

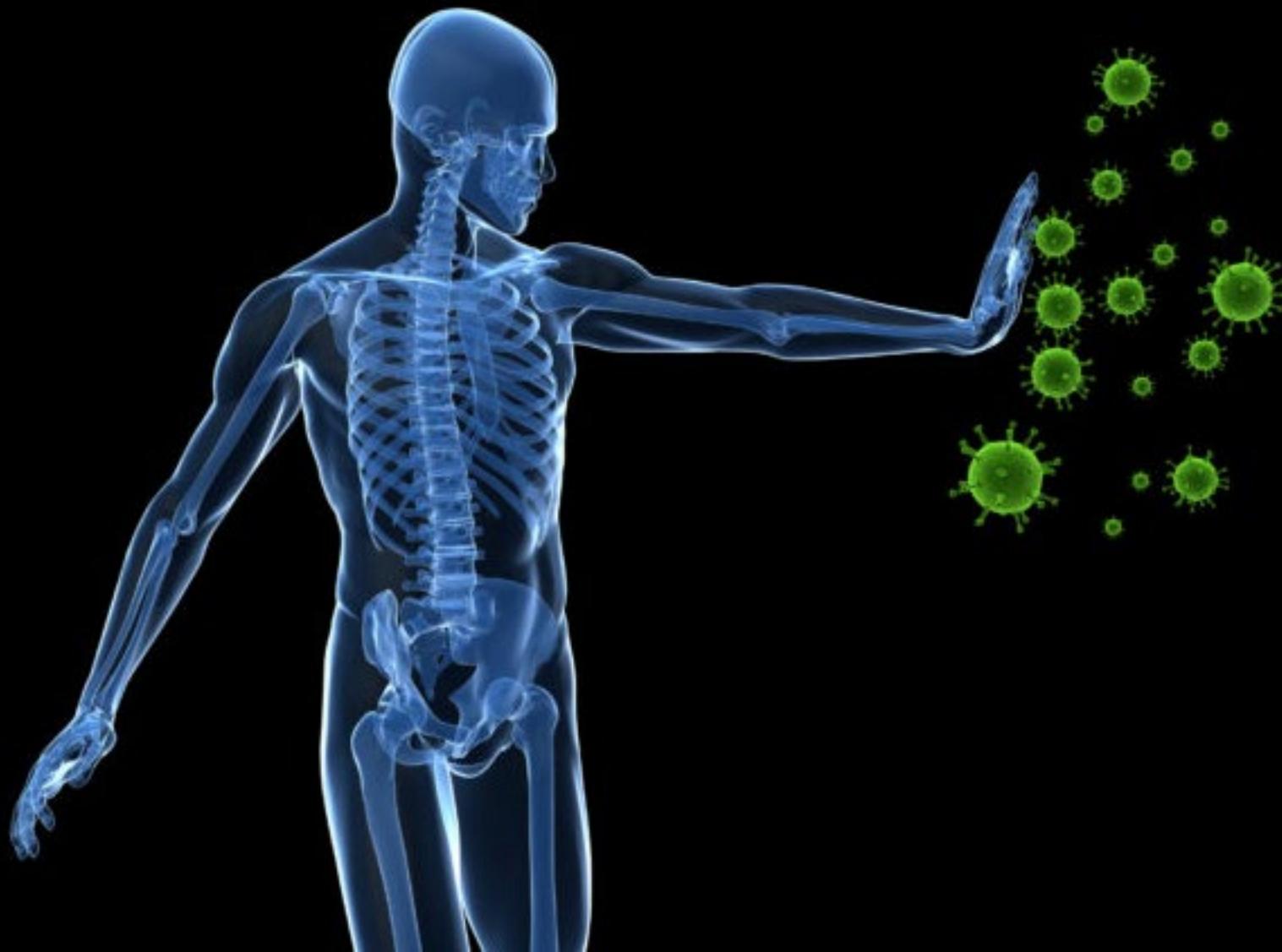
Introduction au système immunitaire

Comment les cellules et les organismes
se défendent

Prof. Freddy Radtke, ISREC, SV, EPFL (SV2534)

