



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

FACULTE DE PHARMACIE INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET
BIOLOGIQUES

THÈSE n°8

THÈSE

Pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 20 janvier 2022 par

Mme PETOT-ROSA Sophie

Née le 17 mars 1996

À Écully

**Mise au point d'un système CRISPR/Cas9 pour étudier des
variants faux-sens du gène *APOB* et évaluer la sécrétion
d'Apolipoprotéine B**

JURY

Mme Christine VINCIGUERRA, PU-PH

Mme Mathilde DI FILIPPO, PH

M. Alexandre JANIN, MCU-PH

Mme Oriane MARMONTEL, PH

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université Frédéric FLEURY
- Présidence du Conseil Académique Hamda BEN HADID
- Vice-Président du Conseil d'Administration Didier REVEL
- Vice-Président de la Commission Recherche Jean François MORNEX
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon

SANTE

- UFR de Médecine Lyon Est Directeur : Gilles RODE
- UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux Directrice : Carole BURILLON
- Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Directeur : Claude DUSSART
- UFR d'Odontologie Directrice : Dominique SEUX
- Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR) Directeur : Xavier PERROT
- Département de formation et centre de recherche en biologie humaine Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- UFR Fédération Sciences (Chimie, Mathématique, Physique) Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI
- UFR Biosciences Directrice : Mme Kathrin GIESELER
- Département composante Informatique Directeur : M. Behzad SHARIAT
- Département composante Génie Electrique et des procédés (GEP) Directrice Mme Rosaria FERRIGNO
- Département composante Mécanique Directeur : M. Marc BUFFAT
- UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur : M. Yannick VANPOULLE
- Polytech Lyon Directeur : M. Emmanuel PERRIN
- I.U.T. LYON 1 Directeur : M. Christophe VITON
- Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA) Directeur : M. Nicolas LEBOISNE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)

- **BIOPHYSIQUE**

Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE** Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)
- **SANTE PUBLIQUE**
Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)
Madame Delphine HOEGY (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
Madame Nadia WALCHSHOFER (PR)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU-HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE** Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
Monsieur François HALLE (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU-PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

Madame Camille LEONCE (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (PR)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
Monsieur Michel TOD (PU-PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**

Madame Aline INIGO PILLET (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
Madame Sarah HUET (MCU-PH)
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU-PH)
Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)

Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

• **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)
Madame Amy DERICQUEBOURG (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

• **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (PR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)
Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur David GONCALVES (AHU)

• **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
MCU : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
HDR : Habilitation à Diriger des Recherches
AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Centre de Biologie Est, dans le Laboratoire des Lipides de l'Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon.

Je remercie tout d'abord le professeur Christine Vinciguerra, qui me fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie également les pharmaciens hospitaliers Madame Mathilde Di Filippo, Monsieur Alexandre Janin et Madame Oriane Marmontel, membres du jury qui me font le plaisir de juger ce travail, pour le temps consacré à sa lecture.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de stage et de thèse, le Docteur Mathilde Di Filippo, pour la façon dont elle m'a accueillie, guidée et aidée tout au long de ce projet. Merci encore pour le temps consacré à mon travail, et merci de m'avoir permis de réaliser ce projet.

Je remercie ma technicienne référente, Madame Séverine Nony, pour sa patience, sa pédagogie et les nombreuses choses qu'elle m'a apprises. Je remercie aussi Monsieur Xavier Vanhoye pour son aide et ses conseils lors de la réalisation de ce projet.

Je remercie infiniment ma famille pour leur soutien et leur investissement, qui m'ont permis de réaliser ces études difficiles dans les meilleures conditions possibles. Je remercie mes amis pour les bons moments passés dans et en dehors de la fac.

Enfin, je remercie mon compagnon Thomas qui, je le sais, est et sera toujours là pour moi.

Table des Matières

Introduction	17
I. Rappels bibliographiques	18
1. Les lipoprotéines	18
a. Description	18
b. L'apolipoprotéine B	19
c. Métabolisme des lipoprotéines.....	22
i. La voie entéro-hépatique ou voie exogène.....	22
ii. La voie endogène.....	23
iii. La voie de retour	23
2. Les hypobetalipoprotéïnémies.....	24
a. L'hypocholestérolémie	24
b. L'hypobêtalipoprotéïnémie familiale (HBLF).....	25
c. Variants responsables de l'HBLF	26
i. Les variations du gène <i>APOB</i>	26
ii. Relation structure activité de l'ApoB	27
3. Méthodes de diagnostic moléculaire	27
a. Séquençage Sanger	28
b. Séquençage haut débit NGS.....	30
4. Méthodes d'étude <i>in vitro</i> de la pathogénicité des variants	32
a. Transfection de cellules ne produisant pas la protéine	32
b. Méthode d'édition du génome : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9.....	33
i. Origine de la découverte	33
ii. Utilisation de cette technique pour éditer le génome	35
II. Objectifs de l'étude	37

III. Matériel et méthodes	38
1. Variations étudiées.....	38
a. Patients.....	38
b. Variants retenus pour l'étude	41
2. Construction du plasmide	41
a. Le vecteur PX459	42
b. Design des ARN guides	43
c. Transformation des bactéries E. Coli.....	46
d. Screening et culture primaire.....	46
e. Séquençage et maxiculture	48
f. Maxiprep : purification de l'ADN plasmidique	48
3. Transfections cellulaires.....	49
a. Première transfection dans les cellules HuH7.....	49
i. Les cellules HuH7.....	49
ii. Test de sélection par la puromycine / Test de l'innocuité du Scr7	49
iii. Différentes conditions de transfection testées.....	50
iv. Extraction d'ADN, PCR et séquençage.....	51
v. Résultat des transfections : analyse des séquences avec le logiciel TIDE.....	52
4. Deuxième transfection avec les ADN donneurs.....	53
i. Conditions de transfection retenues.....	53
ii. Sélection clonale par dilution limite	54
5. Dosage de l'ApoB par la méthode ELISA	54
a. Principe de l'ELISA	54
b. Dosage de l'ApoB.....	55
IV. Résultats	56
1. Construction du plasmide et des ARN guides	56
a. Screening et culture primaire.....	56

b.	Séquençage des produits de PCR	57
c.	Maxipreps et dosage de l'ADN	58
d.	Séquençage des Maxipreps	58
2.	Transfections cellulaires	59
a.	Test de sélection par la puromycine / Test de l'innocuité du Scr7	59
b.	Optimisation des conditions de transfection	60
i.	Dosage de l'ADN extrait après transfection et traitement à la puromycine	60
ii.	Séquençage de l'ADN et analyse des séquences avec TIDE	62
c.	Deuxième transfection avec les ADNd	63
3.	Dosage de l'ApoB par la méthode ELISA	63
V.	Discussion	65

Liste des figures

FIGURE 1 – REPRESENTATION D’UNE LIPOPROTEINE ET DE SES COMPOSANTS (7)	18
FIGURE 2 – STRUCTURE DE LA PARTIE N-TERMINALE DU GENE APOB, DE L’APOB-100 ET DE L’APOB-48 (9)	21
FIGURE 3 – ÉDITION DE L’ARNM DU GENE APOB CHEZ L’HOMME (10)	21
FIGURE 4 – STRUCTURE ET COMPOSITION DES LIPOPROTEINES CONTENANT L’APOB-48 OU L’APOB-100 (11) .	22
FIGURE 5 – METABOLISME RESUME DES LIPOPROTEINES (14)	24
FIGURE 6 – POSITION DU GENE APOB SUR LE CHROMOSOME 2 (SIGNALEE PAR LE TRAIT ROUGE). FIGURE DISPONIBLE A L’URL : HTTPS://WWW.GENECARDS.ORG/CGI-BIN/CARDDISP.PL?GENE=APOB-ICR	26
EXON 26	27
FIGURE 7 – REPARTITION DES VARIATIONS DU GENE APOB RESPONSABLES DE L’HBLF (5)	27
FIGURE 8 – PRINCIPE DE LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	28
FIGURE 9 – PRINCIPE SCHEMATISE DU SEQUENÇAGE SANGER.....	30
FIGURE 10 – PRINCIPE SCHEMATISE DU SEQUENÇAGE NGS ILLUMINA.	31
FIGURE 9 – PRINCIPE DE LA TRANSFECTION CELLULAIRE PAR LIPOFECTION.....	32
FIGURE 11 – PRINCIPE RESUME DE L’IMMUNITE BACTERIENNE.	34
FIGURE 12 – PRINCIPE D’EDITION GENOMIQUE PAR LE SYSTEME CRISPR-CAS9.....	35
FIGURE 13 – COMPARAISON DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE ET NON HOMOLOGUE.	36
FIGURE 14 – SCHEMA DES ETAPES DE L’ETUDE	37
FIGURE 15 – ARBRE GENEALOGIQUE ET BILANS LIPIDIQUES DE LA FAMILLE B.....	39
FIGURE 16 – ARBRE GENEALOGIQUE ET BILANS LIPIDIQUES DE LA FAMILLE E.	40
FIGURE 17 – REPRESENTATION DU PLASMIDE PX459. FIGURE DISPONIBLE A L’URL : HTTPS://WWW.SNAPGENE.COM/RESOURCES/PLASMID- FILES/?SET=CRISPR_PLASMIDS&PLASMID=PSPCAS9(BB)-2A-PURO_(PX459)_V2.0	42
FIGURE 18 – SCHEMA DES ETAPES DE LA CONSTRUCTION DU PLASMIDE	43
FIGURE 19 – PRINCIPE DE LA METHODE ELISA SANDWICH. FIGURE ADAPTEE DE CELLE DISPONIBLE A L’URL : HTTPS://FR.MOLECULARDEVICES.COM/APPLICATIONS/ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY- ELISA#OVERVIEW	55
FIGURE 20 – DOSAGE DE L’APOB SECRETEE ET DE L’APOB INTRACELLULAIRE AUX TEMPS T=2H, 6H ET 24H POUR LES MODELES WILD TYPE (WT), HETEROZYGOTE (HZ) ET HOMOZYGOTE (HO)	64

FIGURE 21 – COMPARAISON DES DIFFERENTS FORMATS POSSIBLES POUR DELIVRER LE MATERIEL
CRISPR/CAS9 : RIBONUCLEOPROTEINES (RNPS), ARNM/ARNG ET PLASMIDE. (50)..... 67

FIGURE 22 – PRINCIPE DE LA COTRANSFECTION DE VECTEURS CRISPR/CAS9 AVEC DES VECTEURS DE PETITE
TAILLE FACILITANT LEUR PASSAGE A TRAVERS LA MEMBRANE CELLULAIRE. (54)..... 68

Liste des tableaux

TABLEAU 1 - CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES LIPOPROTEINES PLASMATIQUES HUMAINES. EC = ESTERS DE CHOLESTEROL, TG = TRIGLYCERIDES.....	19
TABLEAU 2 - EXPRESSION TISSULAIRE ET DISTRIBUTION PLASMATIQUE DES PRINCIPALES APOLIPOPROTEINES HUMAINES.....	20
TABLEAU 3 - ÉTUDES PREALABLEMENT PUBLIEES DE L'EFFET DE VARIATIONS FAUX-SENS DE L'APOB REALISEES PAR LA METHODE DE TRANSFECTION CELLULAIRE IN-VITRO	33
TABLEAU 4 – NOM ET IDENTITE DES VARIATIONS TESTEES DANS L'ETUDE	41
TABLEAU 5 - COUPLES D'AMORCES CORRESPONDANT AUX DIFFERENTS ARN GUIDES.....	44
TABLEAU 6 – MELANGE REACTIONNEL POUR UNE REACTION D'HYBRIDATION DES AMORCES.....	45
TABLEAU 7 – MELANGE REACTIONNEL POUR UNE REACTION DE LIGATION	45
TABLEAU 8 – MELANGE REACTIONNEL POUR UNE REACTION DE PCR A PARTIR DE COLONIES BACTERIENNES .	47
TABLEAU 9 – PROGRAMME DE TEMPERATURE DE PCR	47
TABLEAU 10 – PLAN DE PLAQUE POUR LE TEST DE SELECTION A LA PUROMYCINE (NT : NON TRANSFECTE, PURO- : SANS PUROMYCINE)	50
TABLEAU 11 – QUANTITES DE REACTIFS UTILISEES POUR CHAQUE CONDITION DE TRANSFECTION	51
TABLEAU 12 – VOLUMES DE REACTIFS UTILISES POUR LA TRANSFECTION OPTIMISEE AVEC LES ADND.....	53
TABLEAU 13 – ARN GUIDES, LEURS SEQUENCES ET LES CLONES CRIBLES CORRESPONDANTS.....	56
TABLEAU 14 – RESULTAT DU SEQUENÇAGE DES SCREENINGS (CONFORME : INSERTION DE L'ARNG, - : ABSENCE D'INSERTION DE L'ARNG, INTERPRETABLE : SEQUENCE ILLISIBLE)	57
TABLEAU 15 – RESULTAT DU DOSAGE DE L'ADN DES MAXIPREPS	58
TABLEAU 16 – NOMBRE DE CELLULES ET LEUR POURCENTAGE DE VIABILITE DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE TRAITEMENT AU SCR7 ET A LA PUROMYCINE.....	59
TABLEAU 17 – DOSAGE DE L'ADN EXTRAIT POUR CHAQUE CONDITION DE TRANSFECTION TESTEE.....	61
TABLEAU 18 : POURCENTAGE DE SEQUENCES L ET R (SENS ET ANTISENS) ABERRANTES PAR RAPPORT A LA SEQUENCE DE REFERENCE.....	62

Liste des abréviations

ABL : Abêtalipoprotéinémie

ACAT : Acyl coenzyme A cholesterol-acyltransferase

ADNd : ADN donneur

ApoB : Apolipoprotéine B

ARNg : ARN guide

ARNm : ARN messenger

ATB : Antibiotique

CETP : *Cholesteryl ester transfer protein*

ddNTP : Didésoxyribonucléotides

DMEM : *Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

HAL : Hypoalphalipoprotéinémie

LCAT : Lécithine cholestérol acyl transférase

HBLF : Hypobêtalipoprotéinémie familiale

HDL : *High density lipoproteins*

HDR : *Homology Directed Repair*

Ho : Homozygote

HuH7 : *Human Hepatoma cell line 7*

Hz : Hétérozygote

IDL : *Intermediate density lipoprotein*

InDel : Insertions/Délétions

Kb : Kilobase

LB : Luria Bertani

LDL : *Low density lipoproteins*

LDL-C : Cholestérol LDL

LDLR : Récepteur des LDL

LH : Lipase hépatique

LPL : Lipoprotéine lipase

MA : Maladie d'Anderson

MRC : Maladie de rétention des Chylomicrons

MTTP : *Microsomal Triglycéride Transfert Protein*

NEB : *New England Biolabs*

NGS : *Next Generation Sequencing*

NHEJ : *Non-Homologous End-Joining*

NT : Non transfecté

Pb : Paire de bases

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PCR : *Polymérase Chain Reaction*

RNP : Ribonucléoprotéine

SOC : *Super Optimal broth with Catabolite repression*

VLDL : *Very low density lipoproteins*

Introduction

L'hypobêtalipoprotéinémie familiale (HBLF) est une maladie autosomique codominante touchant environ 1/1000 individus. (1) Elle se traduit par une hypocholestérolémie et un déficit de sécrétion d'apolipoprotéine B (ApoB). Cette maladie est souvent asymptomatique dans sa forme hétérozygote mais est associée à un surrisque de stéatose hépatique et, dans les cas les plus sévères, à un syndrome de malabsorption lipidique. (2)

Environ la moitié des HBLF sont causées par des variations délétères ou probablement délétères du gène *APOB*, qui entraînent la création d'apolipoprotéines B tronquées de taille variable, souvent non-fonctionnelles, qui seront peu ou non sécrétées dans le plasma. (3) (4) Cependant, il existe aussi des variations faux-sens non-tronquantes du gène *APOB*, dont la mise en cause dans le développement de la maladie reste à déterminer. (5)

L'objectif de ce projet consistait donc à étudier l'effet de plusieurs variations faux-sens du gène *APOB*, issues de la littérature ou identifiées chez des patients ayant consulté le service. Les variations en question sont c.172G>C soit p.(A58P), c.1051C>A soit p.(L351M), c.289T>G soit p.(C97G), c.1052T>G soit p.(L351R) et c.6544G>T soit p.(C2182Y).

Afin d'étudier l'effet de ces variations, la méthode d'édition génomique CRISPR-Cas9 a été sélectionnée. Cette méthode, consistant à guider une nucléase pour couper l'ADN génomique à un endroit donné, et à intégrer une variation grâce à un modèle (une séquence d'ADN « donneur ») via la voie de recombinaison homologue, présente l'avantage de permettre d'éditer le génome de façon très précise. (6)

Lors de cette étude, des constructions plasmidiques contenant le matériel CRISPR-Cas9 ont tout d'abord été mises au point, puis transfectées dans des cellules exprimant naturellement l'ApoB, les cellules HuH7. La sécrétion de la protéine a ensuite été mesurée par un test ELISA, dans l'optique d'estimer ainsi l'effet de chaque variation sur la sécrétion d'ApoB.

I. Rappels bibliographiques

1. Les lipoprotéines

a. Description

Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques dont le rôle est de transporter dans le sang les lipides insolubles (cholestérol, triglycérides (TG), phospholipides). Elles sont composées d'un cœur lipidique hydrophobe constitué d'esters de cholestérol et de triglycérides, et d'une enveloppe amphiphile composée d'une monocouche de lipides polaires tels que des phospholipides et du cholestérol libre, ainsi que d'apolipoprotéines (Figure 1).

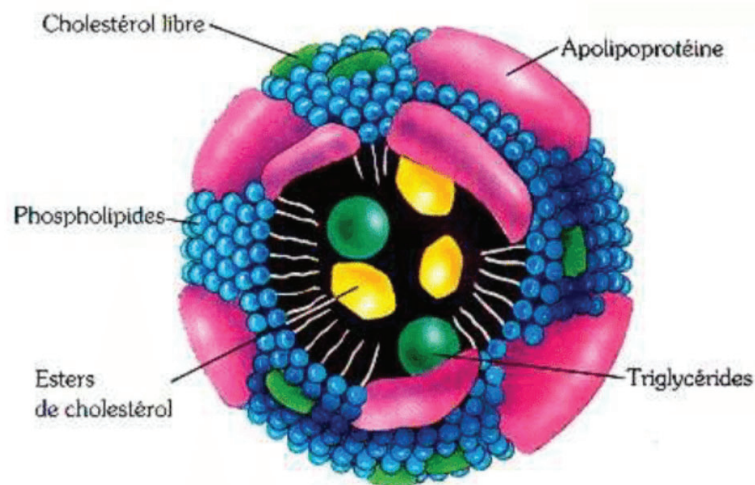


Figure 1 – Représentation d'une lipoprotéine et de ses composants (7)

Les lipoprotéines sont classées en plusieurs catégories en fonction de leur taille, de leur densité et de leur composition. Les lipides étant moins denses que les protéines, plus une lipoprotéine contient de lipides, plus elle est grande, et moins elle est dense. On distingue les chylomicrons, les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), les LDL (*Low Density Lipoprotein*) et les HDL (*High Density Lipoprotein*). Les chylomicrons et les VLDL transportent principalement des triglycérides, tandis que les LDL et les HDL transportent du cholestérol estérifié (CE). Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau 1. (8)

Tableau 1 - Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines. EC = esters de cholestérol, TG = Triglycérides

LIPOPROTEINE	DENSITE (g/mL)	TAILLE (nm)	PROPORTION EC/TG
Chylomicrons	0,93	75 - 1200	1/19
VLDL	0,93 – 1,006	30 – 80	1/3,3
IDL	1,006 – 1,019	27 - 50	1/3,5
LDL	1,019 – 1,063	18 -27	1/0,23
HDL2	1,063 – 1,125	9 – 12	1/0,22
HDL3	1,125 – 1,210	7 – 9	1/0,19
préβHDL	1,210 – 1,250	<7	Non détectable
Lp(a)	1,040 – 1,115	25	Non détectable

b. L'apolipoprotéine B

Les apoprotéines (Apo) constituent la partie protéique des lipoprotéines. Elles se placent autour des particules de lipoprotéines et servent de charpente pour la structure de celles-ci. Elles jouent aussi un rôle dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines, dans l'interaction avec des récepteurs cellulaires spécifiques, ou encore dans l'activation ou l'inhibition d'enzymes impliquées dans leur métabolisme intravasculaire. Il existe plusieurs apolipoprotéines. Les principales apolipoprotéines humaines et leur localisation sont détaillées dans le Tableau 2. (8)

Tableau 2 - Expression tissulaire et distribution plasmatique des principales apolipoprotéines humaines.

