

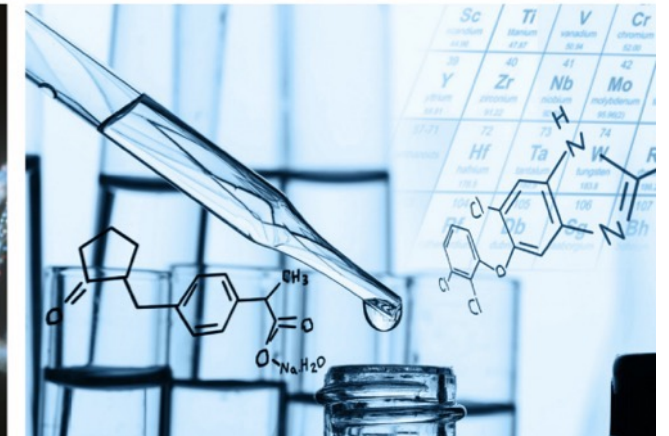
CRISPR/Cas9 en 2022

Les techniques incontournables en laboratoire



Cours en ligne
20.10.2022

Dre Claudia Simoes Avello
Responsable UFA



Sommaire

Partie 1 : 40 min

- Introduction à CRISPR/Cas9
- Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9
 - 1) Design d'expérience
 - 2) Mise en culture
 - 3) Design d'ARNguide
 - 4) Clonage
 - 5) Transfection
 - 6) Tests sur des protéines
- Quiz
- Questions et réponses

Sommaire

Partie 1 : 40 min

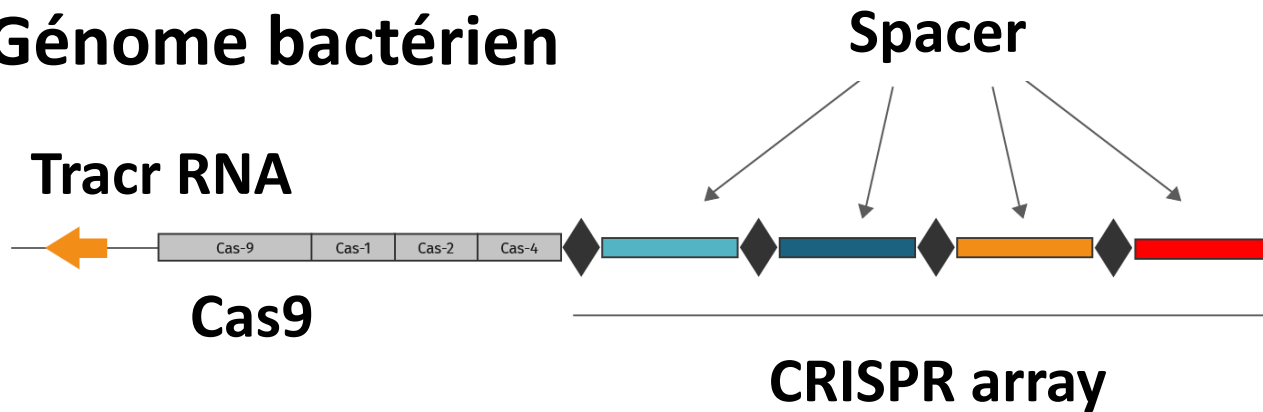
- Introduction à CRISPR/Cas9
- Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9
 - 1) Design d'expérience
 - 2) Mise en culture
 - 3) Design d'ARNguide
 - 4) Clonage
 - 5) Transfection
 - 6) Tests sur des protéines
- Quiz
- Questions et réponses

Partie 2 : 10 min

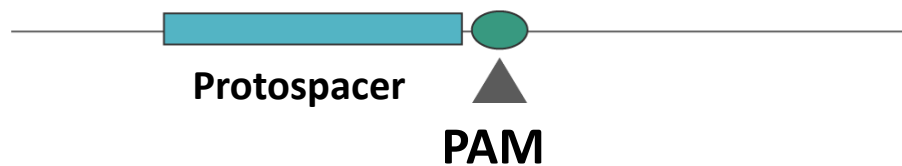
- Programme de formation
- Questions et réponses

Introduction à CRISPR/Cas9

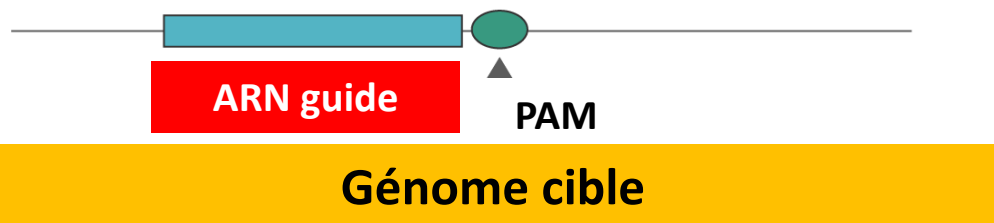
Génome bactérien



Génome viral



Génome cible (eucaryote)



C lusters of
R egularly Spaced
I nterspersed
S hort
P alindromic
R epeats

Introduction à CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 appliquée aux cellules eucaryotes



Jinek et al. (2012) Science 337: 816

The Nobel Prize in Chemistry 2020



© Nobel Prize Outreach. Photo: Bernhard Ludewig
Emmanuelle Charpentier
Prize share: 1/2