E-mail: Freddy.Radtke@epfl.ch

Le Système Immunitaire



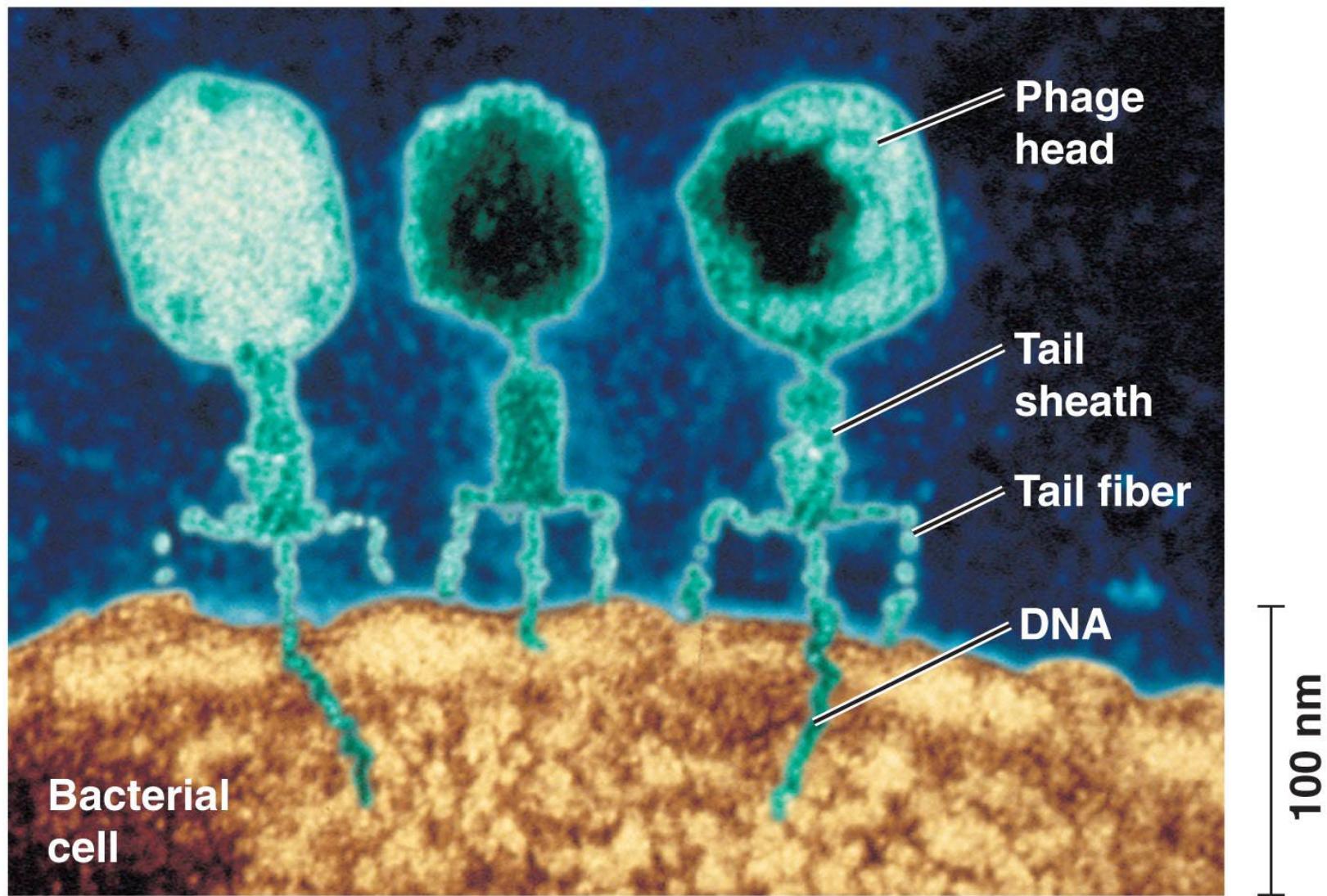
L'immunité est définie comme la résistance à une maladie, en particulier aux maladies infectieuses. L'ensemble des cellules, des tissus et des molécules qui permettent une résistance aux infections est appelé le **système immunitaire**.