NOM	TISSU	DISTRIBUTION
Apo AI	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL
Apo AII	Foie, intestin	HDL
Apo AIV	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL
Apo AV	Foie	/
Apo B100	Foie	VLDL, IDL, LDL
Apo B48	Intestin	Chylomicrons
Apo CI	Foie, intestin	Chylomicrons, VLDL, HDL
Apo CII	Foie, intestin	Chylomicrons, VLDL, HDL
Apo CIII	Foie, intestin	Chylomicrons, VLDL, HDL
Apo D (Apo AIII)	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, rein	HDL, LDL, VLDL
Apo E	Foie, macrophages, cerveau	Chylomicrons, HDL, LDL, VLDL

L'apolipoprotéine dont il sera question dans cette étude est l'ApoB. On distingue deux ApoB différentes, synthétisées à partir d'un même gène, le gène *APOB*, après un processus de régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm : l'Apo B-100 (4536 acides aminés, 100%) et l'Apo B-48 (2152 acides aminés, correspondant aux 48% de l'extrémité N-terminale de l'ApoB100) (Figure 2). (9)

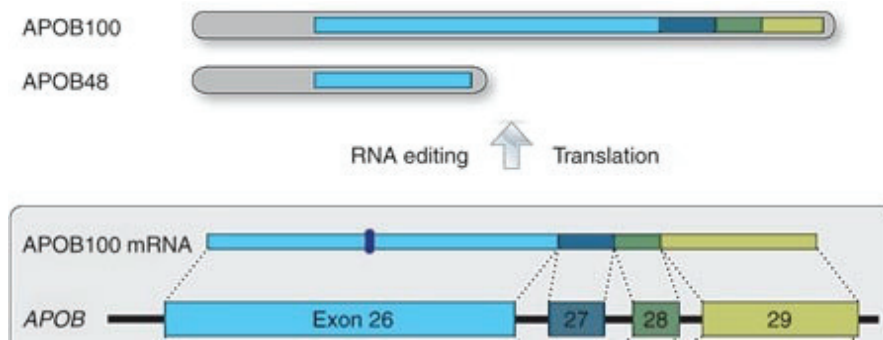


Figure 2 – Structure de la partie N-terminale du gène APOB, de l’ApoB-100 et de l’ApoB-48 (9)

L’ApoB-48 est produite dans l’intestin et participe à la structure des chylomicrons, des lipoprotéines de grande taille permettant le transport des lipides alimentaires, ou lipides exogènes, vers le foie. Il s’agit d’une version tronquée de l’ApoB-100 : l’ARNm de l’Apo B-100 est édité afin de transformer le codon de la glutamine 2153 (CAA) en codon stop (UAA) (Figure 3) (10).

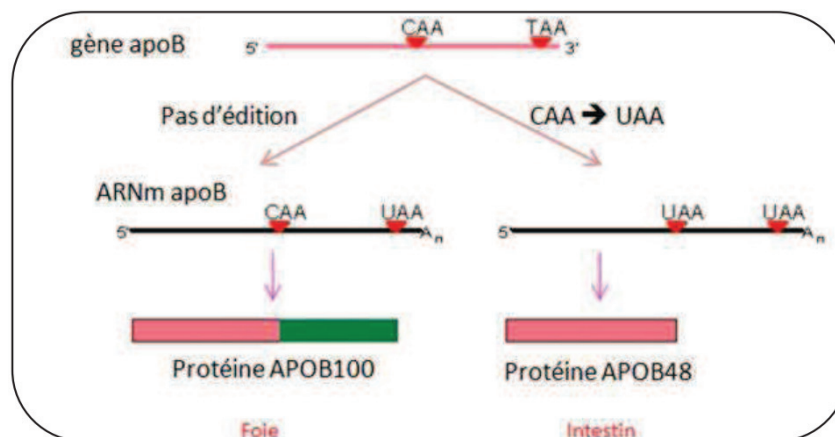


Figure 3 – Édition de l’ARNm du gène APOB chez l’Homme (10)

L’Apo B-100 est, elle, synthétisée par le foie, où elle est ensuite combinée aux lipides pour former les VLDL, riches en triglycérides. Ces VLDL sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine où elles sont transformées en IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*) par une enzyme, la lipoprotéine lipase (LPL), qui hydrolyse les triglycérides. Une autre enzyme, la lipase hépatique (LH), transforme ensuite les IDL en LDL. Les VLDL contiennent chacune une molécule d’Apo B-100 qui sera conservée lors de cette transition (Figure 4). (11)

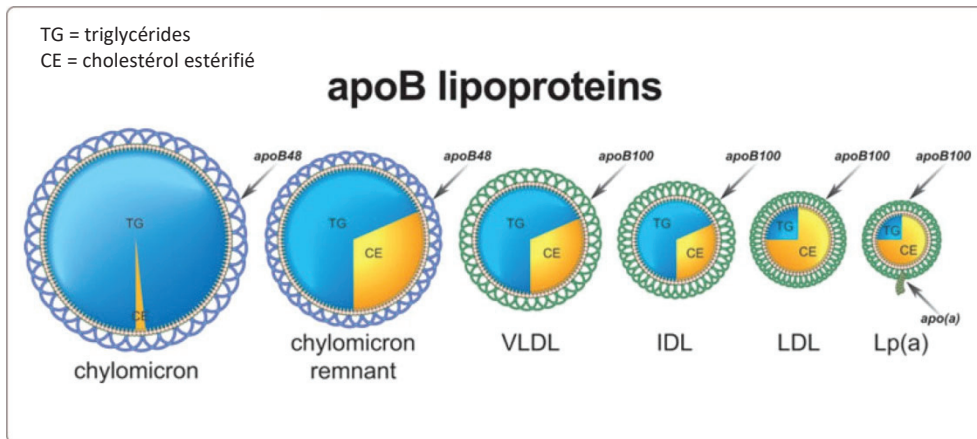


Figure 4 – Structure et composition des lipoprotéines contenant l’ApoB-48 ou l’ApoB-100 (11)

C’est cette Apo B-100 qui est mesurée dans les dosages sanguins réalisés en routine par technique immunoturbidimétrique. Contrairement à la concentration de LDL cholestérol (LDL-C) qui est calculée grâce à la formule de Friedwald à partir des taux de cholestérol total, de HDL cholestérol et de TG, en cas de TG inférieurs à 3.90 mmol/L, la concentration d’Apo B-100 est mesurée directement. De plus, celle-ci reflète le nombre de LDL. L’Apo B-100 pourrait donc être un meilleur indicateur de risque de maladie cardio-vasculaire que le LDL-C, d’où l’intérêt de son dosage. Il n’est cependant jamais prescrit en première intention car il n’existe actuellement pas de recommandations thérapeutiques basées sur les taux d’ApoB. (12)

Cet examen peut aussi être prescrit afin de suivre l’efficacité d’un traitement hypolipémiant, pour diagnostiquer la cause d’une hyperlipidémie ou bien une anomalie génétique entraînant une sur- ou une sous-production d’Apo B-100. (13)

c. Métabolisme des lipoprotéines

Il existe trois voies d’absorption et de transport des lipides dans l’organisme : la voie entéro-hépatique, la voie endogène (ou d’apport) et la voie de retour (ou reverse).

i. La voie entéro-hépatique ou voie exogène

La voie entéro-hépatique est la voie de transport des lipides exogènes, c’est-à-dire des lipides alimentaires absorbés au niveau de l’intestin, vers le foie. Ces lipides sont d’abord transportés par les chylomicrons. Ces lipoprotéines sont synthétisées dans les entérocytes par la protéine MTTP (Microsomal Triglycéride Transfert Protein), qui permet de stabiliser l’ApoB-48 lors de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique et de lui transférer les TG et le cholestérol estérifié par l’acyl coenzyme A cholestérol-acyltransferase (ACAT). Les chylomicrons sont ensuite sécrétés dans la lymphe puis rejoignent la circulation sanguine au niveau du canal thoracique.

Ces chylomicrons se lient dans la circulation sanguine à la lipoprotéine lipase, qui hydrolyse les TG qu'ils contiennent afin de faciliter l'absorption des acides gras par les tissus. Les acides gras non estérifiés résiduels encore présents dans la circulation sont internalisés par les hépatocytes grâce aux récepteurs LRP1. (8)

ii. La voie endogène

La voie endogène est la voie d'apport des lipides du foie vers les tissus périphériques. La synthèse des VLDL dans le foie est similaire à celle des chylomicrons dans l'intestin, à la différence que c'est l'ApoB-100 qui est présente à leur surface, et non l'ApoB-48. Dans la circulation générale, la LPL lipolyse des TG des VLDL libère des acides gras qui servent de source d'énergie pour les tissus périphériques et transforme les VLDL en IDL. Ensuite, les LDL formées à partir des IDL sous l'action de la LH vont, elles, fournir du cholestérol aux tissus.

Pour être captées par les tissus, ces lipoprotéines vont se fixer à des récepteurs cellulaires, les récepteurs des LDL (LDLR), par liaison d'apolipoprotéines : l'ApoE lie pour les VLDL, et l'ApoB-100 pour les IDL et les LDL. (8)

iii. La voie de retour

La voie de retour, ou voie antiathérogène, est la voie du transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, où il sera catabolisé. Ce sont les HDL qui ramènent le cholestérol excédentaire circulant jusqu'au foie. L'ApoAI présente à leur surface permet aux récepteurs scavenger SR-B1 hépatiques de les reconnaître. Les HDL sont aussi capables de transférer des esters de cholestérols vers les VLDL et les IDL en échange de TG via l'action de la protéine de transfert de cholestérol CETP (*cholesteryl ester transfer protein*).

Les HDL sont synthétisées par le foie, où les HDL naissantes de forme lenticulaire (ou discoïdale) sont pauvres en lipides et riches en ApoAI. Au niveau des tissus périphériques, la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) estérifie le cholestérol libre en esters de cholestérols. Ceux-ci sont hydrophobes et pénètrent alors au cœur des HDL, qui deviennent des HDL3 sphériques de plus grande taille. Ils captent ensuite sur leur périphérie du cholestérol libre, et deviennent alors des HDL2. (8)

Le métabolisme des lipoprotéines est résumé dans la Figure 5.

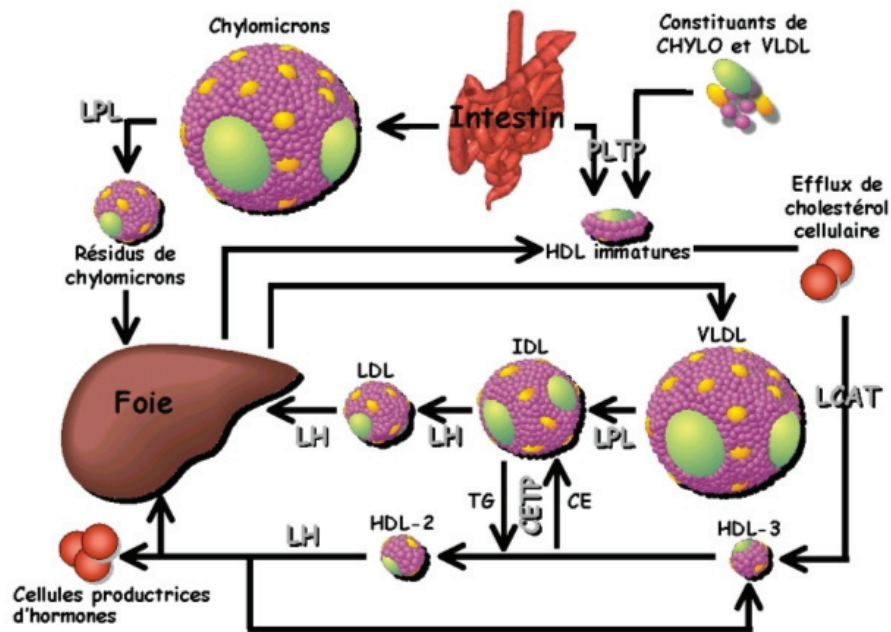


Figure 5 – Métabolisme résumé des lipoprotéines (14)

2. Les hypobetalipoprotéinémies

Les variations sur le gène *APOB* peuvent être à l'origine d'une hypocholestérolémie si elles entraînent un défaut de synthèse ou de sécrétion des lipoprotéines, tout comme elles peuvent être impliquées dans les hypercholestérolémies en cas de variation diminuant ou abolissant la reconnaissance avec le LDLR.

Cette étude se focalisera sur des variants identifiés chez des patients présentant une hypocholestérolémie ; le versant des hypercholestérolémies ne sera donc pas détaillé.

a. L'hypocholestérolémie

L'hypocholestérolémie se définit par une concentration en cholestérol total sérique inférieure au 5^e percentile pour l'âge et le sexe. (15) En pratique, il est généralement admis comme seuil un taux de cholestérol total inférieur à 2,6 mmol/L et de LDL-C inférieur à 1,56 mmol/L. (16)

L'hypocholestérolémie peut être d'origine secondaire, par exemple due à une insuffisance hépatocellulaire, une hyperthyroïdie, une dénutrition, une malabsorption digestive ou encore un syndrome traumatique, inflammatoire ou infectieux, ou bien d'origine primitive ou génétique.

Certaines de ces hypocholestérolémies se caractérisent un taux de LDL-C et d'apoB inférieurs au 5^{ième} percentile pour l'âge et le sexe déterminé génétiquement (formes

primitives) : elles sont appelées hypobetalipoprotéinémies (HBL). Il s'agit d'un groupe de maladies génétiques rares qui comprend l'abêtalipoprotéinémie, l'hypobêtalipoprotéinémie familiale (HBLF) et la maladie d'Anderson, ou maladie de rétention des chylomicrons (MRC). Elles se caractérisent par une hypocholestérolémie liée à un défaut d'assemblage et/ou de sécrétion des lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B. (17)

La forme la plus sévère de l'HBL, l'abêtalipoprotéinémie (ABL), est très rare (prévalence estimée inférieure à 1/1 000 000) (1) et se caractérise par une absence d'apolipoprotéine B dans le plasma. La MRC est également une forme rare d'HBL. Etant de transmission autosomique récessive, elles se distinguent de l'HBLF par le fait que les valeurs du cholestérol sérique des parents du patient sont diminuées dans l'HBLF mais restent normales dans l'ABL et la MRC. Compte tenu qu'elles sont causées par des variations sur les gènes *MTTP* (situé en 4q24) et *SAR1B* (situé en 5q31.1) respectivement (1) (18) ; elles ne seront pas détaillées ici.

b. L'hypobêtalipoprotéinémie familiale (HBLF)

L'HBLF est une maladie autosomique codominante causée par des variations délétères ou probablement délétères sur le gène *APOB*. Sa prévalence est estimée à 0,03%. (2)

L'HBLF est souvent asymptomatique dans sa forme hétérozygote mais est associée à un surrisque de stéatose hépatique. Elle est associée dans les cas plus sévères, en cas de variations homozygotes (Ho) ou hétérozygotes (Hz) composites conduisant à l'absence de sécrétion d'apoB48, à un syndrome de malabsorption lipidique. Cette malabsorption peut entraîner un retard de croissance dans la petite enfance, une carence en vitamines liposolubles (A, E, K) entraînant des signes neurologiques et une rétinite pigmentaire, une stéatorrhée, une acanthocytose, une stéatose et une cytolyse hépatique. (2)

Le diagnostic de l'HBLF repose sur la réalisation d'un bilan lipidique après 12h de jeûne. Le taux sérique de LDL est mesuré (<0,10 g/L pour la forme sévère ; <0,80 g/L pour la forme modérée), de triglycérides (<0,20 g/L pour la forme sévère ; <0,50 g/L pour la forme modérée), et d'ApoB (<0,10 g/L pour la forme sévère ; <0,50 g/L pour la forme modérée). Le diagnostic de certitude est apporté par la recherche des variations sur les gènes connus (cf. chapitre c) par séquençage. Par ailleurs, les conséquences de la pathologie sont évaluées grâce à une mesure de la stéatorrhée, une recherche d'acanthocytose (sur lame), un dosage de vitamines liposolubles (A, D, E, K), ainsi qu'un examen neurologique et hépatique. (18)

La prise en charge de cette pathologie consiste en une réduction des apports lipidiques et une supplémentation en vitamine E. (1) Le pronostic est favorable pour la forme modérée, et plutôt mauvais dans la forme homozygote ou hétérozygote composite. (18)

c. Variants responsables de l'HBLF

Environ 50% des HBLF sont causées par des variations délétères ou probablement délétères d'un ou des deux allèles du gène *APOB*. (3) Il existe aussi d'autres gènes qui peuvent être responsables de l'HBLF, comme notamment les variations retrouvées sur le gène *PCSK9* (1p34.1-p32) (19) ou sur le gène *ANGPTL3* (20), que nous ne détaillerons pas.

i. Les variations du gène *APOB*

Le gène *APOB* est un gène de 43 kb constitué de 29 exons et situé en position 2p24.1, c'est-à-dire en position 24.1 sur le bras court (p) du chromosome 2 (Figure 6).



Figure 6 – Position du gène *APOB* sur le chromosome 2 (signalée par le trait rouge). Figure disponible à l'URL : <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=APOB-ICR>

Les variations du gène *APOB* entraînent pour la plupart la création d'apolipoprotéines B tronquées de taille variable dont l'extrémité carboxy-terminale est absente, peu ou pas sécrétées dans le plasma. Celles-ci ont une capacité réduite à lier les lipides et à former des particules lipoprotéiques dans le foie et l'intestin, et ne sont plus capables d'exporter les lipides à partir de ces organes. (4)

Ces protéines tronquées sont nommées selon un système centile : par exemple, l'ApoB-48 correspond à 48% de l'ApoB-100. Les protéines ApoB d'une taille inférieure à celle de l'ApoB-30 ne sont pas détectables dans le plasma, et sont en général retrouvées chez les patients présentant le phénotype le plus sévère. (1)

Une cinquantaine de mutations du gène *APOB* ont été décrites dans la littérature, dont les deux tiers sont des délétions ou des variations non-sens situées sur l'exon 26, aboutissant à la création d'un codon stop. (5) Cependant, il existe aussi des variations du site d'épissage et quelques variations faux-sens qui ont été décrites dans la littérature (Figure 7).

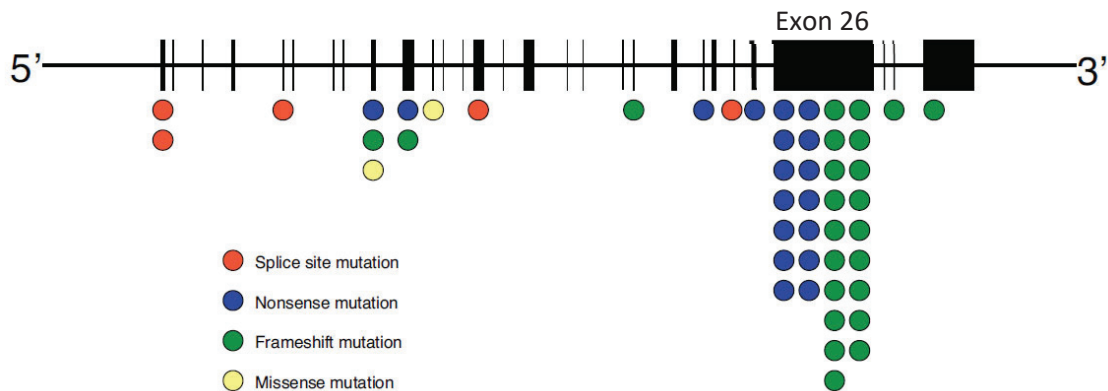


Figure 7 – Répartition des variations du gène APOB responsables de l’HBLF (5)

ii. Relation structure activité de l’ApoB

L’ApoB-100 possède une structure composée d’hélices alpha et de feuillets bêta divisée en cinq domaines, nommés et répartis de la façon suivante : NH₂-β_{α1}-β₁-α₂-β₂-α₃-COOH. (21) Les domaines β₁ et β₂ de l’ApoB jouent un rôle dans l’organisation du cœur lipidique des LDL. Il a aussi été montré que la séquence d’acides aminés du domaine β_{α1} de l’ApoB est homologue à celle de la protéine MTTP, qui intervient dans la synthèse des lipoprotéines. (22) La structure du domaine β_{α1} contient plusieurs sites de liaison à la protéine MTTP (interaction de type ionique). (23) L’interaction entre ce domaine et la protéine MTTP serait à l’origine de la formation d’une « poche lipidique » qui faciliterait le recrutement des lipides lors de la synthèse des lipoprotéines. (24)

Une variation du gène *APOB* qui aboutirait à une modification de la structure des domaines de l’ApoB nécessaires à son activité serait donc à l’origine de la production d’une protéine non-fonctionnelle, ce qui entraînerait l’apparition de la pathologie.

3. Méthodes de diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire des pathologies humaines repose sur des techniques de biologie moléculaire portant sur le génome et le transcriptome. Il inclut des techniques telles que l’hybridation *in situ* de chromosomes pour les analyses cytogénétiques, et le séquençage de l’ADN pour l’identification d’organismes pathogènes dans le diagnostic des maladies infectieuses ou dans la détection de variations dans le cas de maladies génétiques.

