

# cellectis

Quoi de neuf en  
ingénierie des  
génomés?

Le point sur les  
méganucléases

P. Duchateau

26 Janvier 2010



## Note de mise en garde

La présente présentation et les informations qu'elle contient, ne constituent ni une offre de vente ou de souscription, ni la sollicitation d'un ordre d'achat ou de souscription, des actions Celectis dans un quelconque pays. Ce document contient des déclarations prospectives de la Société relatives à ses objectifs. Ces déclarations prospectives reposent sur les estimations et anticipations actuelles des dirigeants de la Société et sont soumises à des facteurs de risques et incertitudes tels que la capacité de la Société à mettre en œuvre sa stratégie, le rythme de développement du marché concerné, l'évolution technologique et de l'environnement concurrentiel, et tous les risques liés à la gestion de la croissance de la Société. Les objectifs de la Société mentionnés dans le présent communiqué pourraient ne pas être atteints en raison de ces éléments ou d'autres facteurs de risques et d'incertitude tels que décrits, notamment, dans le prospectus préparé par la Société à l'occasion de son introduction en bourse et ayant reçu de l'Autorité des marchés financiers ("AMF") le visa n° 07-023 en date du 22 janvier 2007.

# Sommaire

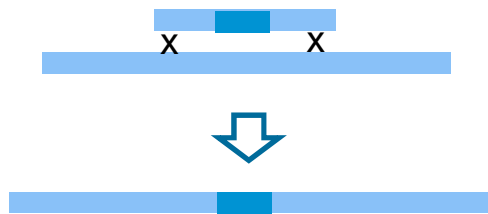
- Stratégies
- caractérisation des méganucléases



# 1. Approche ciblée induite par méganucléase: Stratégies

# Utilisation de la recombinaison homologue

**Recombinaison ciblée  
« Classique »:**  
 $10^{-6}$ - $10^{-9}$



Homologous gene targeting décrit par

- Rothstein (1983) in yeast
- Capecchi, Smithies and co-workers (1986-1987) in mammalian cells

**Recombinaison ciblée  
induite par endonucléases:**  
 $10^{-2}$ - $10^{-5}$

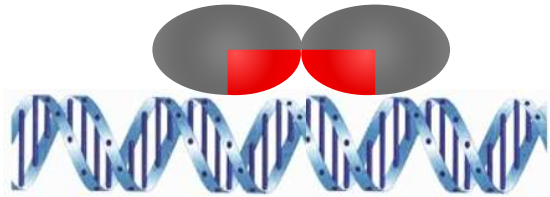


Meganuclease-induced gene targeting, décrit par

- Rouet et al. (1994)
- Choulika et al. (1995) in mammalian cells

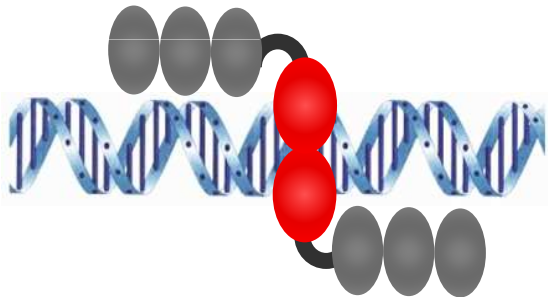
# Différent types d' Endonucléases utilisés pour la recombinaison ciblée

## Méganucléases (homing endonucleases)



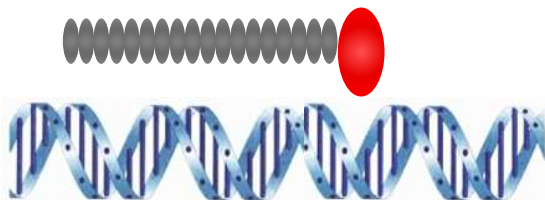
- Protéines naturelles
- 1<sup>ère</sup> endonucléases utilisées en ingénierie de génomes
- peu de modularité apparente (2 domaines séparable ?)

## Zinc-Finger Nucléases



- Protéine artificielle: Fusions de doigts de zinc (« DNA binding domain ») avec un domaine catalytique (FokI)
- 1<sup>ère</sup> endonucléase artificielle décrite clivant un gène humain
- Haut niveau de modularité (6-8 séparable domaines “polydactyls”)

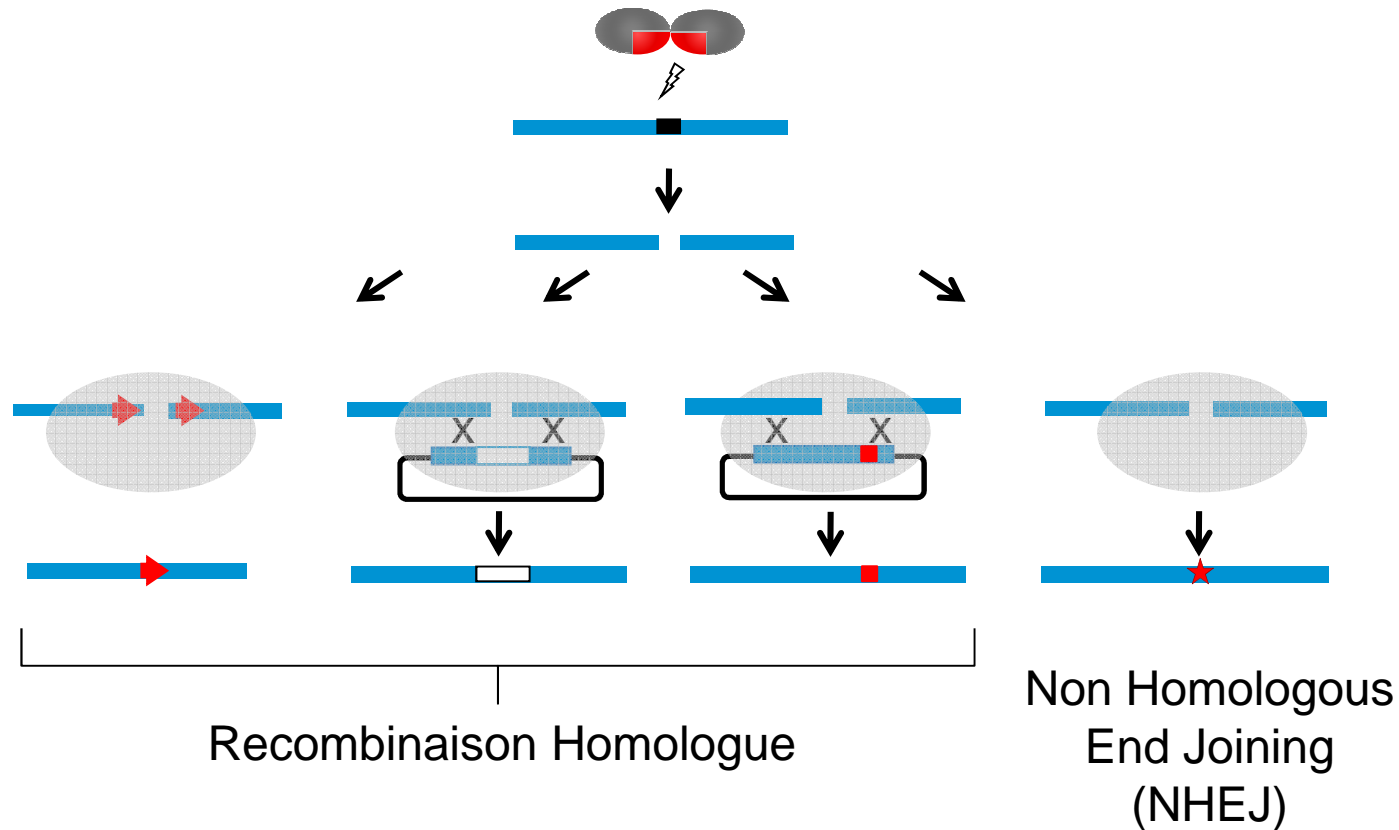
## Endonucléases chimiques



- « DNA binding domain » Chimique (TFO, polyamine) fusionné à un effecteur (chimique ou enzyme de restriction)
- grande modularité