Plan

- Les bactéries et leur système de défense
 - Enzymes de restriction
 - CRISPR-Cas
- Le système immunitaire des vertébrés
 - Barrières physiques
 - Système immunitaire inné
 - Système immunitaire adaptatif
 - Vaccin

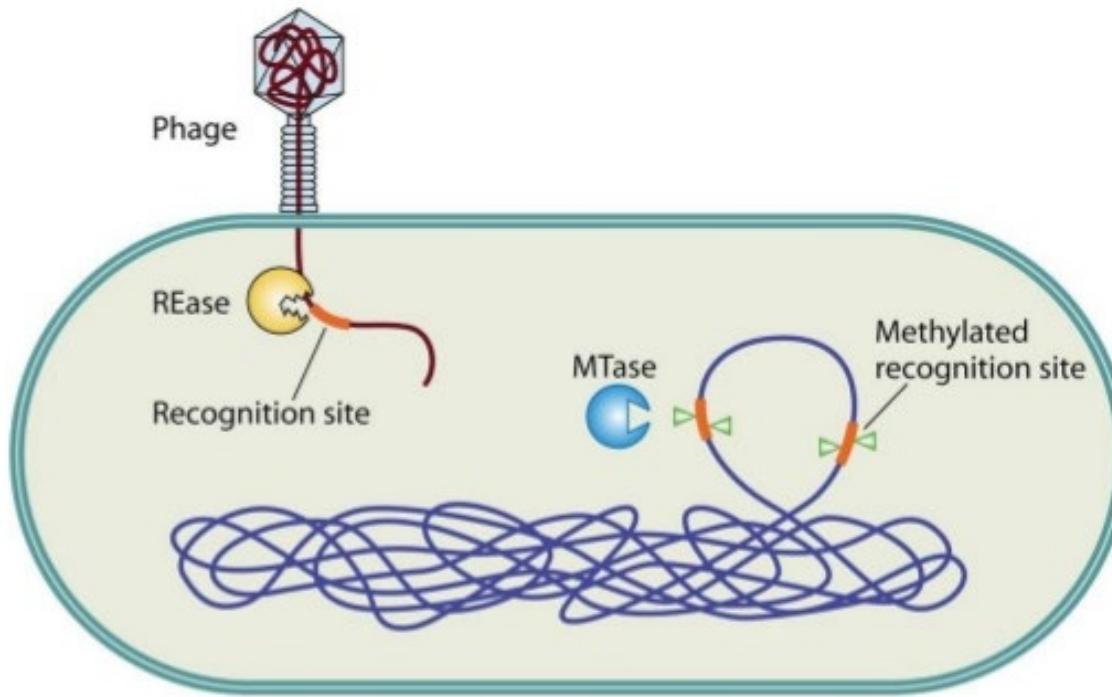
Evidence that viral DNA can program cells



RMB 10/5/10 E-6

STAS

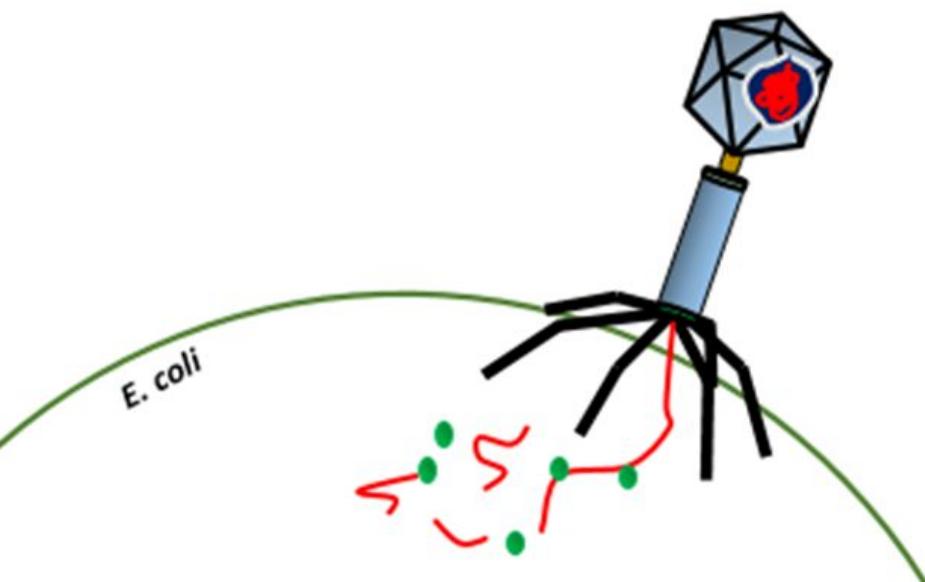
Les enzymes de restriction (endonucléases) font partie du système de défense des bactéries et les protègent d'un ADN étranger