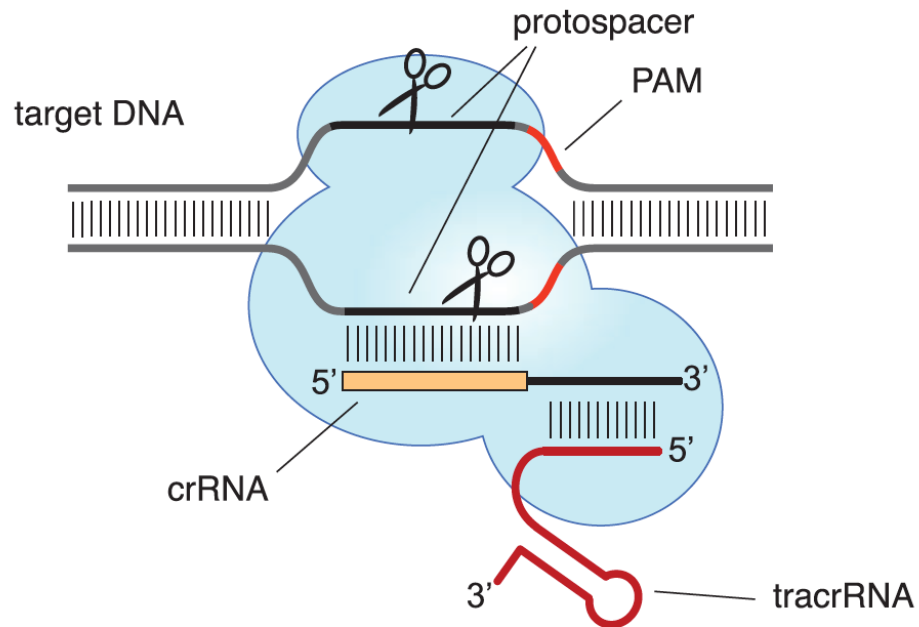
© Nobel Prize Outreach. Photo: Brittany Hosea-Small
Jennifer A. Doudna
Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Chemistry 2020 was awarded jointly to Emmanuelle Charpentier and Jennifer A. Doudna "for the development of a method for genome editing."

