



Centre National de la Recherche Scientifique

Institut de Génétique Humaine

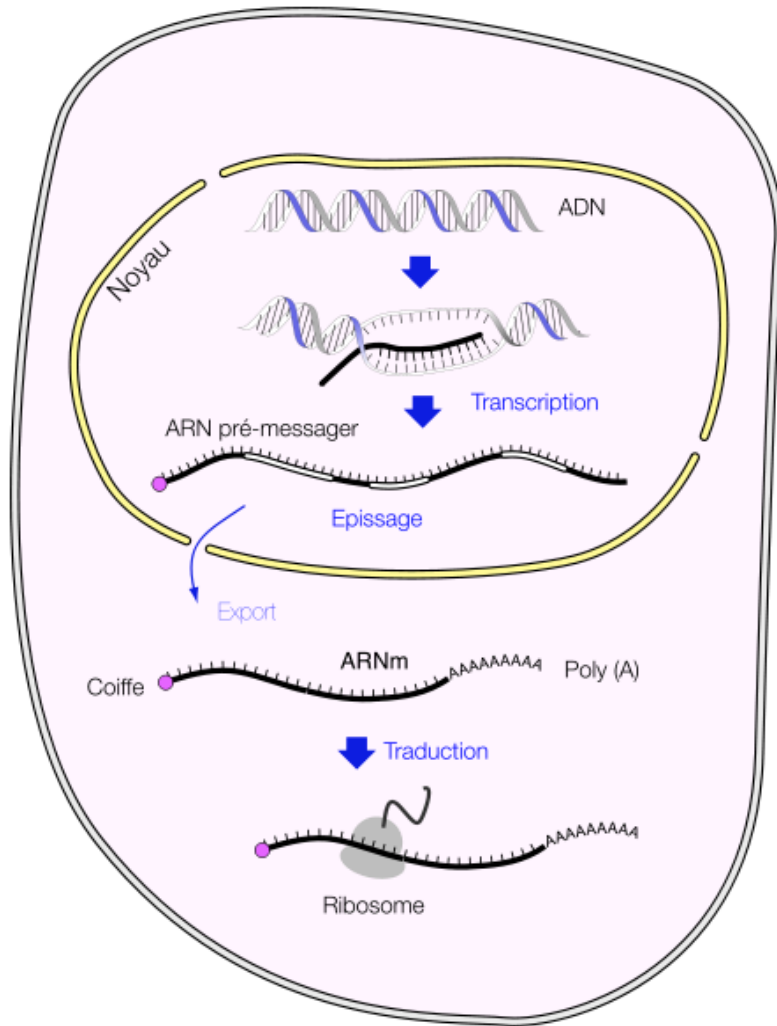


CRISPR/Cas9 : la technique qui fait croustiller la biologie moléculaire

Isabelle Busseau

XXI^{ème} siècle : une nouvelle ère pour la génétique

La vision moléculaire du gène et sa place dans la cellule



Séquençage du génome entier

+

Identification informatique de séquences "typiques" de gènes
(séquences consensus de transcription,
épissage, polyadénylation, traduction...)

+

Séquençage "à haut débit" de tous les ARN

=

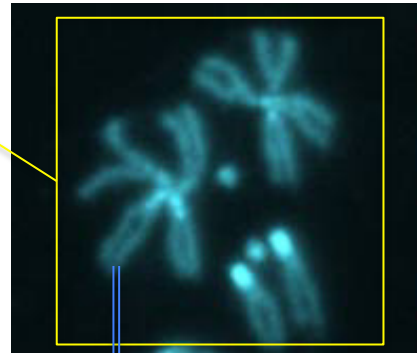
Projet ENCODE



XXI^{ème} siècle : une nouvelle ère pour la génétique



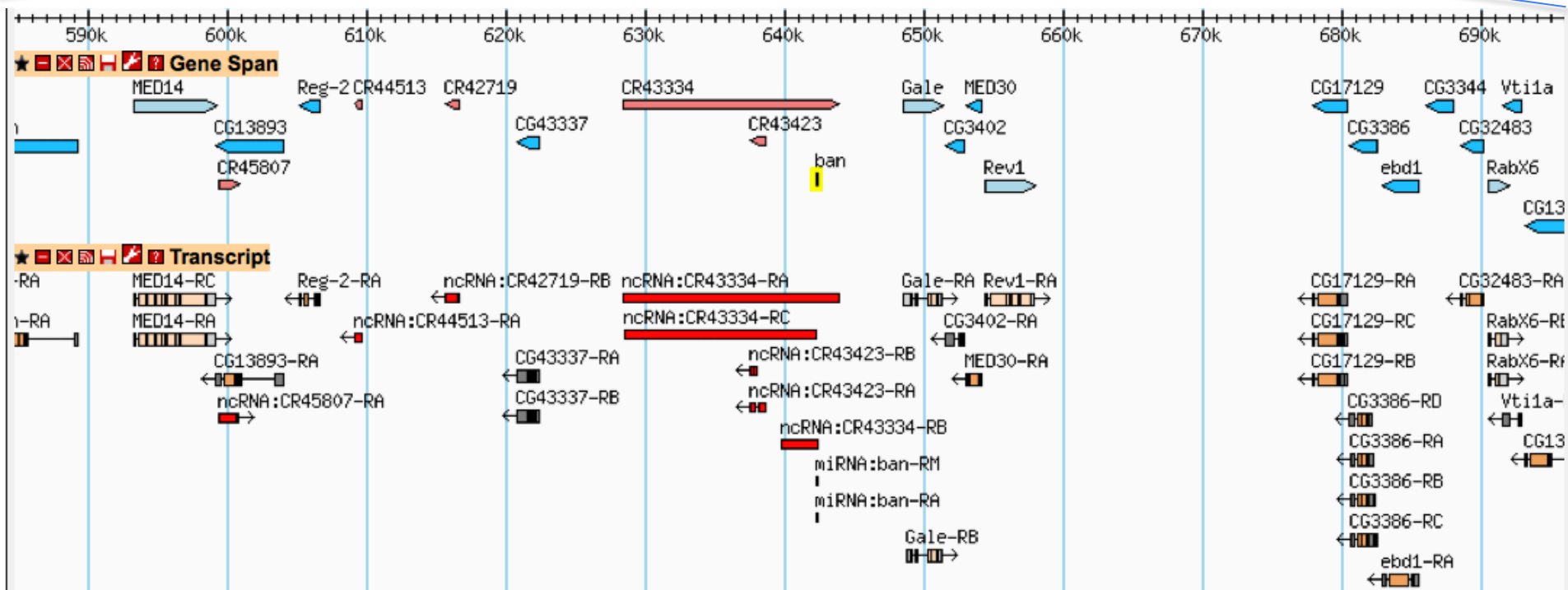
Drosophila melanogaster



4 paires de chromosomes

Taille du génome : 130Mb
(130 million de paires de bases)
≈13600 genes

100Kb (100 000 paires de bases)

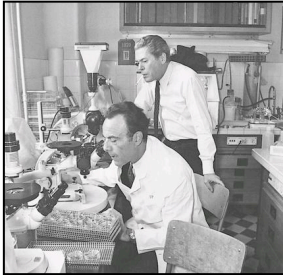


La fonction biologique d'un gène ne peut être comprise qu'en étudiant des mutants

"Forward genetics" = génétique classique

top-down

Comprendre comment un processus biologique est contrôlé génétiquement :
Identifier les gènes impliqués dans ce processus et étudier leur impact.



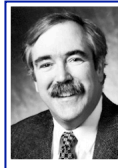
François Jacob (1920-2013)
Jacques Monod (1910-1976)

Mutagenèse : obtention de mutants au hasard.

Crible : parmi ces mutants choisir ceux dont le phénotype se rapporte au processus étudié.



Christiane Nüsslein-Volhard



Eric F. Wieschaus

Exemple : crible à grande échelle qui a permis d'identifier les gènes impliqués dans le développement embryonnaire précoce de la Drosophile.

"Reverse genetics"

bottom-up

Comprendre à quoi sert un gène identifié bio-informatiquement. Puisqu'il existe, et à plus forte raison si il est bien conservé dans les espèces voisines donc soumis à pression de sélection, alors on pense qu'il doit bien servir à quelque chose.

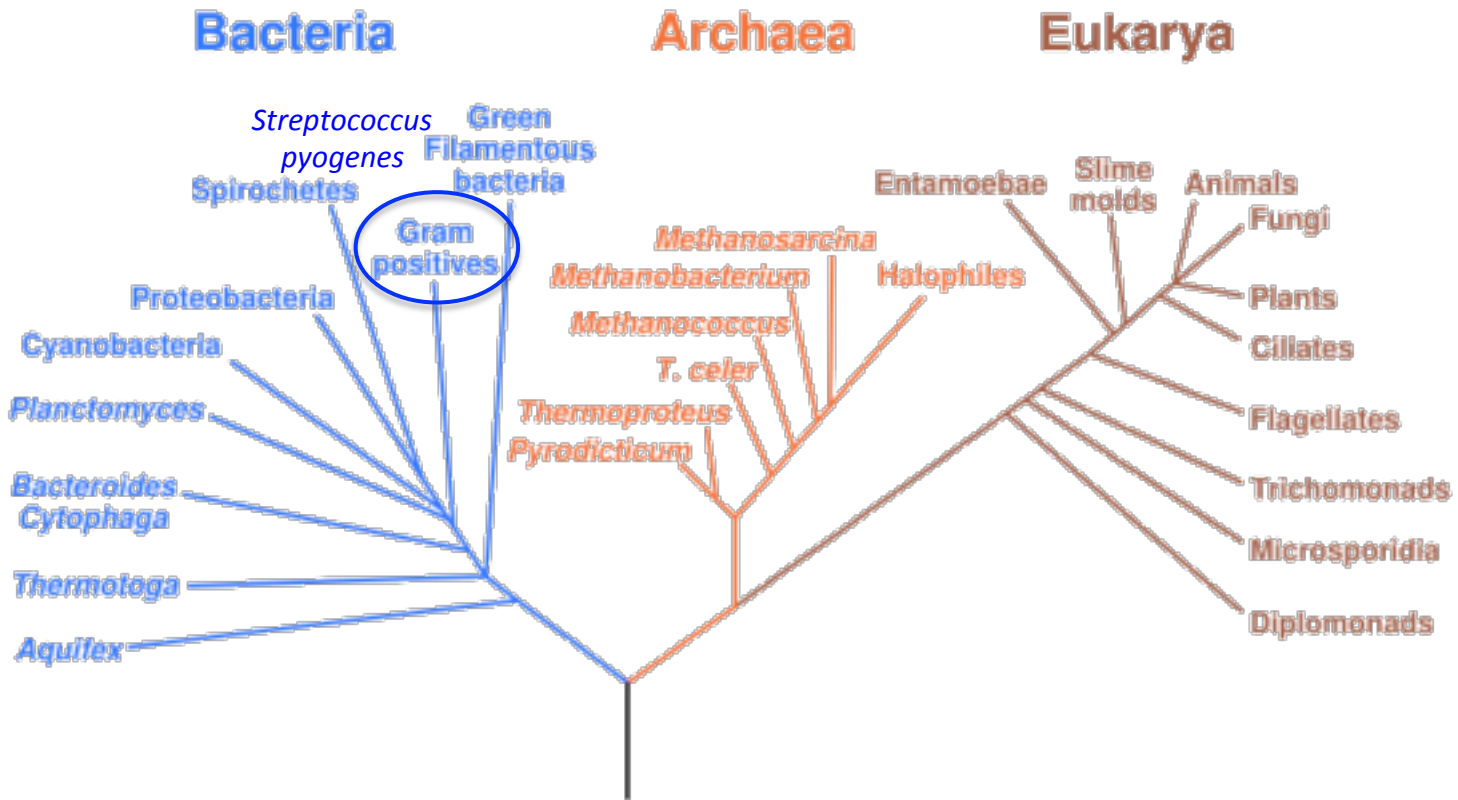
Mutagenèse dirigée, sans a priori sur le phénotype du mutant.

Exemple : souris dites "KO" (knockout), obtenues par recombinaison homologue.

