

Projet de programmation 2024- 2025 - Master 1 Bioinformatique

Titre: Analyse de donnée génomiques SingleCell DNA-seq pour l'étude de la genotoxicité du système CRISPR-Cas9

- **Nom(s) du (des) responsables du projet :**

Aurélie Bedel Aurelie.bedel@u-bordeaux.fr

François Moreau-Gaudry francois.moreau-gaudry@u-bordeaux.fr

Julian Boutin julian.boutin@u-bordeaux.fr

- **Laboratoire:**

BRIC Team 08 – Biotherapies Génétique et Oncologie (BioGO)

- **Description:**

Le système CRISPR-Cas9 est dérivé de l'immunité bactérienne. Cette découverte a valu à Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier le prix Nobel de chimie en 2020. Grâce à son efficacité et à sa facilité d'utilisation, il a révolutionné notre capacité à modifier précisément le génome, conduisant à l'édition de gènes pour des applications cliniques. En ciblant le génome à l'aide d'un guide ARN, il permet d'effectuer une coupure double brin précise dans l'ADN à un locus donné. Cette coupure permet d'invalider ou de corriger le gène ciblé.

Malheureusement, des effets secondaires dits de génotoxicité ont rapidement été décrits. Les coupures hors cible peuvent induire des modifications de gènes non ciblés initialement, ou des changements majeurs tels que des translocations chromosomiques (génotoxicité « OFF-target »). Heureusement, ce type de génotoxicité est aujourd'hui sous contrôle grâce au développement d'outils CRISPR-Cas9 « haute-fidélité ». Plus récemment, une autre forme de génotoxicité a été décrite. Les cassures double-brin dans les gènes ciblés peuvent conduire à un large éventail de modifications génomiques, pas toujours souhaitées ou anticipées, en raison de la complexité des mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN (« génotoxicité ON-target »). La génotoxicité « ON-target » peut induire de grandes anomalies de plusieurs milliers à plusieurs millions de bases qui ne sont pas détectables par les méthodes standard basées sur la PCR. En utilisant des méthodes génomiques (FISH, scDNAseq CGH-array/SNP-array), notre laboratoire a pu identifier des changements chromosomiques majeurs dans 0,1 à 10% des cellules [1] : perte d'extrémité chromosomique, appelée CL-LOH pour loss-of heterozygosity with copy-loss (perte d'hétérozygotie avec perte de copie), ou modification de l'extrémité chromosomique identique à l'autre allèle, comme un « copier-coller ». On parle alors de CN-LOH pour copy-neutral loss-of heterozygosity (perte d'hétérozygotie sans perte de copie).

Par ailleurs nous avons observé, fortuitement, des gains de matériel génétique à la fois dans les cellules HEK en ciblant *UROS* et dans des fibroblastes en ciblant *ABRAXAS2*. Ces gains (jusqu'à 60 Mb), commencent au site de coupure, et sont en position centromériques.

- **Projet**

Le projet proposé vise à mettre en place un « pipeline » bioinformatique permettant l'analyse des données de single cell DNA-seq (scDNASeq) afin de mettre en évidence la présence de gains chromosomiques. Il s'agit d'une mesure de variation du nombre de copies (CNV). Les fichiers de scDNAseq seront disponibles à partir d'un échantillon qui est connu pour présenter un gain chromosomique de plusieurs mégabases en amont (coté du centromère) du site de coupure chromosomique. Ainsi, ce contrôle cellulaire nous permettra de valider le pipeline bioinformatique développé dans ce projet. Le développement de cet outil pour la recherche des gains chromosomiques pourrait permettre son application comme contrôle de qualité en pré-clinique pour

les protocoles qui envisagent l'approche CRISPR-Cas9 en thérapie génique. En effet, ce pipeline associé à un scDNA-seq pourrait déterminer si un site de coupure est dans une région génomique sûre ou s'il peut provoquer des gains chromosomiques potentiellement dangereux. En effet, ce gain chromosomique peut présenter un risque s'il est responsable d'un avantage de croissance cellulaire.

Bibliographie

- [1] **ON-Target Adverse Events of CRISPR-Cas9 Nuclease: More Chaotic than Expected.** Boutin J, Cappellen D, Rosier J, Amintas S, Dabernat S, Bedel A, Moreau-Gaudry F. CRISPR J. 2022 Feb;5(1):19-30.
- [2] **CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations.** Cullot G*, Boutin J*, Toutain J, Prat F, Pennamen P, Rooryck C, Teichmann M, Rousseau E, Lamrissi-Garcia I, Guyonnet-Duperat V, Bibeyran A, Lalanne M, Prouzet-Mauléon V, Turcq B, Ged C, Blouin JM, Richard E, Dabernat S, Moreau-Gaudry F*, Bedel A*. Nat Commun. 2019 Mar 8;10(1):1136.
- [3] **CRISPR-Cas9 globin editing can induce megabase-scale copy-neutral losses of heterozygosity in hematopoietic cells.** Boutin J*, Rosier J*, Cappellen D, Prat F, Toutain J, Pennamen P, Bouron J, Rooryck C, Merlio JP, Lamrissi-Garcia I, Cullot G, Amintas S, Guyonnet-Duperat V, Ged C, Blouin JM, Richard E, Dabernat S, Moreau-Gaudry F*, Bedel A*. Nat Commun. 2021 Aug 13;12(1):4922
- [4] **Cell cycle arrest and p53 prevent ON-target megabase-scale rearrangements induced by CRISPR-Cas9.** Cullot G*, Boutin J*, Fayet S*, Prat F*, Rosier J, Cappellen D, Lamrissi I, Pennamen P, Bouron J, Amintas S, Thibault C, Moranvillier I, Laharanne E, Merlio JP, Guyonnet-Duperat V, Blouin JM, Richard E, Dabernat S, Moreau-Gaudry F*, Bedel A*. Nat Commun. 2023 Jul 10;14(1):4072.