Introduction à CRISPR/Cas9

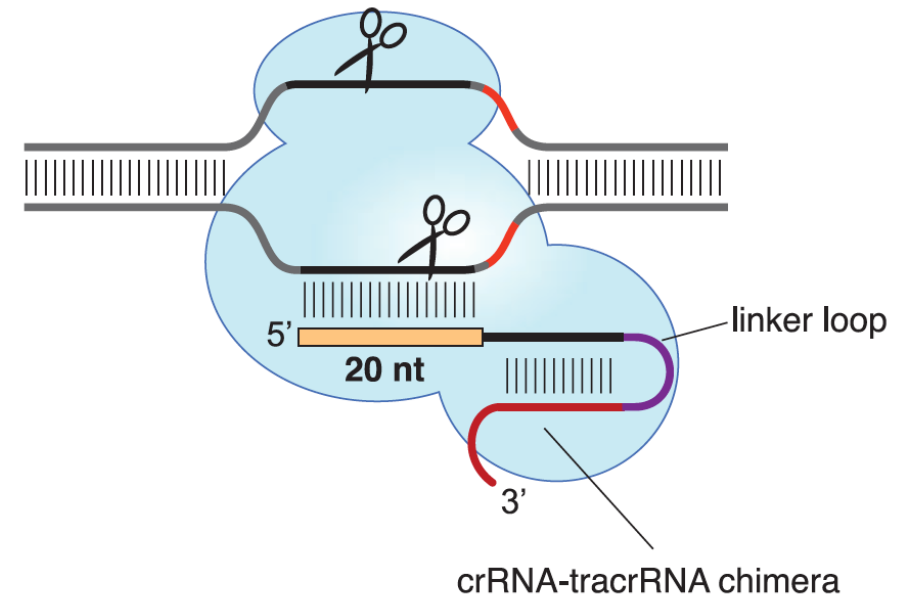
Bactéries

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cellules eucaryotes

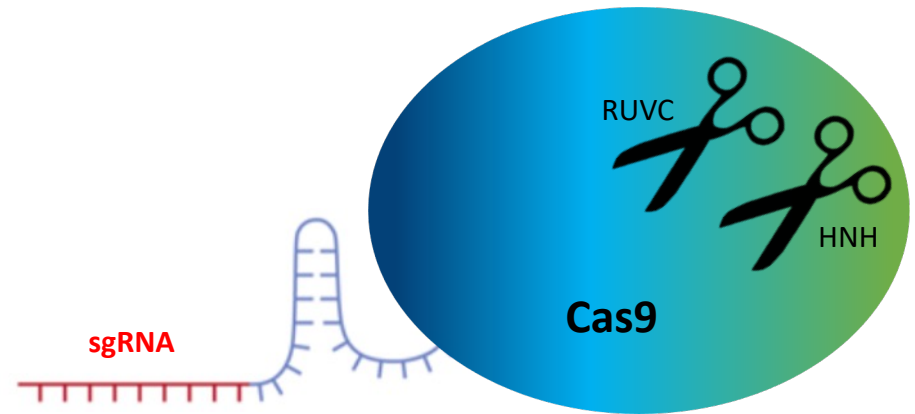
Cas9 programmed by single chimeric RNA



Introduction à CRISPR/Cas9

Applications de CRISPR/Cas9

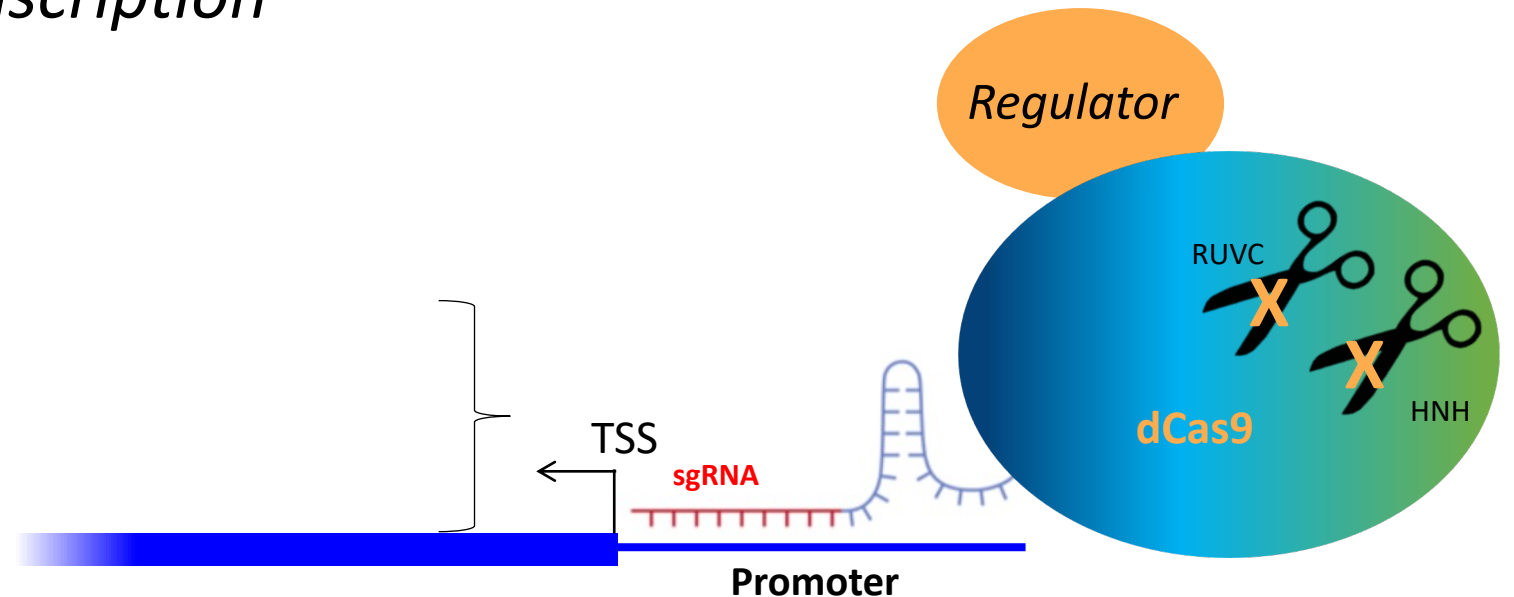
- CRISPR *knockout*
- CRISPR *mutation*
- CRISPR *knockin*



Introduction à CRISPR/Cas9

Applications de CRISPR/Cas9

- CRISPRi: *Silence transcription*
- CRISPRa: *Activate transcription*
- CRISPR *regulation*



Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

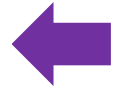
Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP
Clonage

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNguides

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage



5) Transfection

Méthode

Analyse

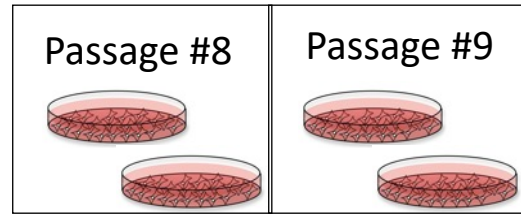
Sélection cellules *KO*

6) Tests cellulaires

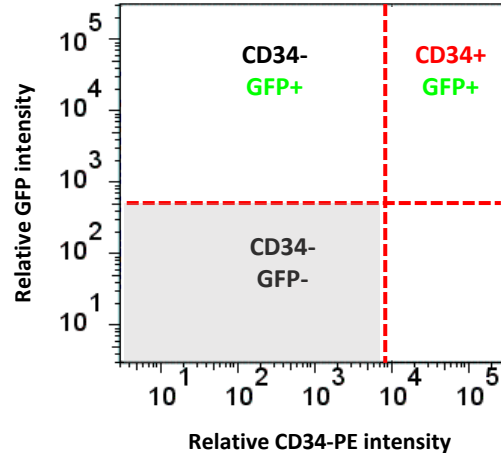
Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*

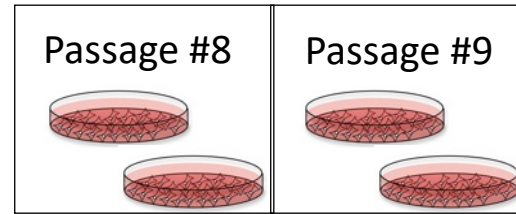
1) Design d'expérience



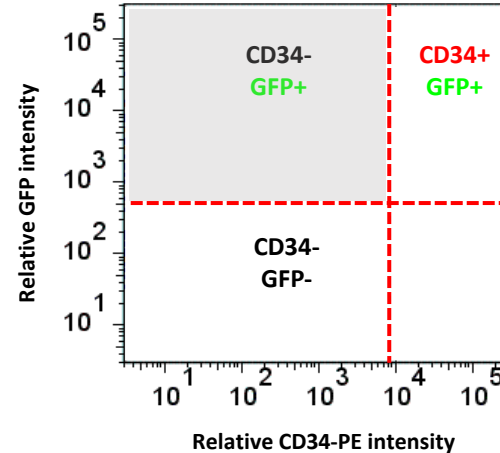
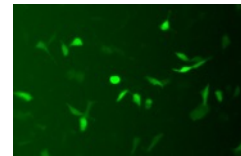
Non-transfected