- La plupart des bactéries utilisent des enzymes de restriction (ER) comme défense contre les bactériophages.
- Les enzymes de restriction empêchent la réPLICATION du phage en clivant son ADN à des sites spécifiques (sites de restriction).
- L'ADN de l'hôte est protégé par des méthylases qui ajoutent des groupes méthyle (CH_3) aux bases adénine ou cytosine dans le site de reconnaissance, modifiant ainsi le site et protégeant l'ADN

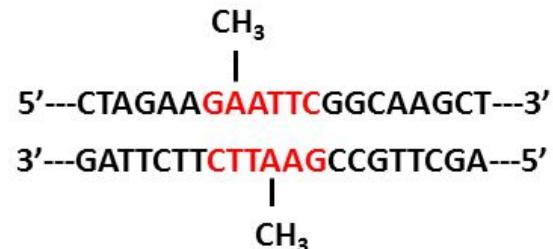
Restriction Enzymes as a Natural Defense

- Bacteria use restriction enzymes as a defense mechanism to protect against infectious pathogens such as viruses called bacteriophage



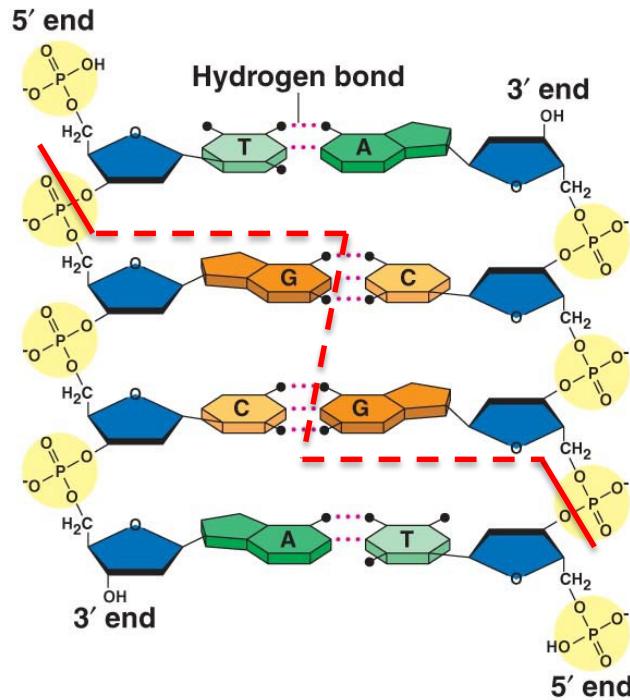
Bacterial DNA:

Bacterial DNA is methylated



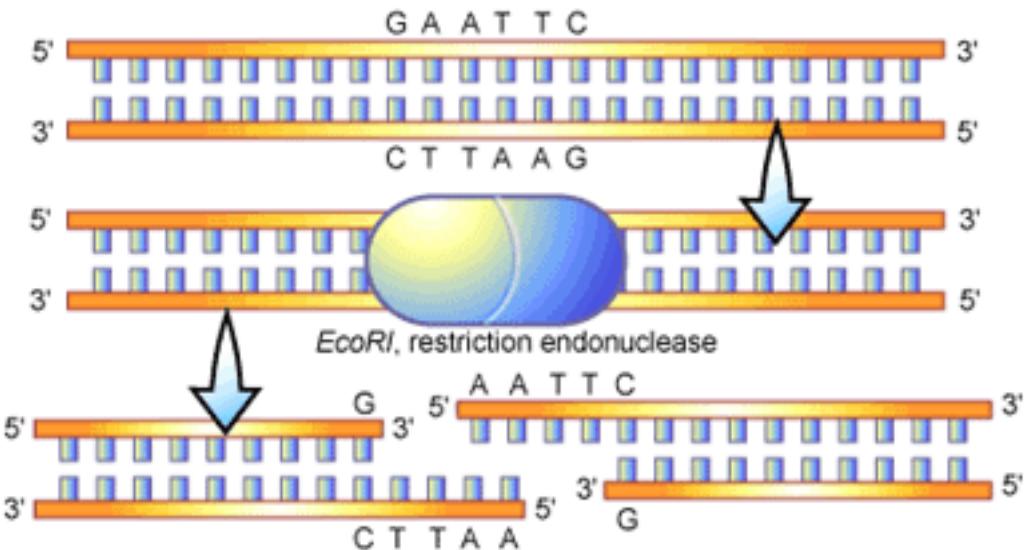
- Methyl groups will sterically hinder restriction sites, preventing their digestion by restriction enzymes