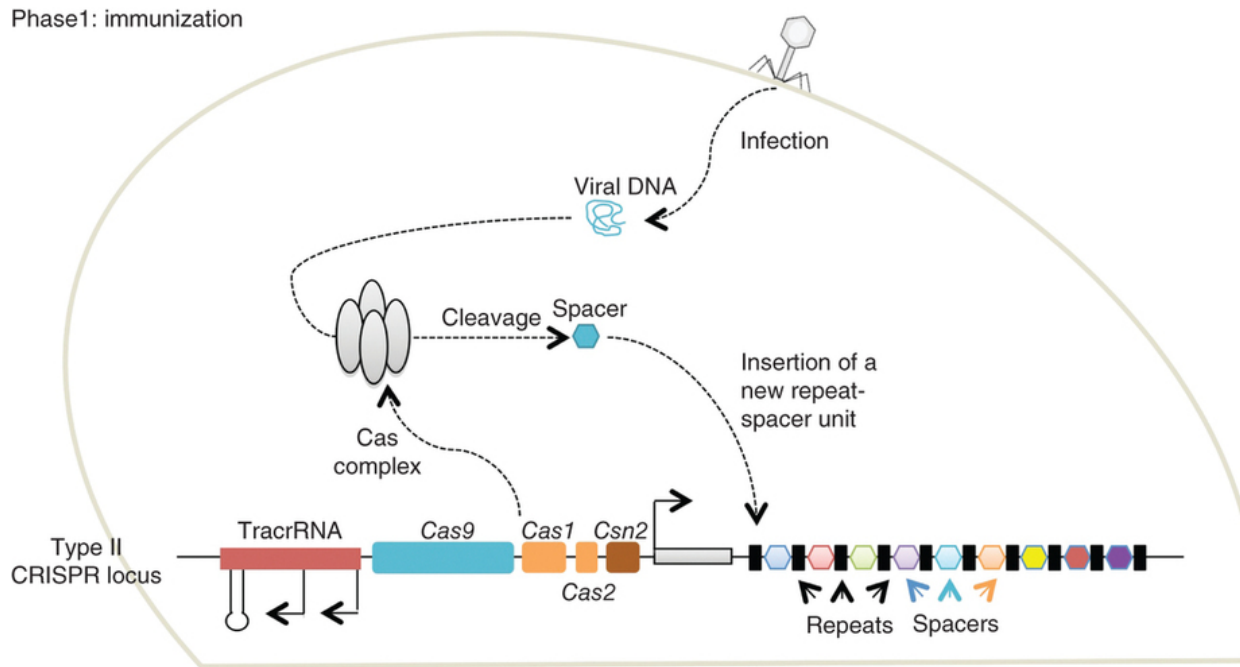
La technologie CRISPR/Cas9 permet d'obtenir des mutants vraiment très facilement

Origine bactérienne du système CRISPR/Cas9 :
système de défense adaptative contre les infections par les virus

Phylogenetic Tree of Life



Origine bactérienne du système CRISPR/Cas9 : système de défense adaptative contre les infections par les virus

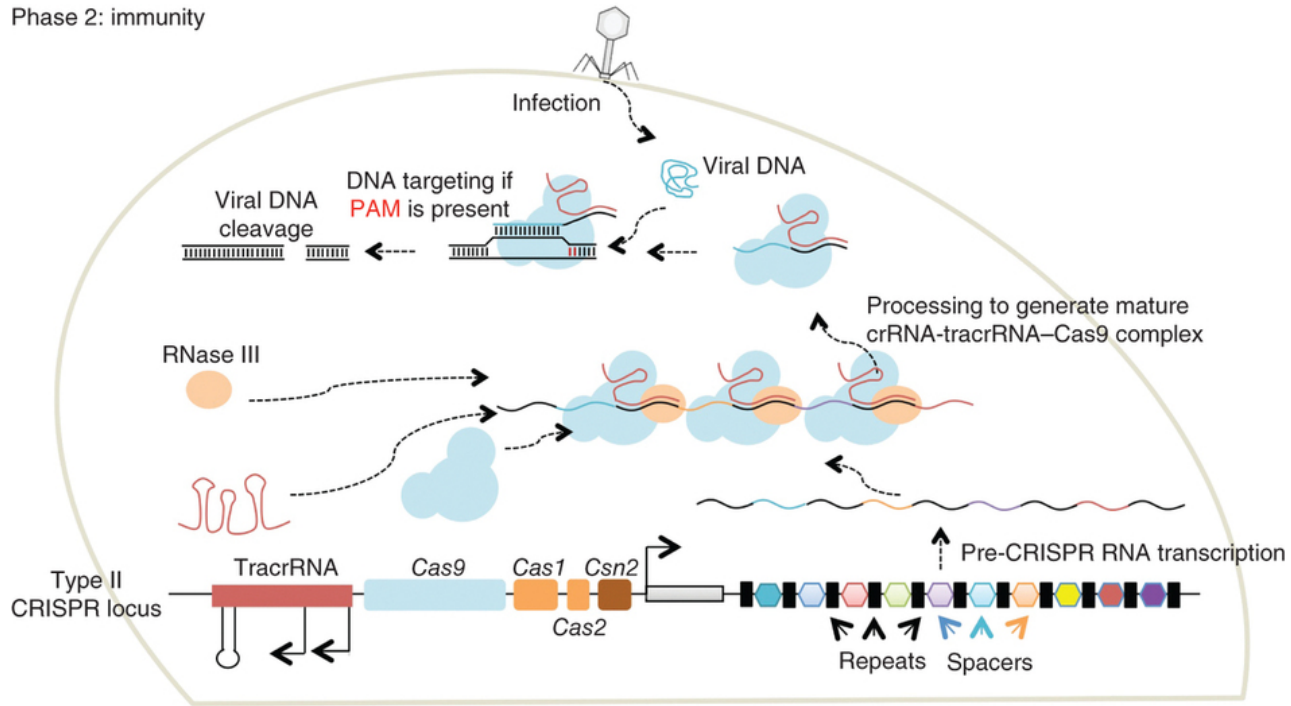


CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Cas = CRISPR-Associated Protein

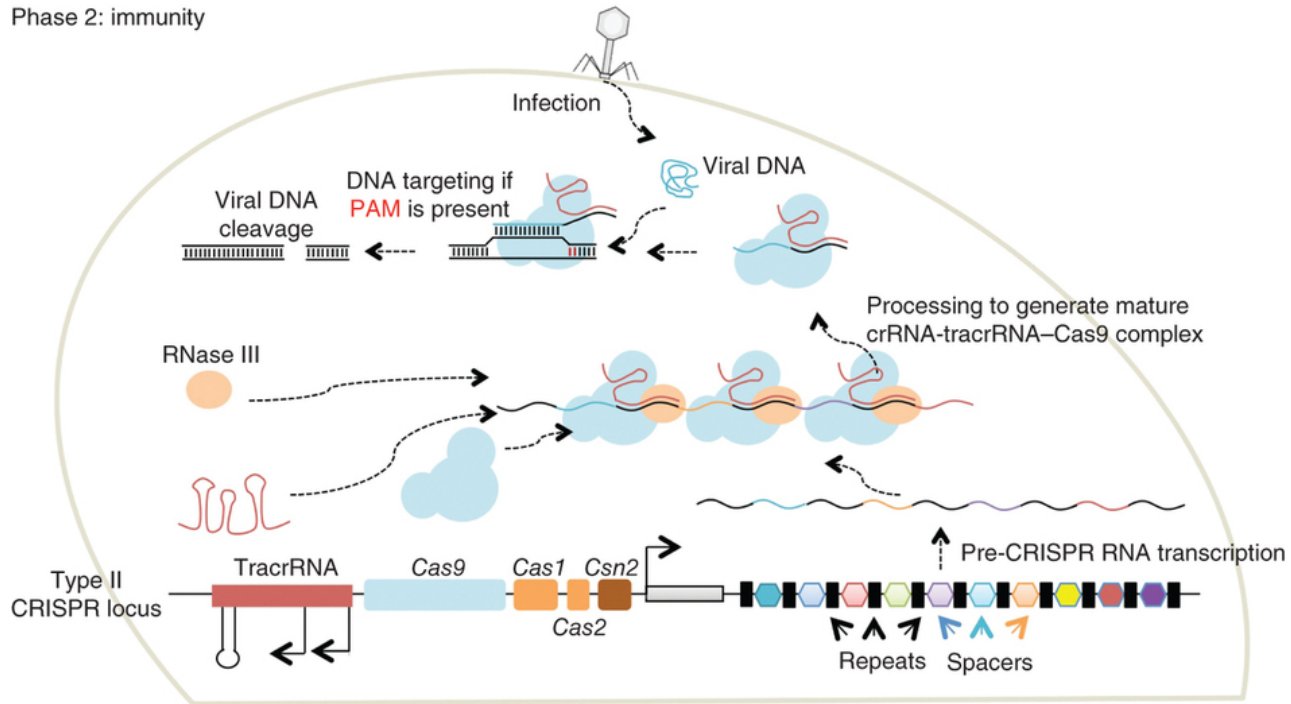
Origine bactérienne du système CRISPR/Cas9 : système de défense adaptative contre les infections par les virus

Phase 2: immunity

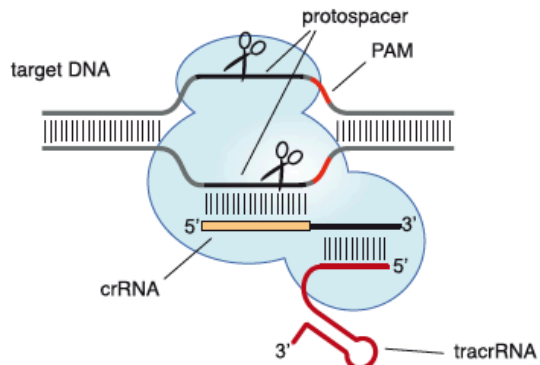


Origine bactérienne du système CRISPR/Cas9 : système de défense adaptative contre les infections par les virus

Phase 2: immunity

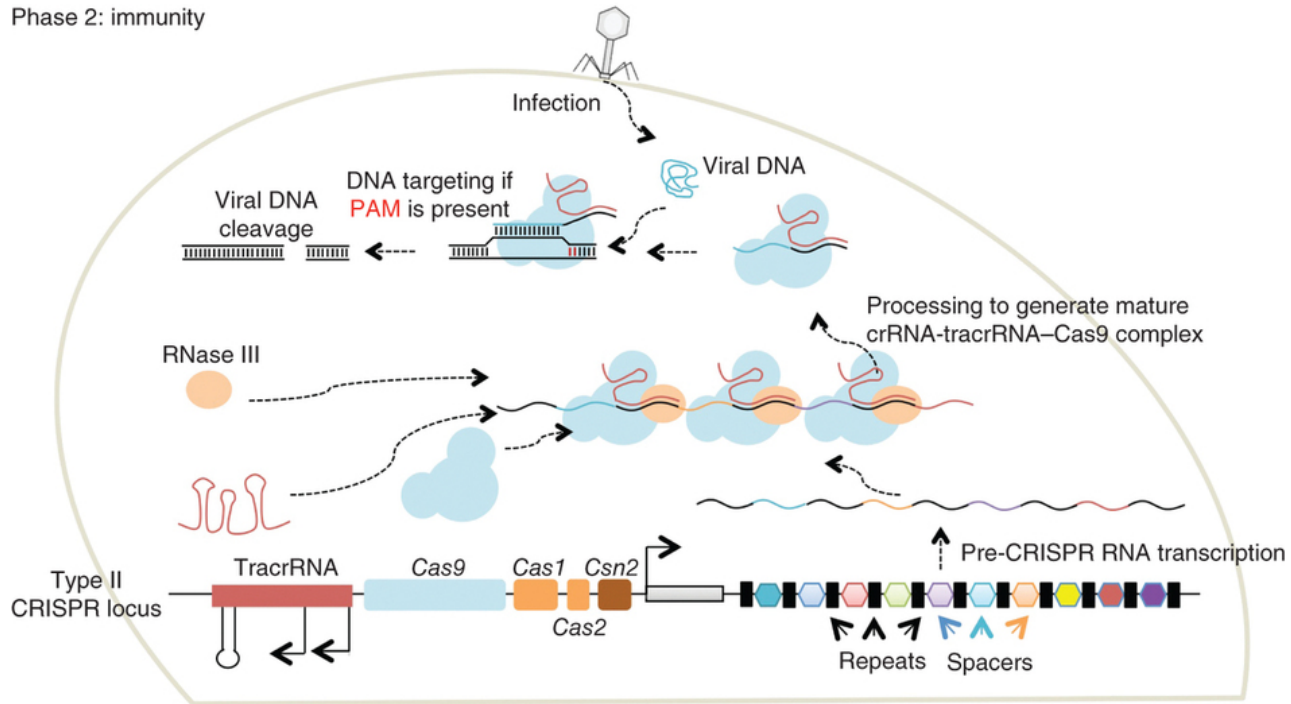


Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex

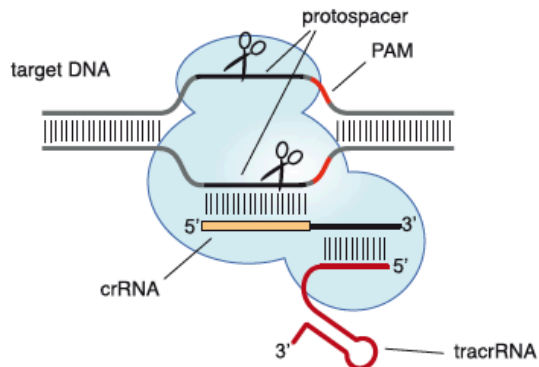


Origine bactérienne du système CRISPR/Cas9 : système de défense adaptative contre les infections par les virus