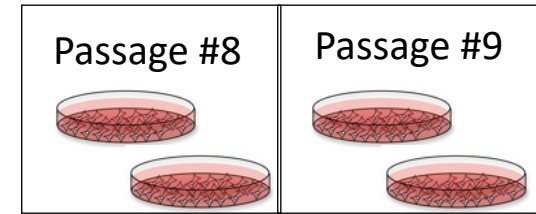
Control
RNA



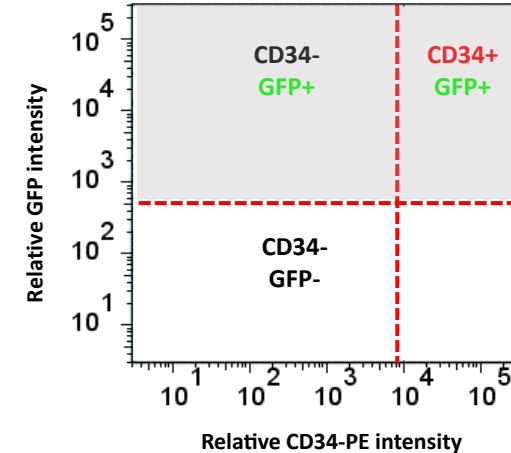
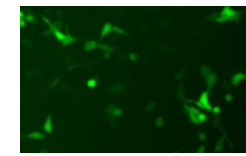
dCas9-VP160-GFP +
NS gRNA



CRISPR control
RNA



dCas9-VP160-GFP
+ 6 gRNA's



CD34 CRISPR
RNA

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNguides

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage



5) Transfection

Méthode

Analyse

Sélection cellules *KO*

6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie

Rôle du gène *KO*

2) Mise en culture

- Cellules
 - Cellules immortalisées
 - Cellules primaires
 - Prélèvements
- Conditions de culture
 - Atmosphère
 - Milieu de culture
 - Suppléments (glucose, AA, FBS, antibiotiques...)
- Solubilité des composés ajoutés (co-solvants)
- Qualité des cellules
 - Numéro de passage
 - Contaminations (Mycoplasmes !)

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

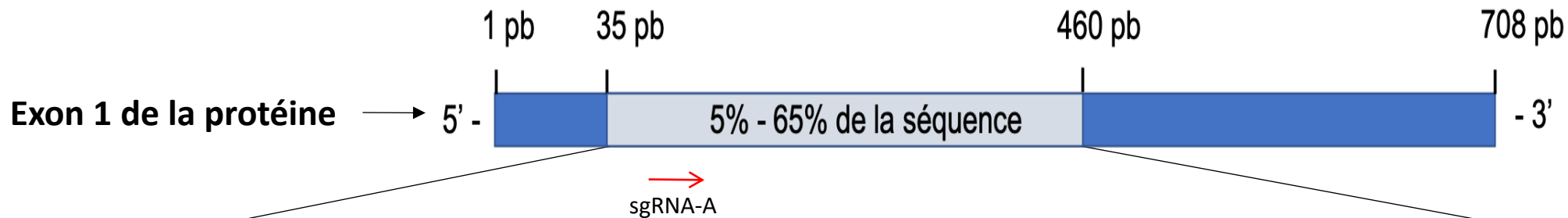
Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

3) Design d'ARNGuide

Caractéristiques de la séquence d'ARNGuide pour un *knockout*

- La séquence de **20 nt** est **unique** dans le génome de l'espèce d'intérêt
- La séquence est immédiatement adjacente au PAM (**NGG** pour *S. pyogenes* Cas9)
- La séquence se situe dans la région codante (exon), loin des extrémités N- et C-terminal, entre 5% à 65% de la séquence totale



```
5' CACATGAAACTGTACATGGAGGGCACC GTGAACAACCACCACTTC AAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAA  
GCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAAGATCAAGGTGGTTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACAT  
CCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAGCCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGC  
AGTCCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAGAATCACACATACGAAGACGGGGGCGTGCTGACCGCTACCC  
AGGACACCAGCCTCCAGAACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAACGGGGTGA 3'
```

3) Design d'ARNGuide

Outils

Séquences génomiques:

UCSC genome browser

<https://genome.ucsc.edu/>

Ensemble

<http://www.ensembl.org/index.html>

Design d'ARNGuide:

CRISPOR

<http://crispor.tefor.net/>

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNguides

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



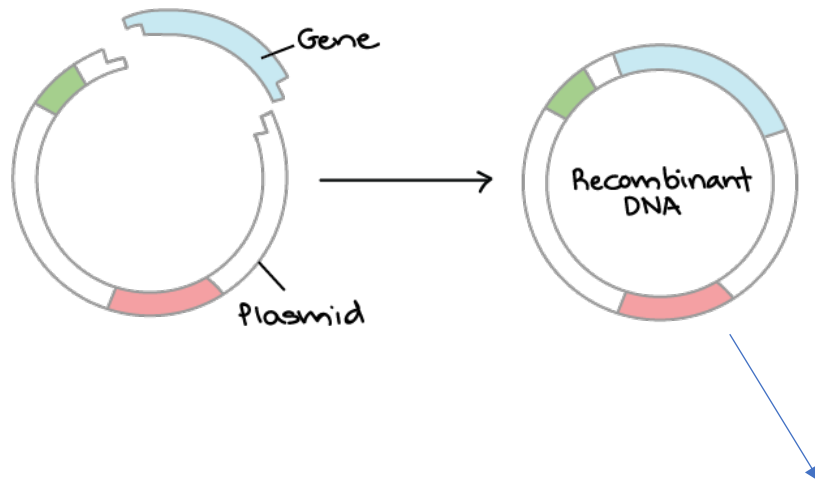
4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