Le screening, ou « criblage » moléculaire, est une technique permettant d’étudier l’ADN en recherchant facilement tout ou partie d’un gène d’intérêt dans une banque d’ADN génomique. Les principales méthodes de screening moléculaire utilisées seront détaillées ci-dessous.

a. Séquençage Sanger

La première étape du séquençage de l'ADN par la méthode Sanger est une réaction de PCR (*Polymérase Chain Reaction* ou amplification en chaîne par polymérase). La PCR est une technique de réplication ciblée de l'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon peu abondant, de grandes quantités (plusieurs millions de copies en quelques heures) d'un fragment d'ADN spécifique de longueur définie. Cette technique se base sur des réactions successives de réplication de l'ADN. À chaque cycle, la quantité de copies d'ADN double et les produits de synthèse sont utilisés comme matrices pour les cycles suivants. (25) L'amplification est donc exponentielle et non linéaire.

La PCR est composée de 3 étapes, résumées dans la Figure 8 :

- **La dénaturation thermique de l'ADN à 95 °C** : les liaisons hydrogène entre les 2 brins de l'ADN sont brisées. L'ADN se retrouve sous forme monocaténaire dans le milieu.
- **L'hybridation des amorces** : dans le milieu réactionnel se trouvent deux amorces, chacune complémentaire du brin sens ou anti-sens de l'ADN d'intérêt. Les amorces sont de courtes séquences d'ADN, complémentaires du brin matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire au brin matrice. Entre 50°C et 65°C, elles sont capables de s'hybrider sur les séquences complémentaires des brins d'ADN.
- **L'élongation des amorces à 72°C** : une fois les amorces hybridées, la Taq polymérase (ADN polymérase) va synthétiser le brin d'ADN à partir de ces amorces en incorporant les dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates) complémentaires de la séquence de la matrice, présents dans le milieu. C'est ce qu'on appelle l'étape d'élongation.

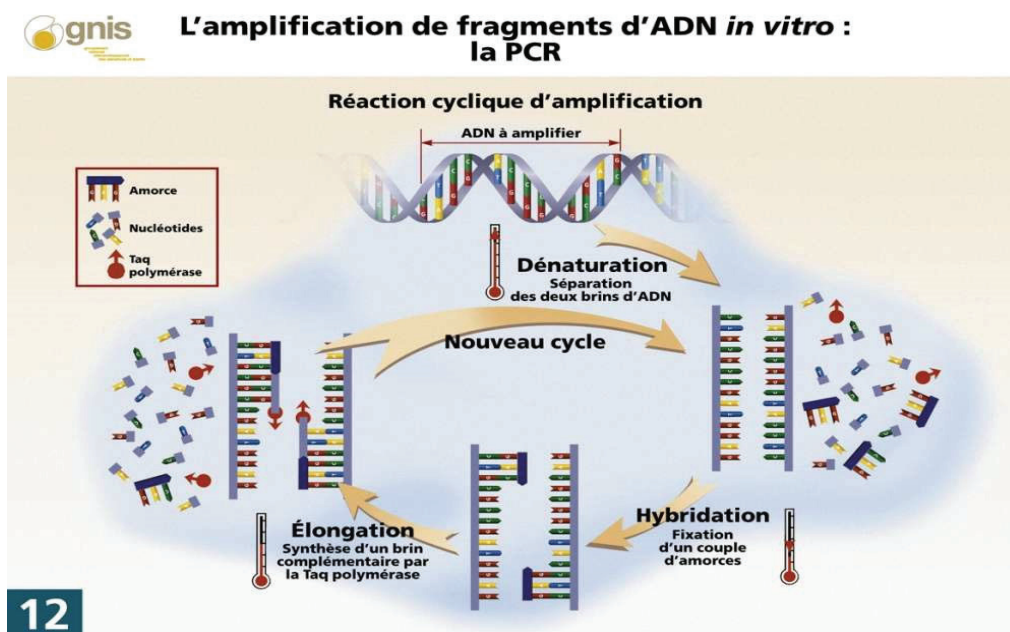


Figure 8 – Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR) (26)

Après élimination des amorces et des dNTP en excès, une réaction PCR de séquençage est réalisée. Au cours de cette réaction, une ADN polymérase va recopier le brin d'ADN à séquencer préalablement dénaturé en ajoutant soit des dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates), soit des ddNTP (didésoxyribonucléotides) présents dans le milieu réactionnel. Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. La formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant est donc impossible, et l'élongation du brin d'ADN est interrompue. Les ddNTP sont marqués par des groupements fluorescents spécifiques à chacun des quatre nucléotides, émettant chacun une fluorescence de couleur différente. La compétition entre les dNTP et les ddNTP dans le milieu est optimisée de façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à chaque position possible. On obtient alors une multitude de copies d'ADN dont la longueur diffère d'un nucléotide. (27)

Tous les produits de la réaction de séquence sont ensuite séparés en fonction de leur taille par une électrophorèse capillaire réalisée par un séquenceur. Le logiciel lit l'ordre des différentes fluorescences de ces fragments et déduit la séquence nucléotidique du fragment d'ADN de départ (Figure 9). (27)

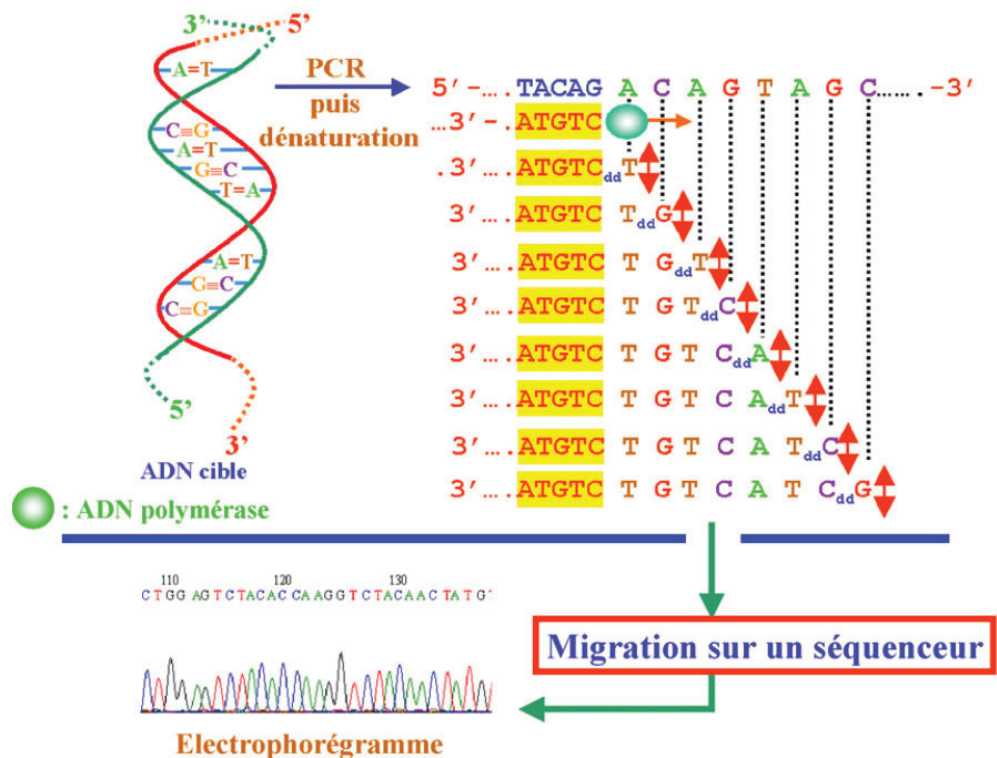


Figure 9 – Principe schématisé du séquençage Sanger. Après dénaturation du produit amplifié par PCR, l'un des deux brins s'hybride à une amorce spécifique. L'incorporation aléatoire d'un ddNTP à la place d'un dNTP (tous deux contenus dans le milieu réactionnel) ne permet plus la polymérisation par l'ADN polymérase. L'extension s'arrête. À la fin de la réaction de séquence nous avons des fragments de taille différente. Ces fragments sont soumis à une électrophorèse capillaire et sont séparés par taille. Chaque ddNTP étant marqué par un fluorophore différent, un signal lumineux sera généré, spécifique de la base didéoxy incorporée. Les signaux lumineux sont analysés par un logiciel spécifique, et le résultat de l'analyse peut être lu, par exemple, sous forme d'un électrophorégramme. (27)

b. Séquençage haut débit NGS

Le séquençage à haut débit NGS (*Next Generation Sequencing*) permet de séquencer de grandes quantités d'ADN en peu de temps. Toutes les techniques de séquençage haut débit présentent trois étapes communes (28) (29) :

- **La préparation de banques (ou librairie) :** la séquence d'ADN d'intérêt est fragmentée de façon aléatoire par sonification ou par des enzymes de restriction. La taille des fragments est généralement comprise entre 100 et 300 pb. Il est possible de filtrer les fragments d'ADN en leur permettant de s'hybrider sur des séquences complémentaires spécifiques fixées sur une plaque ou en milieu liquide. Les fragments qui ne se sont pas hybridés sont éliminés.

- **L'amplification** : la banque ou les fragments spécifiques sont amplifiés grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR.
- **Le séquençage** : l'ADN est séquençé en utilisant différentes techniques. On peut notamment citer la technique par synthèse Illumina (Solexa), le pyroséquençage 454 (Roche), la méthode SOLiD (Thermofisher), ou encore la détection des ions H⁺ (*Ion Proton Torrent*, Thermofisher).

La technique la plus commune, et celle qui a été utilisée dans cette étude, est la technique Illumina. Des fragments simple brin d'ADN d'environ 150 pb, auxquels est ajouté un adaptateur, sont d'abord fixés sur un support solide. Ils forment alors un « pont » sur la plaque et sont ensuite amplifiés par PCR. Il y a alors une dénaturation de l'ADN de façon à obtenir des groupes (clusters) séparés, contenant environ 1000 copies de chaque fragment d'ADN simple brin. (30) Le principe est schématisé dans la Figure 10. Les fragments sont alors séquençés. Au premier cycle de séquençage, les amorces, l'ADN polymérase et quatre terminateurs marqués par un fluorochrome sont ajoutés. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par chaque cluster est lue et la première base est déterminée. Au cycle suivant, quatre nouveaux terminateurs marqués sont ajoutés, puis la fluorescence de la deuxième base est lue, et ainsi de suite. La lecture des bases est effectuée à chaque position des clusters sur toutes les séquences en parallèle. (31)

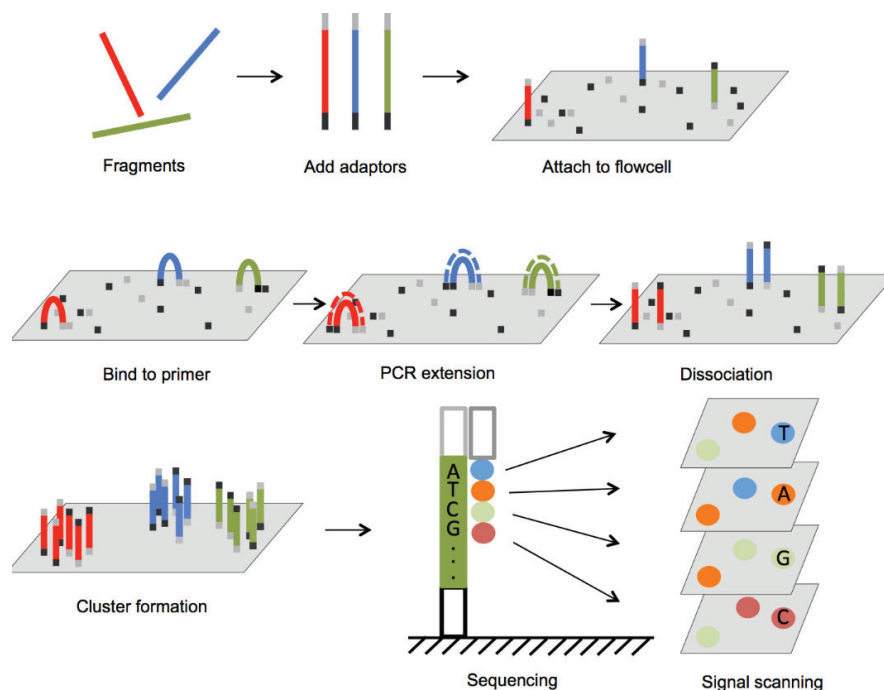


Figure 10 – Principe schématisé du séquençage NGS Illumina. Des fragments d'ADN pourvus d'un adaptateur sont fixés sur un support solide. Ils sont amplifiés par une PCR en pont. L'ADN est dénaturé afin d'obtenir des clusters de fragments, qui sont ensuite séquençés. (32)

Enfin, quelle que soit la méthode de séquençage utilisée, les séquences obtenues sont alignées avec la séquence de référence afin de détecter des variations.

4. Méthodes d'étude *in vitro* de la pathogénicité des variants

Afin d'étudier la pathogénicité des variants, deux méthodes sont possibles : transférer, dans des cellules ne produisant pas la protéine d'intérêt, l'ADN codant pour des protéines normales (wild type) ou Mutantes obtenues par mutagenèse, ou éditer directement le génome de cellules produisant la protéine d'intérêt grâce à la méthode Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9. Ces deux techniques seront détaillées ci-dessous en illustrant avec les études déjà publiées pour l'étude des variants *APOB*.

a. Transfection de cellules ne produisant pas la protéine

Le principe de la transfection cellulaire consiste à introduire dans une cellule un vecteur (un plasmide) contenant l'ADN codant pour une protéine d'intérêt. La protéine sera produite par la machinerie cellulaire par transcription et traduction de l'ADN plasmidique. Cette protéine est qualifiée de recombinante et sa fonctionnalité est étudiée. La lipofection est une méthode couramment utilisée pour transférer des acides nucléiques dans des cellules eucaryotes grâce à des liposomes qui vont s'adsorber à la membrane de la cellule. (33) Le principe de cette méthode est schématisé dans la Figure 9.

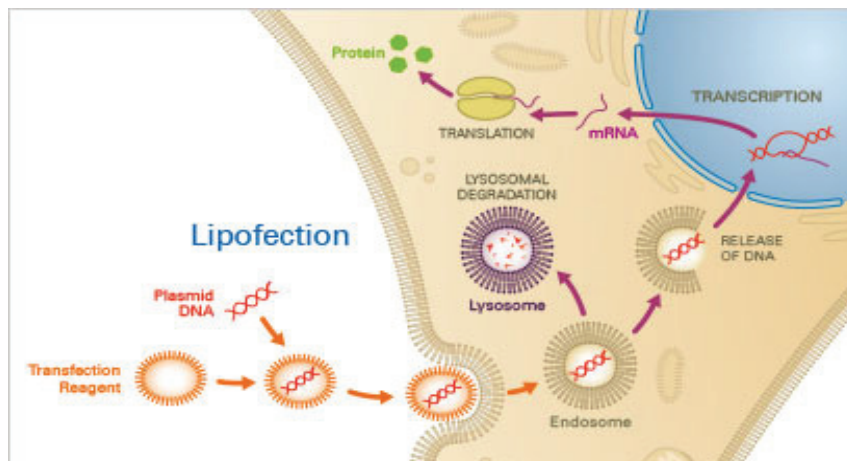


Figure 9 – Principe de la transfection cellulaire par lipofection. Les liposomes contenant de l'ADN s'adsorbent à la membrane cellulaire. L'ADN est transporté par les endosomes jusque dans le noyau. Il est ensuite transcrit en ARNm, puis traduit en protéine. Figure disponible à l'URL : <https://ibidi.com/content/263-chemical-transfection>

Plusieurs études *in-vitro*, présentées dans le Tableau 3, ont été réalisées en utilisant ce principe pour l'étude de variants faux sens *APOB*.

Tableau 3 - Études préalablement publiées de l'effet de variations faux-sens de l'ApoB réalisées par la méthode de transfection cellulaire *in-vitro*

Publication	Variations testées	Modèle cellulaire	Protéines recombinantes utilisées	Résultats
Burnett <i>et al.</i> (2003) (4)	p.(R463W)	McA-RH7777	ApoB-48 et ApoB-17	Diminution de la sécrétion d'ApoB de 45% (ApoB-48) et 40% (ApoB-17) par rapport à la protéine wild type (WT).
Burnett <i>et al.</i> (2007) (34)	p.(L343V)	McA-RH7777	ApoB-100, ApoB-48 et ApoB-17	Diminution de la sécrétion des protéines ApoB mutées de 50% par rapport au WT.
Zhong <i>et al.</i> (2009) (35)	p.(A31P), p.(G275S), p.(L324M), p.(G912D), p.(G945S)	McA-RH7777	ApoB-48	Diminution de la sécrétion de toutes les protéines ApoB mutées par rapport au WT. G912D : diminution de 20%, G275S : 30%, L324M : 40%, G945S : 50%, A31P : non détectée.
Yilmaz <i>et al.</i> (2016) (36)	p.(R505W)	McA-RH7777	ApoB-48	Diminution de 40% de la sécrétion d'ApoB-48 mutée par rapport à l'ApoB-48 WT.

b. Méthode d'édition du génome : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9

i. Origine de la découverte

En 1987, des microbiologistes japonais étudiant le génome de procaryotes (bactéries et archées) découvrirent de mystérieuses séquences nucléotidiques répétées espacées d'autres séquences de nucléotides. Ces répétitions palindromiques se révélèrent être une structure courante dans le génome de nombreux micro-organismes procaryotes. Elles furent baptisées du nom de « CRISPR » pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. (6)

Bien plus tard, au milieu des années 2000, le rôle immunitaire de ces motifs répétés fut dévoilé : il s'agissait d'un système de défense des organismes procaryotes pour se protéger

des attaques répétées de virus nommés bactériophages. Le principe est simple : lorsque la bactérie rencontre un virus, elle produit un ARN guide qui correspond à ce virus, codé à partir des séquences CRISPR, puis une enzyme, une nucléase Cas (le plus souvent la Cas9). La Cas9 va intégrer cet ARN et aller se fixer sur le virus par principe de complémentarité des bases. Elle pourra ainsi couper son ADN, entraînant sa mort. La bactérie va ensuite garder cette séquence d'ARN en mémoire dans son génome (les fameuses séquences intercalées entre les motifs répétés CRISPR), et la réutilisera lorsqu'elle rencontrera de nouveau ce virus. (6) Cette capacité pourrait donc se comparer à une sorte d'immunité adaptative (Figure 11).

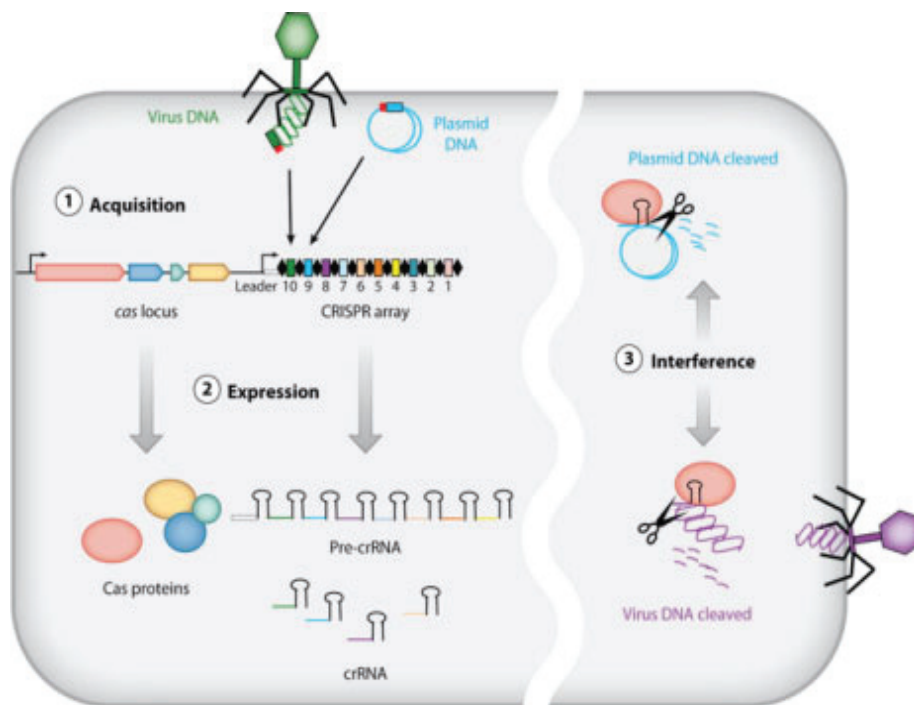


Figure 11 – Principe résumé de l'immunité bactérienne. 1 : un système CRISPR-Cas conserve de courtes séquences d'ADN du génome des virus et plasmides rencontrés. 2 : la matrice CRISPR (séquences répétées et espaceurs) est transcrite en un long transcrit primaire appelé pré-crRNA, qui est ensuite maturé en un ensemble de courts fragments d'ARN appelés crRNAs. Chacun d'entre eux contient une séquence unique complémentaire d'un fragment d'ADN invasif rencontré précédemment. 3. Les crRNAs sont utilisés comme ARN guides pour que les protéines Cas puissent cibler et hydrolyser l'ADN apparenté des virus ou plasmides lors d'une nouvelle infection. Figure disponible à l'URL : <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/4CRISPR/1CRISPR.htm>.

ii. Utilisation de cette technique pour éditer le génome

Cette technique CRISPR-Cas9 peut être symbolisée par une « paire de ciseaux » permettant de couper l'ADN à un endroit donné, pour ensuite le réparer en y intégrant une variation précise grâce à une séquence d'ADN qui servira de modèle.