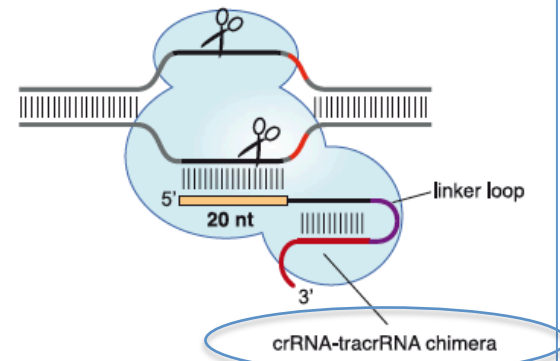
Phase 2: immunity



Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



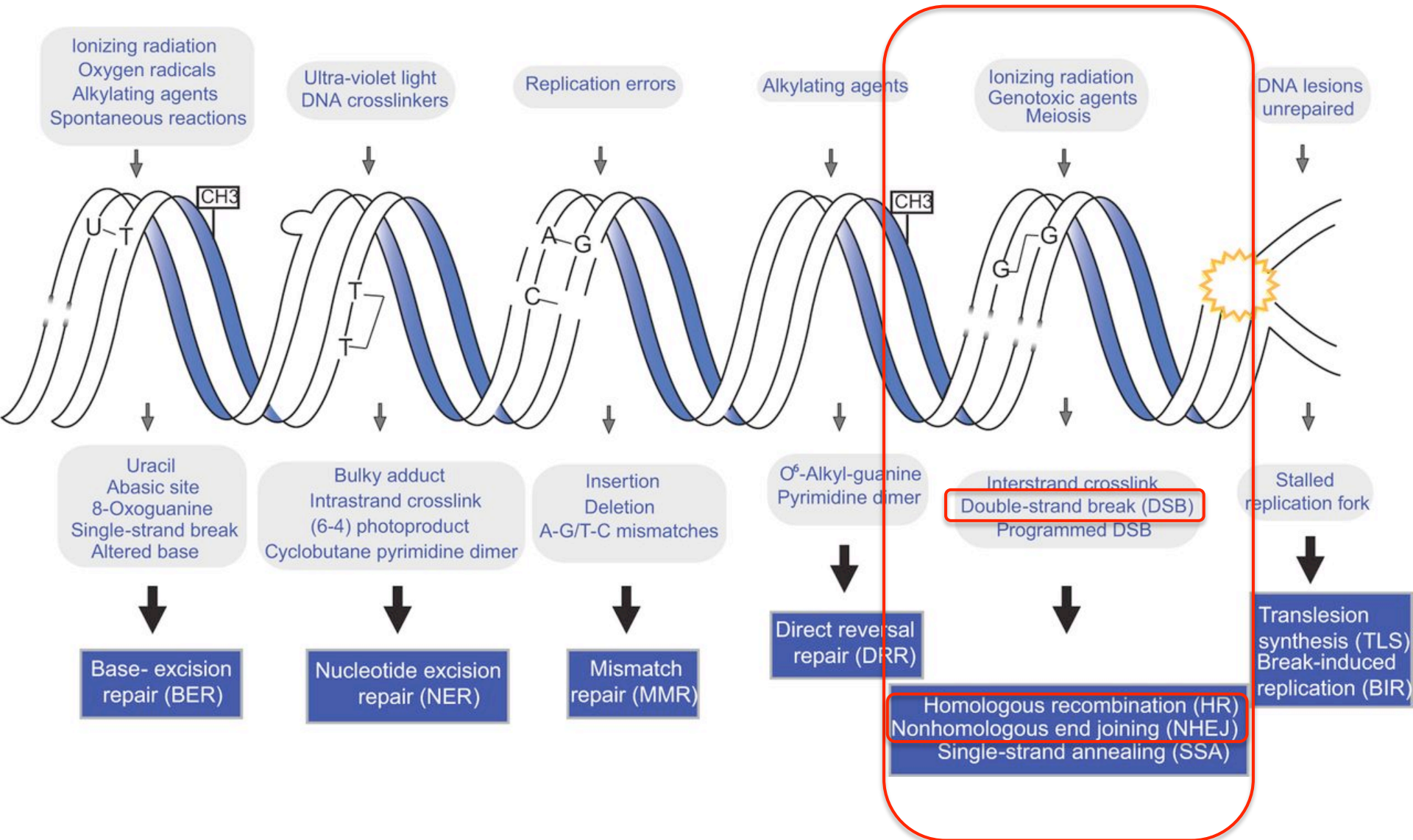
Cas9 programmed by single chimeric RNA



Jennifer Doudna
&
Emmanuelle Charpentier
2012

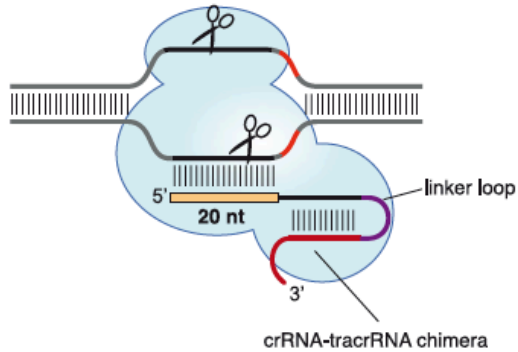
small guide RNA
sgRNA
gRNA

Les systèmes de réparation des lésions de l'ADN



Mise en oeuvre du système CRISPR/Cas9

Cas9 programmed by single chimeric RNA



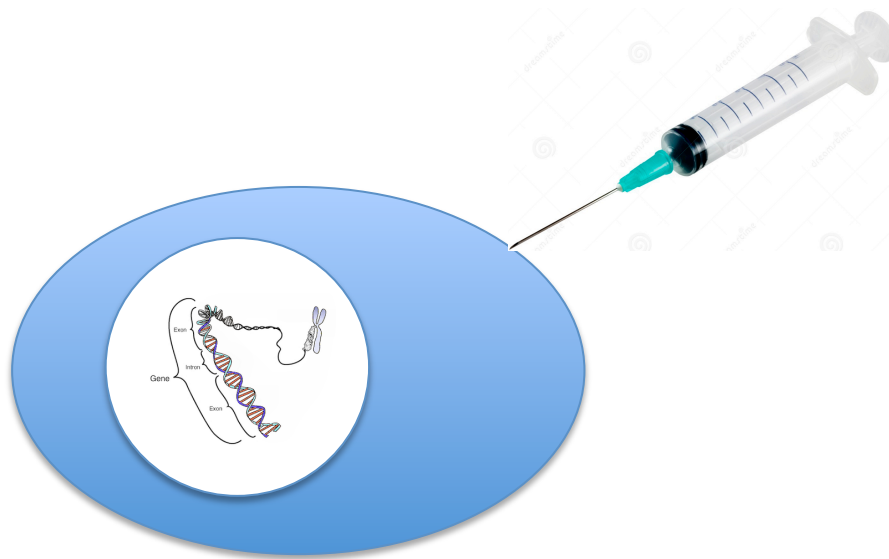
Introduire dans une cellule

Cas9 :

- l'ARN messager codant la protéine Cas9
- le gène *Cas9* porté par un vecteur d'expression ou transgène

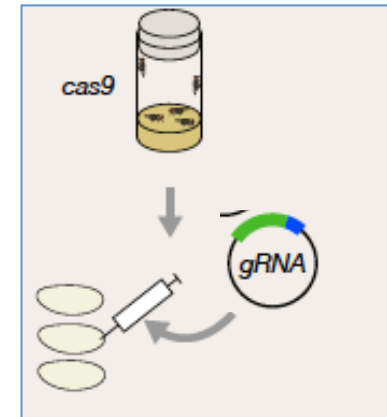
sgRNA :

- le sgRNA lui-même
- le gène du sgRNA porté par un vecteur d'expression ou transgène



Drosophile :

lignées transgéniques pour Cas9

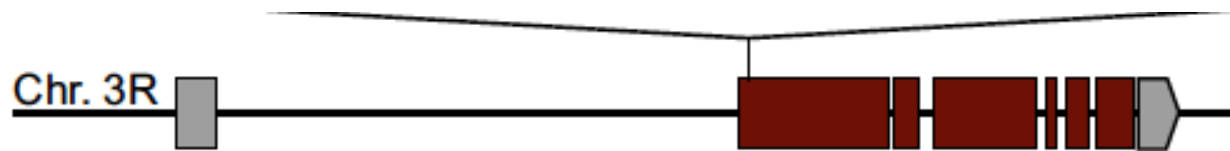


On y injecte un plasmide exprimant le sgRNA grâce à un promoteur fort

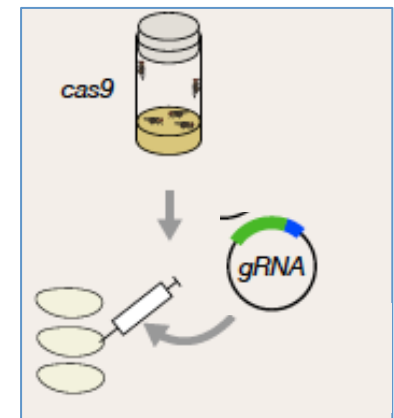
Exemple : créer une mutation dans le gène *ebony* de la Drosophile



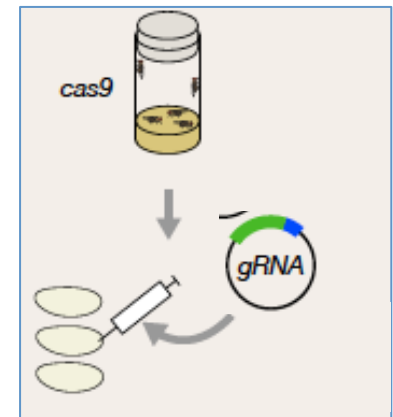
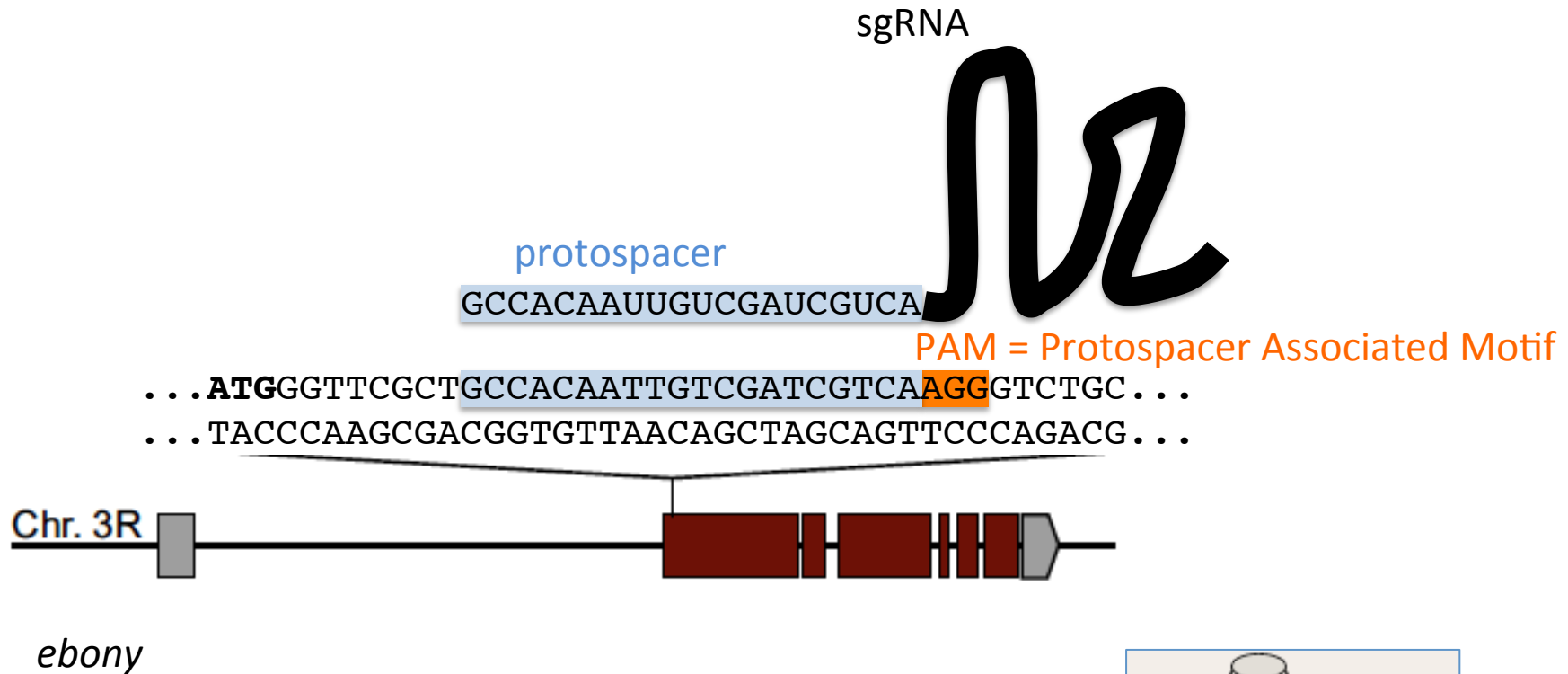
...**ATG**GGTTCGCTGCCACAATTGTCGATCGTCAAGGGTCTGC...
...TACCCAAGCGACGGTGTTAACAGCTAGCAGTTCCCAGACG...



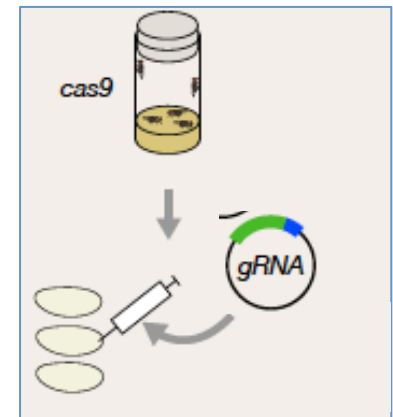
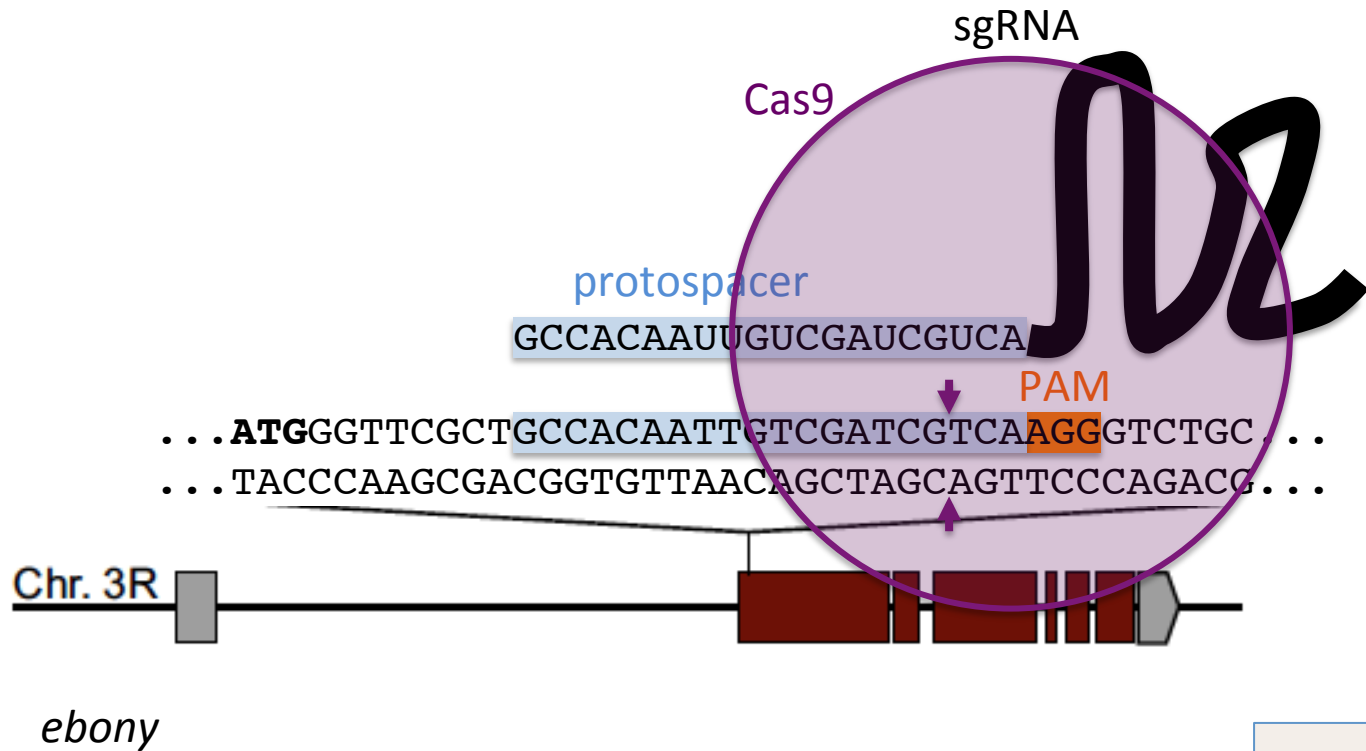
ebony