4) Clonage

Clonage moléculaire



≠

Clonage reproductif



**Vecteur de
transfection**

4) Clonage

Types de vecteurs :

- **Plasmide**
- Bactériophage lambda (phage λ)
- Phagemide (type Bluescript)
- Cosmide
- YAC, BAC

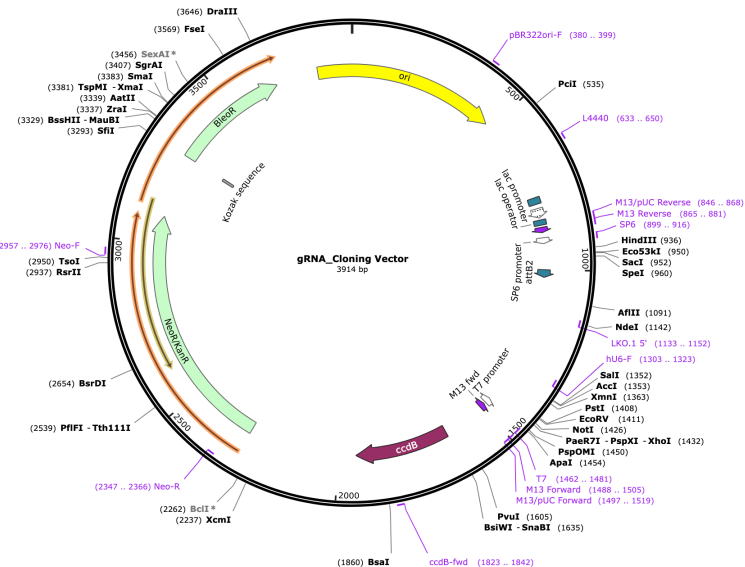
Le choix du vecteur dépend:

- du type de cellule à transfecter
- de la nature de l'ADN
- du type de transfection: transitoire ou stable

4) Clonage

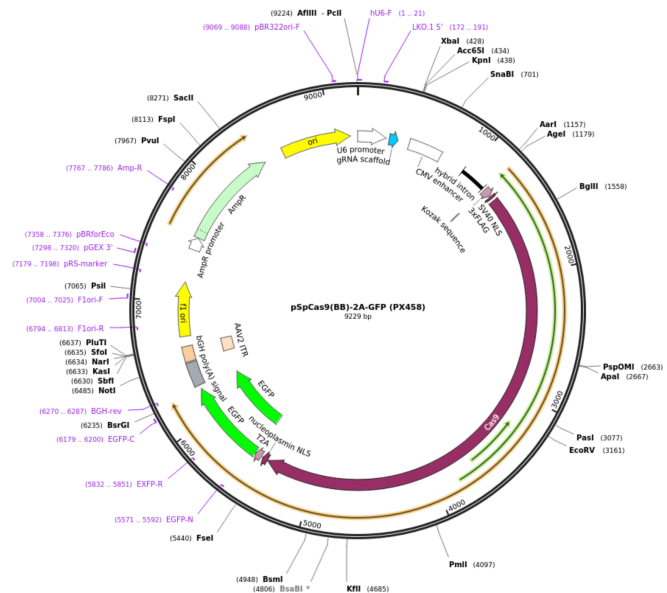
Vecteurs utilisés dans le but de réaliser un *knockout*