Pour ce faire, un plasmide contenant entre autres la séquence codant pour un ARN guide de 20 nucléotides complémentaire de la séquence d'ADN cible, ainsi que la séquence de la Cas9, est créé. Ce plasmide est ensuite transfecté dans des cellules. Dans le noyau de la cellule, l'ARN guide va se fixer sur la séquence homologue de l'ADN cible. La Cas9 va reconnaître une autre séquence, appelée trcrARN, qui est juxtaposée à l'ARN guide. La Cas9 va alors cibler une séquence de 3 nucléotides de NGG appelée PAM (Proto Adjacent motif) et effectuer une coupure sur les deux brins de l'ADN complémentaire à l'ARN guide grâce à ses deux domaines nucléasiques (Figure 12). Cette coupure parallèle générera des bouts francs sur l'ADN. (37)

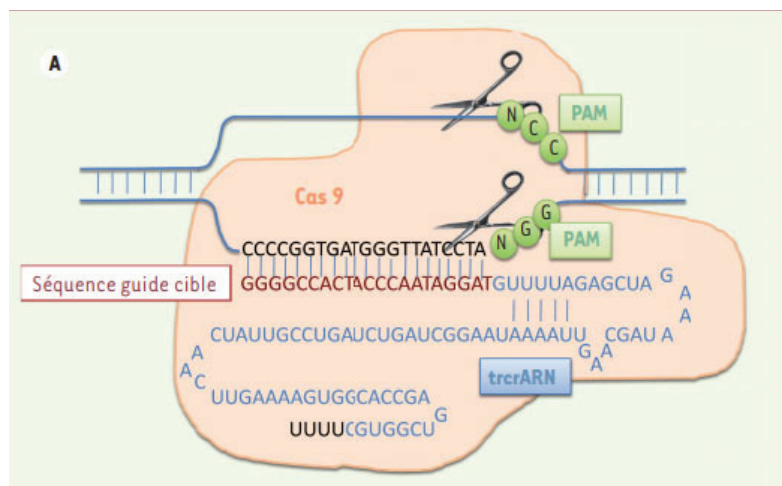


Figure 12 – Principe d'édition génomique par le système CRISPR-Cas9. La Cas9 (en orange) est guidée par un ARN guide (en rouge), complémentaire à la séquence d'ADN cible, et par une séquence appelée trcrARN (en bleu). La Cas9 cible une séquence de 3 nucléotides de type NGG, appelée PAM (en vert), et coupe chacun des deux brins de l'ADN à cet endroit. (37)

Contrairement au cas de l'ADN viral où la coupure sera permanente, la cellule eucaryote va réparer l'ADN qui a été coupé. Deux types de réparation existent :

- Le système NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*) : il s'agit d'un système de réparation endogène de l'ADN susceptible d'introduire des mutations au site de jonction lors de la réparation de celui-ci, notamment des insertions ou des délétions de bases. Les mutations ainsi créées seront donc aléatoires. Si ces mutations se trouvent sur une région codante d'un gène, cela pourra entraîner un décalage du cadre de lecture et

l'apparition d'un codon stop prématuré, aboutissant à l'inactivation du gène en question.

- Le système HDR (*Homology Directed Repair*) : il est possible d'intégrer une variation donnée lors de la réparation de l'ADN. Pour cela, il suffit de fournir à la cellule un brin d'ADN contenant la séquence souhaitée qui servira de modèle, et dont les extrémités sont homologues à celles du site de coupure. Cette séquence sera alors intégrée de façon définitive au génome par recombinaison homologue. Cette voie de réparation de l'ADN est plus fidèle, permettant une édition du génome précise (Figure 13). C'est cette technique qui est utilisée dans la méthode CRISPR-Cas9. (38)

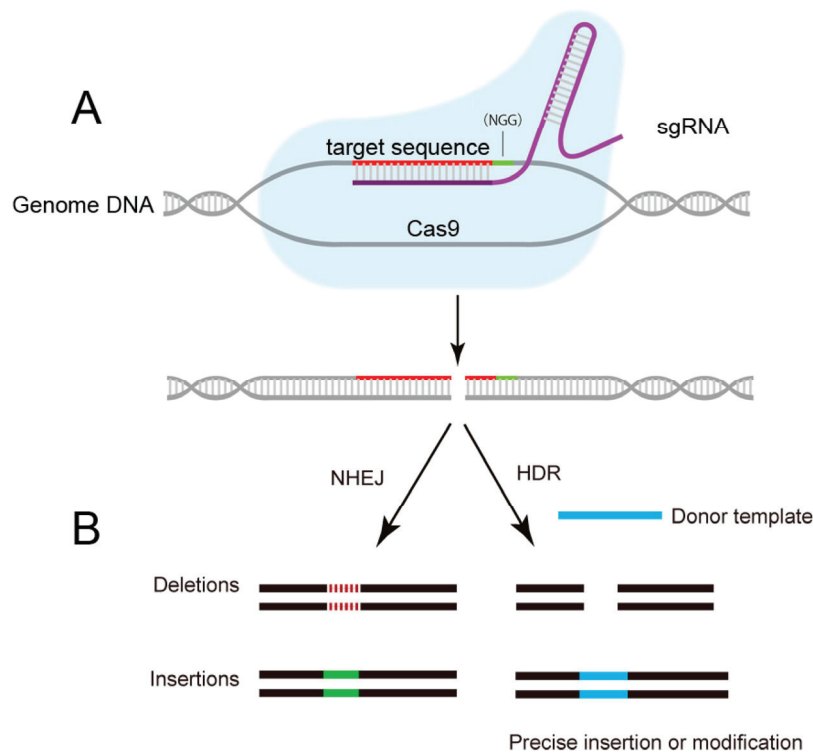


Figure 13 – Comparaison de la recombinaison homologue et non homologue. (A) Le système CRISPR-Cas9 induit une coupe double brin de l'ADN. (B) L'ADN est réparé soit par la voie non homologue (NHEJ), conduisant à des insertions et délétions, soit par la voie homologue (HDR), permettant une édition génomique précise grâce à une séquence modèle. (39)

II. Objectifs de l'étude

L'effet des variants faux-sens du gène *APOB* est difficilement prévisible : il pourrait aussi bien se traduire par une hypocholestérolémie si la variation diminue la synthèse d'ApoB, ou par une hypercholestérolémie si elle affecte la conformation de l'ApoB et sa reconnaissance par le LDLR, ou même ne pas être délétère. **L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de variations faux-sens identifiées chez des patients présentant une hypocholestérolémie sur la sécrétion d'ApoB, afin d'évaluer si elles sont responsables de la pathologie.**

Pour cela, des variants faux-sens mis en évidence chez des patients présentant une HBLF ont été sélectionnés afin d'étudier leur effet *in vitro*. Nous avons transfecté des cellules avec un plasmide contenant le matériel génétique nécessaire à l'édition génomique par la méthode CRISPR-Cas9 ainsi qu'avec une séquence d'ADN contenant la variation étudiée servant de modèle à la recombinaison homologue, puis nous avons mesuré le taux de protéine ApoB sécrétée par les cellules transfectées, afin de déterminer si ces variations ont un effet sur sa sécrétion.

Avant mon arrivée dans le service, un premier essai avait été réalisé avec deux plasmides distincts, BLADE et KBU2, contenant respectivement l'ADN codant pour les ARN guides CRISPR et pour la protéine Cas9. Cette méthode présentait des inconvénients : il fallait que la cellule ait été transfectée par les deux plasmides (diminuant encore la probabilité d'obtenir une transfection correcte), et aucun d'entre eux ne contenait de gène de résistance permettant facilement la sélection des clones mutants.

En vue du nouvel essai réalisé dans cette étude, un plasmide unique contenant à la fois l'ADN codant pour les ARN guides CRISPR et pour la protéine Cas9 a été sélectionné. Ce plasmide devrait permettre d'obtenir un meilleur taux de transfection, puisqu'il suffit que les cellules intègrent ce seul plasmide plutôt que les deux plasmides BLADE et KBU2 à la fois, comme c'était le cas auparavant.

Le déroulement de l'étude réalisée est schématisé dans la Figure 14.

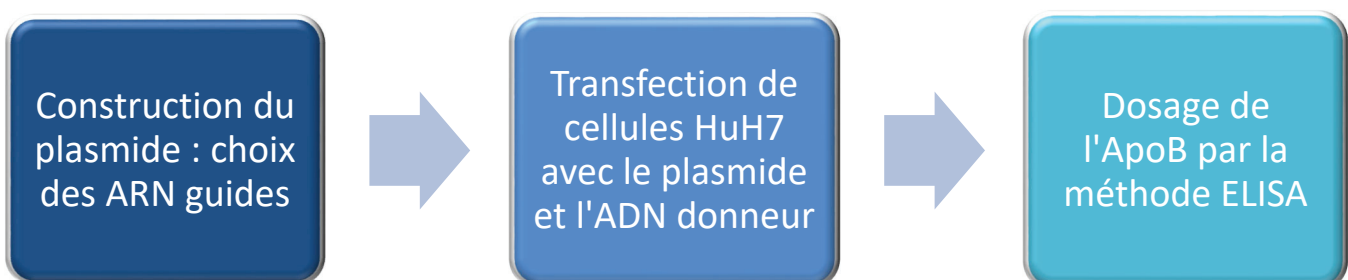


Figure 14 – Schéma des étapes de l'étude

III. Matériel et méthodes

1. Variations étudiées

a. Patients

Dans le cadre de cette étude, le séquençage de l'ADN des patients, après extraction, avait préalablement été réalisé dans le laboratoire soit par séquençage Sanger soit par séquençage haut débit sur Nextseq500 Illumina.

Les variants inclus dans cette étude ont été mis en évidence chez des patients présentant un tableau clinique et biologique évoquant une HBLF (taux de LDL et d'ApoB sériques inférieurs au 95^e percentile pour l'âge et le sexe), ainsi qu'une ségrégation familiale.

Des patients appartenant à deux familles différentes et présentant une HBLF avec un contexte familial (parent au 1^{er} degré aussi atteint) ont ainsi été retenus. L'HBLF de ces patients était de cause inconnue : aucune variation délétère n'avait été retrouvée sur les gènes *PCSK9*, *MTTP* et *SAR1B*, et aucune variation non-sens aboutissant à la formation d'un codon stop n'avait été découverte sur le gène *APOB*. La présence de variations faux-sens non tronquantes du gène *APOB* était donc l'hypothèse la plus probable.

L'arbre généalogique et le bilan lipidique de chaque membre de ces deux familles sont présentés dans les Figures 15 et 16.

HBLF : Hypobétalipoprotéinémie Familiale

CT : Cholestérol Total

TG : Triglycérides

HDL : High Density Lipoprotein

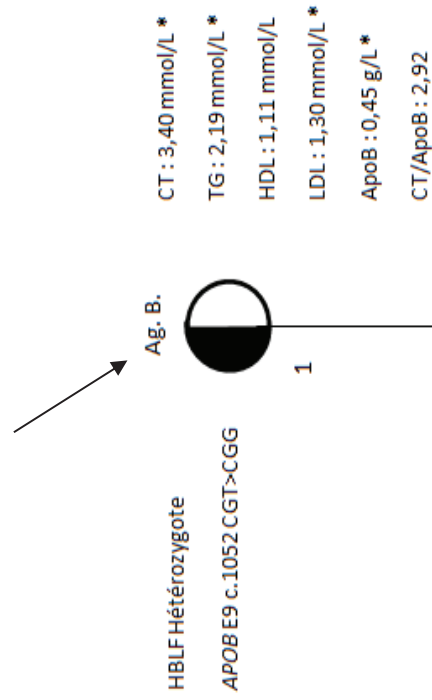
LDL : Low Density Lipoprotein

ApoB : Apolipoprotéine B

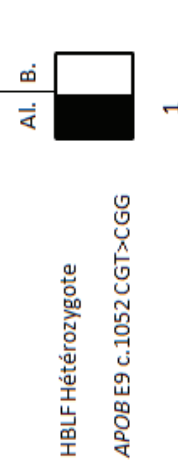
* : concentration en dehors des valeurs usuelles

→ Propositus

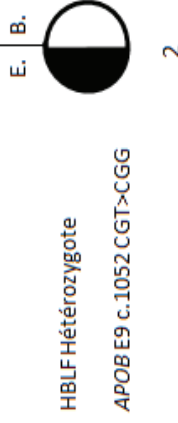
I.



II.



CT : 3,43 mmol/L
TG : 1,36 mmol/L
HDL : 1,54 mmol/L
LDL : 1,27 mmol/L *
ApoB : 0,39 g/L *
CT/ApoB : 3,40 *



CT : 2,61 mmol/L *
TG : 0,44 mmol/L
HDL : 1,47 mmol/L
LDL : 0,94 mmol/L *
ApoB : 0,23 g/L *
CT/ApoB : 4,38 *

Figure 15 – Arbre généalogique et bilans lipidiques de la famille B.

HBLF : Hypobétalipoprotéïnémie Familiale

CT : Cholestérol Total

TG : Triglycérides

HDL : High Density Lipoprotein

LDL : Low Density Lipoprotein

ApoB : Apolipoprotéine B

* : concentration en dehors des valeurs usuelles

==== : Consanguinité

➔ : Propositus

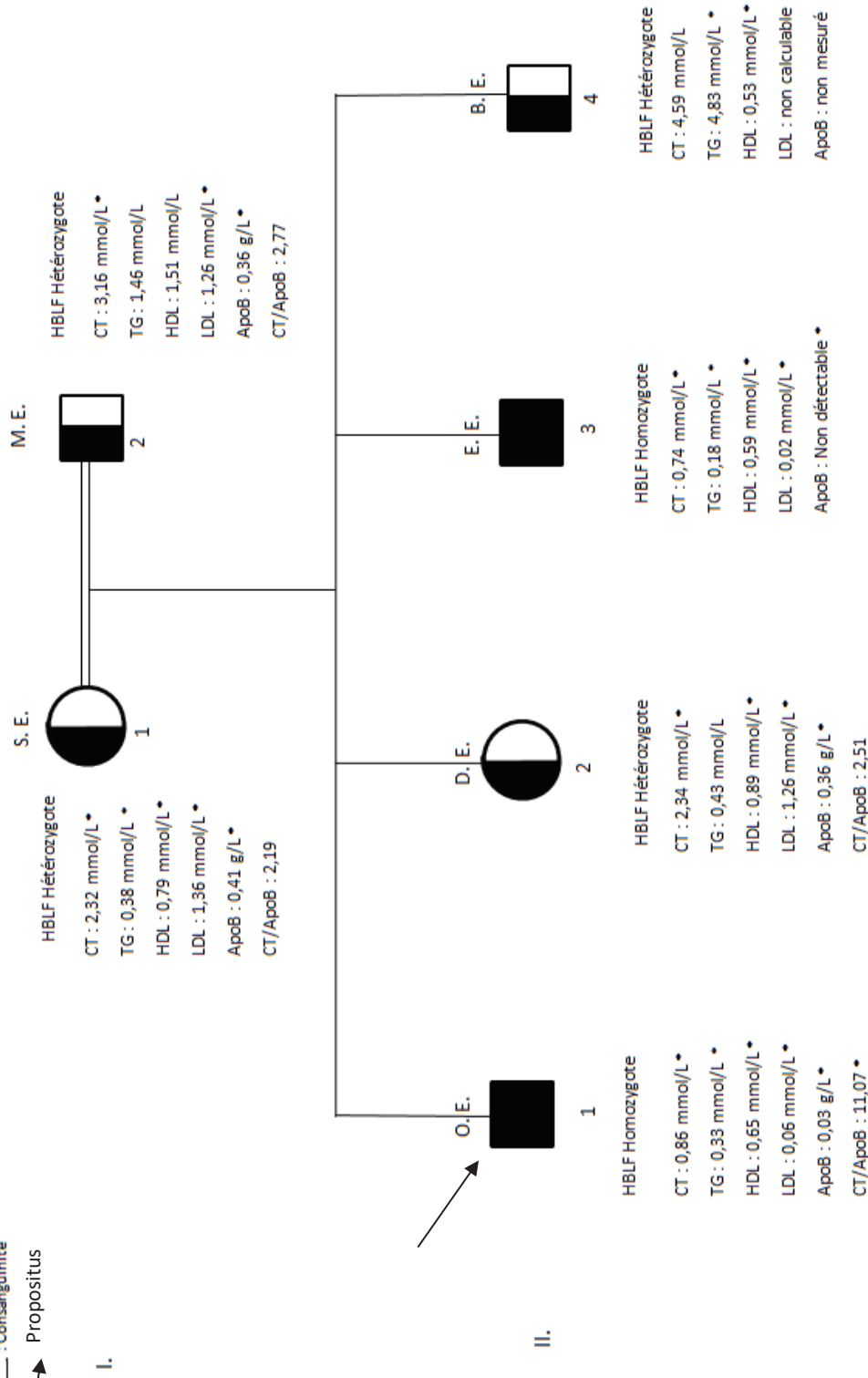


Figure 16 – Arbre généalogique et bilans lipidiques de la famille E.

b. Variants retenus pour l'étude

Les critères de sélection des variants pour cette étude sont : des variants faux-sens retrouvés sur le gène *APOB* non décrits dans la littérature et décrits à une fréquence inférieure à 1 pour 1000 dans les bases de données gnomAD, mis en évidence chez des patients présentant une HBLF, dont ils pourraient être la cause.

La liste des variations identifiées dans le laboratoire ou issues de la bibliographie qui ont été retenues pour être étudiées est présentée dans le Tableau 4. Ces variations sont situées sur les exons 3, 4, 9 et 26 du gène *APOB*.

Tableau 4 – Nom et identité des variations testées dans l'étude

Nom attribué à la variation pour la suite de l'étude	Variation à tester				Patient ou publication
	Gène	Exon	Variation nucléotidique	Variation protéique	
Témoin protéine tronquée	/	/	/	/	Témoin HBLF
MutT1	<i>APOB</i>	E3	/	p.Ala58*	Témoin HBLF
Mut58P	<i>APOB</i>	E3	c.172G>C	p.Ala58Pro	Zhong <i>et al.</i> (35) : ApoB sécrétée à 0%
Mut97G	<i>APOB</i>	E4	c.289T>G	p.Cys97Gly	Patient O. E. Ho ADN 4249
Mut351M	<i>APOB</i>	E9a	c.1051C>A	p.Leu351Met	Zhong <i>et al.</i> (35) : ApoB sécrétée à 50%
Mut351R	<i>APOB</i>	E9b	c.1052T>G	p.Leu351Arg	Patient Ag. B. Hz ADN 4841
Mut2182Y	<i>APOB</i>	E26	c.6544G>T	p.Cys2182Tyr	Patient O. E. Ho ADN 4249

2. Construction du plasmide

La première étape de l'étude *in vitro* de ces variants faux-sens est la construction d'un plasmide qui contiendra tout le matériel génétique nécessaire. Une fois construit, ce vecteur est introduit dans des bactéries (transformation bactérienne) qui le produiront en grande quantité par clonage, puis il sera transfecté dans des cellules eucaryotes capables d'exprimer l'ApoB.

a. Le vecteur PX459

Le vecteur sélectionné dans cette étude est le plasmide PX459 (Réf. 62988, Addgene), contenant déjà l'ADN pour la protéine Cas9 et dans lequel l'ADN codant les ARN guides CRISPR va être introduit. Ce plasmide contient notamment les gènes de résistance à l'ampicilline et à la puromycine, qui permettront la sélection des cellules transfectées, ainsi que les sites de coupure de la *BbsI*, l'enzyme de restriction qui va permettre de couper l'ADN à l'endroit voulu. Le plasmide PX459 est schématisé dans la Figure 17.



Figure 17 – Représentation du plasmide PX459. Figure disponible à l'URL : [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=crispr_plasmids&plasmid=pSpCas9\(BB\)-2A-Puro_\(PX459\)_V2.0](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=crispr_plasmids&plasmid=pSpCas9(BB)-2A-Puro_(PX459)_V2.0)

La construction du plasmide qui sera utilisé dans la suite de cette étude se déroule en plusieurs étapes, résumées dans la Figure 18, qui seront détaillées au fur et à mesure.