[Cannata et al., PNAS 2008](#); [Eisenschmidt et al., NAR 2005](#); [Simon et al., NAR 2008](#); [Arimondo et al., MCB 2006](#)

# Principales approches de « chirurgie génomique »



**Elimination de duplication**

**« Knock-in » de séquences manquantes**

**« Knock-out »**

**Correction de Mutation**

(Limitée par taille des tracts de conversion)

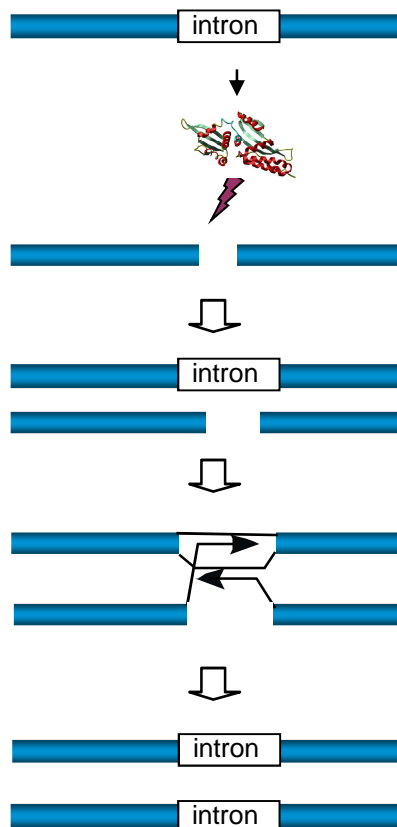
**Non Homologous End Joining (NHEJ)**

**Inactivation de gène**



## 2. Méganucléases

# La découverte des méganucléases, et du mécanisme de “homing”



- 1983: identification de la méganucléase HO initiant changement de signe sexuel chez la levure
- 1986: identification de la méganucléase I-SceI et du mécanisme de « homing »
- Depuis, plus de 500 méganucléases identifiées. Les méganucléases sont par définition des endonucléases ayant un large site de reconnaissance (>14 bp). Leur fonction est d'initier la recombinaison homologue
- Ont été utilisées comme outils d'ingénierie de génomes

## 1994-2009: Validation de la technologie par de nombreux laboratoires, dans plusieurs types cellulaires and organismes

➤ 1994-1995: « gene correction » et « gene insertion » .I-SceI en cellules mammifères

➤ 1988-2009: méganucléase HO sous promoteur inductible a été utilisée dans l'étude des mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN chez la levure *S. cerevisiae* (Jim Haber & autres)

➤ 1993-2009: : méganucléase I-SceI utilisée dans l'étude des mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN chez la plante (Holger Puchta & autres)

➤ 1994-2009: I-SceI utilisée dans l'étude des mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN chez la plante dans les cellules mammifères (Maria Jasin & others)

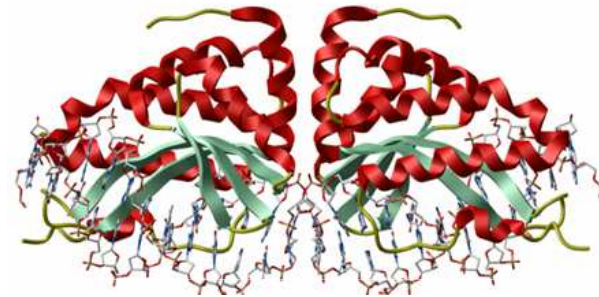
➤ 2000-2009: I-SceI utilisée pour l'induction de recombinaison ciblée, et I-CreI pour l'induction de recombinaison entre répétitions en tandem chez la Drosophile, (Kent Golic)

➤ 2009: Centaines de publications décrivant l'utilisation de I-SceI, HO, I-CreI, et I-CeuI, (plantes, levure, cellules mammifères, souris, bactérie, poisson, nématode, Trypanosome, etc... par très nombreux of laboratoires

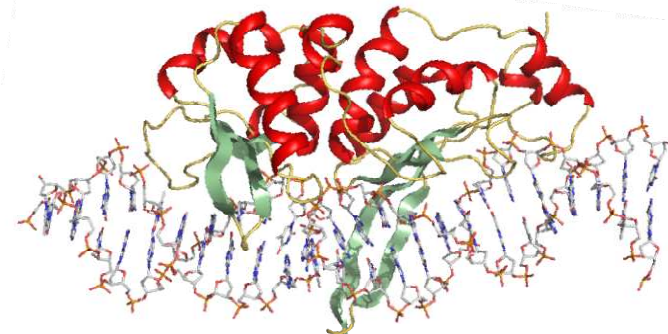
# Les méganucléases de la famille LAGLIDADG : Nos « scaffolds » préférés

- Les méganucléases LAGLIDADG sont les endonucléases naturelles les plus spécifiques
- Leur fonction est d'induire une recombinaison ciblée (the homing process)
- La famille LAGLIDADG est aussi la plus grande des 4 familles de méganucléases et la mieux caractérisée (plusieurs structures disponibles depuis 1997)
- Etudes structurales montrent une forte interdépendance entre la fixation et la coupure

I-CreI (dimère)



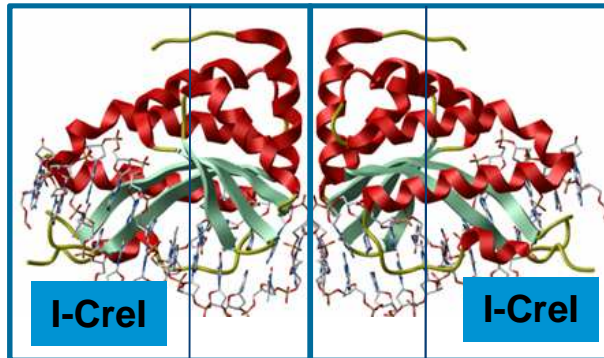
I-SceI (monomère)



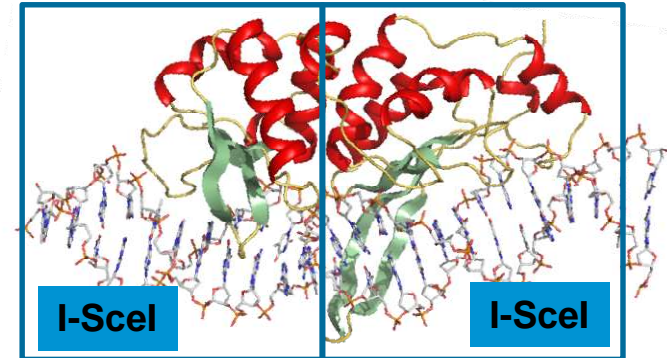
# Méganucléases comme squelette pour l'ingénierie d'endonucléases

## Détermination de domaines séparables (2 ou plus?)

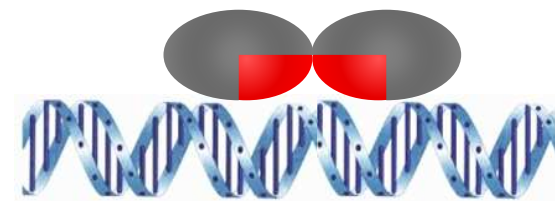
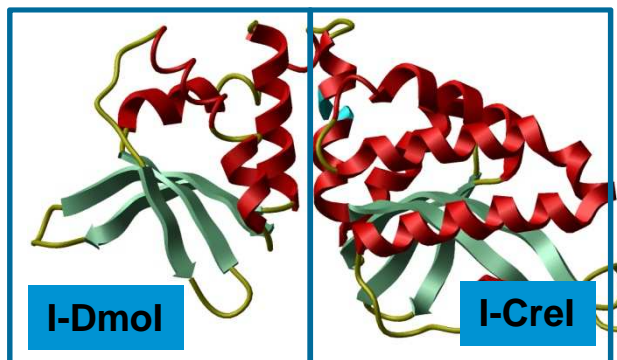
I-Crel (dimer)