ARN guide
addgene.org
#41824



Ajout de la séquence
de 20 nt par clonage

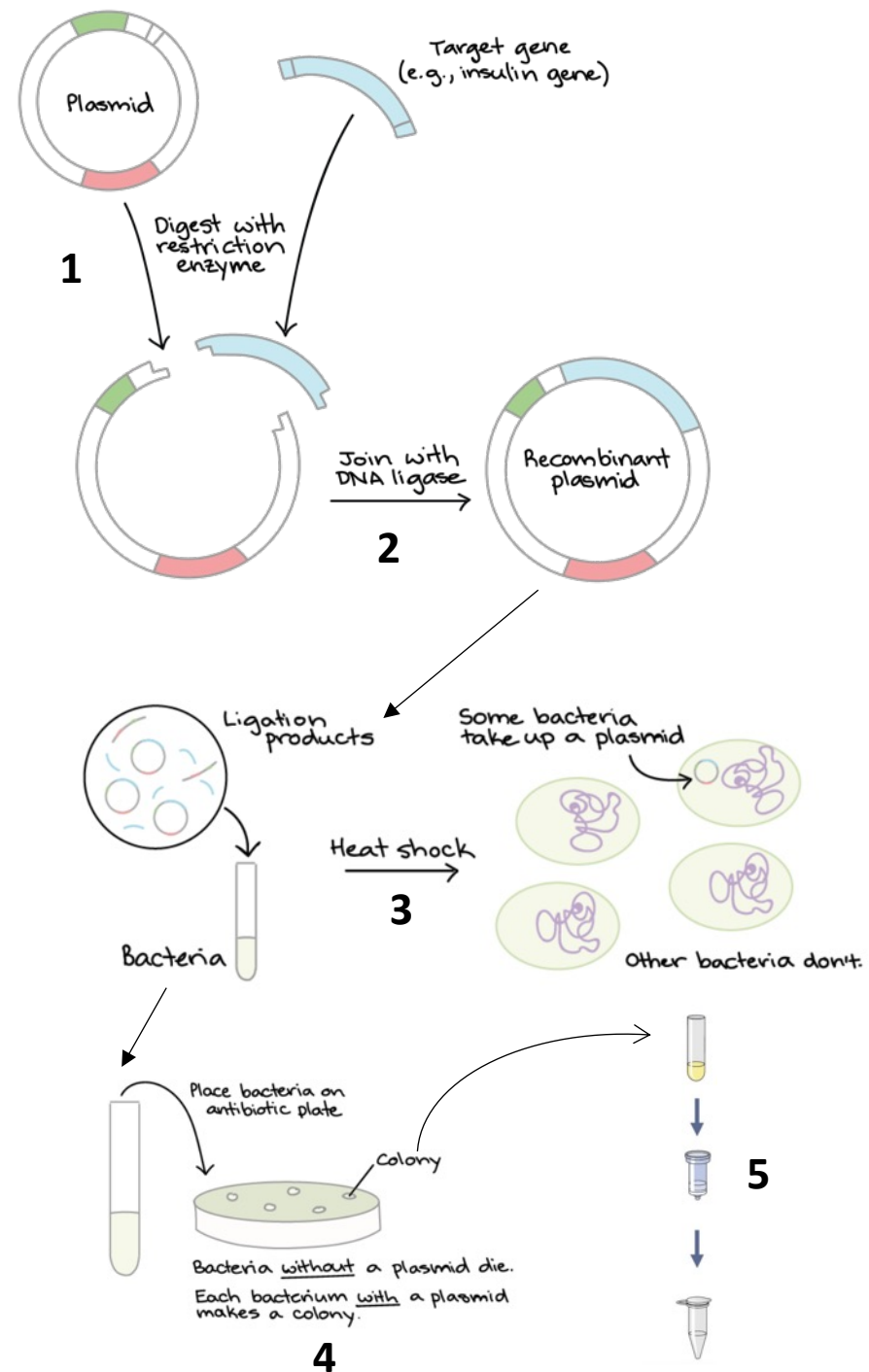
Cas9-T2A-EGFP
addgene.org
#48138



4) Clonage

Etapes d'un clonage moléculaire

1. Obtention des fragments
 - 1.1. Linéarisation du vecteur
 - 1.2. Création du fragment
2. Ajout de l'insert
3. Transformation
4. Sélection de colonies
5. Purification du vecteur recombinant

