétique est peut-être la dernière intervention nécessaire pour faire basculer la lutte contre le paludisme en notre faveur. Nous voulons faire du paludisme une maladie du passé.

A PROPOS DES AUTEURS:

Nom
Andrew Hammond, PhD
Position
Chercheur postdoctoral

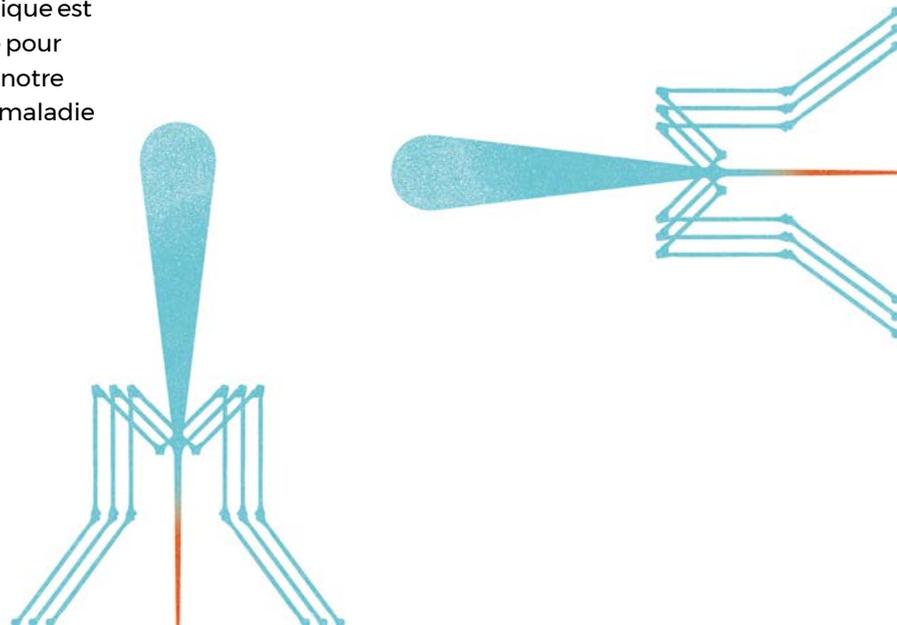
Nom
Xenia Karlsson
Position
Etudiante master

Nom
Ziyin Wang
Position
Etudiant master

Institution
Imperial College London
London, UK



Ce texte est une traduction du break «Driving down malaria» écrit à l'origine par Andrew Hammond, Xenia Karlsson, Ziyin Wang et publié sur TheScienceBreaker (<https://doi.org/10.25250/thescbr.brk053>). Ce texte est mis à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons CC BY-SA 4.0





LE CLONAGE D'UN GÈNE

Créez dans votre classe un organisme génétiquement modifié!

L'expérience

Dans cette expérience, deux plasmides sont à votre disposition. Le premier contient un gène codant pour un marqueur de résistance à un antibiotique, le chloramphénicol. Ce gène sera récupéré par restriction et inséré (ligué) dans un autre plasmide, dit receveur, qui lui-même possède déjà une résistance à un autre antibiotique, l'ampicilline.

Le produit de la ligation sera ensuite introduit dans une bactérie. Seules les bactéries ayant reçu le nouveau plasmide pourront pousser sur un milieu de culture contenant les deux antibiotiques.

Attention à ne pas confondre le clonage moléculaire avec le clonage reproductif (créer un individu génétiquement identique à un autre) ou le clonage thérapeutique (fabriquer des tissus à partir de cellules souches). Le clonage moléculaire est très utile puisqu'il permet la fabrication de nombreux médicaments comme l'insuline humaine, produite par des bactéries!

Mots clés

Clonage moléculaire, plasmide, cellule hôte, restriction, ligation, transformation bactérienne, organisme génétiquement modifié.