I-SceI (monomer)



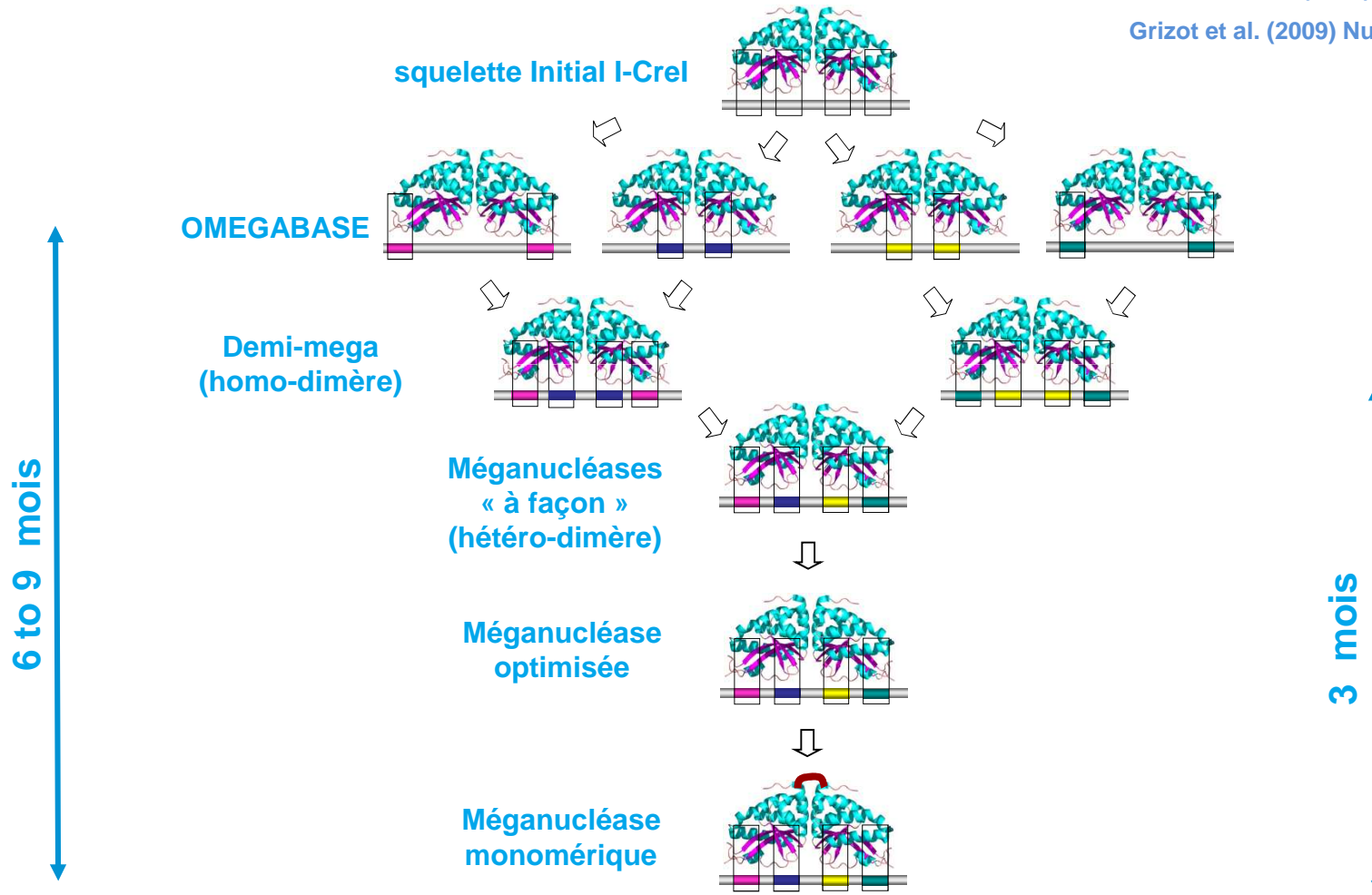
DmoCre or E-Drel (artificial hybrid)



Chevalier et al., Mol. Cell 2002  
Epinat et al., NAR 2003

# L'ingénierie des méganucléase

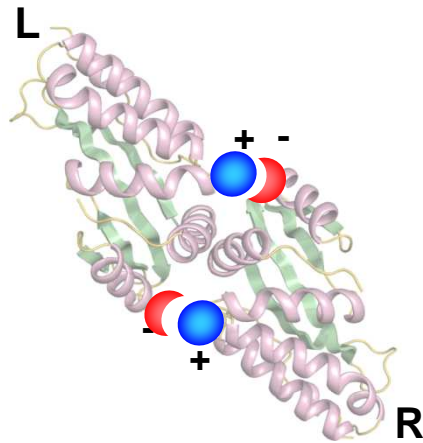
Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res.  
Arnould et al. (2006) J. Mol. Biol.  
Smith et al. (2006) Nucleic Acids Res.  
Arnould et al. (2007) J. Mol. Biol.  
Redondo et al. (2008) Nature  
Grizot et al. (2009) Nucleic Acids Res.



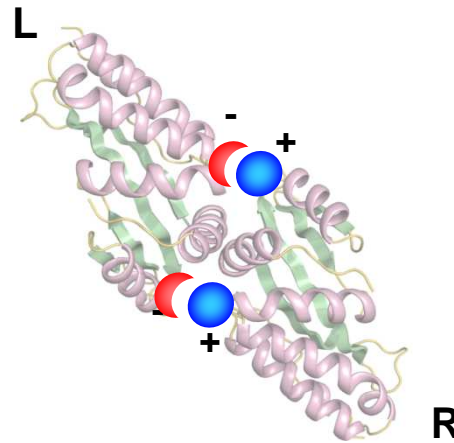


### 3. Caractérisation des méganucléases

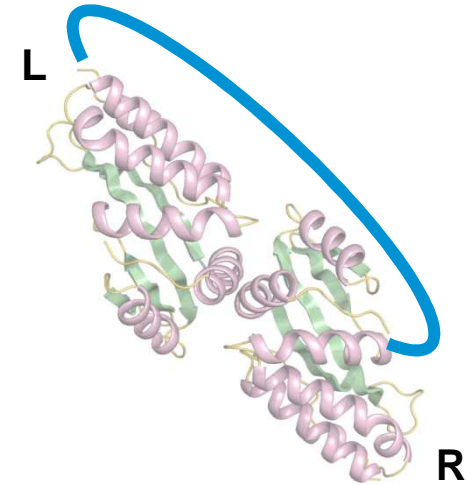
# Hétérodimère Obligatoire et molécule simple chaîne: Une question, deux réponses