Exemple : créer une mutation dans le gène *ebony* de la Drosophile

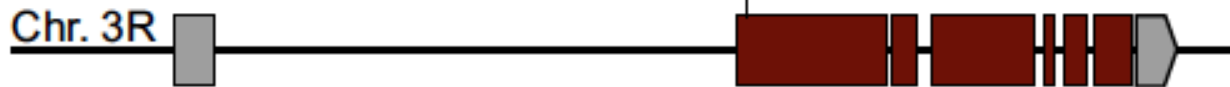


Exemple : créer une mutation dans le gène *ebony* de la Drosophile

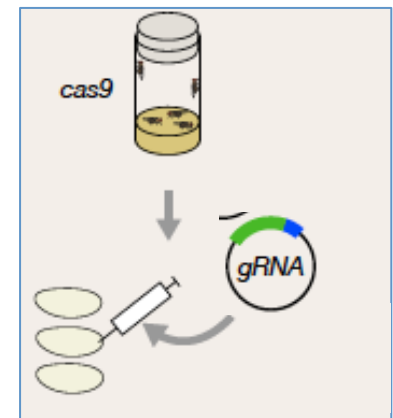
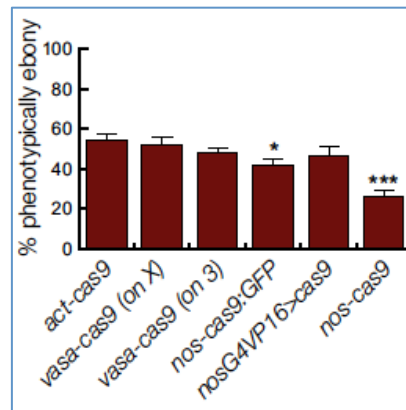
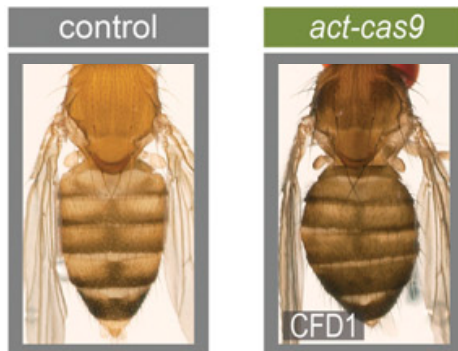


Exemple : créer une mutation dans le gène *ebony* de la Drosophile

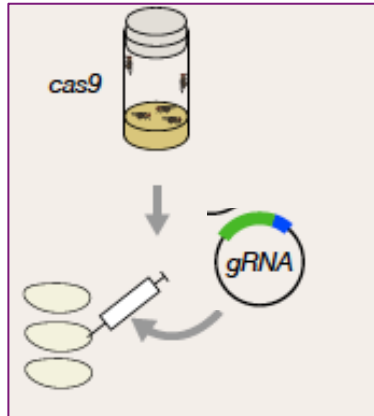
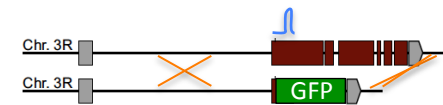
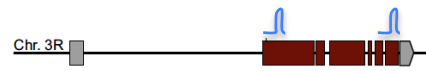
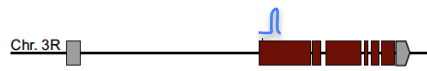
ATGGGTTCGCTGCCACAATTGTCGATCGTCAAGGGT
ATGGGTTCGCTGCCACAATTGTC-----AAGGGT -7
ATGGGTTCGCTGCCACAATTGTC-----gAAGGGT -8,+1
ATGGGTTCGCTGCCACAATTGTCGAccctgCAAGGG -4,+5
ATGGGTTCGCTGCCACAATTGTCGATC---AAGGGT -3



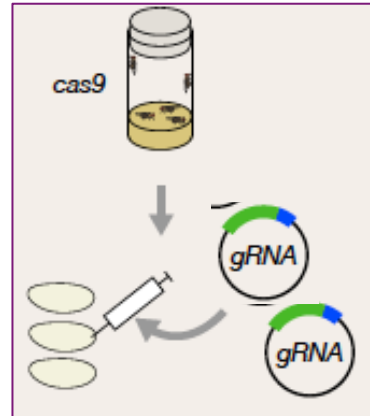
ebony



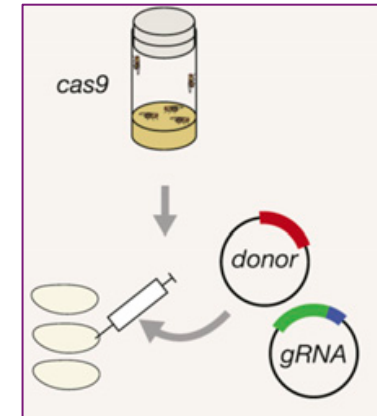
Diverses stratégies de modification du génome en utilisant le système CRISPR/Cas9



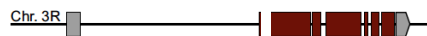
Un seul sgRNA



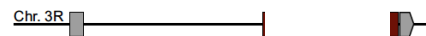
Deux sgRNA



Un ou deux sgRNA + un plasmide qui contient région génomique ciblée, dans laquelle on a créé la mutation voulue.

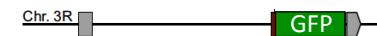


Création de petites délétions



Création d'une délétion entre les deux coupures

Thérapie génique de la myopathie de Duchenne



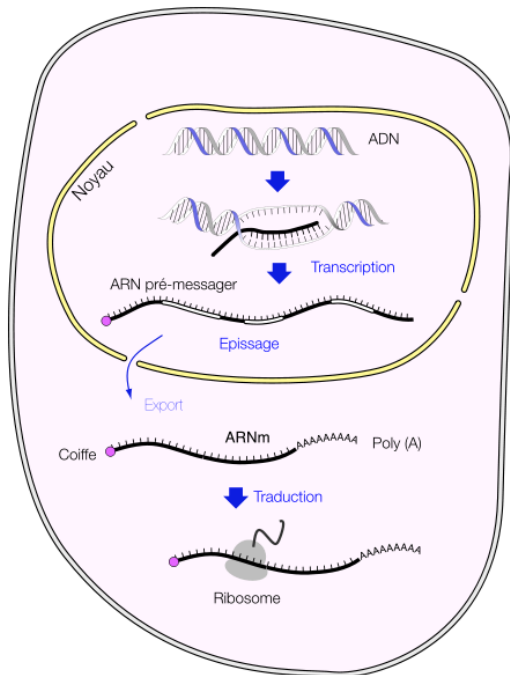
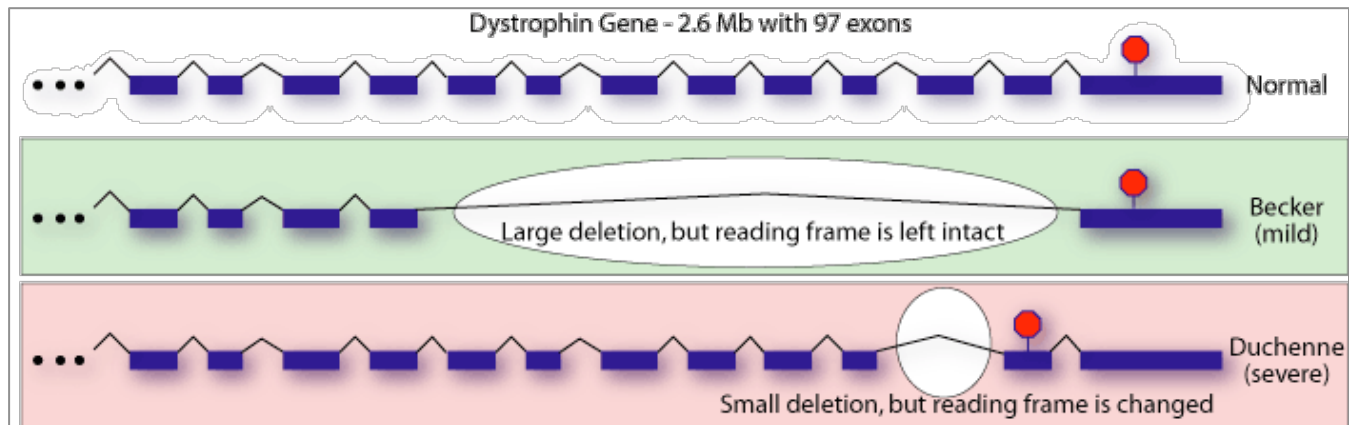
Création d'une mutation par recombinaison homologue : remplacement de séquence

Etude fonctionnelle d'un micro-ARN et de ses cibles

Eradication du moustique

Exemple : dystrophie musculaire de Duchenne

Mutations dans le gène qui code la dystrophine, une protéine importante pour la résistance des fibres musculaires



Espoir thérapeutique : "exon skipping"

Utilisation d'oligonucléotides pour "forcer" un épissage supplémentaire de l'ARN, afin de restaurer la traduction de la partie distale de la protéine.

Essais thérapeutiques en cours, protocole plutôt peu efficace.

Exemple : dystrophie musculaire de Duchenne

Science

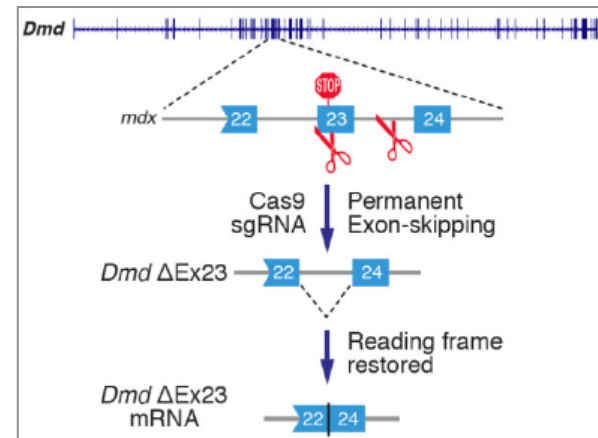
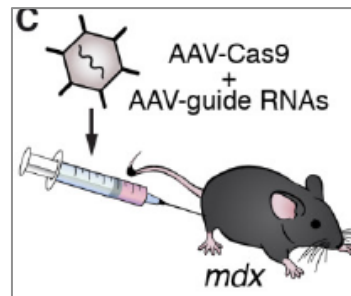
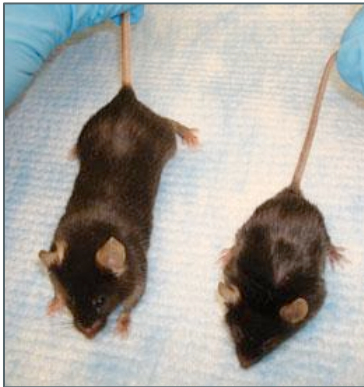
REPORTS

Cite as: C. Long *et al.*, *Science*
10.1126/science.aad5725 (2015).

Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy

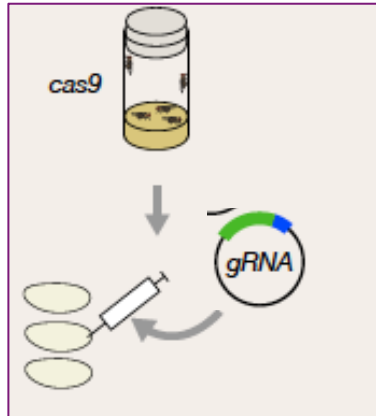
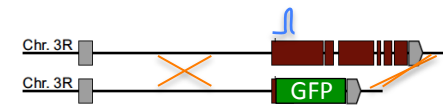
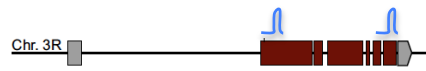
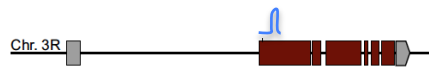
Chengzu Long,^{1,2,3*} Leonela Amoasii,^{1,2,3*} Alex A. Mireault,^{1,2,3} John R. McAnally,^{1,2,3} Hui Li,^{1,2,3} Efrain Sanchez-Ortiz,^{1,2,3} Samadrita Bhattacharyya,^{1,2,3} John M. Shelton,⁴ Rhonda Bassel-Duby,^{1,2,3} Eric N. Olson^{1,2,3†}

Modèle souris Mdx

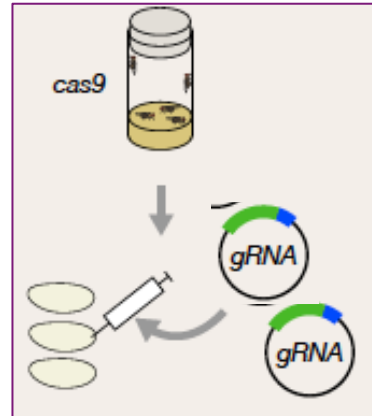


CRISPR/Cas9-mediated genome editing holds clinical potential for treating genetic diseases, such as Duchenne muscular dystrophy (DMD), which is caused by mutations in the dystrophin gene. To correct DMD by skipping mutant dystrophin exons in postnatal muscle tissue *in vivo*, we used adeno-associated virus-9 (AAV9) to deliver gene editing components to postnatal *mdx* mice, a model of DMD. Different modes of AAV9 delivery were systematically tested, including intra-peritoneal at postnatal day (P) 1, intra-muscular at P12, and retro-orbital at P18. Each of these methods restored dystrophin protein expression in cardiac and skeletal muscle to varying degrees and expression increased from 3 to 12 weeks post-injection. Postnatal gene editing also enhanced skeletal muscle function, measured by grip strength tests 4 weeks post-injection. This method provides a potential means of correcting mutations responsible for DMD and other monogenic disorders after birth.