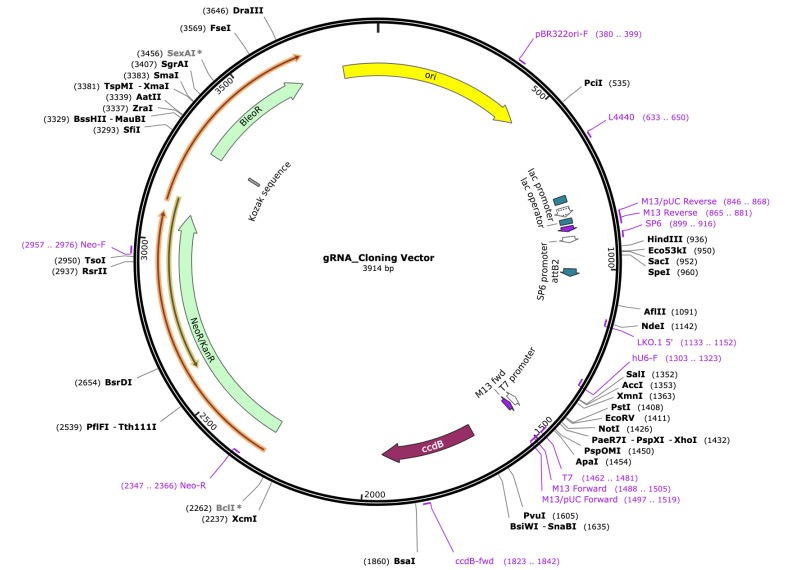


4) Clonage

Outils

Vecteurs

<https://www.addgene.org/>



4) Clonage

Outils

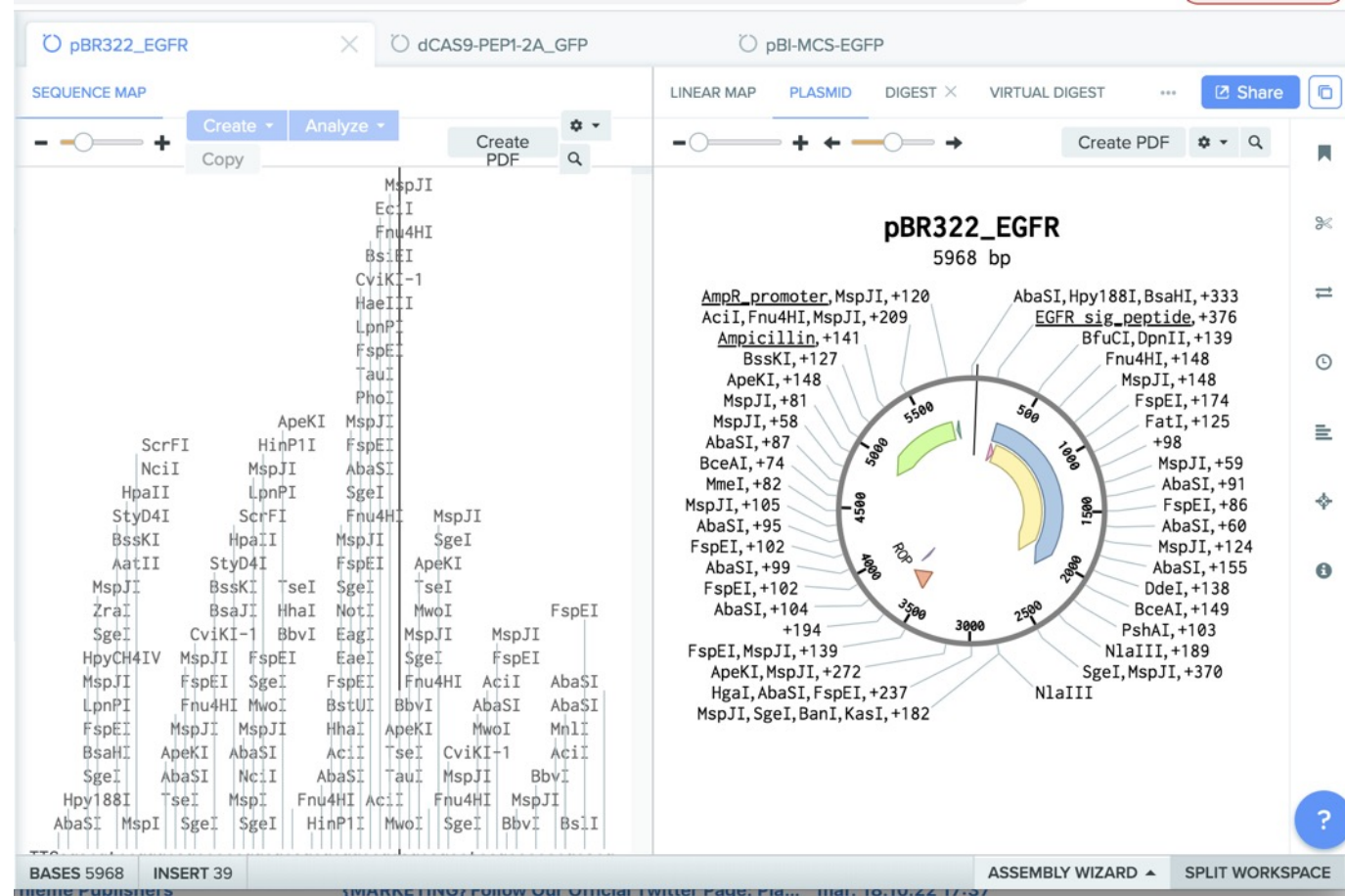
Vecteurs

<https://www.addgene.org/>

Analyse et design des vecteurs

<https://www.benchling.com/>

http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html



4) Clonage

Outils

Vecteurs

<https://www.addgene.org/>

Analyse et design des vecteurs

<https://www.benchling.com/>

http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html

Analyse des résultats de séquençage

<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode

Analyse

Sélection cellules *KO*

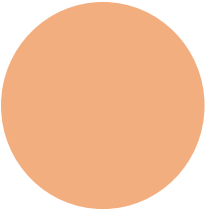


4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

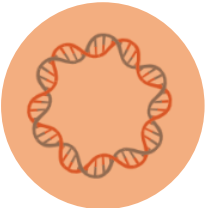
5) Transfection



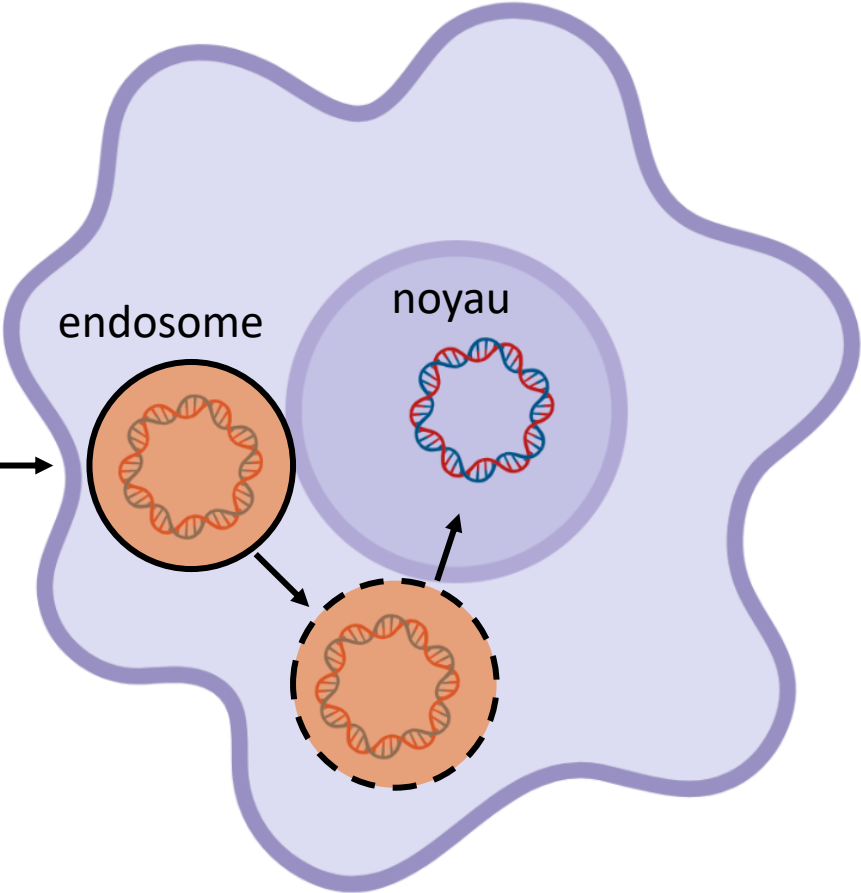
réactif



plasmide



complexe



endosome

noyau

cellule eukaryote

5) Transfection

Méthodes chimiques

- Polymères cationiques: DEAE-Dextrane
- Co-précipitation Calcium-Phosphate
- **Lipofection** (liposomes): Lipofectamine
- Complexes non-lipidiques: FuGENE