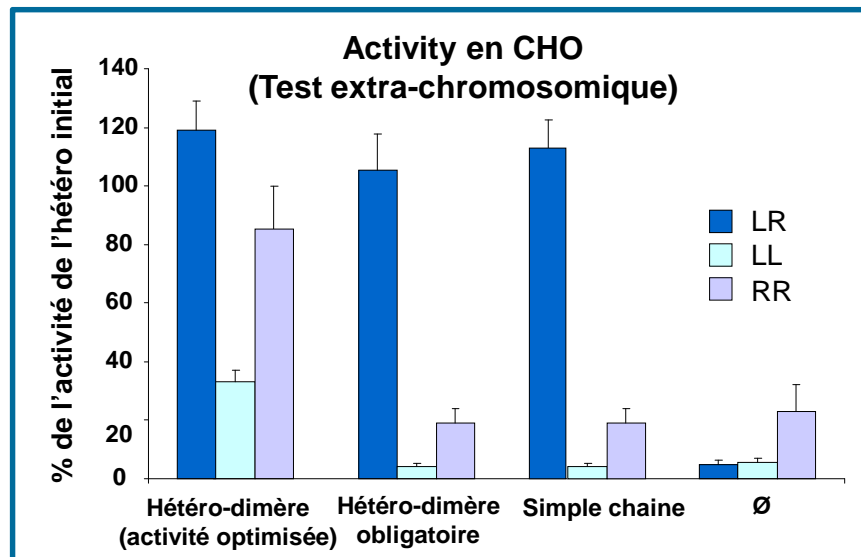
**Hétéro-dimère**  
L/L; L/R; R/R



**Hétérodimère Obligatoire**  
L/R



**Molécule simple chaîne**  
L/R



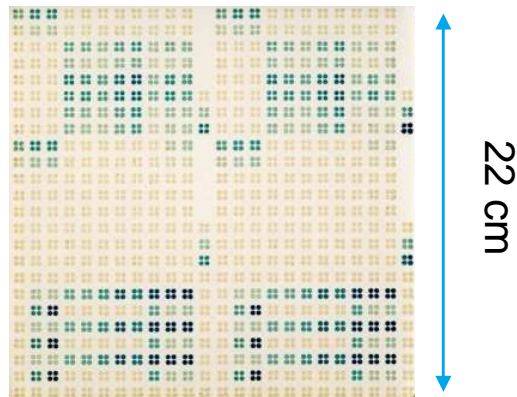
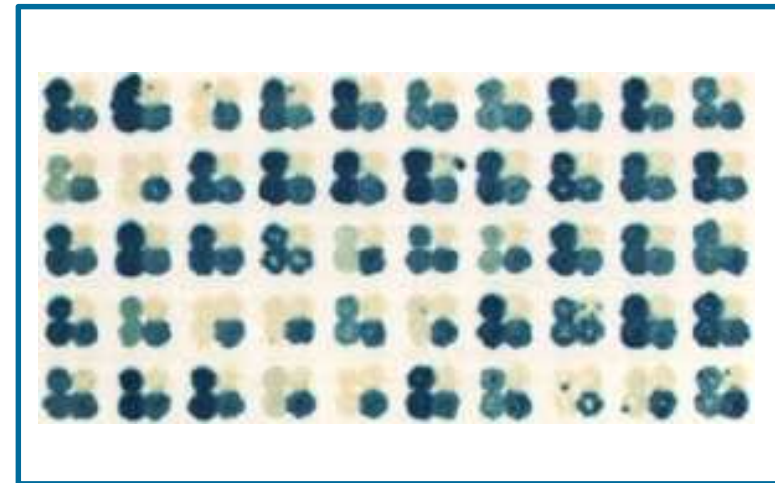
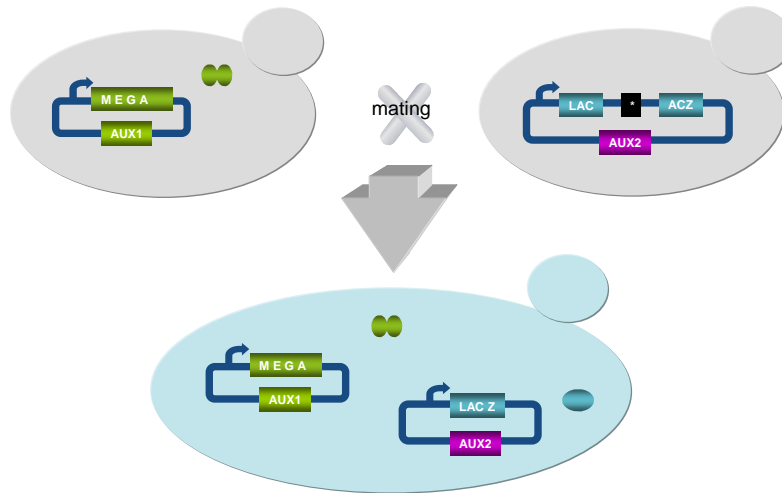
Epinat et al. NAR 2003

Grizot et al., NAR 2009

Li et al.; NAR 2008

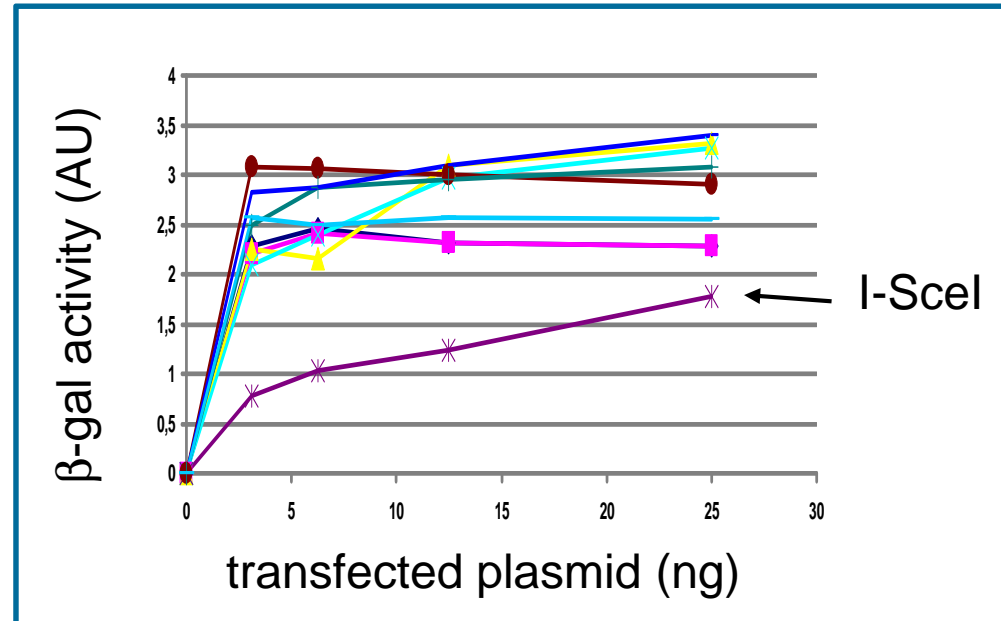
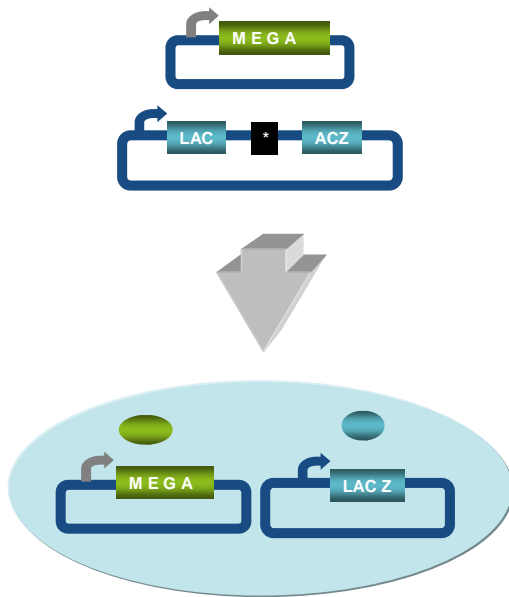
# Caractérisation : en levure (essai extra-chromosomique)