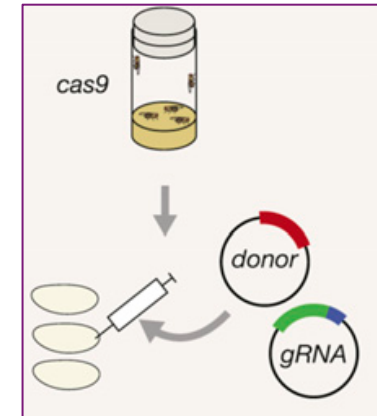
Diverses stratégies de modification du génome en utilisant le système CRISPR/Cas9



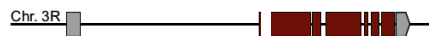
Un seul sgRNA



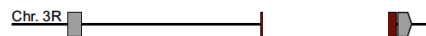
Deux sgRNA



Un ou deux sgRNA + un plasmide qui contient région génomique ciblée, dans laquelle on a créé la mutation voulue.

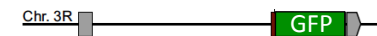


Création de petites délétions



Création d'une délétion entre les deux coupures

Thérapie génique de la myopathie de Duchenne



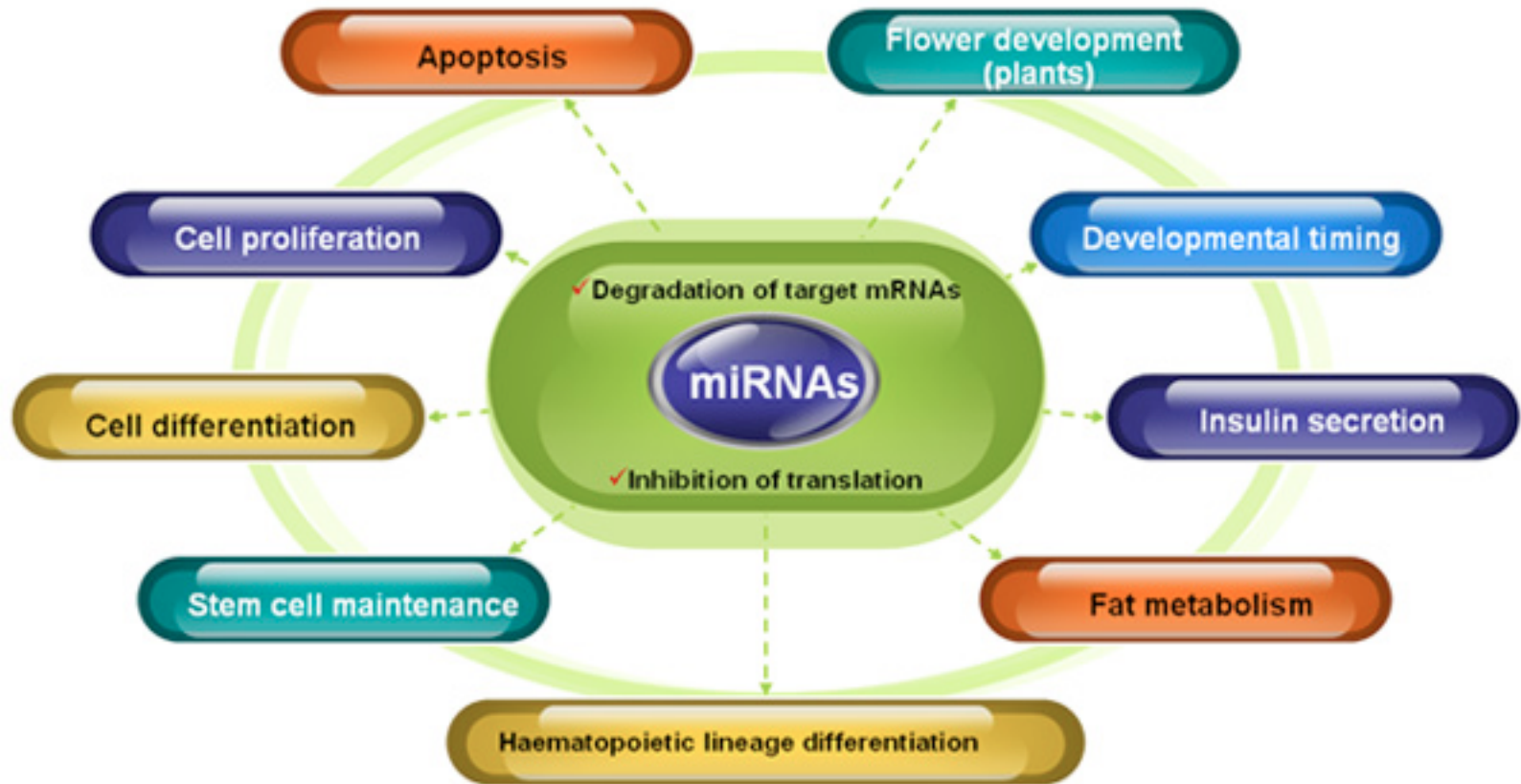
Création d'une mutation par recombinaison homologue : remplacement de séquence

Etude fonctionnelle d'un micro-ARN et de ses cibles

Eradication du moustique

Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles

Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants qui ont un rôle régulateur de l'expression des gènes. On a montré leur implication dans tous les processus biologiques



Chez l'Homme : plus de 2500 micro-ARN identifiés.
Chez la Drosophile : 256 micro-ARN identifiés.

miR bantam
5' **UGAGAUCAUUUUGAAAGCUGAUU** 3'

Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles

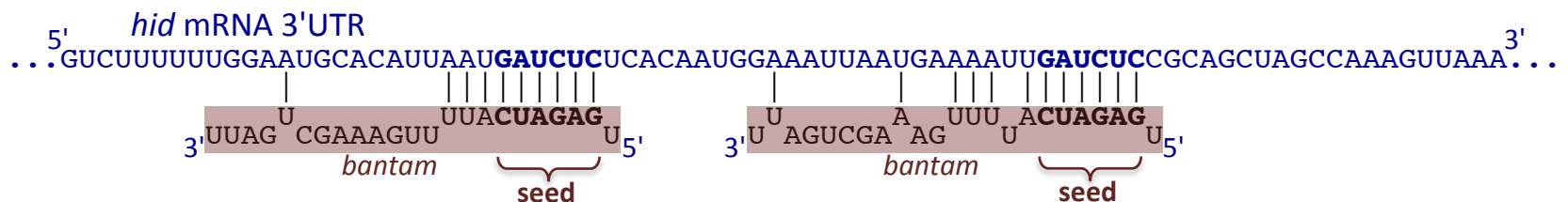
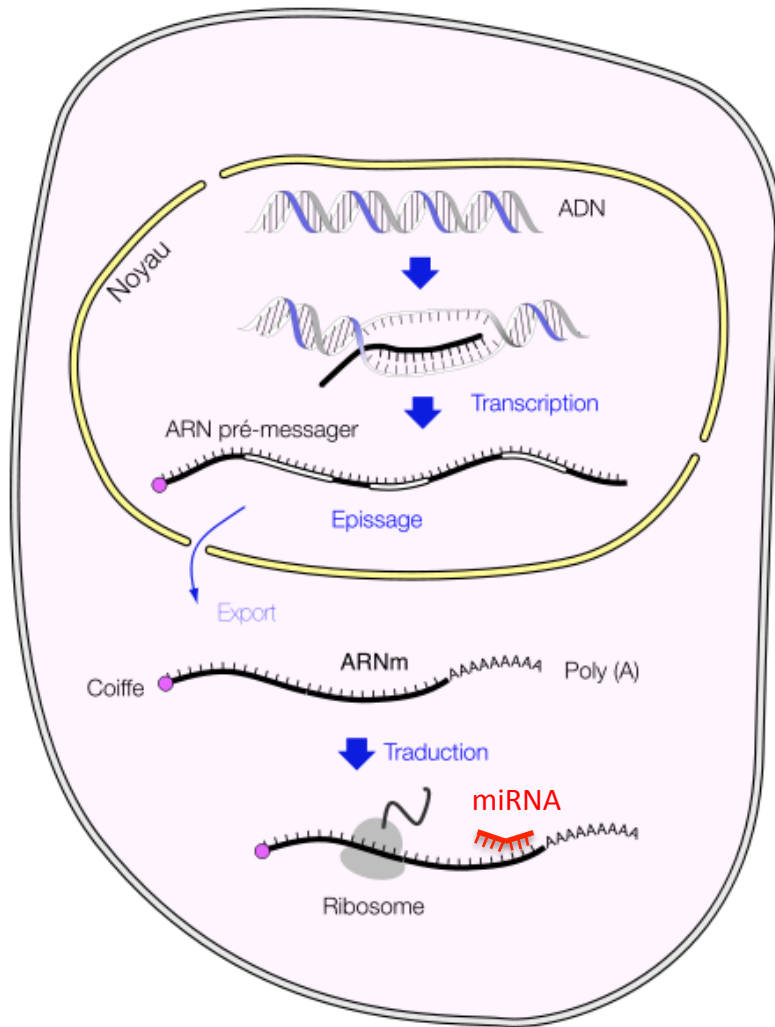
La régulation d'un gène peut se faire à plusieurs niveaux

transcription

maturation des ARN
(épissage, polyadénylation)

stabilité des ARN
traduction

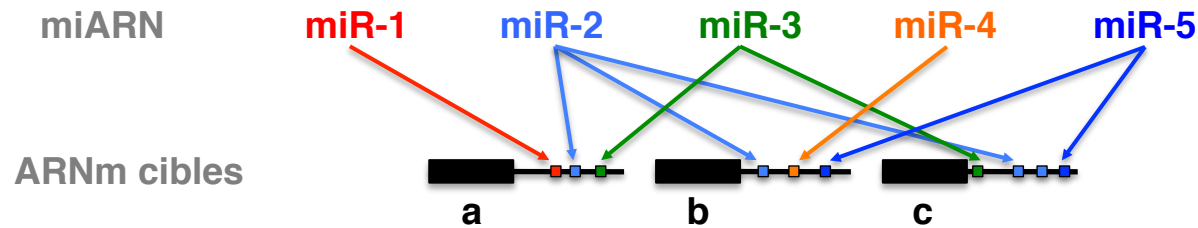
Régulation par une classe de petits
ARN non codants, les miARN
(miARN) de 22 nucléotides



Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles

Les microARN et leurs cibles forment des réseaux d'interaction complexes :

- chaque miARN peut s'associer à plusieurs ARN messagers
- chaque ARN messager peut être reconnu par plusieurs miARN

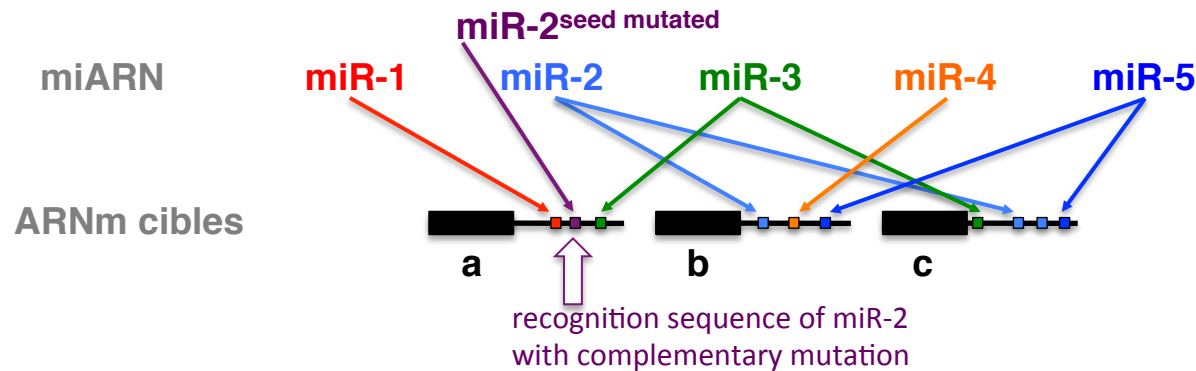


Si on veut comprendre l'impact biologique des régulations médiées par les miARN, il est nécessaire d'isoler une interaction donnée du reste du réseau.

Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles

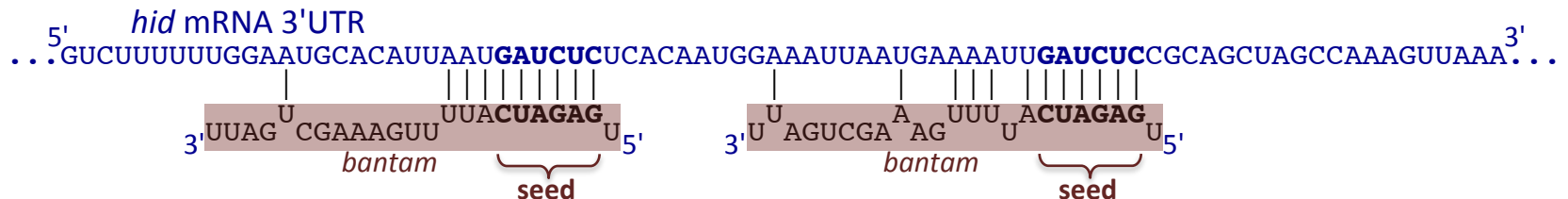
Les microARN et leurs cibles forment des réseaux d'interaction complexes :

- chaque miARN peut s'associer à plusieurs ARN messagers
- chaque ARN messager peut être reconnu par plusieurs miARN