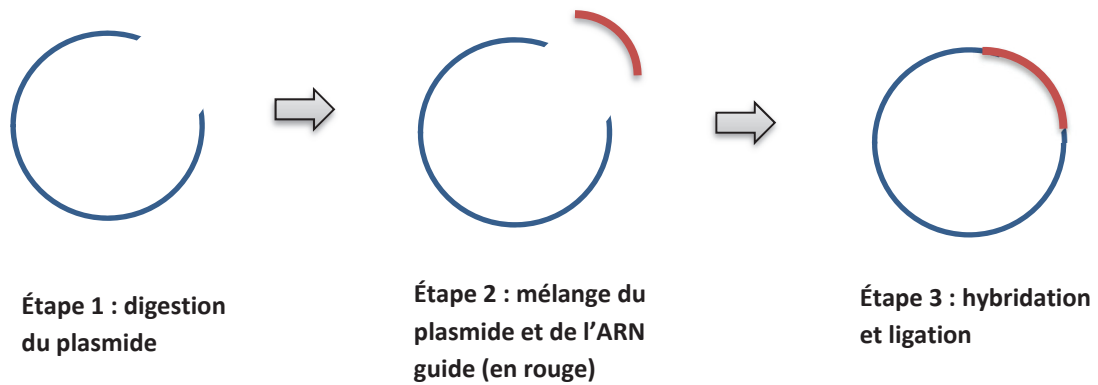


Figure 18 – Schéma des étapes de la construction du plasmide

Afin d'intégrer les ARNs guides dans le plasmide, il faut d'abord le digérer, c'est-à-dire induire une coupure double brin à un endroit précis pour que l'ARN guide puisse être inséré. Pour cette étape, un plasmide issu d'une Maxiprep (préparation de plasmide purifié) dosé à 1289 ng/ μ L (R260/280=1,9 et R260/230=2,3) est utilisé.

Un mix contenant 1 μ L (10U) d'enzyme BbsI (NEW ENGLAND BIOLABS®), 5 μ L de tampon 10X buffer 2.1, 1 μ g soit 0,8 μ L de plasmide PX459 et de l'eau distillée QSP 50 μ L est préparé. C'est cette enzyme qui va permettre la digestion du plasmide. Ce mix est ensuite placé sur un thermocycleur (T3000 Thermocycler, Biometra) et un programme de 15 min à 37°C puis inactivation de 20 min à 65°C est lancé. La taille attendue du plasmide digéré est de 9,17 kb.

Le plasmide digéré est conservé à -20°C pour une utilisation ultérieure. Le plasmide qui sera utilisé dans la suite de cette étude avait été digéré préalablement à mon arrivée dans le service.

b. Design des ARN guides

Le design des ARN guides (ARNg) qui seront intégrés dans le vecteur digéré est effectué à partir du logiciel Benchling : ce logiciel permet de repérer la séquence de 20 nucléotides la plus pertinente à proximité du site de la variation d'intérêt. Le choix est fait en fonction de leur score « on-target » (prédiction de la probabilité de créer la variation prévue et voulue) et « off-target » (prédiction de la probabilité de voir apparaître des variations non prévues et non voulues).

La liste des 7 couples d'amorces ARN guide à tester afin de sélectionner le plus efficace est présentée dans le Tableau 5. Les amorces sont commandées à un fournisseur (Eurofins).

Tableau 5 - Couples d'amorces correspondant aux différents ARN guides. Chaque couple comprend une amorce F (Forward) et une amorce R (Reverse) complémentaires. La séquence en majuscules correspond aux 20 nucléotides de l'ARNg. La séquence en minuscules appartient au plasmide, et marque l'endroit où va s'insérer l'ARNg.

Mutation	Exon	Nom	Séquence
Mut58P	ApoBE3	ApoB_ARNGuide-A58P-F1	caccgCGACCCGATTCAAGCACCTC
Mut58P	ApoBE3	ApoB_ARNGuide-A58P-R1	aaacGAGGTGCTTGAATCGGGTCGc
Mut58P	ApoBE3	ApoB_ARNGuide-A58P-F2	caccgCCGGAAGTACACATACAACT
Mut58P	ApoBE3	ApoB_ARNGuide-A58P-R2	aaacAGTTGTATGTGTACTTCCGGc
Mut58P	ApoBE3	ApoB_ARNGuide-A58P-F3	caccgTATGAGGCTGAGAGTTCCAG
Mut58P	ApoBE3	ApoB_ARNGuide-A58P-R3	aaacCTGGAACTCTCAGCCTCATAc
Mut97G	ApoBE4	ApoB_ARNGuide-C97G-F1	caccgGGTGTATGGCTTCAACCCTG
Mut97G	ApoBE4	ApoB_ARNGuide-C97G-R1	aaacCAGGGTTGAAGCCATACACCc
Mut351M/D	ApoBE9	ApoB_ARNGuide-L351-F1	caccgAAGCTGGTTACTGAGCTGAG
Mut351M/D	ApoBE9	ApoB_ARNGuide-L351-R1	aaacCTCAGCTCAGTAACCAGCTTc
Mut2182Y	ApoBE26	ApoB_ARNGuide-D2182Y-F1	caccgAAATCAACTTTAATGAAAAA
Mut2182Y	ApoBE26	ApoB_ARNGuide-D2182Y-R1	aaacTTTTTCATTAAAGTTGATTTc
Mut2182Y	ApoBE26	ApoB_ARNGuide-D2182Y-F2	caccgTGTAATTTAGTAAAAACAA
Mut2182Y	ApoBE26	ApoB_ARNGuide-D2182Y-R2	aaacTTGTTTTTACTAAATTTACAc

Pour que la séquence des ARN guides puisse s'intégrer dans le plasmide, une étape d'hybridation des amorces est nécessaire. De plus, durant cette étape, un deuxième brin d'ADN va être synthétisé, la séquence des ARNg étant simple brin et le plasmide double brin. Le mélange réactionnel présenté dans le Tableau 6 est préparé.

Tableau 6 – Mélange réactionnel pour une réaction d'hybridation des amorces

	Volume (µL)
Eau distillée	43
Buffer T4 Ligase 10X (New England Biolabs, B0202S)	5
Amorce L 100 µM	1
Amorce R 100 µM	1
Total	50

Le programme d'hybridation est lancé sur un thermocycleur (Biometra) : 20 secondes à 95 °C puis 40 °C. Vient alors l'étape de ligation des amorces à présent double brin dans le plasmide précédemment digéré, grâce à la T4 ligase. Le mélange réactionnel présenté dans le Tableau 7 est préparé.

Tableau 7 – Mélange réactionnel pour une réaction de ligation

	Volume (µL)
Eau distillée	15
Buffer T4 Ligase 10X (New England Biolabs, B0202S)	2
T4 Ligase (New England Biolabs, M0202)	1
Amorces hybridées 100 µM	1
Vecteur PX459 « ouvert »	1
Total	20

Le programme de ligation est lancé dans le thermocycleur : 2h à 25°C puis 10 minutes à 65 °C.

c. Transformation des bactéries *E. Coli*

Afin d'obtenir de grandes quantités du plasmide précédemment fabriqué, il faut l'introduire dans des bactéries *E. Coli* NEB (New England Biolabs) rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium CaCl_2 . Une bactérie compétente est une bactérie dans la membrane cellulaire de laquelle des micro-perforations sont créées, afin que l'ADN puisse y pénétrer.

Les bactéries compétentes sont conservées sur glace de façon à figer leur membrane, puisque les phospholipides sont figés à cette température. 25 μL de bactéries sont mis en contact avec 2,5 μL de plasmide dans 400 μL de milieu liquide SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*). Après 1h de repos sur la glace, le temps que l'ADN vienne s'adsorber à la surface des bactéries, un choc thermique à 42°C est réalisé pendant 30 à 40 secondes : la fluidité membranaire est brusquement restaurée, ce qui permet à l'ADN de franchir l'enveloppe bactérienne.

Les bactéries sont ensuite mises en culture à l'étuve pendant 1h, le temps pour elles de répliquer le plasmide et d'exprimer la protéine de résistance à l'ampicilline, la bêta-lactamase. Puis, entre 20 et 200 μL de ce milieu sont étalés sur une gélose contenant de l'ampicilline, qui permettra de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide.

d. Screening et culture primaire

Afin de déterminer si les bactéries ont intégré le plasmide contenant l'ADN codant pour les ARNs guides, un screening (criblage) est réalisé : 4 colonies sont prélevées au hasard sur les géloses pour chaque ARN guide, sur lesquelles on effectuera donc 4 PCR. Par la même occasion, des cultures primaires sont réalisées sur ces 4 échantillons : ils sont incubés dans 400 μL de milieu pendant 6h à l'étuve avec agitation, puis conservés à +4°C.

Pour effectuer une PCR sur les colonies, le mix de PCR présenté dans le Tableau 8 est réalisé.

Tableau 8 – Mélange réactionnel pour une réaction de PCR à partir de colonies bactériennes

	Volume (µL)
Eau distillée	15,35
dNTP (Qiagen, 201912)	5
PCR Buffer 10X (Qiagen, 203603)	2,5
Hot Star Taq Plus DNA polymerase (Qiagen, 203603) 1,5 mM	0,15
Amorce L 5µM	1
Amorce R 5µM	1
Sous total	25,00
ADN 40ng/ml	1 colonie

Le programme de PCR présenté dans le Tableau 9 est ensuite réalisé sur thermocycleur.

Tableau 9 – Programme de température de PCR

Programme sur BIOMETRA -TD: TD70.60				
Activation		94°C	5'	1 cycle
Amplification 1	Dénaturation	94°C	40"	10 cycles
	Hybridation	Gradient de 70°C à 60°C	40"	
	Elongation	72°C	1'	
Amplification 2	Dénaturation	94°C	40"	25 cycles
	Hybridation	60°C	40"	
	Elongation	72°C	1'	
Élongation finale		72°C	10'	

Il faut enfin contrôler l'amplification par PCR sur un gel Lonza (FlashGel DNA cassellés 2.2%, Ozyme, cat 703338). Les produits de PCR migrent sur le gel d'agarose 2% par électrophorèse et sont séparés en fonction de leur taille (masse moléculaire) et de leur

conformation (linéaire ou circulaire relâchée ou surenroulée) : les fragments de petite taille migrent plus vite et plus loin que ceux de grande taille, et la forme surenroulée migre plus rapidement que la forme linéaire, qui elle-même migre plus rapidement que la forme circulaire relâchée. L'échantillon est mélangé à un agent intercalant qui est capable de s'intercaler dans l'ADN bicaténaire et qui va produire une fluorescence lorsqu'il est exposé aux UV. La fluorescence des produits de PCR est observée et la taille de l'échantillon est estimée grâce à un marqueur de poids moléculaire qui sert de référence.

e. Séquençage et maxiculture

Afin de déterminer quels clones contiennent le plasmide ayant intégré l'ARN guide, un séquençage par la méthode Sanger est réalisé en utilisant le kit Big Dye Terminator v3.1 (Réf. 4337455, Life Technologies) et un séquenceur Applied Biosystems 3730 DNA Analysez/3130x1 Genetic Analyzer ou Applied Biosystems 3500xL Dx Genetic Analyzer. Les amorces utilisées sont PX459_130F (TTTCTTGGGTAGTTTGAGT) et PX459_429R (AGCCATTTGTCTGCAGAATTG). Les séquences sont ensuite lues avec le logiciel Chromas[®]2.01 (Technelysium), qui permet de les visualiser, puis éventuellement avec le logiciel Seqscape[®]3 (Applied Biosystems), qui permet de les aligner et de les comparer à une séquence de référence.

Plusieurs « Minicultures » sont ensuite préparées à partir des clones bactériens contenant le plasmide dont la séquence est correcte : quelques colonies sont ajoutées à 2mL de milieu liquide LB (Luria Bertani, Réf. 3001-031, MP) contenant 2 µL d'ampicilline à 100mg/mL. Ces minicultures sont placées à l'étuve à 37°C avec agitation pendant 5 heures. Une culture de volume plus important, ou « Maxiculture » est préparée à partir de la Miniculture s'étant le mieux développée : 100 µL de Miniculture sont ajoutés à 100 mL de milieu LB contenant 100µL d'ampicilline à 100mg/mL. Cette Maxiculture est placée la nuit à l'étuve à 37°C avec agitation.

f. Maxiprep : purification de l'ADN plasmidique

Une maxipréparation, ou Maxiprep, est une technique permettant d'extraire et de purifier une petite quantité d'ADN (généralement entre 500 µg et 1000 µg) sous forme de plasmide, à partir de 100 à 500 mL de culture bactérienne. La Maxiprep est réalisée avec le kit PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit 25 (Life Technologie, cat K2100-17), selon le protocole fourni par le fabricant.

L'ADN purifié obtenu est dosé au NanoDrop (Labtech) par mesure de la densité optique à 260 nm. Un autre séquençage de l'ADN par la méthode Sanger est réalisé, afin de vérifier que sa séquence est correcte.

3. Transfections cellulaires

a. Première transfection dans les cellules HuH7

i. Les cellules HuH7

Les cellules HuH7 (*Human Hepatoma cell line 7*), furent à l'origine issues d'un carcinome hépatocellulaire bien différencié présent chez un patient masculin japonais de 57 ans, en 1982. Cette lignée fut établie par H. Nakabayshi et J. Sato. (40)

La lignée HuH7 se compose de cellules tumorigènes immortelles de type épithélial. Elles sont adhérentes aux surfaces et se développent sous forme de monocouche 2D. Leur temps de doublement est de 24h environ.

Les cellules HuH7 sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire T25 (25 cm², Ref : 018647, DUSTCHER), dans une étuve à 37°C avec une atmosphère à 5% de CO₂. Leur milieu de culture est composé de 7 mL de milieu DMEM (*Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*) additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF ou FBS ; Eurobio, CVFSVF00 0U) et d'1% pénicilline/streptomycine (Lonza, DE17-602E).

Afin de favoriser la croissance par contact cellulaire sans bloquer la prolifération par inhibition de contact, la confluence des cellules doit être comprise entre 30 et 90%. Un repiquage, ou subculture, est donc effectué chaque semaine.

ii. Test de sélection par la puromycine / Test de l'innocuité du Scr7

Afin d'évaluer l'efficacité de la résistance à la puromycine apportée par le nouveau plasmide PX459 et définir les meilleures conditions de sélection, un test de sélection par la puromycine est réalisé. En parallèle, un test d'innocuité du Scr7 (inhibiteur de la ligase IV permettant d'inhiber la voie de recombinaison NHEJ et de favoriser la recombinaison homologue), dilué dans le DMSO (diméthylsulfoxyde), est effectué.

Une plaque de 12 puits estensemencée avec 50 000 cellules par puits dans 1mL de milieu. Il faut prévoir 2 puits contrôle non transfectés (NT) afin de vérifier l'innocuité du Scr7 et du DMSO, 3 puits non transfectés traités à la puromycine pour évaluer son effet sur les cellules HuH7, et 7 puits transfectés soit avec le plasmide PX459 « vide », soit avec le plasmide contenant les ARN guides correspondant à deux des variations étudiées, afin de déterminer l'efficacité de ces ARN guides et du gène de résistance à la puromycine présent dans le plasmide. Ces derniers seront traités à la puromycine 1X (7 µL de solution de puromycine (Sigma Aldrich, CMAX00001) à 5mg/mL dans 7 mL de DMEM) au bout de 24h ou de 48h, pour

évaluer le délai nécessaire à l'apparition de la bêta-lactamase qui induit la résistance à la puromycine. Le plan de plaque est présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10 – Plan de plaque pour le test de sélection à la puromycine (NT : Non Transfecté, Puro- : sans puromycine)

	1	2	3	4
A	NT_DMSO0.1%	NT_Puro-	Mut-_Puro-	Mut97G_Puro-
B	NT_Scr7	NT_Puro24h	Mut-_Puro24h	Mut97G_Puro24h
C	Mut351M_Puro48h	NT_Puro48h	Mut-_Puro48h	Mut97G_Puro48h

Les cellules sont ensuite observées au microscope optique et comptées avec un compteur automatique de cellules ADAM-MC. Cet appareil permet de compter le nombre de cellules/mL, et indique les rapports A260/A280 (comparaison de l'absorbance à 260 et 280 nm, représentatif de la contamination en protéines, devant être compris entre 1,8 et 2,0) et A260/A230 (comparaison de l'absorbance à 260 et 230 nm, représentatif de la contamination en solvants, devant être compris entre 2,0 et 2,2).

iii. Différentes conditions de transfection testées

Afin d'optimiser la transfection dans les cellules HuH7, différentes conditions ont été testées. Deux méthodes de transfection ont été utilisées : la transfection classique par endocytose avec mise en contact des cellulesensemencées avec un complexe plasmide (PX459 ou KBU2) /transfectant, et la transfection par électroporation. Une cotransfection des plasmides PX459 et KBU2 (contenant le gène de la Cas9) a aussi été réalisée pour la transfection classique et la transfection par électroporation. Les transfactions ont été réalisées dans des plaques 12 puits avec 40 000 ou 50 000 cellules par puits dans 1 mL de milieu (DMEM + 10%SVF + antibiotique (ATB)).

Pour la transfection classique, les transfectants utilisés sont soit le X-tremeGENE™ 9 DNA Transfection Reagent (Merck, Réf. 6365787001), soit le FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, Réf. E2311). Après 20 minutes de repos à température ambiante, 54 µL du complexe plasmide/transfectant sont déposés en « goutte à goutte » dans chaque puits. Des agitations en huit sont effectuées puis la plaque est placée à l'étuve.

Pour la transfection par électroporation, l'appareil utilisé est le MP-100 Mini Microporator (Digital Bio). Les cellules sont centrifugées à 1500 tours/min pendant 8 minutes et le culot est repris dans 200 μL de solution R du kit Neon®Invitrogen (ThermoFisher, Réf. 10124334). La transfection est réalisée selon le protocole fourni par le fabricant. Deux conditions d'électroporation ont été testées :

- Condition « pulse 1 » : 1 impulsion de 425V/cm pendant 40 secondes.
- Condition « pulse 2 » : 3 impulsions de 1230V pendant 20 secondes.

Les différentes conditions de transfection testées et les quantités de réactifs associées sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11 – quantités de réactifs utilisées pour chaque condition de transfection

	Nombre de cellules	DMEM (μL)	X-tremeGENE (μL)	FuGENE (μL)	PX459-ARNg (μg)	KBU2 (μg)
Transfection avec X-tremeGENE	50 000	50	3	/	1	/
Transfection avec FuGENE	40 000	50	/	1,5	0,5	/
				3	1	/
				3	0,5	0,5
Transfection par électroporation	50 000	/	/	/	0,5	/
					0,5	0,5

La sélection à la puromycine est réalisée 48h après la transfection, temps nécessaire aux cellules pour produire la résistance à cette dernière grâce au plasmide. Une solution de puromycine est préparée, contenant 3,5 mL d'une solution mère de puromycine à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromycine, et 3,5 mL de milieu (DMEM + 10%SVF + ATB). 1 mL de cette solution est ajouté dans chaque puits. Une seconde sélection à la puromycine est réalisée 72h après la transfection avec la même solution.

iv. Extraction d'ADN, PCR et séquençage

Afin de déterminer si le plasmide a été correctement transfecté dans les cellules et que la Cas9 a coupé l'ADN génomique sur le site de coupure souhaité, l'ADN des cellules doit être extrait et séquençé.

Pour cela, les cellules transfectées sont mises en suspension 96h après la transfection. Tout d'abord, elles sont lavées au PBS (Phosphate Buffered Saline), puis trypsinées pendant 3

minutes avec 150 µL de trypsine (une protéase permettant d'hydrolyser les liaisons peptidiques). 0,6 mL de milieu sont ensuite ajoutés.

L'extraction de l'ADN des cellules de chaque puits est réalisée avec le Kit NucleoSpin® Tissue Macherey-Nagel (Réf. 740952.250) selon le protocole fourni par le fabricant. L'ADN extrait est dosé au NanoDrop (Labtech).

Une PCR est ensuite réalisée, puis la taille des produits de PCR est contrôlée sur gel Lonza (FlashGel DNA cassés 2.2%, Ozyme, cat 703338). Ces produits de PCR sont ensuite purifiés, puis séquencés. Les couples d'amorces utilisés sont ApoB_Exon3_NewU (CCATTTTAAATTCTCTATGCCACTG) / ApoB_Exon3_NewD (GATGTTCTGCGTTTGCTCAGTA) et ApoB_Exon9_NewU (CTTTCCCCTGTGCTGATACTC) / Apob_Exon9_NewD (ATTTGGCCAAGGTTTGAAAGTT).

v. Résultat des transfections : analyse des séquences avec le logiciel TIDE

Le logiciel TIDE, disponible à l'URL <https://tide.deskgen.com/>, est un logiciel permettant d'estimer quantitativement un pourcentage de séquences aberrantes par rapport à une séquence de référence. Ce pourcentage est le reflet de l'efficacité de la transfection des cellules avec le système CRISPR-Cas9.

En effet, si les cellules transfectées ont correctement intégré le plasmide PX459 et correctement exprimé la Cas9 et l'ARN guide, une coupure double brin de l'ADN aura eu lieu au niveau du site de coupure prévu. Ensuite, chaque cellule aura réparé l'ADN de façon différente par le système NHEJ ou par recombinaison homologue (éventuellement en se servant d'un ADN « donneur » comme modèle si celui-ci a été ajouté lors de l'étape de transfection). Lors du séquençage, une superposition de différentes séquences sera visible dans le logiciel Chromas à partir du site de coupure de la Cas9. Le logiciel TIDE va quant à lui permettre d'estimer le pourcentage de séquences aberrantes.