$3 \cdot 10^5$  points / week

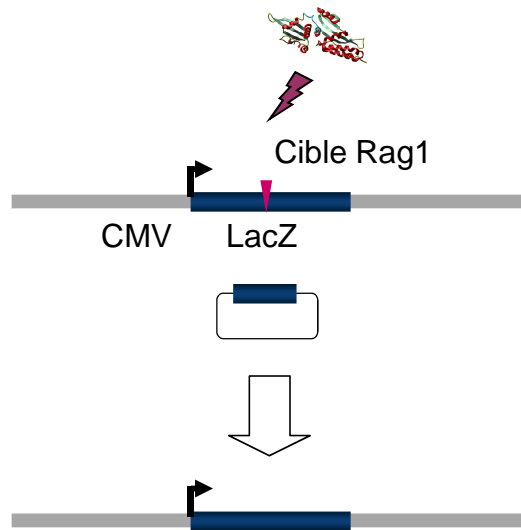


# Caractérisation : en cellules CHO-K1 (système rapporteur extra-chromosomique)

10<sup>4</sup> points / week



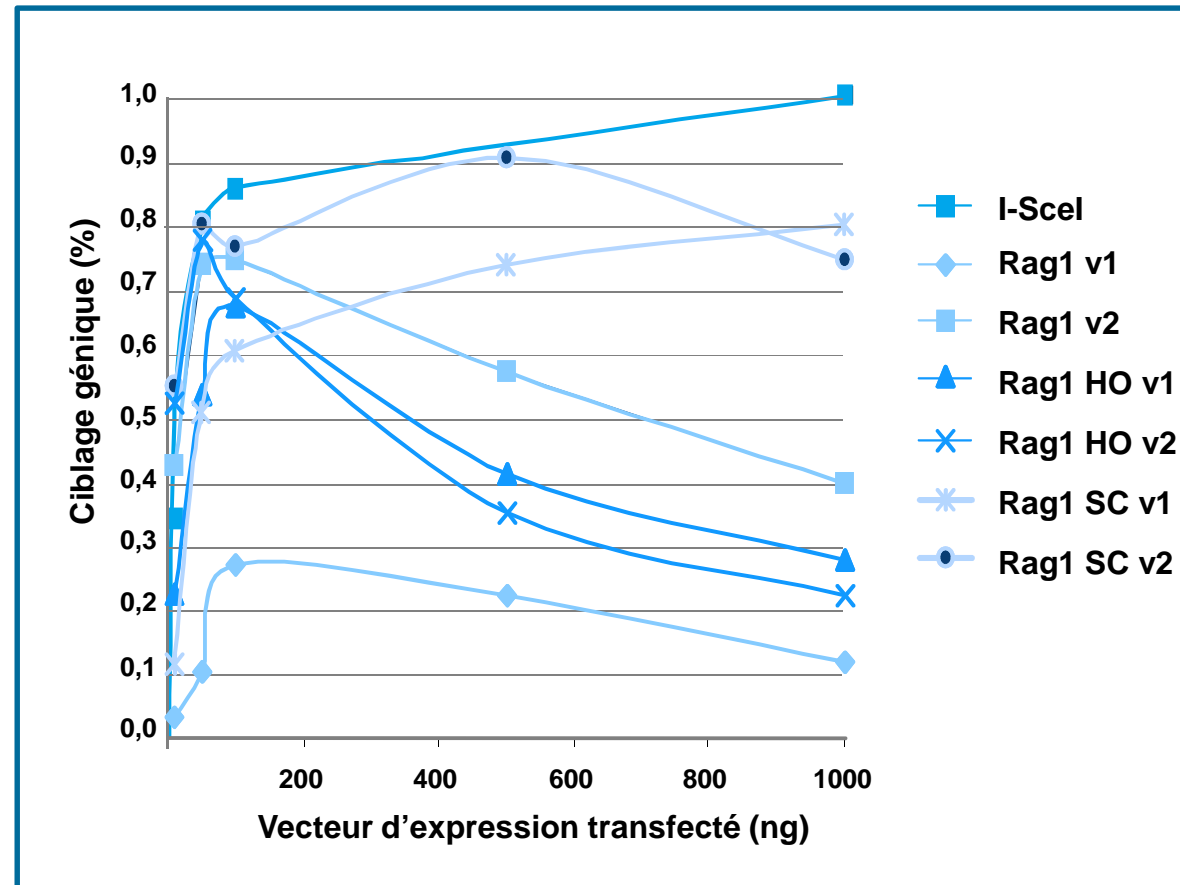
# Caractérisation : en cellules CHO-K1 (système rapporteur intra-chromosomique)



Arnould et al. JMB 2007

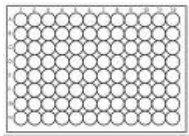
Redondo et al. Nature 2008

Grizot et al. NAR 2009



# Caractérisation : test de survie cellulaire en CHO-K1

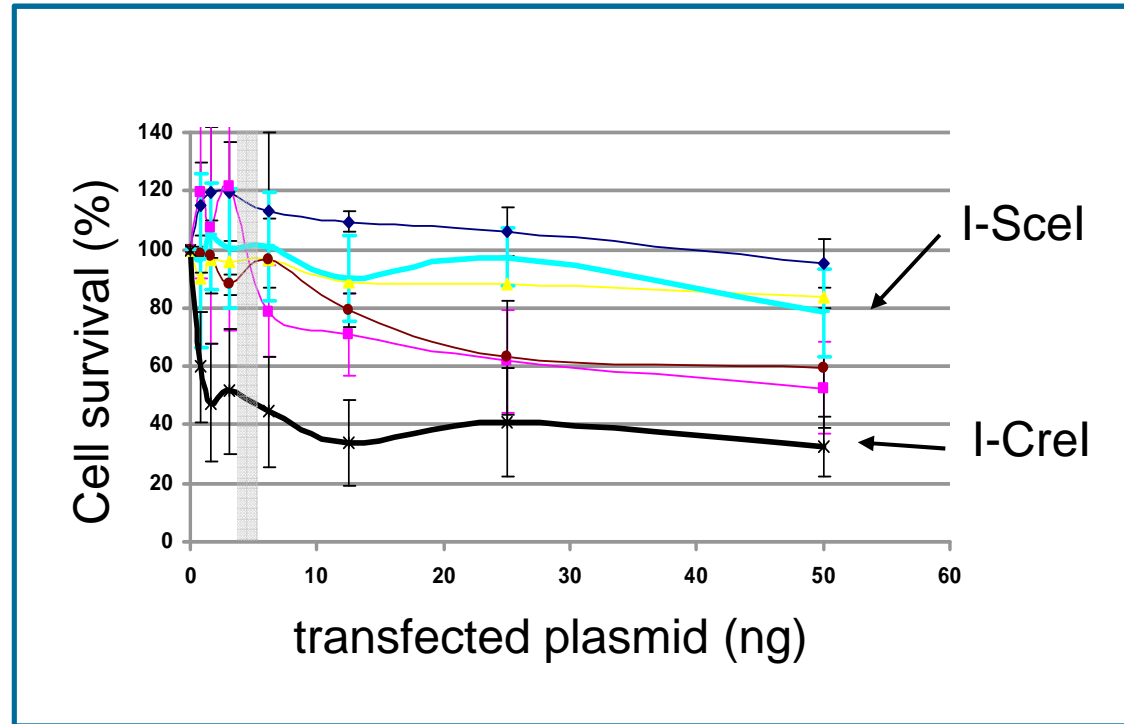
Co-Transfection  
en CHO-K1  
(MN et GFP)