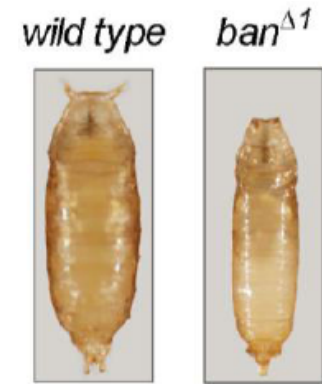
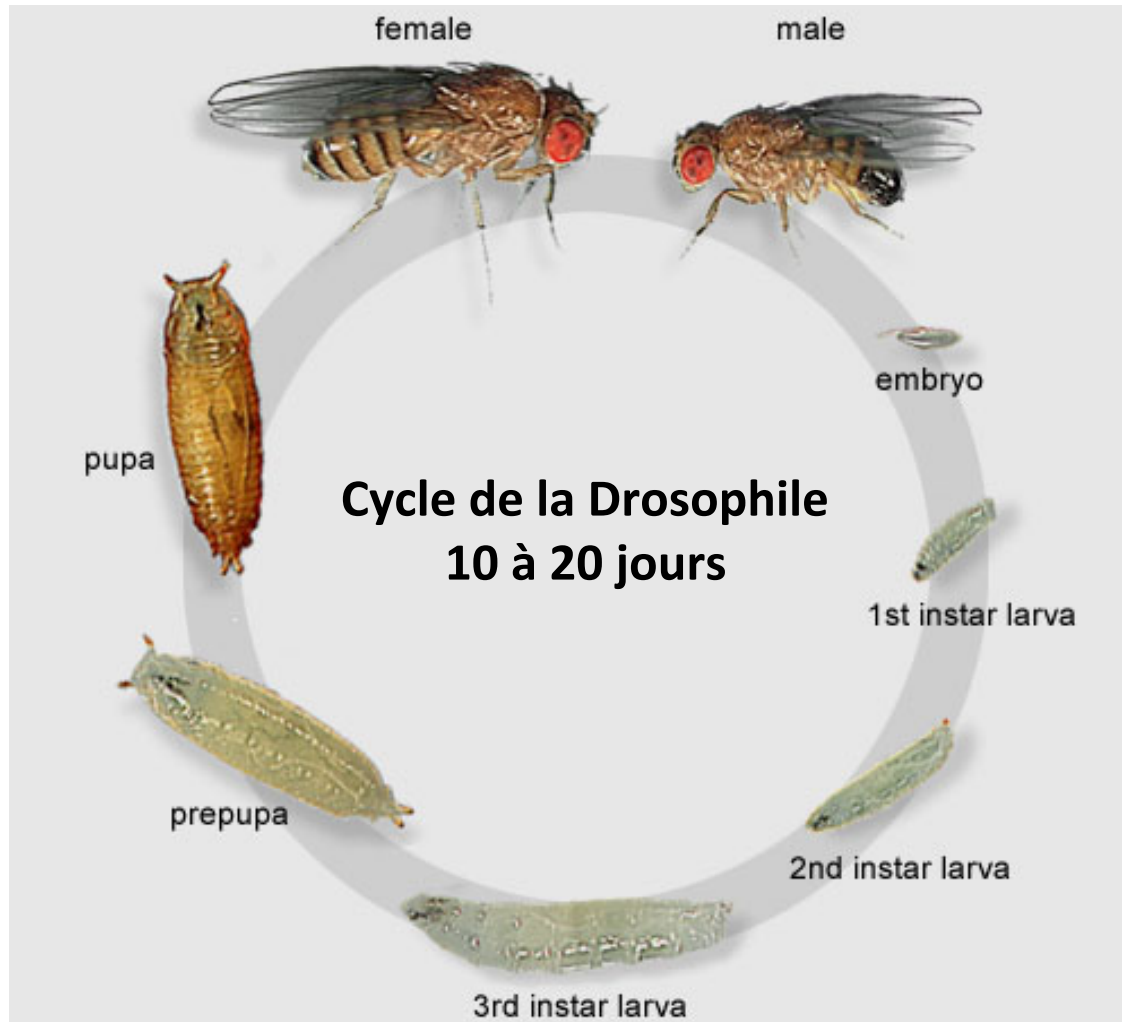
Si on veut comprendre l'impact biologique des régulations médiées par les miARN, il est nécessaire d'isoler une interaction donnée du reste du réseau.

La technologie CRISPR/Cas9 permet de muter la séquence de la seed sur un miARN et sa séquence de reconnaissance sur un ARNm, in vivo.



Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles

Le micro-ARN *bantam* chez la Drosophile

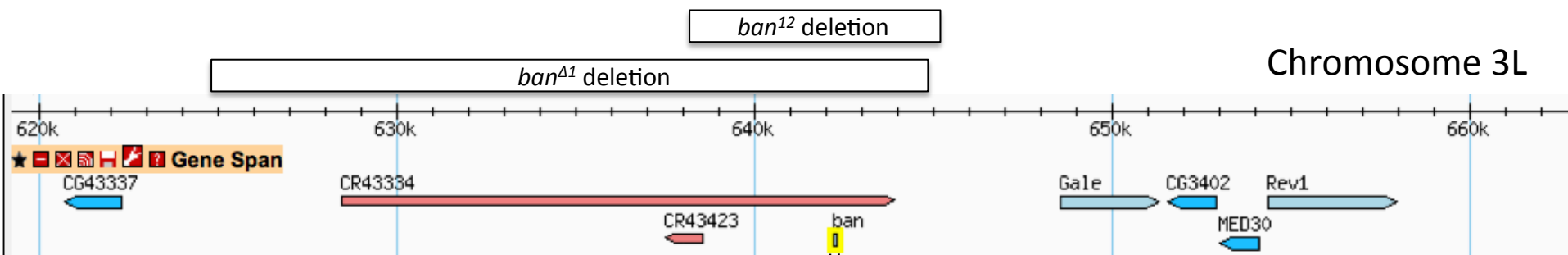


Le micro-ARN *bantam* est important pour la croissance, la viabilité, la métamorphose...

Les mutants *ban*^{Δ1} font des pupes anormalement petites et n'arrivent pas jusqu'à l'âge adulte.

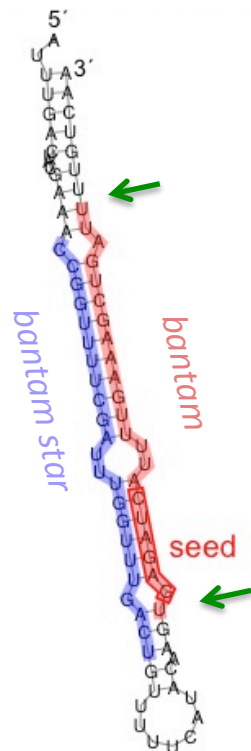
Plusieurs cibles de *bantam* sont prédites, mais on ne comprend pas la relation entre la régulation moléculaire de leurs ARN par *bantam* et le rôle biologique de *bantam*

Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles



pre-miR
bantam

AUUUGACUACGAAACCGGUUUUCGAUUU**GGUUUG**ACUGUUUUUCAUACAAGU**GAGAU**CAUUUUGAAAGCUGAUUUUGUCAA



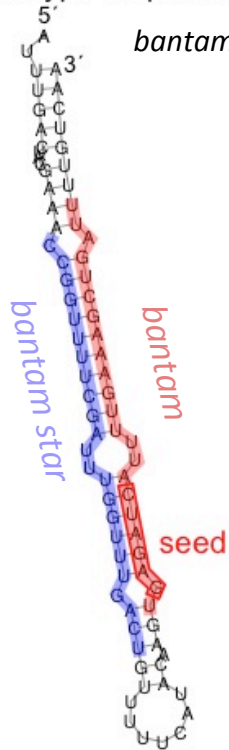
Folded *pre-miR* is cut by Dicer to produce mature *bantam*

miR bantam

5' **U**GAGAU****CAUUUUGAAAGCUGAUU 3'

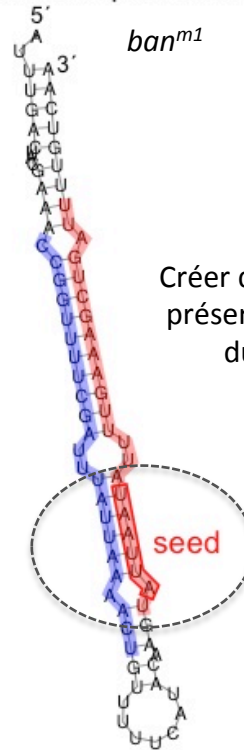
Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles

wild-type sequence:



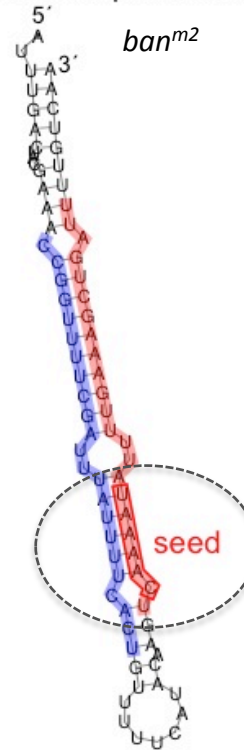
(predicted ΔG : -25.50 kcal.mol⁻¹)

mutated sequence #1:



(predicted ΔG : -22.00 kcal.mol⁻¹)

mutated sequence #2:



(predicted ΔG : -21.60 kcal.mol⁻¹)

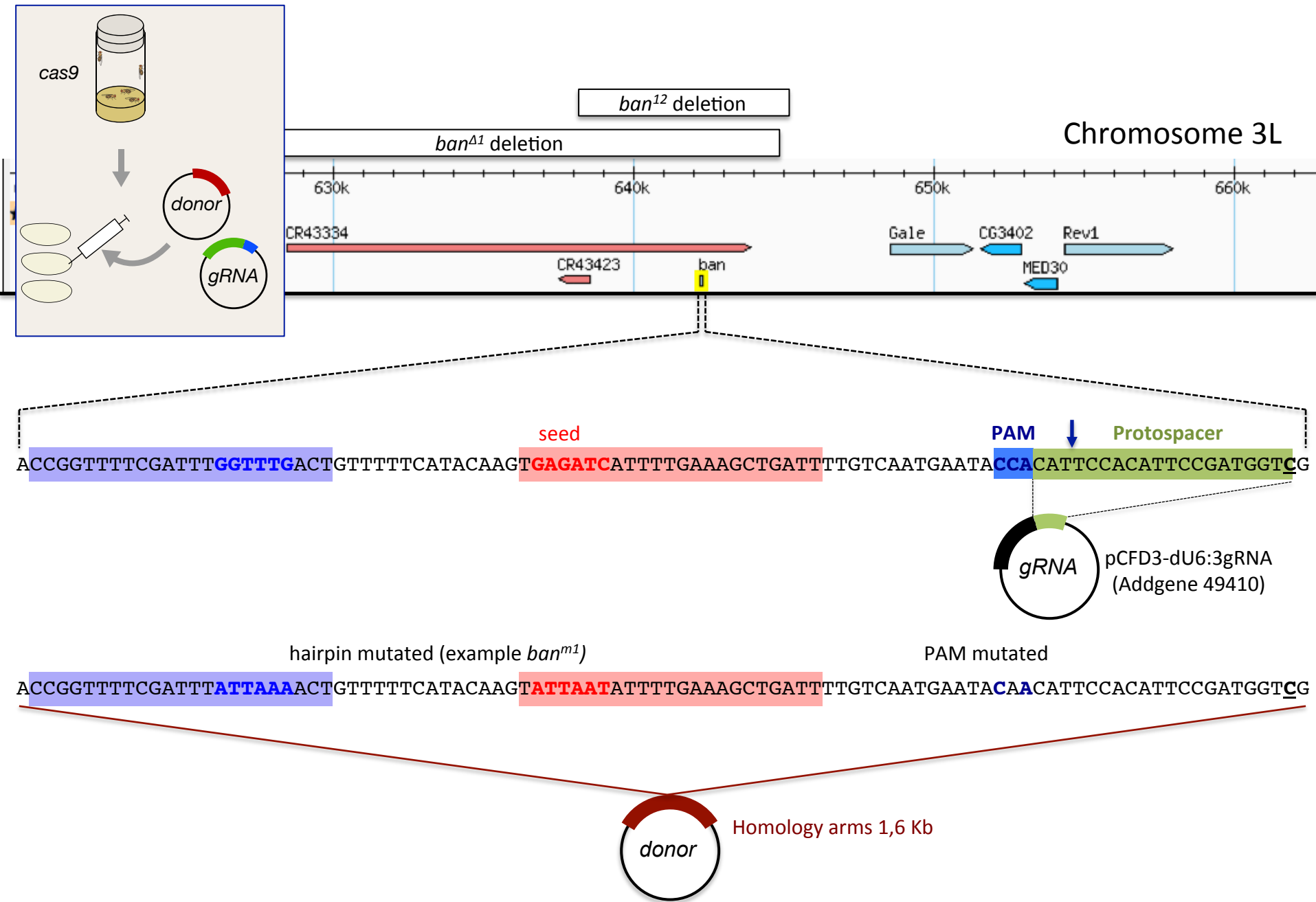
bantam star

seed

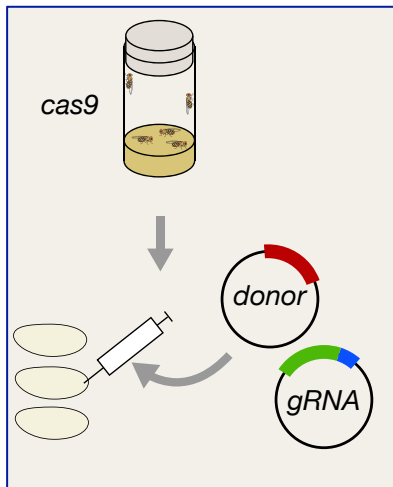
bantam

<i>bantam</i>	AUUUGACUACGAAACCGGUUUUCGAUUU	GGUUUG	ACUGUUUUUCAUACAAGU	GAGAU	AUUUUGAAAGCUGAUUUUGUCA
<i>ban^{m1}</i>	AUUUGACUACGAAACCGGUUUUCGAUUU	AUUAAA	ACUGUUUUUCAUACAAGU	AUUAAU	AUUUUGAAAGCUGAUUUUGUCA
<i>ban^{m2}</i>	AUUUGACUACGAAACCGGUUUUCGAUUU	AUUUUC	ACUGUUUUUCAUACAAGU	CAAAAU	AUUUUGAAAGCUGAUUUUGUCA
<i>ban^{md}</i>	AUUUGACUACGAAACCGGU	----- <i>deletion</i> -----			GAAAGCUGAUUUUGUCA

Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles



Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles



Résultats des injections dans des embryons

Typical injection mixture :

500-600 ng/ μ L donor plasmid DNA pBT-*bantam*^{mut}

134 ng/ μ L pCFD3-dU6:3gRNA (Addgene 49410)