Pour cela, la séquence de l'ARN guide doit être indiquée dans le logiciel afin de lui permettre de déterminer l'emplacement du site de coupure de la Cas9. La séquence à tester et celle de référence sont ensuite téléchargées. Le logiciel aligne les séquences et calcule le pourcentage de séquences aberrantes par rapport à celle de référence. Si un grand nombre de séquences aberrantes est observé à partir du site de coupure, cela signifie que la Cas9 a coupé l'ADN à l'endroit voulu.

4. Deuxième transfection avec les ADN donneurs

i. Conditions de transfection retenues

Une nouvelle transfection cellulaire est réalisée dans les conditions optimales déterminées à l'étape 3.iii (la méthode de transfection retenue étant la transfection par électroporation du plasmide PX459 seul), à la différence que de l'ADN « donneur », ou ADNd (Eurofins), qui servira de modèle à la recombinaison homologe, est ajouté dans chaque puits.

Trois conditions sont testées en parallèle :

- Condition 1 : 100 000 cellules + 1µg de plasmide + 2µL d'ADNd à 10µM.
- Condition 2 : 100 000 cellules + 2µg de plasmide + 4µL d'ADNd à 10µM.
- Condition 3 : 200 000 cellules + 2µg de plasmide + 4µL d'ADNd à 10µM.

Les volumes de réactifs utilisés sont présentés dans le Tableau 12. L'électroporation est effectuée avec une pulsation de 425 V/cm, soit 1275 V, pendant 40 ms.

Tableau 12 – Volumes de réactifs utilisés pour la transfection optimisée avec les ADNd

	Mut97G Condition 1	Mut97G Condition 2	Mut97G Condition 3	Mut351M et Mut351R Condition 1	Mut351M et Mut351R Condition 2	Mut351M et Mut351R Condition 3	Témoin négatif (sans électroporation)
Nombre de cellules	5.10 ⁵	5.10 ⁵	10.10 ⁵	5.10 ⁵	5.10 ⁵	10.10 ⁵	5.10 ⁵
PX459 (µL)	1,56	3,2	3,2	1,93	3,87	3,87	/
ADNd [50µM] (µL)	0,6	1,2	1,2	0,6	1,2	1,2	/
Tampon (µL)	7,84	5,6	0,6	7,47	4,93	0	10
Volume final (µL)	15	15	15	15	15	15	15

Les cellules électroporées sontensemencées dans une plaque 12 puits dans 1 mL de milieu (DMEM+SVF) contenant du Scr7 à 15000X, mais pas d'ATB. La plaque est placée à l'étuve à 37°C et le traitement à la puromycine est effectué 48h après la transfection.

ii. Sélection clonale par dilution limite

Afin de sélectionner parmi la population de cellules présentes dans chaque puits un seul clone d'intérêt qui aura réparé l'ADN de façon homologue à l'ADN donneur à la suite de la transfection et de la coupure induite par la Cas9, une dilution limite est réalisée. L'objectif est d'isoler chaque cellule dans un puits différent d'une plaque 96 puits, en prévoyant 0,75 cellules par puits pour être certain qu'il n'y en ait qu'une et pas plus.

Les cellules sont lavées au PBS, traitées avec 300 µL de trypsine et mises en suspension dans 1,2 mL de milieu. Elles sont ensuite comptées au C-Chip™ et le volume nécessaire pour avoir 75 cellules dans 10 mL de milieu est prélevé. Ces 10 mL sont répartis dans la plaque 96 puits, qui est placée à 37°C à l'étuve.

Après 3 semaines de croissance, l'ADN des cellules de chaque puits est extrait et séquencé, afin de déterminer quel est le génotype de la population clonale et identifier les clones porteurs de la variation d'intérêt.

5. Dosage de l'ApoB par la méthode ELISA

a. Principe de l'ELISA

La technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

La méthode utilisée dans cette étude est la méthode ELISA « sandwich » ou DAS ELISA (*Double Antibody Sandwich ELISA*). Elle se divise en 4 étapes (41) :

- L'anticorps de capture est fixé sur un support.
- L'échantillon possédant l'antigène à identifier est incubé sur le support, puis un lavage est effectué.
- L'anticorps de détection marqué par une enzyme est incubé avec l'antigène afin qu'il puisse s'y fixer, puis un lavage est effectué.
- Une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme est ajoutée. Le produit de la réaction est coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée avec un photomètre. Plus l'intensité de la coloration est élevée, plus l'antigène est présent en grande quantité.

Le principe de la méthode ELISA sandwich est schématisé dans la Figure 19.

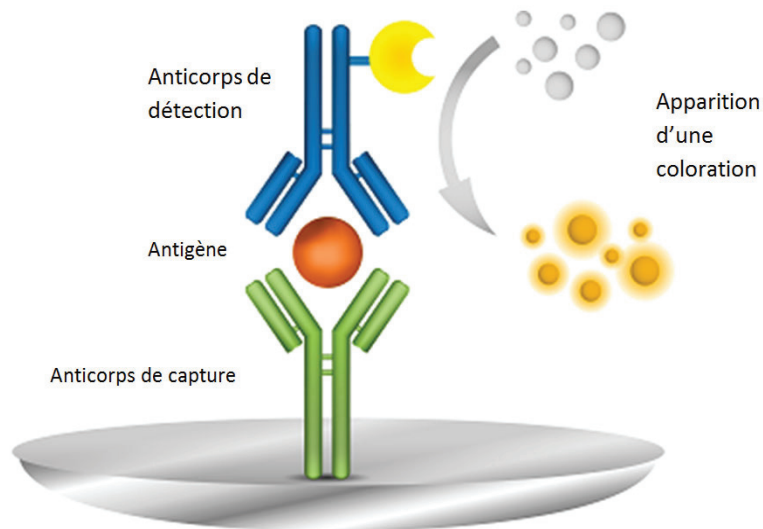


Figure 19 – Principe de la méthode ELISA sandwich. Figure adaptée de celle disponible à l'URL : <https://fr.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa#overview>

b. Dosage de l'ApoB

Le but de cette étape est de vérifier l'efficacité et la reproductibilité du test ELISA pour doser l'ApoB, et ainsi valider son utilisation pour estimer l'effet des variations étudiées. Des clones cellulaires obtenus avant mon arrivée dans le service sont utilisés. Ces clones correspondent aux variations suivantes :

- c.1064dupT Hz (p.Arg356Glufs*5) : modèle de FHBL hétérozygote,
- c.1064dupT Ho (p.Arg356Glufs*5) : modèle de FHBL homozygote,

Pour ces deux variations, le but est dans un premier temps de valider le modèle, c'est-à-dire de montrer qu'il y a significativement moins d'ApoB pour le clone c.1064dupT Hz et aucune sécrétion d'ApoB pour le clone c.1064dupT Ho, par rapport au WT.

Les clones cellulaires d'intérêt sont ensemencés dans des boîtes T25 avec 10^6 cellules par boîte et 5 mL de milieu. Ces cellules sont traitées au DMSO 96h après leur ensemencement. Elles sont ensuite traitées à l'acide oléique (0,6 mM) à T=2h, 6h ou 24h (pour obtenir une cinétique), car celui-ci stimule la synthèse et la sécrétion d'ApoB. (42) L'ApoB est dosée dans le surnageant, et dans les cellules après ajout de 500 μ L de PBS et centrifugation (le surnageant est récupéré), pour chaque condition.

L'ApoB est dosée avec le kit Human apoB ELISA development kit (HRP) (Mab Tech, 3715-1H-20) selon le protocole fourni par le fabricant. L'absorbance du produit de la réaction est lue à 450 nm. Le test est réalisé deux fois afin d'obtenir une moyenne.

IV. Résultats

1. Construction du plasmide et des ARN guides

a. Screening et culture primaire

Après la ligation des ARNg dans le plasmide et la transformation bactérienne, un screening (criblage) est réalisé sur 4 colonies pour chaque ARNg, soit 28 screenings au total. 28 cultures primaires, une par screening, sont préparées en parallèle. Le Tableau 13 indique quel clone bactérien correspond à quel ARNg.

Tableau 13 – ARN guides, leurs séquences et les clones criblés correspondants

Variation	ARN guide	Séquence	Clone
Mut58P	ARNg1	caccgCGACCCGATTCAAGCACCTC aaacGAGGTGCTTGAATCGGGTCGc	A1
	ARNg2	caccgCCGGAAGTACACATACT aaacGGCCTTCATGTGTATGTTGAc	A2
	ARNg3	caccgTATGAGGCTGAGAGTTCCAG aaacCTGGAACCTCAGCCTCATAc	A3
Mut97G	ARNg1	caccgGGTGTATGGCTTCAACCCTG aaacCAGGGTTGAAGCCATACACCc	B1
Mut351M/351R	ARNg1	caccgAAGCTGGTACTGAGCTGAG aaacCTCAGCTCAGTAACCAGCTTc	C1
Mut2182Y	ARNg1	caccgAAATCAACTTTAATGAAAAA aaacTTTTTCATTAAGTTGATTTc	E1
	ARNg2	caccgTGTAATTTAGTAAAAACAA aaacTTGTTTTTACTAAATTTACAc	E2

La taille des produits de PCR obtenus à partir des 28 colonies « screenées » est contrôlée sur gel Lonza. La taille attendue est de 319 pb (299 pb du plasmide « vide » et 20 pb de l'ARNg). Tous les clones présentent une taille correcte.

b. Séquençage des produits de PCR

Parmi les 4 screenings réalisés pour chaque ARNg, 2 sont choisis pour être séquencés (à l'exception des clones A1 et A2 pour lesquels les 4 screenings sont séquencés). Le séquençage est réalisé avec les amorces du plasmide PX459_130F (TTTCTGGGTAGTTTGCAGT) et PX459_429R (AGCCATTTGTCTGCAGAATTG). Les screenings sélectionnés pour être séquencés et le résultat de leur séquençage sont présentés dans le Tableau 14. Les séquences de ces screenings sont disponibles en annexe.

Tableau 14 – Résultat du séquençage des screenings (Conforme : insertion de l'ARNg, - : absence d'insertion de l'ARNg, interprétable : séquence illisible)

Clone	Screening	Séquence R	Séquence F
A1	1	-	-
	2	Conforme	Conforme
	3	-	-
	4	-	-
A2	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
A3	3	Conforme	Conforme
	4	Conforme	Conforme
B1	1	Conforme	Conforme
	2	Conforme	Conforme
C1	3	Conforme	Conforme
	4	-	-
E1	3	Conforme	Ininterprétable
	4	Conforme	Ininterprétable
E2	1	Conforme	Ininterprétable
	2	Conforme	Ininterprétable

Lorsqu'une séquence est désignée comme « conforme » dans le Tableau 13, cela signifie que l'ARNg s'est correctement inséré dans le plasmide et qu'il est apte à être utilisé. Les ARNg retenus pour la suite de l'étude sont donc les suivants :

- Pour **Mut58P**, l'ARNg **3**,
- Pour **Mut97G**, l'ARNg **1**,
- Pour **Mut351M** et **Mut351R**, l'ARNg **1**
- Pour **Mut2182Y**, l'ARNg **1**.

c. Maxipreps et dosage de l'ADN

Une maxiculture est réalisée à partir des minicultures préparées en parallèle pour les clones A1-screening 2, A3-screening 3, B1-screening 1, C1-screening 3, E1-screening 3 et E2-screening 1. Une Maxiprep est ensuite réalisée sur les maxicultures afin d'extraire l'ADN des clones bactériens, qui est ensuite dosé au NanoDrop. Le dosage de l'ADN de chaque population clonale est présenté dans le Tableau 15. Les ratios A260/280 et A260/A230 sont aussi indiqués.

Tableau 15 – Résultat du dosage de l'ADN des Maxipreps

Nom de l'échantillon	[ADN] (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
Mut58P – ARNg 1	821	1,91	2,16
Mut58P – ARNg 3	696	1,89	2,11
Mut97G – ARNg 1	951	1,90	2,18
Mut351M – ARNg 1	774	1,91	2,16
Mut2182Y – ARNg 1	1092	1,90	2,18
Mut2182Y – ARNg 2	896	1,90	2,22

d. Séquençage des Maxipreps

Le séquençage des Maxipreps avec les amorces PX459_130F et PX459_429R a montré que l'ADN extrait de toutes les Maxipreps était identique à la séquence de référence et qu'il pouvait donc être utilisé pour la transfection cellulaire.

2. Transfections cellulaires

a. Test de sélection par la puromycine / Test de l'innocuité du Scr7

Deux jours après le traitement à la puromycine et au Scr7 selon le plan de plaque présenté dans le chapitre III. 3. A. i, les cellules sont comptées, et leur taux de viabilité est calculé. Le nombre de cellules obtenu pour chaque puits est présenté dans le Tableau 16. On effectue une normalisation en pourcentage de toutes les conditions par rapport à la condition « NT Puro- », qui est la condition de référence sans transfection et sans traitement à la puromycine.

Tableau 16 – Nombre de cellules et leur pourcentage de viabilité dans différentes conditions de traitement au Scr7 et à la puromycine (NT : Non Transfecté, Mut- : pas de mutation intégrée dans le plasmide, Puro- : pas de traitement à la puromycine)

Puits	Nombre de cellules/mL			% de viabilité	Normalisation NT Puro- (%)
	Non viables	Total	Total-Non viables		
1 : DMSO	7,92.10 ³	2,37.10 ⁴	1,58.10 ⁴	66	126
2 : Scr7	3,3.10 ³	4,50.10 ⁴	4,17.10 ⁴	92	333
3 : Mut97G Puro 48h	1,05.10 ³	8,99.10 ³	1,57.10 ³	14	12,5
4 : NT Puro-	2,64.10 ³	1,51.10 ⁴	1,25.10⁴	82	100
5 : NT Puro 24h	9,24.10 ³	7,92.10 ³	1,32.10 ³	14	10,56
6 : NT Puro 48h	1,38.10 ⁴	1,10.10 ⁴	2,80.10 ³	20	22
7 : Mut- Puro-	3,25.10 ⁴	1,78.10 ⁵	1,46.10 ⁵	81	1168
8 : Mut- Puro 24h	7,26.10 ³	5,28.10 ³	1,98.10 ³	27	15,8
9 : Mut- Puro 48h	1,64.10 ⁴	1,32.10 ⁴	3,30.10 ³	20	26,4
10 : Mut351M Puro-	5,94.10 ³	7,34.10 ⁴	6,74.10 ⁴	91	539
11 : Mut351M Puro 24h	4,62.10 ³	6,60.10 ³	1,98.10 ³	30	15,8

Une bonne viabilité (92%) est observée dans le puits avec le Scr7 seul. L'innocuité de celui-ci est donc démontrée. La viabilité est significativement diminuée avec l'ajout de puromycine, qui est donc efficace. Cette diminution de la viabilité est plus importante lorsque la puromycine est ajoutée à 24h que lorsqu'elle est ajoutée à 48h. Il faut donc entre 24 et 48h aux cellules pour exprimer la résistance à la puromycine.

b. Optimisation des conditions de transfection

i. Dosage de l'ADN extrait après transfection et traitement à la puromycine

Plusieurs conditions de transfection ont été testées : transfection d'un ou deux plasmides, différents réactifs de transfection ou transfection par électroporation (voir partie « Matériel et Méthodes »). Les cellules sont transfectées avec les Maxipreps précédemment préparées Mut97G-ARNg1, Mut351M-ARNg1 ou Mut351R-ARNg1. Le dosage de l'ADN extrait pour chaque condition de transfection est présenté dans le Tableau 17.

Tableau 17 – Dosage de l'ADN extrait pour chaque condition de transfection testée

		[ADN] (ng/μL)	Moyenne [ADN] (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
Transfection par endocytose avec X-tremeGENE	PX459-Mut97G	38	13,7	1,43	0,65
	PX459-Mut351M	0,40		0,82	0,94
	PX459-Mut351R	1,1		2,6	0,89
Transfection par endocytose avec FuGENE	PX459-Mut351M (0,5 μg)	0,95	1,1	0,91	0,64
	PX459-Mut351M (1 μg)	1,3		0,92	0,71
Transfection par électroporation	PX459-Mut351M – pulse 1 - Scr7	24	16,7	1,5	0,70
	PX459-Mut351M – pulse 2 - Scr7	26		1,7	0,97
	PX459-Mut351M – pulse 1	18		1,5	0,69
	PX459-Mut351M – pulse 2	6,2		1,5	0,91
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 1 -Scr7	15		1,7	1,1
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 2 -Scr7	18		1,5	0,79
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 1	11		1,4	0,65
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 2	15		1,4	0,68

On obtient la concentration la plus élevée d'ADN extrait en moyenne dans le cas de la transfection par électroporation. Cela signifie qu'il s'agit de la méthode pour laquelle l'efficacité et le rendement de la transfection sont les meilleurs. La taille des plasmides extraits a ensuite été contrôlée sur gel Lonza. La taille était celle attendue pour chaque condition, c'est-à-dire que des plasmides de taille correcte ont été transfectés dans les cellules.

ii. Séquençage de l'ADN et analyse des séquences avec TIDE

Afin de déterminer quelle condition de transfection a permis d'exprimer la Cas9 avec le plus d'efficacité, le pourcentage de séquences aberrantes pour chaque condition est calculé avec le logiciel TIDE. Les résultats sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : pourcentage de séquences L et R (sens et antisens) aberrantes par rapport à la séquence de référence

		% de séquences aberrantes L	% de séquences aberrantes R
Transfection par endocytose avec XtremeGENE	PX459-Mut97G	0	0
	PX459-Mut351M	0	0
	PX459-Mut351R	0	0
Transfection par endocytose avec FuGENE	PX459-Mut351M (0,5 µg)	0	0
	PX459-Mut351M (1 µg)	0	0
Transfection par électroporation	PX459-Mut351M – pulse 1 - Scr7	25	21
	PX459-Mut351M – pulse 2 - Scr7	5	2
	PX459-Mut351M – pulse 1	19	16
	PX459-Mut351M – pulse 2	3	2
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 1 -Scr7	1	0
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 2 -Scr7	5	3
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 1	28	22
	PX459-Mut351M + KBU2 – pulse 2	0	0

Aucune coupure par la Cas9 n'est observée pour les conditions de transfection classiques par endocytose, puisque le pourcentage de séquences aberrantes est de 0, ce qui signifie que l'ADN n'a pas effectué de réparations qui auraient pu modifier sa séquence. Des coupures sont observées pour certaines conditions de transfection par électroporation. La condition présentant le plus haut taux de coupures est la condition PX459-Mut351M + KBU2-pulse 1 (cotransfection des plasmides PX459 et KBU2). Mais puisque de bons résultats, à peu de différence près, sont aussi obtenus avec la transfection du plasmide PX459 seul pour la condition PX459-Mut351M – pulse 1 - Scr7, c'est cette condition de transfection qui sera retenue.

c. Deuxième transfection avec les ADNd

Une fois les conditions de transfection optimisées, une deuxième transfection cellulaire a été réalisée, cette fois en ajoutant la séquence d'ADNd contenant la variation désirée. La cellule est censée utiliser cette séquence comme modèle pour effectuer une recombinaison homologue après la coupure par la Cas9, et ainsi intégrer la variation dans son génome. Les variations qui ont été testées lors de cette étape sont Mut97G, Mut351M et Mut351R.

Après l'extraction de l'ADN des cellules transfectées etensemencées en plaque 96 puits, celui-ci est séquencé. Il a été observé que, contrairement aux résultats attendus, les séquences étant censées avoir été recombinaison selon l'ADNd ajouté correspondaient au contraire à la séquence d'origine non mutée. Cela signifie que la variation d'intérêt n'a pas été intégrée au génome de la cellule.

3. Dosage de l'ApoB par la méthode ELISA

Les résultats du dosage de l'ApoB sécrétée et de l'ApoB intracellulaire aux temps t=2, 6 et 24h sont présentés dans la Figure 20.