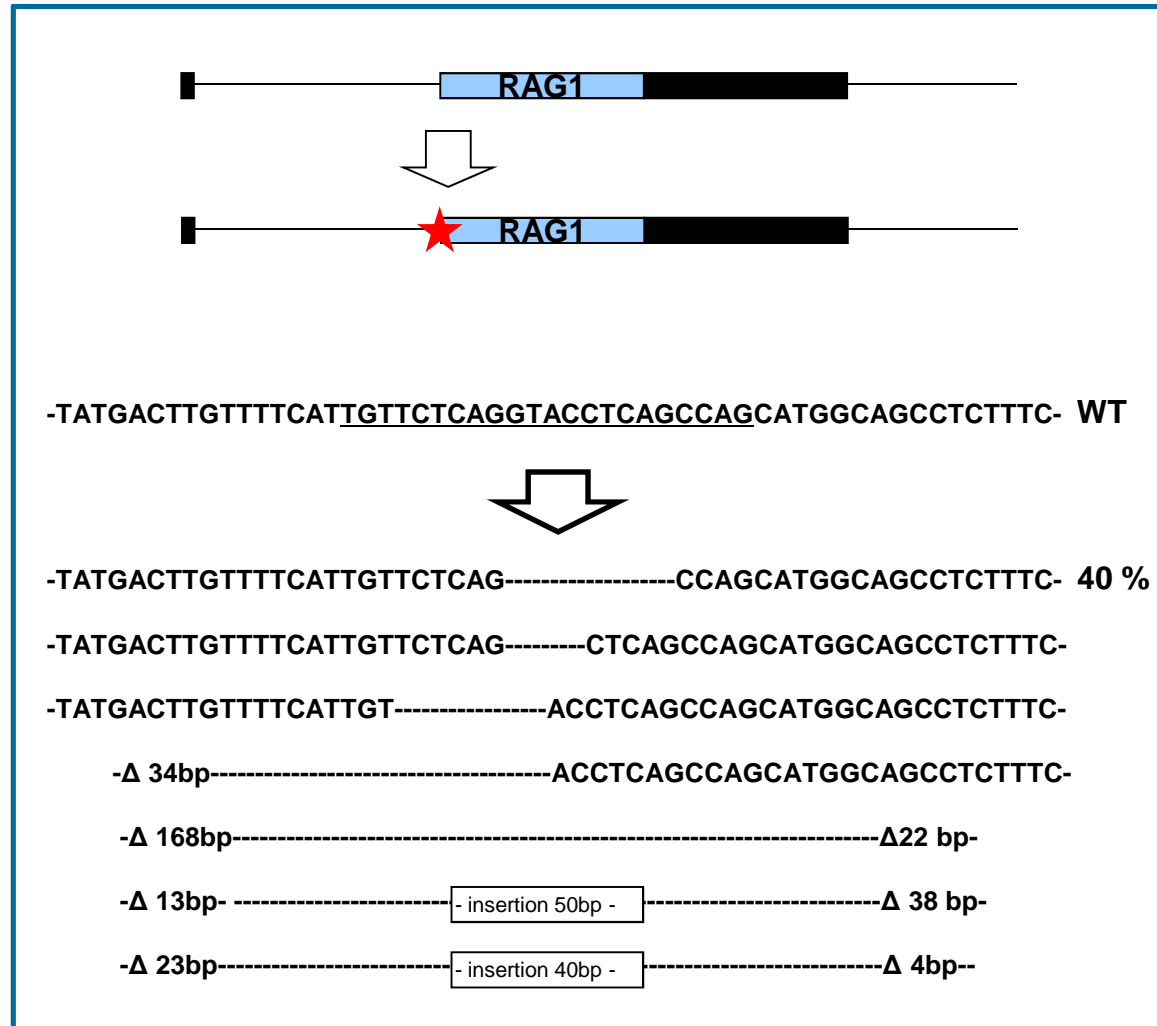
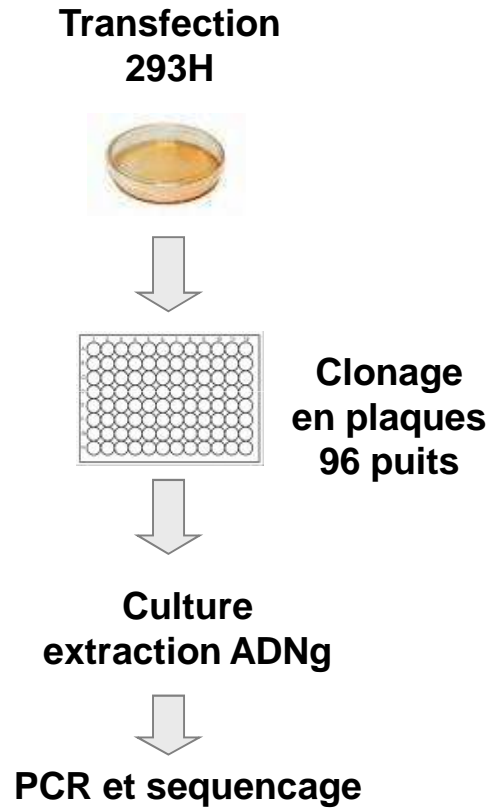
Culture



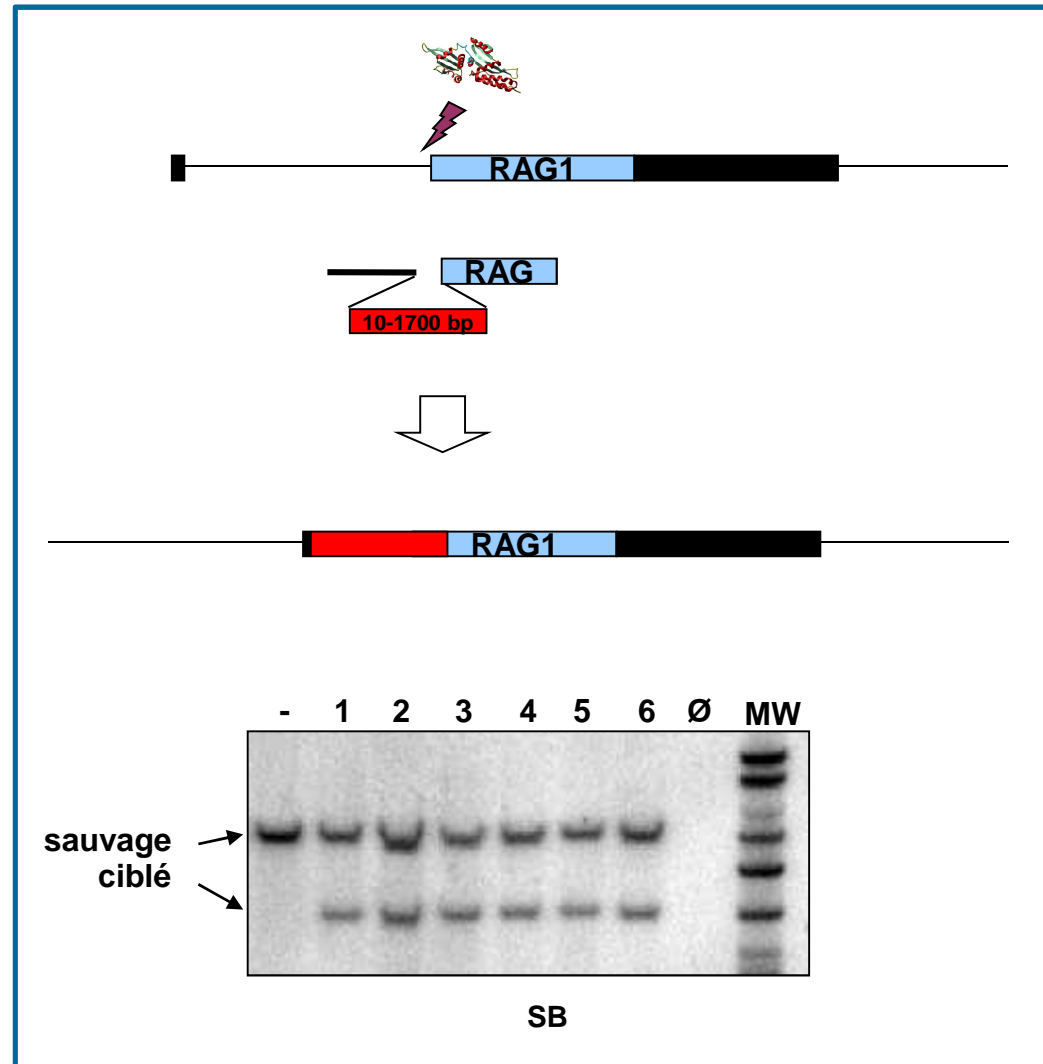
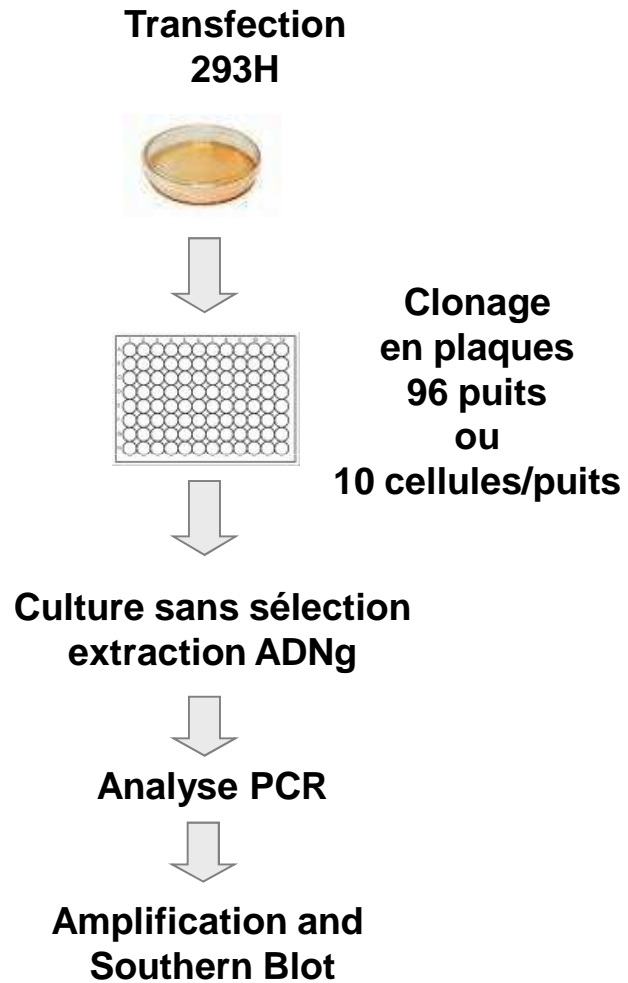
Détermination  
cellules GFP+  
(Jour 1 et 6)