Méthodes physiques

- **Electroporation**
- Micro-injection

Méthodes biologiques (transduction)

- Adénovirus
- Lentivirus

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

6) Test sur des protéines

Analyses (semi-) quantitatives et qualitatives

- **SDS page**
- **Western blot**
- FACS
- ELISA
- Binding assays
- **MS des protéines**
- **Réactions enzymatiques** et méthodes de suivi (p. ex. **HPLC**)

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

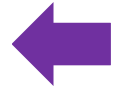
Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP
Clonage

Quiz

1 - Que prendre en considération lors du design d'une expérience ?

- a) Le but de l'expérience
- b) Les techniques à être utilisées
- c) Le nombre des réplicats
- d) Toutes les options sont justes**

2 - À quel mot correspond le C dans CRISPR ?

- a) Crossed
- b) Cluster**
- c) Crying

3 - Comment s'appelle la protéine Cas9 sans activité catalytique ?

- a) Dead Cas9 (dCas9)**
- b) Inactive Cas9 (iCas9)
- c) Silenced Cas9 (sCas9)

4 - Suite à une transfection, les cellules n'expriment pas le vecteur sous forme de protéine. Parmi les causes ci-dessous, laquelle NE JUSTIFIE PAS ce résultat ?

- a) Les cellules sont mortes
- b) Les cellules sont contaminées
- c) Il fait chaud et la salle d'incubateurs n'est pas climatisée**
- d) Mon vecteur contient une séquence erronée

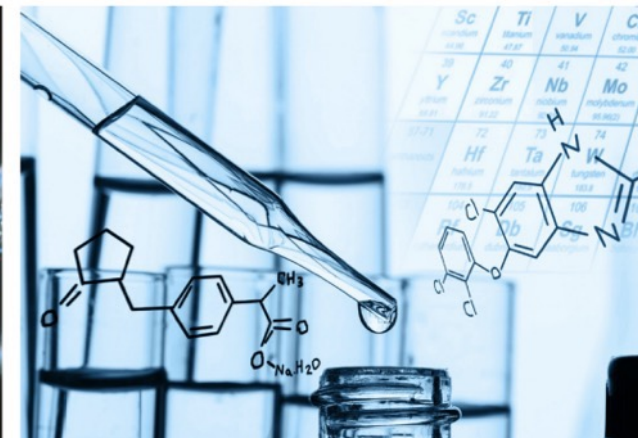
5 - Vous avez des cellules difficiles à transférer. Quelle méthode de transfection choisissez-vous en priorité ?

- a) Electroporation**
- b) Micro-injection
- c) Lipofection

6 - L'HPLC est une technique utile aux biologistes

- a) Vrai**
- b) Faux
- c) Je n'ai aucune idée

Pratiques en laboratoire de chimie et biologie



Pratiques en laboratoire de chimie et biologie



Pour quoi?

- *Pénurie de formation pratique en Suisse*

Pour qui?

- *Tout personnel technique de laboratoire*

Quoi?

- *6 modules pratiques de 2 à 4 jours*

Pratiques en laboratoire de chimie et biologie



MODULE 1 – MÉTHODES EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE



MODULE 2 – CLONAGE DES VECTEURS APPLIQUÉS À CRISPR/CAS₉



MODULE 3 – RÉACTIONS ENZYMATIQUES ET MÉTHODES DE SUIVI



MODULE 4 – CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION : APPLICATIONS CRISPR/CAS₉



MODULE 5 – MÉTHODES EN BIOCHIMIE DES PROTÉINES



MODULE 6 – INITIATION PRATIQUE AU DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE



Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

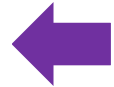
Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP
Clonage

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats

Modules 1-6

2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture

3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences

5) Transfection

Méthode

Analyse

Sélection cellules *KO*

4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie

Rôle du gène *KO*

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture

Modules 1 et 4



3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode

Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences

Module 2



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage



5) Transfection

Méthode

Analyse

Sélection cellules *KO*

6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie

Rôle du gène *KO*

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNguides

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

Modules 1 et 2

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires

Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode

Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

Module 4

Etapes d'une expérience cellulaire CRISPR/Cas9

1) Design d'expérience

Bien définir le but
Choix de la lignée cellulaire
Gène cible

Contrôles et Réplicats



2) Choix de la lignée cellulaire d'origine

Espèce
Organe
Tissu

Mise en culture



3) Design d'ARNGuide

Knockout du gène
Séquence de l'exon
Espèce en question

Obtention des séquences



6) Tests cellulaires Comparaison protéines

Mécanismes de la maladie
Rôle du gène *KO*



5) Transfection

Méthode
Analyse

Sélection cellules *KO*



4) Système CRISPR/Cas9

Vecteurs ou complexe RNP

Clonage

Modules 3, 5 et 6