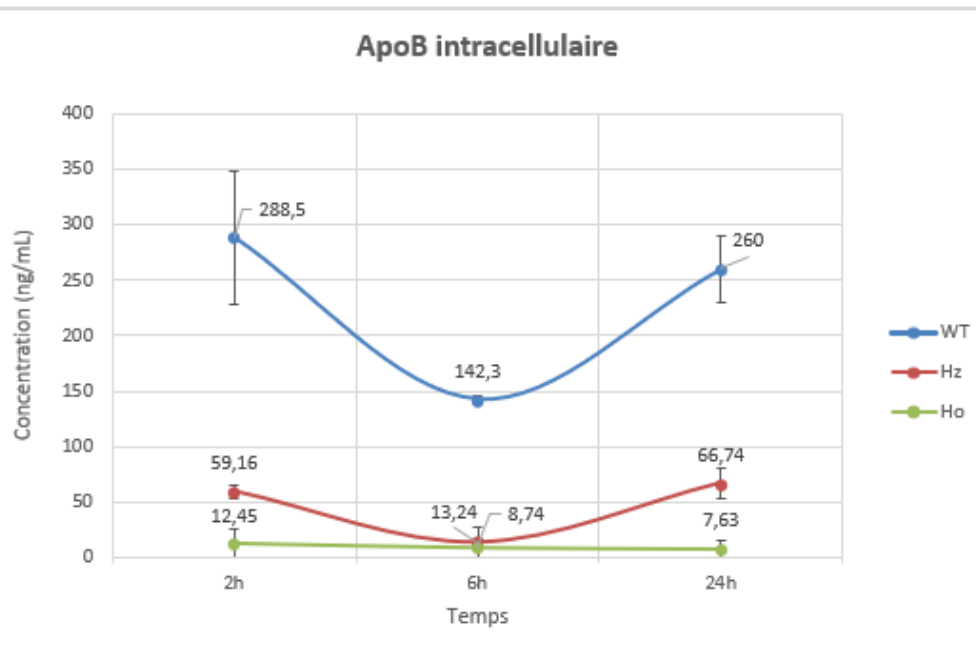
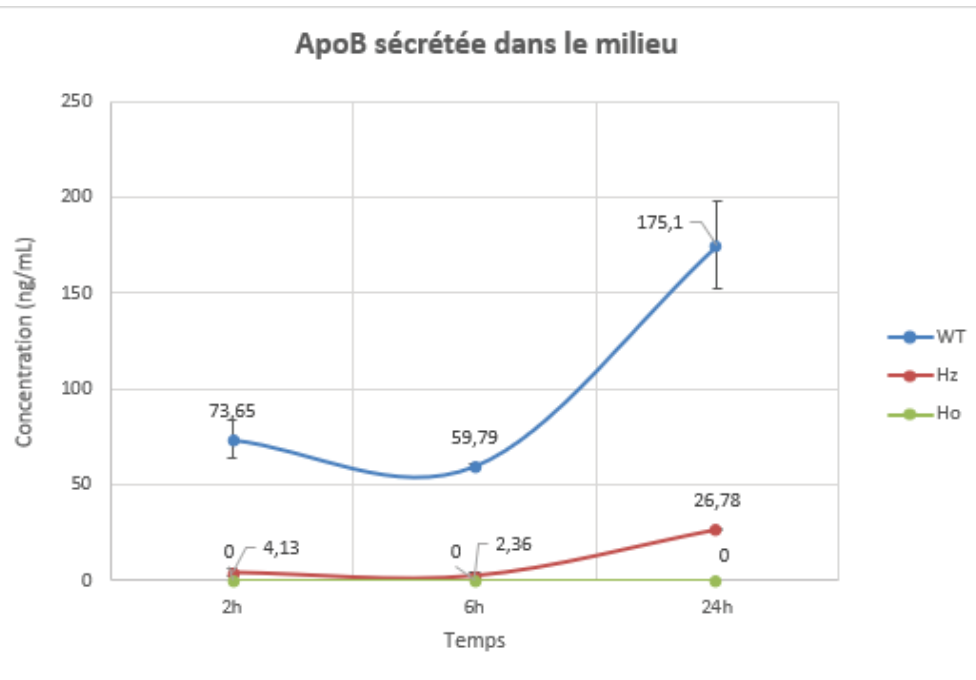


Figure 20 – Dosage de l'ApoB sécrétée et de l'ApoB intracellulaire aux temps t=2h, 6h et 24h pour les modèles wild type (WT), hétérozygote (Hz) et homozygote (Ho)

Pour le modèle HBLF hétérozygote, on observe des concentrations d'ApoB intracellulaire et d'ApoB sécrétée diminués par rapport au WT : à t=24h, diminution d'environ 75% pour l'ApoB intracellulaire, et d'environ 85% pour l'ApoB sécrétée. Pour le modèle homozygote, on observe une diminution d'environ 97% de l'ApoB intracellulaire à t=24h, et aucune sécrétion d'ApoB dans le milieu. Ces résultats sont cohérents avec ceux attendus.

V. Discussion

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de variations faux sens identifiées chez des patients présentant une hypocholestérolémie sur la sécrétion d'ApoB, afin d'évaluer si elles sont responsables du phénotype d'hyperlipoprotéïnémie. Pour cela nous avons :

- Réalisé des constructions plasmidiques utilisées pour transfecter des cellules dans le but d'éditer leur génome par la méthode CRISPR-Cas9,
- Optimisé les conditions de transfection cellulaire,
- Étudié la sécrétion d'ApoB par les cellules éditées en comparaison à la sécrétion d'ApoB par les cellules non éditées (wild type).

La technique CRISPR-Cas9 présente deux avantages par rapport à une transfection dans des cellules ne produisant pas la protéine. D'une part, elle nous permet d'étudier l'effet des variations sur l'ApoB100. En effet, il est difficile d'insérer l'ADNc de cette protéine, comptant environ 16 kb, dans un plasmide. D'autre part, l'utilisation d'un modèle cellulaire produisant naturellement l'ApoB sera plus représentative de l'effet *in vivo* des variations.

Deux variations du gène *APOB* connues dans la littérature ont été choisies comme contrôle positif pour l'étude : c.172G>C soit p.(A58P), associée à une diminution de la sécrétion d'ApoB de 100% (35), et c.1051C>A soit p.(L351M), associée à une diminution de la sécrétion d'ApoB de 50% (35). Trois autres variations, retrouvées après séquençage de l'ADN de patients présentant une HBLF, et dont l'effet restait à déterminer, ont aussi été étudiées : c.289T>G soit p.(C97G), c.1052T>G soit p.(L351R), c.6544G>T soit p.(C2182Y). L'objectif était d'éditer l'ADN génomique de cellules pour y intégrer ces variations.

Après une transfection classique du par endocytose du plasmide construit dans des cellules Huh7 avec le transfectant X-TremeGENE (choisi car peu cytotoxique, facile à utiliser et efficace dans la plupart des lignées cellulaires couramment utilisées) (43) (44), l'analyse des séquences avec le logiciel TIDE de l'ADN extrait des cellules n'a pas montré de séquence aberrante, de coupure de l'ADN génomique par la Cas9. Cela pouvait être dû au fait que, soit le système CRISPR-Cas9 n'était pas fonctionnel, soit la Cas9 avait coupé l'ADN génomique qui s'était refermé aussitôt sans effectuer de recombinaison, soit le plasmide n'avait tout simplement pas été transfecté dans les cellules (certainement du fait de sa grande taille).

Pour remédier à cela, deux autres méthodes de transfection ont été testées : une transfection chimique avec un autre transfectant, le FuGENE, et une transfection par électroporation. Le transfectant FuGENE a été choisi car il est peu toxique (meilleure viabilité cellulaire) (45), et il est couramment utilisé pour la transfection de nombreuses lignées cellulaires, même celles difficiles à transfecter. (46) L'électroporation a été sélectionnée comme méthode de transfection alternative car, en créant des pores dans la membrane cellulaire, l'insertion du plasmide dans la cellule est facilitée par rapport à une transfection

par endocytose, permettant d'obtenir ainsi une meilleure efficacité de la transfection. De plus, cette méthode est simple et facile à mettre en œuvre.

Dans les deux cas, une co-transfection du plasmide PX459 avec le plasmide KBU2 (contenant la Cas9) a été testée. Cette cotransfection a été réalisée pour déterminer si la transfection de la séquence codant la protéine Cas9 dans un autre plasmide permettrait d'augmenter le rendement de la transfection et l'expression de la protéine dans la cellule. Après analyse des séquences de ces nouvelles transfactions par le logiciel TIDE, aucune coupure de l'ADN génomique n'a été relevée dans le cas de la transfection classique avec FuGENE. Cependant, des coupures ont été observées pour certaines conditions de transfection par électroporation (le taux le plus élevé de coupure étant de 28%). Pour comparaison, une étude menée par Liang *et al.* avait permis d'atteindre des taux de production de mutations Indel entre 0 et environ 65%, selon différentes conditions de transfection par électroporation. (47) L'échec de la transfection avec FuGENE s'explique certainement, comme pour la transfection avec X-tremeGENE, par la trop grande taille du plasmide. La condition optimale de transfection qui a été retenue pour la suite de cette étude est donc une transfection par électroporation du plasmide PX459 seul, avec une pulsation de 425V/cm, soit 1275V, pendant 40 ms.

Une étude menée Hashemi *et al.* en 2012 avait pour but d'étudier le taux de transfection par transfection chimique ou par électroporation dans des cellules Huh7, dans des conditions optimisées. Les taux de transfection étaient d'environ 14% pour la transfection chimique, et de 64% pour la transfection par électroporation. (48) Cependant, malgré l'optimisation des conditions de transfection qui a été réalisée, le rendement de la transfection reste assez bas dans notre cas. Plusieurs pistes d'amélioration sont à envisager. Tout d'abord se pose la question du format sous lequel est délivré le matériel CRISPR/Cas9. Nous avons fait le choix d'utiliser un vecteur ADN (plasmide) à cause son utilisation simple et de sa stabilité qui permet son utilisation pour des expériences de longue durée. La grande taille de ce plasmide peut néanmoins compliquer l'étape de transfection. Une alternative serait de transférer l'ARNm de la Cas9 et l'ARNg directement dans le cytosol des cellules. Cette technique présente l'avantage d'avoir une protéine fonctionnelle rapidement puisque l'ARNm a plus facilement accès aux ribosomes (pic d'expression en 5 à 7h), c'est pourquoi elle est plutôt utilisée dans des expériences de courte durée. Une autre méthode serait d'utiliser des RNP, ou ribonucléoprotéines. Ces RNP sont un complexe formé par la protéine Cas9 et l'ARNg. Cette méthode ne nécessite ni transcription, ni traduction du matériel transféré, c'est pourquoi elle est très rapide (fonctionnelle en quelques secondes). Cependant, son principal inconvénient reste son coût élevé. (49)

Ces trois différents formats sont schématisés dans la Figure 21.

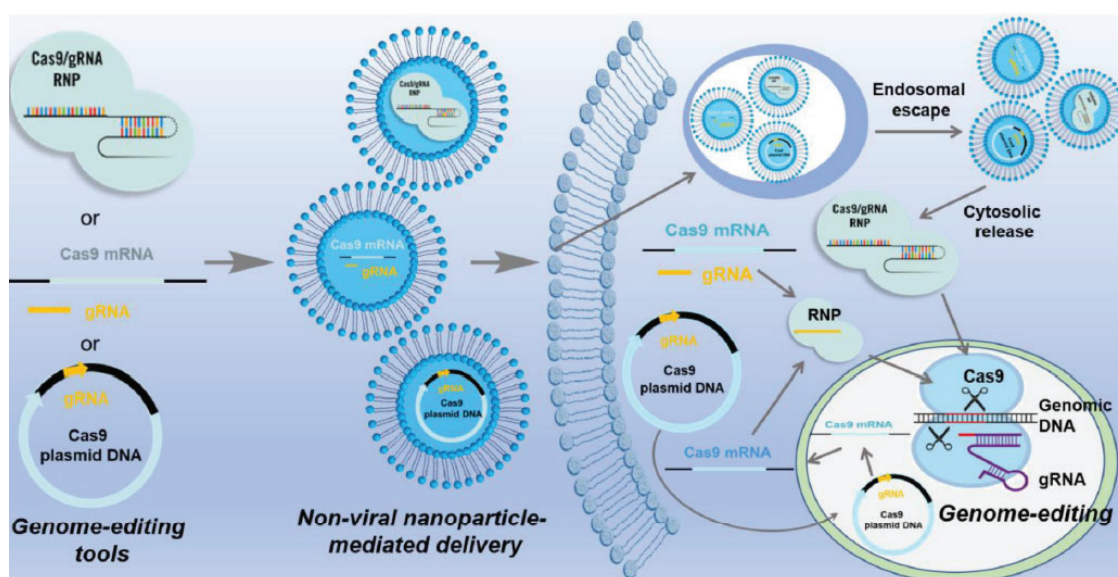


Figure 21 – Comparaison des différents formats possibles pour délivrer le matériel CRISPR/Cas9 : ribonucléoprotéines (RNPs), ARNm/ARNg et plasmide. (50)

Le choix de la technique de transfection est aussi à prendre en compte. La première méthode de transfection qui avait été envisagée pour cette étude est la transfection chimique (avec les transfectants X-tremeGENE puis FuGENE), qui, comme nous l'avons vu, s'est révélée infructueuse. Il existe cependant un nouveau transfectant chimique spécialement conçu pour la transfection de la protéine Cas9 qui pourrait être envisagé pour de futures expériences : la lipofectamine CRISPRMAX. Le matériel à utiliser avec cette méthode de transfection sont des complexes RNP Cas9/ARNg. Cette technique permet d'obtenir une meilleure efficacité de transfection avec moins de densité cellulaire, et présente moins de toxicité cellulaire. Selon une étude menée par Xin Yiu *et al* visant à comparer une soixantaine d'agents de transfection dans le cas de lignées cellulaires couramment utilisées, la Lipofectamine CRISPRMAX a été déterminée comme étant la nanoparticule la plus efficace pour la transfection des complexes RNP Cas9. (51)

La deuxième méthode de transfection utilisée dans cette étude était la transfection par électroporation. Il s'agit d'une méthode simple et plus efficace que la transfection chimique dans les cellules difficiles à transfecter : elle présente de meilleurs taux de transfection et d'édition génomique dans de nombreuses lignées cellulaires, quel que soit le format utilisé (plasmide, ARNm ou RNP). (47) Cependant, son inconvénient principal est de diminuer la viabilité cellulaire, surtout dans le cas de gros plasmides. (49) Pour pallier cela, Cao *et al.* ont mis au point une méthode de nanoélectroporation, avec laquelle une viabilité cellulaire de 90% a été obtenue. En comparaison, le taux de viabilité cellulaire observé dans le cas d'une électroporation en vrac dans du PBS et d'une lipofection était de 55% et 50% respectivement. (52) Cette méthode nécessite l'utilisation d'un appareil supplémentaire de type microporateur, qui est toutefois facilement utilisable en laboratoire.

D'autre part, une approche hybride entre plusieurs méthodes permettrait de combiner leurs avantages et de réduire leurs inconvénients. Par exemple, dans l'étude menée par Ding *et al.*, la combinaison de l'électroporation avec une méthode mécanique de transfection, la déformation de membrane, a permis d'obtenir une transfection d'ADN plasmidique aboutissant à une expression génique rapide, tout en étant peu invasive grâce à l'utilisation d'un champ électrique plus faible que dans le cas d'une électroporation classique. (53) Une autre étude, réalisée par Sondergaard *et al.*, présente une nouvelle méthode permettant d'augmenter significativement le rendement de la transfection de vecteurs CRISPR/Cas9 de grande taille, ainsi que la viabilité cellulaire. (54) Le principe repose sur la cotransfection de ces vecteurs avec de nombreux plasmides plus petits, qui vont faciliter le passage du vecteur à travers la membrane de cellules préalablement soumises à une électroporation (Figure 22).

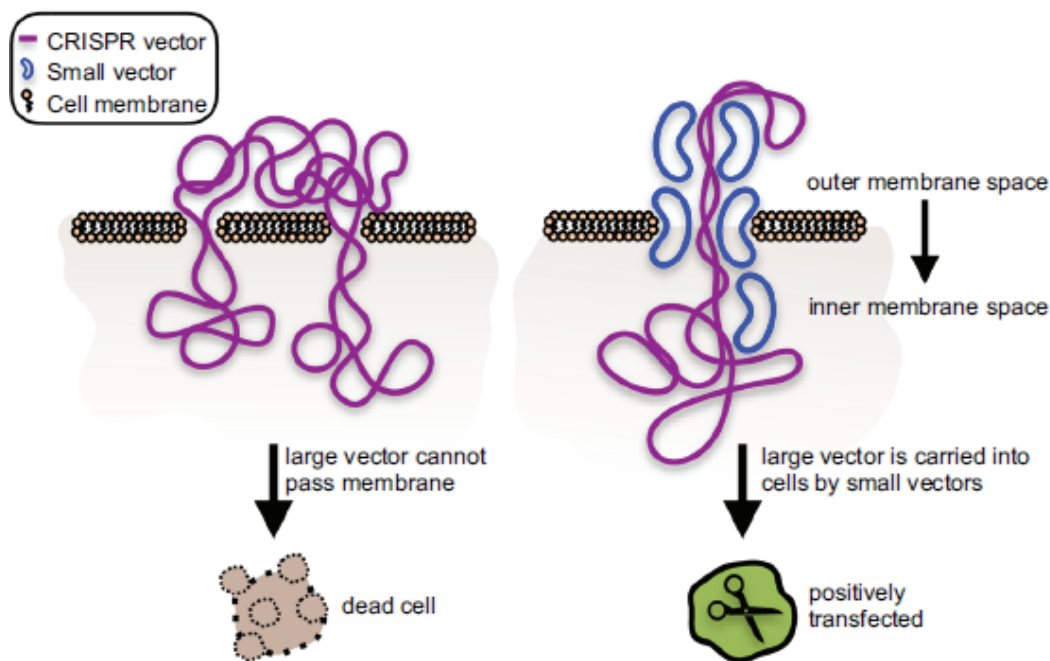


Figure 22 – Principe de la cotransfection de vecteurs CRISPR/Cas9 avec des vecteurs de petite taille facilitant leur passage à travers la membrane cellulaire. (54)

Les résultats de notre transfection par électroporation (séquençage de l'ADN et analyse des séquences avec le logiciel TIDE) ont montré que nous avons réussi à obtenir une coupure de l'ADN génomique par la Cas9 sur le site de coupure souhaité. Nous avons ainsi pu créer des codons STOP entraînant la production d'une protéine tronquée. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir de séquences recombinées après la coupure de la Cas9 selon le modèle d'ADNd ajouté contenant les variations que nous souhaitions étudier. Cela pourrait être dû au fait que la recombinaison de type NHEJ a été largement majoritaire par rapport à la recombinaison homologue, aboutissant à l'apparition de variations InDel. La recombinaison

NHEJ est naturellement majoritaire dans les cellules (55), mais l'ajout de Scr7, inhibiteur de la ligase IV, ne semble donc pas être suffisant pour favoriser suffisamment la recombinaison HDR.

La littérature décrit plusieurs autres méthodes pour favoriser la recombinaison HDR plutôt que la NHEJ. Par exemple, l'une des raisons possibles de recombinaison NHEJ majoritaire est le fait que la Cas9, encore présente dans le milieu après que l'ADN a été coupé et réparé par la voie HDR, induit une nouvelle coupure de ce brin d'ADN qui est, cette fois, réparé par la voie NHEJ. Une étude menée par Paquet *et al.* à ce propos présente une technique consistant à insérer une mutation silencieuse sur l'ADNd soit au niveau du site reconnu par l'ARNg, soit, de préférence, sur le site PAM. Ainsi, lorsque l'ADN est coupé par la Cas9 puis réparé selon l'ADNd modèle, la mutation silencieuse de l'un ou l'autre site (selon le choix réalisé) est intégrée dans l'ADN génomique. L'ARNg ou la Cas9 ne pourront donc plus se fixer à nouveau sur l'ADN et ne pourront plus induire une nouvelle coupure qui risquerait d'être cette fois réparée par la voie NHEJ. Cette méthode a permis d'obtenir une précision d'édition 10 fois supérieure pour chaque allèle, soit une précision d'édition 100 fois supérieure si les deux allèles d'une même cellule sont édités. (56)

Une autre étude, menée par Chu *et al.*, propose comme alternative à l'inhibition de la ligase IV par le Scr7 pour favoriser la recombinaison HDR, l'utilisation des protéines de l'adénovirus 4 E1B55K et E4orf6 (qui favorisent l'élimination de la ligase IV dans le protéasome). Le taux de ligase observé dans les cellules transfectées était alors réduit de 93%. (57)

L'autre étape de cette étude consistait à valider le modèle du test ELISA pour doser l'ApoB. Précédemment, un autre kit ELISA (Elabscience) avait été testé, puis abandonné, car sa sensibilité était trop faible (46.88 ng/mL selon le site du fabricant). Le nouveau kit choisi pour cette étude (Mabtech) dispose d'une meilleure sensibilité (7 ng/ml selon le site du fabricant), suffisante pour détecter l'ApoB sécrétée dans le cadre de notre étude.

Il est décrit dans la littérature que les ApoB tronquées d'une taille inférieure à 27% de l'ApoB-100 ne sont pas sécrétées, et que les troncatures jusqu'à 90% de l'ApoB-100 sont associées à une hypobétalipoprotéïnémie. (58) Le modèle utilisé pour la validation du test ELISA (p.Arg356Glu*5) induit une troncature conduisant à la formation d'une ApoB-9. Le modèle hétérozygote pour cette variation diminue la sécrétion d'ApoB d'environ 75%, tandis que le modèle homozygote abolit totalement sa sécrétion.