# Caractérisation : activité au site endogène (mutagénèses)



# Caractérisation : activité au site endogène (recombinaison homologue ciblée)

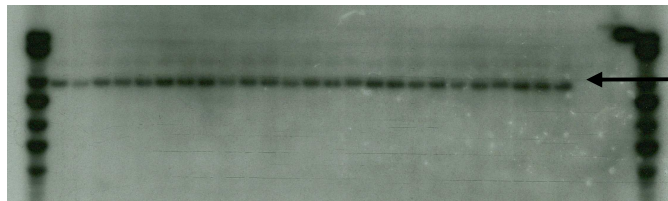
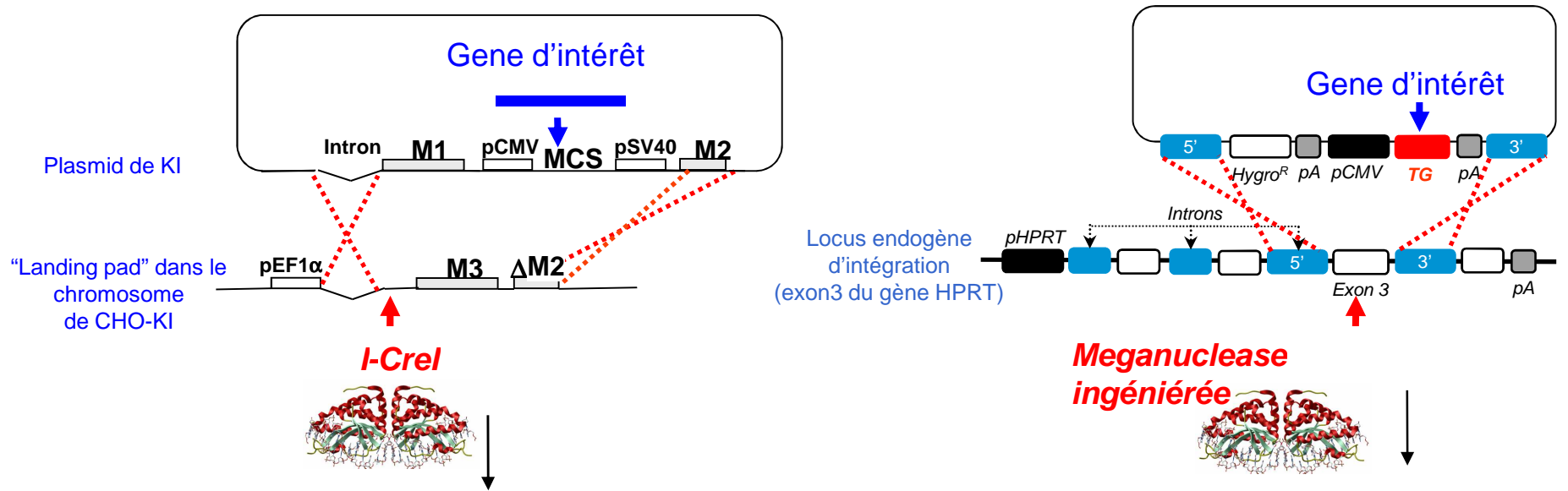


# Exemple d'activité de méganucléases au site endogène

Meganuclease	InDel %	Frequence HR (%)
RAG	1.04/1.47/0.75 (0.03)	8
MN 2	ND	6
MN 3	0,3 (0.2)	0
MN 4	0,3 (0.07)	0
MN 5	0,44 (0.05)	0,3
MN 6	0,22 (0.02)	0,9
MN 7 a	1,35/1.01 (0.05)	8.7
MN 7 b	0,08 (0.07)	0,09
MN 7 C	0.8	ND
MN 8	0,4 (0.00)	0
MN 9	0,08/0.03 (0.03)	1
MN 11	0.19 (0.07)	ND

- Conditions standardisées sans sélection
- InDel: Mutagénèse par Deep sequencage à J7 (% de produit PCR)

# Ingénierie robuste de lignées cellulaires



Southern Blot  
24 clones ciblés issus d'une expérience contrôle  
(100% ciblés)

Recombinaison  
ciblée



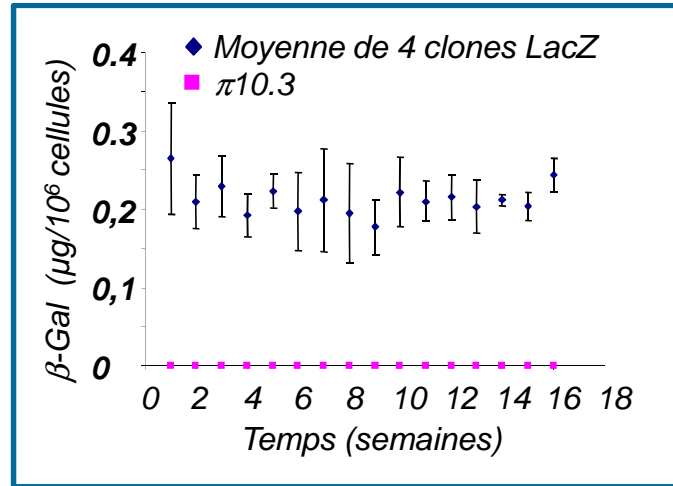
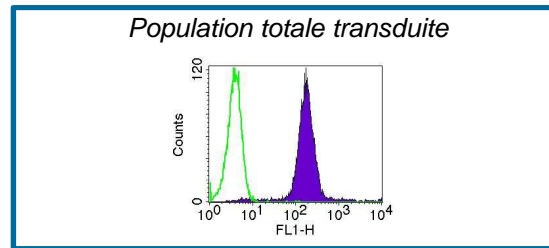
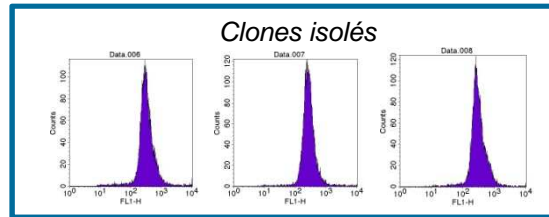
Insertion ciblée à >95 %