Independent experiments	No of injected embryos	No of G0 larvae	No of G0 adults	No of fertile G0 adults	No of G0 giving PCR-positive G1 progeny	No of G1 founders/all tested G1	No of confirmed mutants	Name of mutant line
m1	58	4	2	2	1	5/24	5	<i>m11</i>
m1	72	17	6	3	3	4/37 2/46 1/3	0 0 0	
m2	92	14	5	2	1	2/63	0	
m2	45	12	3	2	2	11/25 2/42	11 1	<i>m28</i> <i>m23</i>
md	101	8	3	2	1	27/27	27	<i>md1</i>
md	64	15	9	7	2	1/8 2/8	1 2	<i>md9</i> <i>md11</i>

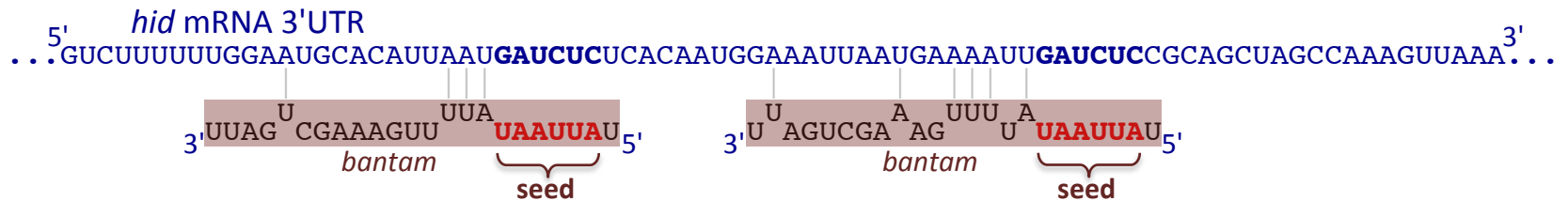
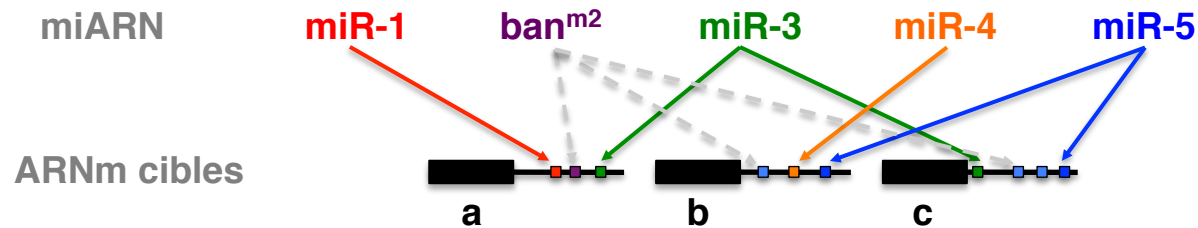
Not OK :
insertion
of donor

OK

Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles

Les microARN et leurs cibles forment des réseaux d'interaction complexes :

- chaque miARN peut s'associer à plusieurs ARN messagers
- chaque ARN messager peut être reconnu par plusieurs miARN



wild type *ban*^{Δ1}



Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles



Le gène *hid* : une cible possible de *bantam*

Red = found by Targetscan

Green = not found by Targetscan

Decision of Hervé & Isa :

Replace GATCTC (wt)
with ATTTTG (m2)

in the five sites
predicted by TargetScanFly

Stop

TGAAGCGCAGGAGACGTGTAATCGAATGATCTATAGTGAAATCAGCTAGCCCTTAAGATATATGCCGATCTAAACATAG
TTGTAGTTAAACCGTACATAAGTGCAACGAATTTATTGAACTGCAGGAGCGAAAGCAGAAAGTCATTAATTCGTAAACGG
ATTGTTAGATACACAAACAGCCAACATACACGAAGAGTGTGCCTAAGATTAAGAAGGTTGACGGGACACAAGAACAATAT
ATTCTATCTGTCTATGGTAACTGCATTTGTATTTCTAAACGAAACGAAAGATAACAATCTTAACTGCTCAAAGTAATGA
AAACTCTTAGACTGGCAAGAGACTCAAATCACACTTATTTTGTGCTGATCCATATTTTGTACAACCTTTTGAGCGGATA
TTTACAAATTATACTAGTACAAAAAAGAGAGAGAGAGATAAGCAAAAGAAAAGTCCACTTTTGAGATACTTTTGATA
ATCTTTGATTTGCATTTAATCATTTCCACACTTGCATTTTATAAACAACAAACAAAATTAATCTCCATTGTAGAACAAA
GTAAACTGCAATTTCAATGTCTTCGCATTTGTAATTCGAATTGCAAGAAAAACAAAATATTTTAAATATGTTTAACTA
GTAGAATTTTAAACGTAAGTCCACAAAAACAAGCACATCTAGCTTTAATTTGTTGAAACAAAAGCAGAAAAACGCAAC
AAAAAATGAATGAAATCATTAATTTAATTTTGTATATAGTTTTTATGCCATTTTGTGATGTTTTGTGTCTACGGTTT
ATGTCATGTTATTTTAGTTAAATTTCTTATGATTTATGTTTATTTGTAATTTTTTGTGATGTTTTGTTCATCATCATA
TTCAAATTTGGTCTCACAATATAATAGTTTTAAGCTCCACGCCCGGAGATTGATGGCAAAACGATTGAAATTTGGCCAGA
AGAGAGATAGTTTTTCCCATTCGTACACAGTCTTTTTTGGAAATGCACATTAATGATCTCTCACAATGGAAATTAATGAAA
ATTTGATCTCTCGCAGCTAGCCAAAGTTAAAAAGAAATGAAGAGGAAACATATTCTATAGGCAATTTTCACTATATGCTA
GAATTTCCCGGGCGTTTCAATGCTAATCGAATACAGTGACATGAAAGCAAAACATAGCGAAATATTAAGAAAATCAATCA
AAAAAGAAAGAAAAACCAATTCCCAAAAATCGCATTGATCTCTAGGATTTTACATAACAATTAATCAATCAACCGTTTTT
CAATGAGAAATGTTTATAAAAAGCAGAAAGTGAAACACAGAAACATAAACAAAAATTAACGAAAGCTTAGATATAAGTTC
GCCAAGCGTTTTAGTTCTATTTTCTAGAATGTCTAAGTTGGTTAGTGAGGTTATTCTCTTTATTAAGCTGTCTTCGGAC
ACAAGTTTATTTGTATATAAGCAATATTATTTGTGTAGCTAAGTGACAGTCCCAATCAAATCCAATCCAATATCACCCA
GTCCCGGACATTTCCAGCAAAACAATAGACTATTCTCGCGTTCACATGTATCAATCTTAATTTGAATTTACCACAAAATG
AAATGAAATACTAAAACCATAACAAATGAAAAATTTTTTGTAAATTTGTTGCATCAAGTGAGCAAGGGGATTAGATT
AAGGAATCATCCTTGCTTTATCCCTGCTTATTGCTAATTAGTTTTCACAAATGATCTCTGTTAAAGTTTTTGTGGCCTTGCG
CCAAAAGTCGTACAGATTTTGGTTTGGCATAAATACCTCGAACAAAAGTTAATGAAAGCAAGCAATGGAAGAAAAA
ATCAGAATGAAACACAAGAAATTTATATTTTGAACCAATGCTACTTAATCCGTTTTTGTAAATTAAGTATCTTTACTCG
ACCTTGTATATAGCGCAGTTCGAATCACAGAATCAAATGCCATTTTTTGTATAGAATTTTATTTGGTGCCAAAACAGTGAC
AGATAATTTAAATGTCTATGAACCCGTGTATTTTCGCATATTATACATTTATACATATATCGTAACTTCAATGATAAGTTTG
ATTCTGAAATTTTGTCAACTCAATTTAAGAAACATTTCTGTTGTAGTTTAGTGATAGCTAGCAGAAAGCACTTTGTTTAA
TTGTACATTTTATATTATGCTGTAATATTTTAATATACATAAATATCATTTATTGATCTCTATGAATATGTTTCATAAGACAA
CAAAAATTTATATATATGAATACATCTATGTGTATGTGTAAATGAATAAAGCGCATAATTTATTATGTAAGATTTATGGA
ACAAATGAAATAAAGTGAAGAAAAATTTTGAAGAAATTAAGTTTGTATATGATTGGAATGGGTTGTCATGGCATAC

Site A

Site B

Site C

Site D

Site E

Poly(A) signal
Poly(A) signal

Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles



Le gène *hid* : une cible possible de *bantam*

Red = found by Targetscan

Green = not found by Targetscan

Decision of Hervé & Isa :

Replace GATCTC (wt)
with ATTTTG (m2)

in the five sites
predicted by TargetScanFly

Stop

TGAAGCGCAGGAGACGTGTAATCGAATGATCTATAGTGAAATCAGCTAGCCCTTAAGATATATGCCGATCTAAACATAG
TTGTAGTTAAACCGTACATAAGTGCAACGAATTTATTGAACTGCAGGAGCGAAAGCAGAAAGTCATTAATTCGTAAACGG
ATTGTTAGATACACAAACAGCCAACATACACGAAGAGTGTGCCTAAGATTAAGAAGGTTGACGGGACACAAGAACAATAT
ATTCTATCTGTCTATGGTAACTGCATTTGTATTTCTAAACGAAACGAAAGATAACAATCTTAACTGCTCAAAGTAATGA
AAACTCTTAGACTGGCAAGAGACTCAAATCACACTTATTTTGTGCTGATCCATATTTTGTACAACCTTTTGAGCGATA
TTTACAAATTATACTAGTACAAAAAAGAGAGAGAGAGATAAGCAAAAGAAAAGTCCACTTTTGAGATACTTTTGATA
ATCTTTGATTTGCATTTAATCATTTCCACACTTGCATTTTATAAACAACAAACAAAATTAATCTCCATTGTAGAACAAA
GTAAACTGCAATTTCAATGTCTTCGCATTTGTAATTCGAATTGCAAGAAAAACAAAATATTTTAAATATGTTTAACTA
GTAGAATTTTAAACGTAAGTCCACAAAAACAAGCACATCTAGCTTTAATTTGTTGAAACAAAAGCAGAAAAACGCAAC
AAAAAATGAATGAAATCATTAATTAATTTTGTATATAGTTTTTATGCCATTTTGTGATGTTTTGTGTCTACGGTTT
ATGTCATGTTATTTTAGTTAAATTTCTTATGATTTATGTTTATTTGTAATTTTTTGTGATGTTTTGTTCATCATCATA
TTCAAATTTGGTCTCACAATATAATAGTTTTTAAGCTCCACGCCCGGAGATTGATGGCAAAACGATTGAAATTTGGCCAGA
AGAGAGATAGTTTTCCCAATTCGTACACAGTCTTTTTTGGAAATGCACATTAATGATCTCTCACAATGGAAATTAATGAAA
ATTTGATCTCTCGCAGCTAGCCAAAGTTAAAAAGAAATGAAGAGGAAACATATTCTATAGGCAATTTTCACTATATGCTA
GAATTTCCCGGGCGTTTCAATGCTAATCGAATACAGTGACATGAAGCAAAACATAGCGAAATATTAAGAAAATCAATCA
AAAAAGAAAGAAAAACCAATTCCTCAAAATCGCATTGATCTCATGGATTATACAATACAATTAATCAATCAACCGTTTTTTA
CAATGAGAAATGTTTATAAAAGCAGAAAGTGAAACACAGAAACATAAACAAAAATTAACGAAAGCTTAGATATAAGTTC
GCCAAGCGTTTTAGTTCTATTTTCTAGAATGTCTAAGTTGGTTTAGTGAGGTTATTCTCTTTATTAAGCTGTCTTCGGAC
ACAAGTTTATTTGTATATAAGCAATATTATTTGTGTAGCTAAGTGACAGTCCCAATCAAATCCAATCCAATATCACCCA
GTCCCGGACATTTCCAGCAAAACAATAGACTATTCTCGCGTTCACATGTATCAATCTTAATTTGAATTTACCACAAAATG
AAATGAAATACTAAAACCATACACAAATGAAAAATTTTTTGTAAATTTGTCATCAAGTGAGCAAGGGGATTAGATT
AAGGAATCATCTTGTCTTTATCCCTGCTTATTGCTAATTAGTTTTCACAAATGATCTCTGTTAAAGTTTTTGTGGCCTTGCG
CCCAAAGTCGTACAGATTTTGGTTTGGCATAAATACCTCGAACAAAAAGTTAATGAAAAACGAAGCAATGGAAGAAAAA
ATCAGAATGAAACACAAGAAATTTATATTTTGAACCAATGCTACTTAATCCGTTTTTGTAAATTAAGTATCTTTACTCG
ACCTTGTATATAGCGCAGTTCGAATCACAGAATCAAATGCCATTTTTTGTATAGAATTTTATTTGGTGCCAAAACAGTGAC
AGATAATTTAAATGTCTATGAACCCGTGTATTTTCGCATATTATACATTTATACATATTCGTAACCTTCAATGATAAGTTTG
ATTCTGAAATTTTGTCAACTCAATTTAAGAAACATTTCTGTTGTAGTTTAGTGATAGCTAGCAGAAAGCACTTTGTTTAA
TTGTACATTTTATATTATGCTGTAATATTTTAATATACATAAAATATCATTATTGATCTCATGAATATGTTTCATAAGACAA
CAAAATTTATATATATGAATACATCTATGTGTATGTGTAAATGAATAAAGCGCATAATTTATTATGTAAGATTTATGGA
ACAAATGAAATAAAGTGAAGAAAAATTTGAAAAATTAAGTTTGTATATGATTTGAATGGGTTTGTCTATGTCATGTCATG