Ces résultats sont cohérents avec ce qui est retrouvé dans la littérature et permettent donc de valiser ce test ELISA pour doser l'ApoB sécrétée, et de distinguer si celle-ci est de type *wild type*, ou contenant une variation hétérozygote ou homozygote.

Cependant, d'autres tests seraient nécessaires pour déterminer si cette méthode a la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la limite de quantification nécessaires pour en faire une technique robuste de dosage d'apoB dans le milieu de culture.

VI. Conclusions

L'apolipoprotéine B entre dans la composition de la structure de certaines lipoprotéines (VLDL, IDL, LDL et chylomicrons). Un déficit de production de cette protéine entraîne donc une diminution de la sécrétion des VLDL entraînant une hypobêtalipoprotéïnémie mais également une stéatose hépatique. La plupart des variations du gène APOB identifiées chez ces patients dans la littérature sont situées sur l'exon 26 et aboutissent à la formation d'un codon stop prématuré. Cependant, plus rarement, les études génétiques mettent en évidence des variants faux sens sur le gène APOB. Dans ce cas, des études de ségrégation familiale et des études fonctionnelles sont indispensables pour établir le lien de causalité entre le variant et l'hypobêtalipoprotéïnémie.

L'objectif de cette étude était donc d'étudier l'effet de variations du gène APOB sur la sécrétion d'ApoB. Pour cela, la méthode d'édition génomique CRISPR/Cas9 a été utilisée. Cette méthode innovante permet d'éditer l'ADN de façon très précise, en permettant d'insérer une variation d'intérêt dans le génome. Le principe consiste à construire un plasmide contenant un ARN guide et la séquence de la Cas9, et à le transférer dans des cellules avec un ADN donneur contenant la variation à étudier, qui servira de modèle pour la recombinaison homologue.

Après l'étude de l'optimisation des conditions de transfection cellulaire, la méthode retenue est la transfection par électroporation avec 1 impulsion de 425V/cm pendant 40 secondes, en présence de Scr7. Cette méthode a permis d'obtenir un meilleur rendement de transfection par rapport à une transfection chimique, tout en conservant une bonne viabilité cellulaire.

Après séquençage et étude des séquences avec le logiciel TIDE, des coupures de l'ADN par la Cas9 ont été mises en évidence. Cela représente la première étape du processus d'édition génomique. Cependant, la transfection avec l'ADN donneur n'a pas permis de montrer l'intégration des variations étudiées par recombinaison homologue.

D'autre part, la réalisation d'un test ELISA pour mesurer le taux de production d'ApoB de clones cellulaires mutés produits lors d'une précédente étude a permis d'obtenir des résultats cohérents avec le type de variation de chaque clone, validant ainsi l'utilisation de cette méthode de dosage de l'ApoB dans le milieu de culture.

Si nous avons rencontré des difficultés lors de cette étude concernant l'intégration au génome des variations étudiées après coupure de l'ADN par la Cas9, nous avons néanmoins mis en évidence que notre plasmide unique contenant à la fois la séquence de l'ARN guide et de la Cas9 était fonctionnel pour obtenir une coupure double brin de l'ADN.

Une piste d'amélioration à l'avenir pour insérer les variations dans le génome à partir du modèle de l'ADN donneur serait de trouver un moyen d'optimiser le rendement de la transfection, ainsi que de favoriser la recombinaison homologue de l'ADN.

Néanmoins, le travail réalisé avec l'outil très innovant qu'est la méthode CRISPR/Cas9 est prometteur, et ouvre des perspectives très intéressantes sur l'étude future de variations délétères encore peu connues, ou encore pour son utilisation dans le cadre de possibles thérapies géniques.

Bibliographie

1. Hooper AJ, Burnett JR. Update on Primary Hypobetalipoproteinemia. *Curr Atheroscler Rep.* 30 avr 2014;16(7):423.
2. Welty FK. Hypobetalipoproteinemia and Abetalipoproteinemia. *Curr Opin Lipidol.* juin 2014;25(3):161-8.
3. Tarugi P, Aversa M, Leo ED, Cefalù AB, Noto D, Magnolo L, et al. Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: An ENID review. *Atherosclerosis.* 1 déc 2007;195(2):e19-27.
4. Burnett JR, Shan J, Miskie BA, Whitfield AJ, Yuan J, Tran K, et al. A novel nontruncating APOB gene mutation, R463W, causes familial hypobetalipoproteinemia. *J Biol Chem.* 11 avr 2003;278(15):13442-52.
5. Whitfield AJ, Barrett PHR, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid Disorders and Mutations in the APOB Gene. *Clin Chem.* 1 oct 2004;50(10):1725-32.
6. Roublin J-B. CRISPR/Cas9 : HISTOIRE, METHODE, POTENTIEL & IMPACT. :160.
7. Walic M. Role of the lipoprotein associated with hepatitis C virus particles and microtubules in HCV cell entry and infection. 18 févr 2010;
8. Toussaint J-F. L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. Elsevier Masson; 2003. 818 p.
9. Disterer P, Al-Shawi R, Ellmerich S, Waddington S, Owen J, Simons J, et al. Exon skipping of hepatic APOB pre-mRNA with splice-switching oligonucleotides reduces LDL cholesterol In Vivo. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 15 janv 2013;21.
10. Bousardon C, Lurin C, Small I, Wollman F-A, Herbert C, Schroeder R, et al. Molecular and functional characterization of the DYW1 protein in the chloroplast editing complex of *Arabidopsis thaliana*. :204.
11. de Graaf J, Couture P, Sniderman AD. The Life History of ApoB Lipoprotein Particles. In: de Graaf J, Couture P, Sniderman AD, éditeurs. *ApoB in Clinical Care* [Internet]. Houten: Bohn Stafleu van Loghum; 2015 [cité 29 juill 2021]. p. 17-64. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-90-368-0980-1_1
12. Place des dosages des apolipoprotéines A1 et B dans le bilan lipidique [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 18 oct 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_728748/fr/place-des-dosages-des-apolipoproteines-a1-et-b-dans-le-bilan-lipidique
13. Sniderman AD, Thanassoulis G, Glavinovic T, Navar AM, Pencina M, Catapano A, et al. Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease: A Narrative Review. *JAMA Cardiol.* 1 déc 2019;4(12):1287-95.

14. 2. 1 Le métabolisme des lipoprotéines [Internet]. [cité 29 juill 2021]. Disponible sur: <https://m.20-bal.com/buhgalteriya/12698/index.html>
15. Song J, Ren J, Chen H. [Primary and secondary hypocholesterolemia]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 18 oct 2010;42(5):612-5.
16. Peretti N. Conséquences métaboliques des malabsorptions lipidiques : apports de l'étude des hypocholestérolémies familiales. *Ol Corps Gras Lipides*. juill 2012;19(4):228-31.
17. Masson E. Hypocholestérolémies génétiques : abêtalipoprotéinémie, hypobêtalipoprotéinémie familiale, maladie d'Anderson [Internet]. *EM-Consulte*. [cité 13 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/227190/hypocholesterolemies-genetiques-abetalipoproteinem>
18. RESERVES IU-TD. Orphanet: Hypo beta lipoproteinemie [Internet]. [cité 13 avr 2021]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=9290&Ziekte\(n\)/ziektegroep=Hypo-beta-lipoproteinemie&title=Hypo-beta-lipoproteinemie&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=9290&Ziekte(n)/ziektegroep=Hypo-beta-lipoproteinemie&title=Hypo-beta-lipoproteinemie&search=Disease_Search_Simple)
19. Tarugi P, Averna M. Hypobetalipoproteinemia: genetics, biochemistry, and clinical spectrum. *Adv Clin Chem*. 2011;54:81-107.
20. Noto D, Cefalù AB, Valenti V, Fayer F, Pinotti E, Ditta M, et al. Prevalence of ANGPTL3 and APOB Gene Mutations in Subjects With Combined Hypolipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. mars 2012;32(3):805-9.
21. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res*. sept 2001;42(9):1346-67.
22. Mann CJ, Anderson TA, Read J, Chester SA, Harrison GB, Köchl S, et al. The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J Mol Biol*. 8 janv 1999;285(1):391-408.
23. Amino Acids 430–570 in Apolipoprotein B Are Critical for Its Binding to Microsomal Triglyceride Transfer Protein* - *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. [cité 29 oct 2021]. Disponible sur: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)59864-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)59864-7/fulltext)
24. Segrest JP, Jones MK, Dashti N. N-terminal domain of apolipoprotein B has structural homology to lipovitellin and microsomal triglyceride transfer protein: a « lipid pocket » model for self-assembly of apob-containing lipoprotein particles. *J Lipid Res*. août 1999;40(8):1401-16.
25. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. mars 2013;133(3):e6.
26. Deluzarche C. PCR [Internet]. *Futura*. [cité 29 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/genetique-pcr-91/>

27. Lamoril J, Ameziane N, Deybach J-C, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-Anal Biol Spéc.* oct 2008;23(5):260-79.
28. Séquençage nouvelle génération (NGS) Clinisciences [Internet]. [cité 29 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.clinisciences.com/achat/cat-sequencage-nouvelle-generation-3452.html>
29. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med.* févr 2019;16(1):4-10.
30. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* avr 2018;122(1):e59.
31. Crom SL. Le séquençage à haut débit. 2011;42.
32. Illumina Sequencing Platform – Biomarker Technologies [Internet]. [cité 3 nov 2021]. Disponible sur: <http://en.biomarker.com.cn/platforms/illumina>
33. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci.* 1 nov 1987;84(21):7413-7.
34. Burnett JR, Zhong S, Jiang ZG, Hooper AJ, Fisher EA, McLeod RS, et al. Missense Mutations in APOB within the $\beta\alpha 1$ Domain of Human APOB-100 Result in Impaired Secretion of ApoB and ApoB-containing Lipoproteins in Familial Hypobetalipoproteinemia *. *J Biol Chem.* 17 août 2007;282(33):24270-83.
35. Zhong S, Magnolo AL, Sundaram M, Zhou H, Yao EF, Leo ED, et al. Nonsynonymous Mutations within APOB in Human Familial Hypobetalipoproteinemia: EVIDENCE FOR FEEDBACK INHIBITION OF LIPOGENESIS AND POSTENDOPLASMIC RETICULUM DEGRADATION OF APOLIPOPROTEIN B *. *J Biol Chem.* 26 févr 2010;285(9):6453-64.
36. Seker Yilmaz B, Mungan N, Leo E, Magnolo L, Artuso L, Bernardis I, et al. Homozygous familial hypobetalipoproteinemia: A Turkish case carrying a missense mutation in apolipoprotein B. *Clin Chim Acta.* 1 nov 2015;452.
37. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *médecine/sciences.* déc 2014;30(12):1066-9.
38. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* nov 2013;8(11):2281-308.
39. Lin G, Zhang K, Li J. Application of CRISPR/Cas9 Technology to HBV. *Int J Mol Sci.* nov 2015;16(11):26077-86.
40. HuH-7 Cell Line Origins and Characteristics [Internet]. 2014 [cité 29 juill 2021]. Disponible sur: <https://huh7.com/>

41. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 2018;72(1):32-42.
42. Oleic Acid Stimulation of Apolipoprotein B Secretion. *Nutr Rev.* 1 nov 1990;48(11):419-21.
43. X-tremeGENE™ Transfection Reagents General Recommendations [Internet]. [cité 10 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/technical-documents/technical-article/genomics/advanced-gene-editing/general-recommendation-for-transfection-reagent-selection>
44. Gharaati-Far N, Tohidkia MR, Dehnad A, Omid Y. Efficiency and cytotoxicity analysis of cationic lipids-mediated gene transfection into AGS gastric cancer cells. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol.* 4 juill 2018;46(5):1001-8.
45. Gao S, Seker E, Casali M, Wang F, Bale SS, Price GM, et al. Ex Vivo Gene Delivery to Hepatocytes: Techniques, Challenges, and Underlying Mechanisms. *Ann Biomed Eng.* sept 2012;40(9):1851-61.
46. Wang T, Larcher LM, Ma L, Veedu RN. Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem.* 8 oct 2018;23(10):2564.
47. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and Highly Efficient Mammalian Cell Engineering via Cas9 Protein Transfection. *J Biotechnol.* 20 mai 2015;31.
48. Hashemi A, Roohvand F, Ghahremani MH, Aghasadeghi MR, Vahabpour R, Motevau F, et al. Optimization of transfection methods for Huh-7 and Vero cells: comparative study. *Tsitol Genet.* déc 2012;46(6):19-27.
49. Fajrial AK, He QQ, Wirusanti NI, Slansky JE, Ding X. A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Theranostics.* 2020;10(12):5532-49.
50. Qiu M, Glass Z, Xu Q. Nonviral Nanoparticles for CRISPR-Based Genome Editing: Is It Just a Simple Adaption of What Have Been Developed for Nucleic Acid Delivery? *Biomacromolecules.* 25 juill 2019;20.
51. Yu X, Liang X, Xie H, Kumar S, Ravinder N, Potter J, et al. Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol Lett.* 1 juin 2016;38(6):919-29.
52. Cao Y, Ma E, Cestellos-Blanco S, Zhang B, Qiu R, Su Y, et al. Nontoxic nanopore electroporation for effective intracellular delivery of biological macromolecules. *Proc Natl Acad Sci.* 16 avr 2019;116(16):7899-904.

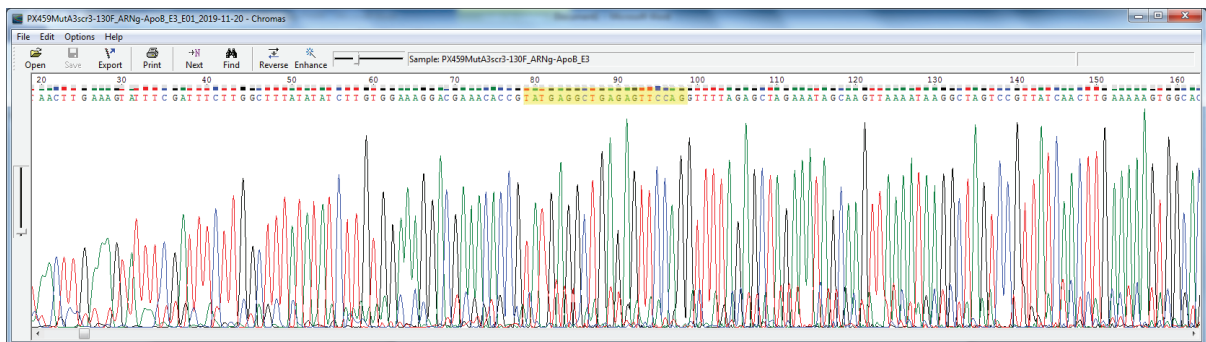
53. Ding X, Stewart M, Sharei A, Weaver JC, Langer RS, Jensen KF. High-throughput Nuclear Delivery and Rapid Expression of DNA via Mechanical and Electrical Cell-Membrane Disruption. *Nat Biomed Eng.* 2017;1:0039.
54. Søndergaard JN, Geng K, Sommerauer C, Atanasoai I, Yin X, Kutter C. Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. *Commun Biol.* 19 juin 2020;3(1):1-6.
55. Lieber MR. The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining *. *J Biol Chem.* 4 janv 2008;283(1):1-5.
56. Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* mai 2016;533(7601):125-9.
57. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* mai 2015;33(5):543-8.
58. Parhofer KG, Barrett PH, Aguilar-Salinas CA, Schonfeld G. Positive linear correlation between the length of truncated apolipoprotein B and its secretion rate: in vivo studies in human apoB-89, apoB-75, apoB-54.8, and apoB-31 heterozygotes. *J Lipid Res.* avr 1996;37(4):844-52.

Annexe 1 – Séquences des PCR (Screening). Séquence surlignée en jaune = séquence de l'ARNg insérée dans le plasmide.

Mut58P, clone A1, screening 2



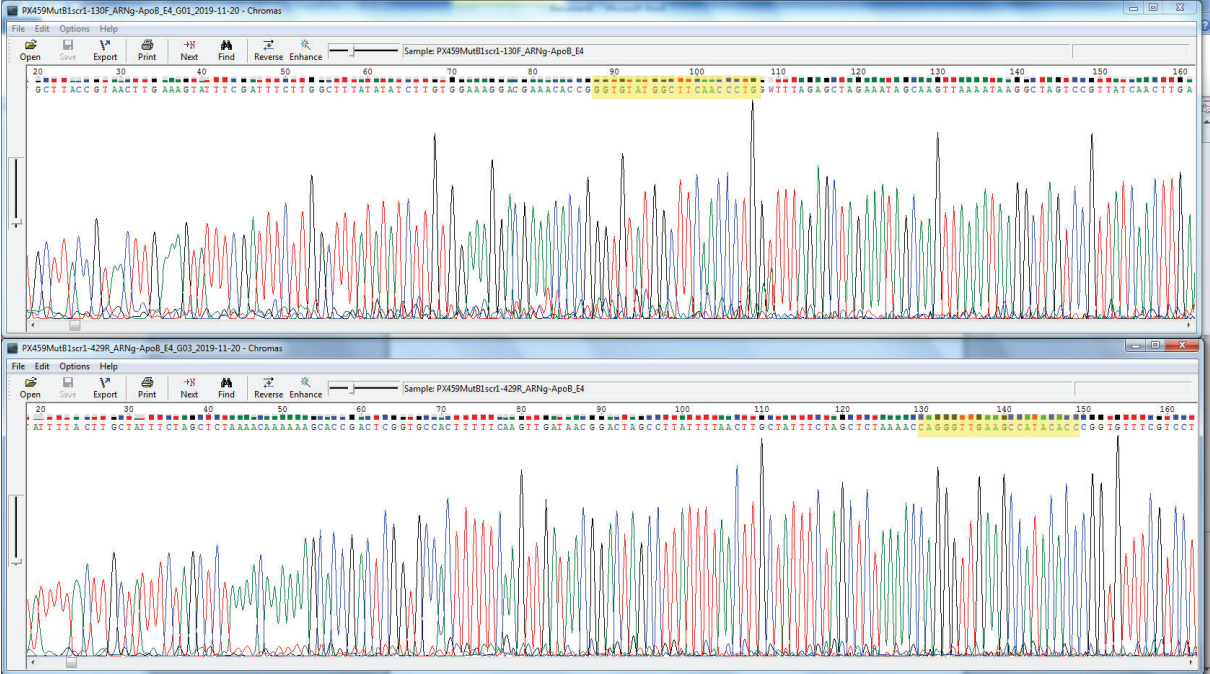
Mut58P, clone A3, screening 3



Mut58P, clone A3, screening 4



Mut97G, clone B1, screening 1



Mut97G, clone B1, screening 2



Mut351M/351R, clone C1, screening 3



Mut2182Y, clone E1, screening 3



Mut2182Y, clone E1, screening 4



Mut2182Y, clone E2, screening 1



Mut2182Y, clone E2, screening 1



L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

PETOT-ROSA Sophie

Mise au point d'un système CRISPR/Cas9 pour étudier des variants faux-sens du gène APOB et évaluer la sécrétion d'Apolipoprotéine B.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2022, 78 p.

RESUME

L'hypobétalipoprotéinémie familiale (HBLF) est une maladie autosomique codominante qui se traduit par une hypocholestérolémie et un déficit de sécrétion d'apolipoprotéine B (ApoB). L'objectif de cette étude consistait à étudier l'effet sur la sécrétion d'ApoB de plusieurs variations faux-sens non-tronquantes du gène APOB : c.172G>C, c.1051C>A, c.289T>G, c.1052T>G et c.6544G>T.

Pour cela, la méthode d'édition génomique CRISPR/Cas9 a été utilisée. La première étape de ce projet consistait à construire un plasmide contenant à la fois un ARN guide et la séquence de la Cas9. Les étapes suivantes visaient à optimiser les conditions de transfection cellulaire du plasmide et à valider l'utilisation d'un kit ELISA pour doser l'ApoB intracellulaire et sécrétée dans le milieu.

Lors de cette étude, des coupures de l'ADN par la Cas9 ont été mises en évidence. Cependant, la transfection avec un ADN donneur (servant de modèle à la recombinaison) n'a pas permis de montrer l'intégration des variations étudiées par recombinaison homologue. D'autre part, la réalisation d'un test ELISA pour mesurer le taux de production d'ApoB de clones cellulaires mutés produits lors d'une précédente étude a permis d'obtenir des résultats cohérents avec le type de variation de chaque clone, validant ainsi l'utilisation de cette méthode de dosage de l'ApoB.

MOTS CLES

CRISPR/Cas9
polipoprotéine B
Hypobétalipoprotéinémie

JURY

Mme Christine VINCIGUERRA, PHUP
Mme Mathilde DI FILIPPO, PH
M. Alexandre JANIN, AHU
Mme Oriane MARMONTEL, PH

DATE DE SOUTENANCE

Jeudi 20 janvier 2022

CONTACT

mathilde.di-filippo@chu-lyon.fr