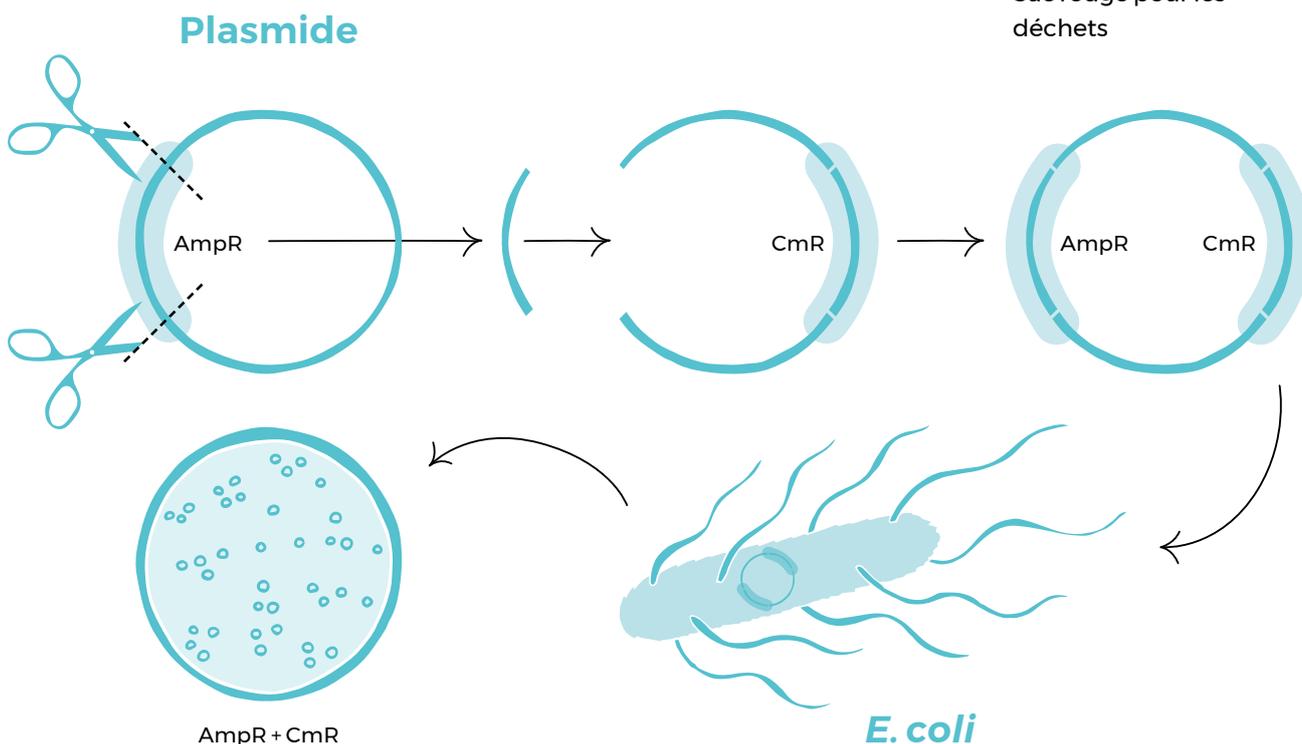
Pour aller plus loin...

Vous pouvez lire le protocole expérimental complet et réserver le matériel sur www.bioutils.ch/protocoles/3-clonage-dun-gene

Matériel

- Micropipettes P20
- Micropipettes P200
- Boîte de pointes jaunes
- Bloc chauffant
- Boîte tubes Eppendorf 1,5 ml
- Portoir tubes Eppendorf
- Bouteille d'eau stérile
- Boîtes de Petri LA + X-Gal + chloramphenicol
- Boîtes de Petri LA + X-Gal + ampicilline + chloramphenicol
- Boîtes de Petri LA + X-Gal
- + ampicilline
- Plasmide pUC19
- Plasmide pHP45-cmR
- Enzyme de restriction BamHI
- Tampon de digestion
- ADN ligase
- Tampon de ligation
- Cellules compétentes *Escherichia coli*
- Boîte pipettes Pasteur pour les étalements
- Milieu LB liquide
- Sac rouge pour les déchets

12



Crédits

Le contenu de cette édition de *break'd!* a été édité par la plateforme de communication en Sciences de la vie BiOutils (Université de Genève), en collaboration avec la plateforme d'édition pour le grand public TheScienceBreaker (Université de Genève), et l'enseignant Dr. Pierre Brawand (Collège Rousseau, Département de l'instruction publique, Genève). Le design visuel du mini-magazine a été développé par le Laboratorio cultura visiva (Scuola universitaria professionale della Svizzera italiana, SUPSI). Le projet a été financé par le Fonds national suisse de la recherche scientifique (Agora).

Responsable de la publication

Prof. Patrick Linder, UNIGE

Comité éditorial

Massimo Caine, UNIGE
Dr. Karl Perron, UNIGE
Dr. Pierre Brawand, DIP

Sélection des articles

Massimo Caine
Dr. Karl Perron
Dr. Pierre Brawand

Rédaction des articles

Dr. Carlo Breda
Prof. Tara Moore
Jared Carlson-Stevermer
Dr. Andrew Hammond
Xenia Karlsson
Ziyin Wang

Édition des articles

Massimo Caine
Dr. Carlos Rivera-Rivera

Traduction des textes

TranslationBunny - Bunny Inc.
Dr. Margot Riggi
Aurélia Weber

Rédaction de l'éditorial

Prof. Martine Collart

Conception et réalisation graphique

Giancarlo Gianocca
Laboratorio cultura visiva, SUPSI

Avec le soutien
du laboratoire
du Dr. Karl Perron
et de l'équipe
de BiOutils



Scuola universitaria professionale
della Svizzera italiana

SUPSI



FONDS NATIONAL SUISSE
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