Site A

Site B

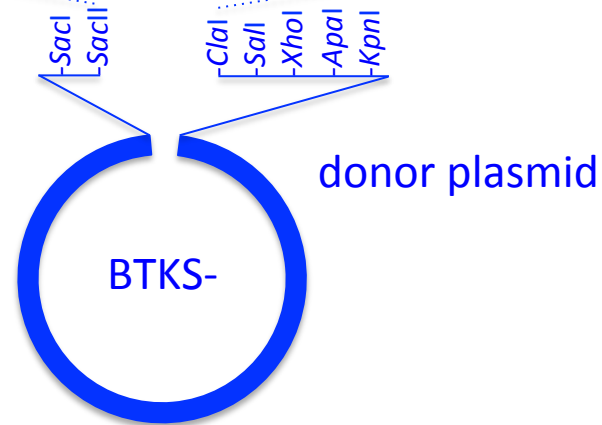
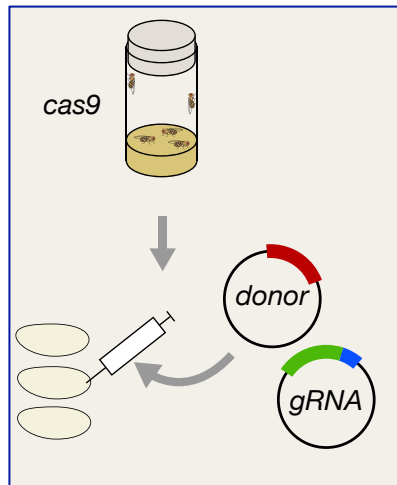
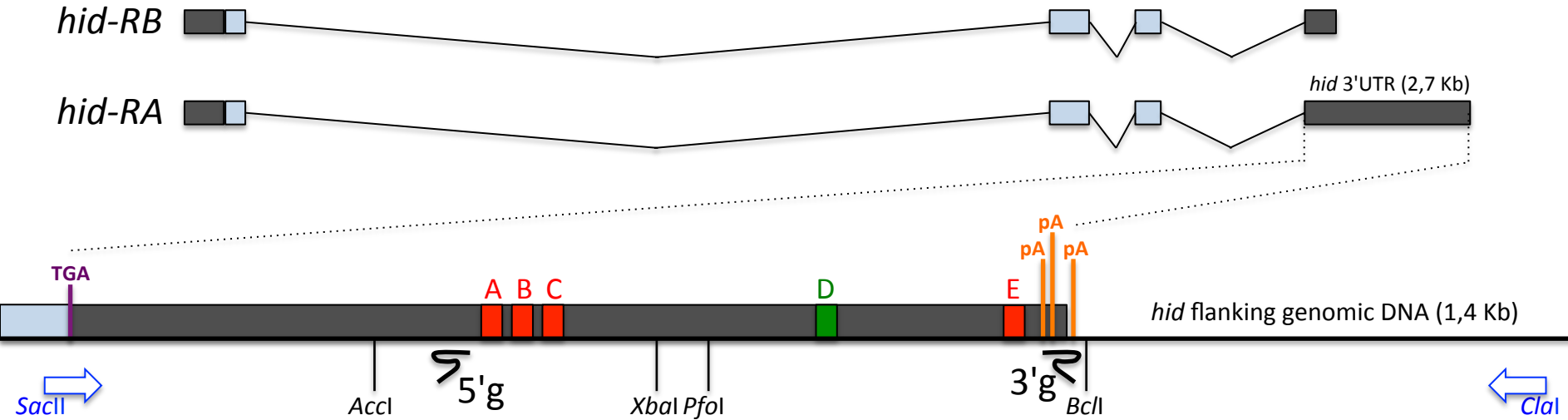
Site C

Site D

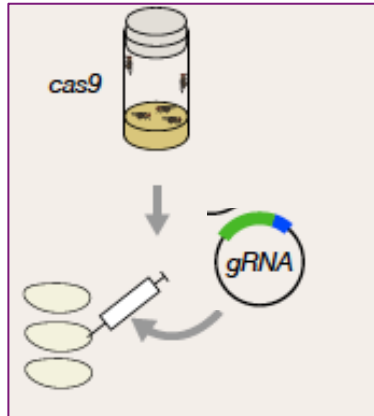
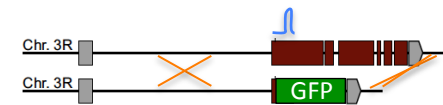
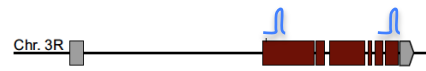
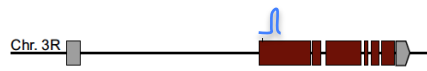
Site E

Poly(A) signal
Poly(A) signal

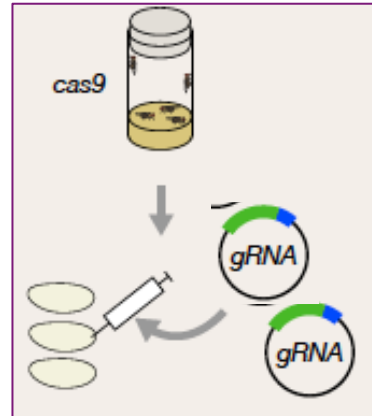
Exemple : étude fonctionnelle d'un microARN et de ses cibles



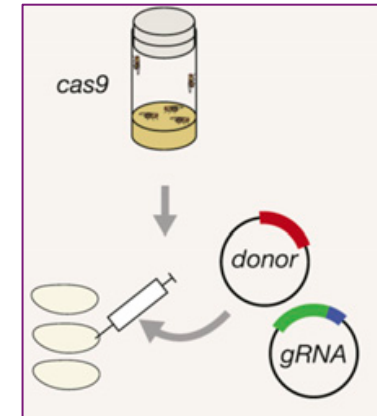
Diverses stratégies de modification du génome en utilisant le système CRISPR/Cas9



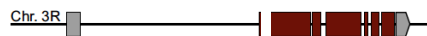
Un seul sgRNA



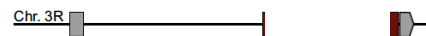
Deux sgRNA



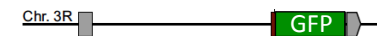
Un ou deux sgRNA + un plasmide qui contient région génomique ciblée, dans laquelle on a créé la mutation voulue.



Création de petites délétions



Création d'une délétion entre les deux coupures



Création d'une mutation par recombinaison homologue : remplacement de séquence

Thérapie génique de la myopathie de Duchenne

Etude fonctionnelle d'un micro-ARN et de ses cibles

Eradication du moustique

Eradication du moustique



A newly emerged female *Anopheles gambiae* mosquito is shown, resting on water before its first flight. Andrew Hammond and colleagues (p 78) develop a CRISPR-Cas9-based gene drive system that targets female fertility in *Anopheles gambiae*, the main vector for the malaria parasite. This paves the way for the development of efficient gene drives that could suppress mosquito populations. Photographers: Andrew Hammond and Alekos Simoni.

Eradication du moustique

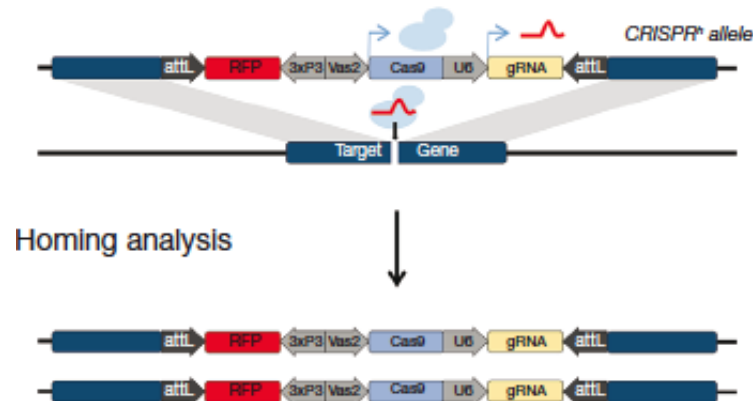
"Gene drive" pour se débarrasser des moustiques potentiels vecteurs de malaria

LETTERS

nature
biotechnology

A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*

Andrew Hammond¹, Roberto Galizi¹, Kyros Kyrou¹, Alekos Simoni¹, Carla Siniscalchi², Dimitris Katsanos¹, Matthew Gribble¹, Dean Baker³, Eric Marois⁴, Steven Russell³, Austin Burt¹, Nikolai Windbichler¹, Andrea Crisanti¹ & Tony Nolan¹



Le gène ciblé est nécessaire pour la fertilité femelle



Le "gene drive" permet la propagation de la mutation à toute la population

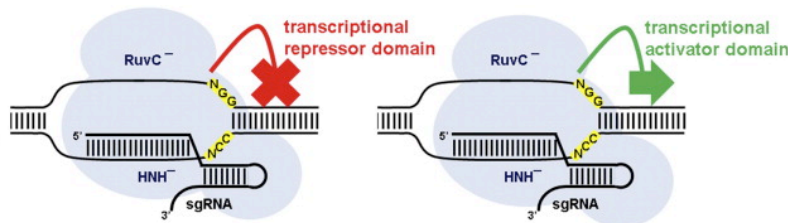
Les perspectives de cette nouvelle technologie

1°) Ce qui peut être envisagé à court terme avec le CRISPR/Cas9

- Amélioration des espèces utilisées par l'agriculture et l'élevage
- Eradication des espèces considérées comme nuisibles (*moustique*)
- Thérapie génique : modifier le génome humain (somatique) (*myopathie de Duchenne*)
- Transformation de l'Homme (germinal)

2°) Le CRISPR "next generation"

- Cas9 peut être modifiée pour devenir :
 - un répresseur de transcription site-spécifique
 - un activateur de transcription site-spécifique



- D'autres systèmes peuvent être encore plus performants, ne pas nécessiter de PAM...

Les raisons du succès

Le système CRISPR/Cas9 pour modifier les génomes "à volonté"

Les avantages de cette nouvelle technologie sur les technologies de modification des génomes déjà existantes

- Efficacité, polyvalence
- Avantages sur la sélection en agriculture : facilité, rapidité
- Avantages sur les OGM : s'affranchir des transgènes
- Avantages en thérapie génique : s'affranchir de la nécessité de vecteurs d'intégration

WORLD VIEW

A personal take on events

MACLENN P. BALL



Regulate gene editing in wild animals

The use of genome-modification tools in wild species must be properly governed to avoid irreversible damage to ecosystems, says Jeantine Lunshof.

Gene editing is a hot topic following a flurry of interest in the use of CRISPR tools to modify human embryos. As an ethicist in a genome-engineering lab, I am an eyewitness to these recent scientific developments and I do have concerns about the way gene editing could be used. But they are not the concerns you might expect.

The ethical issues raised by human germline engineering are not new. They deserve consideration, but outcry over designer babies and precision gene therapy should not blind us to a much more pressing problem: the increasing use of CRISPR to edit the genomes of wild animal populations. Unless properly regulated and contained, this research has the potential to rapidly alter ecosystems in irreversible and damaging ways.

Scientists have already used CRISPR to modify mosquitoes and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. And in combination with another molecular-biology technique called gene drive, they have found a way to massively increase the efficiency of spreading these transformations to offspring and through the population. Once introduced, these genetic changes are self-propagating. If released beyond the laboratory, the effects would spread with every new generation and would quickly run out of control.

Gene drive achieves rapid changes in a sexually reproducing population because it relies on genes that are capable of preferential spread through generations. Without this, introduced traits meet the statistical obstacle of Mendelian inheritance and take hold in a population much more slowly. Altering wild animal populations using gene drive aims to rapidly disrupt a particular trait, such as the ability of *Anopheles* mosquitoes to transmit malaria. It makes only a small-scale initial change to the relevant ecosystem and, in this example, the preliminary disruption would be restricted to the mosquito's natural habitat. But the risk of broader ecosystem disruption is unknown and would require extensive mathematical modelling to estimate.

The gene-drive technique was developed in our lab, and in the initial publication of the method, my colleagues called for strict and validated biosafety measures and public review and consent (K. M. Esvelt *et al.* *eLife* 3, e03401; 2015). Meanwhile, work that combines CRISPR and gene-drive techniques is marching on. In what they call a "mutagenic chain reaction", scientists at the University of California, San Diego, have used the combined approach to alter *D. melanogaster* (V. M. Gantz and E. Bier *Science* 348, 442–444; 2015). To me and others, this research raises serious and significant fears about biosafety. The work was done in a lab, but should any of the modified insects escape, they would be able to spread widely — unlike mosquitoes, which rely on ecological niches — and breed with the wild population. Experiments such as these should

certainly be allowed, but only under the strictest conditions and with appropriate safeguards.

In less than three years, CRISPR has become a key tool for biologists. 'Should they stop before it is too late?' is therefore an immaterial question. Careful assessment of the various applications of CRISPR shows that there is no single or universal ethical evaluation that could cover all of them. The different consequences of human genome modification in either somatic cells or the germ line, and the modification of the ecosystem through gene drives, call for different ethical and policy evaluations.

Some critics argue that the unpredictable effects that human germline genome editing could have on future generations make it dangerous and ethically unacceptable. Uncertainty, however, is not a useful way to judge ethical acceptability. Others highlight the potential non-therapeutic purposes of germline modification. From the standpoint of ethics, it is not clear why trait modification is by definition a bad thing. Moreover, the criteria for what is therapy and what is 'enhancement' are fluid.

The consequences of modifying human genomes will be limited because effects will always be restricted to humans — the index person and their line of descendants. Biosafety and biosecurity risks are not apparent at this moment. Regulation, if and when it comes, might need to be adapted to the local situation, to existing legislation and to cultural and religious normative frameworks.

Presented in those terms, the human applications of CRISPR are much less troubling than the possibility of ecosystem modification. By definition, such disruption has more severe,

complex, system-level consequences, and the breadth of its impact and the duration of its effects are hard to model. Gene drives are designed to be reversible, but this still needs to be tested. Self-propagating modified organisms cannot be contained within national borders and pose major challenges for regulation and governance. We therefore need an urgent review of biosafety and biosecurity protocols for experiments — both in the lab and in field-scale trials — that combine CRISPR and gene-drive techniques in wild organisms. Funders and institutions must lay out and enforce regulations.

The work with gene editing has thrown a useful spotlight on these bioengineering tools. But from an ethical perspective, the question we should ask is not what CRISPR can do for humans, but what humans can do with CRISPR. ■

**WE NEED AN
URGENT REVIEW
OF BIOSAFETY
PROTOCOLS FOR
CRISPR AND GENE-
DRIVE EXPERIMENTS IN
WILD
ORGANISMS.**

➔ **NATURE.COM**
Discuss this article
online at:
go.nature.com/igwpmu

Jeantine Lunshof is assistant professor at the University of Groningen, the Netherlands, and a visiting scientist at Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.
e-mail: jelunshof@genetics.med.harvard.edu