# Homogénéité, reproductibilité et stabilité

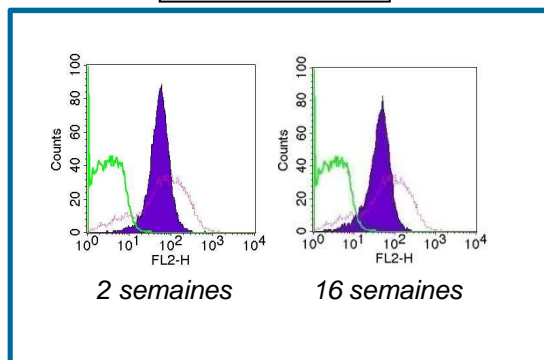
FACS

Transgène : LacZ

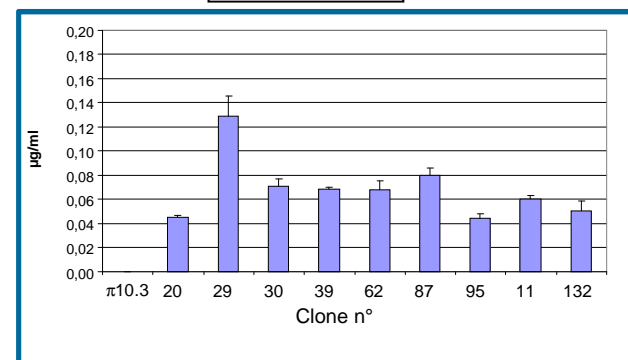
$\beta$ -glo



CD4



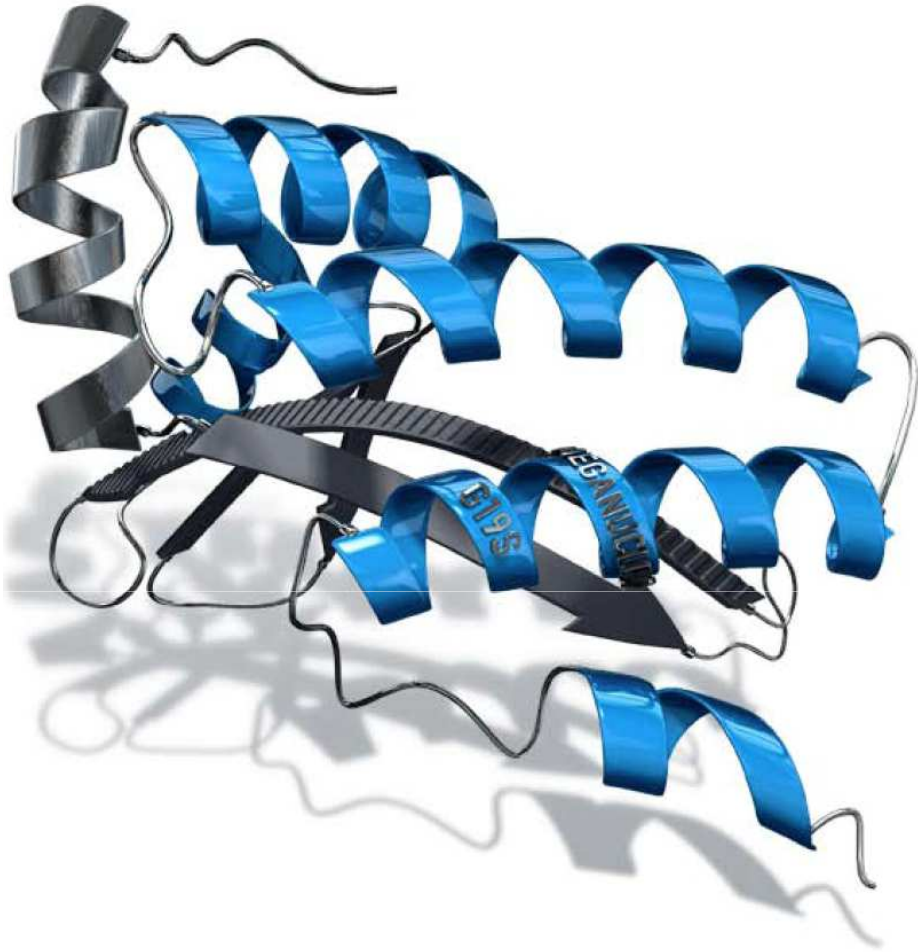
mAb





## 4. Conclusions

- **Les méganucléases sont depuis 15 ans des outils efficaces d'ingénierie des génomes**
- **HTS et design semi-rationnel permettent de créer des méganucléases à spécificité modifiée**
- **Les méganucléases monomériques améliorent la spécificité et résolvent le problème de la stœchiométrie liée aux hétérodimères**
- **Les méganucléases peuvent induire des événements de recombinaison homologue au site endogène (fréquences de plusieurs pourcents)**
- **L'efficacité peut dépendre du locus**
- **Cible potentielle trouvée toutes les 300 bp (20% de taux de succès, dépend de la séquence de la cible)**

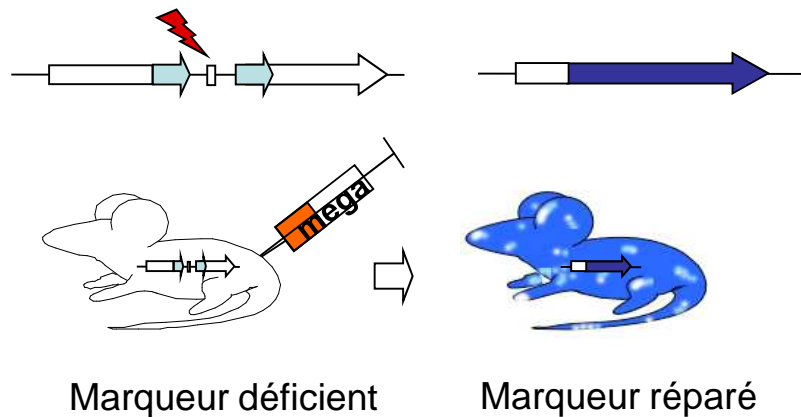


**cellectis**

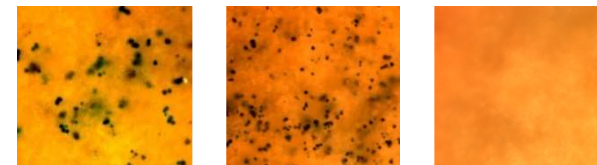
**Merci**

# Evaluation *in vivo*

## Réparation d'un gène marqueur dans le foie



souris transg. + Adeno I-Scel      wt (B6D2) + Adeno control



D0      Injection IV de  $2 \times 10^{11}$  vg  
Adenovirus exprimant I-Scel

↓

D4      Ablation du foie et marquage X-Gal  
(*in toto* ou sections)

### Souris avec hépatocytes réparés

I-Scel	33/33
contrôles	0/16
Non-traitées	0/36