Les endonucléases de restriction sont des ciseaux moléculaires



(b) Partial chemical structure

©min Cummings.



Mécanisme d'action : L'ER scanne l'ADN et se lie à la molécule d'ADN lorsqu'il reconnaît une séquence spécifique. L'ER effectue une coupure dans chacun des squelettes de sucre/phosphate de la double hélice - en hydrolysant la liaison phosphodiester.

Les enzymes de restriction

- La première enzyme de restriction, HindII, a été isolée en 1970 par Hamilton Smith et ses collègues.
- Plus de 3000 enzymes de restriction ont été étudiées en détail.
- Plus de 600 d'entre elles sont disponibles dans le commerce.
- Utilisées couramment pour la modification et la manipulation de l'ADN dans les laboratoires (Biotechnologie)

	Cleavage site	Location of methylase	Examples
Type I	Random Around 1000bp away from recognition site	Endonuclease and methylase located on a single protein molecule	EcoK I EcoA I CfrA I
Type II	Specific Within the recognition site	Endonuclease and methylase are separate entities	EcoR I BamH I Hind III
Type III	Random 24-26 bp away from recognition site	Endonuclease and methylase located on a single protein molecule	EcoP I Hinf III EcoP15 I

Nomenclature des enzymes de restriction

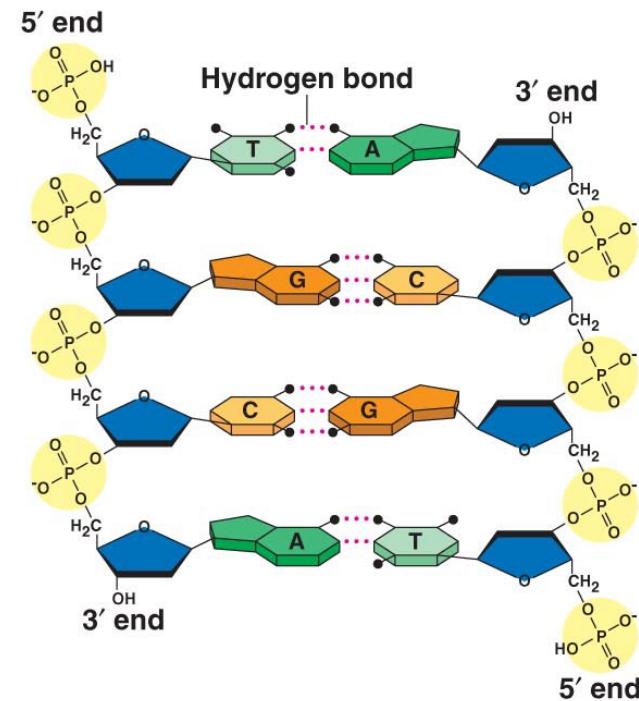
- Chaque enzyme porte le nom de la bactérie à partir de laquelle elle a été isolée selon une nomenclature spécifique : genre, espèce et souche bactérienne.

EcoRI (G/AATTC)

Derivation of the EcoRI name		
Abbreviation	Meaning	Description
E	<i>Escherichia</i>	genus
co	<i>coli</i>	species
R	RY13	strain
I	First identified	order of identification in the bacterium

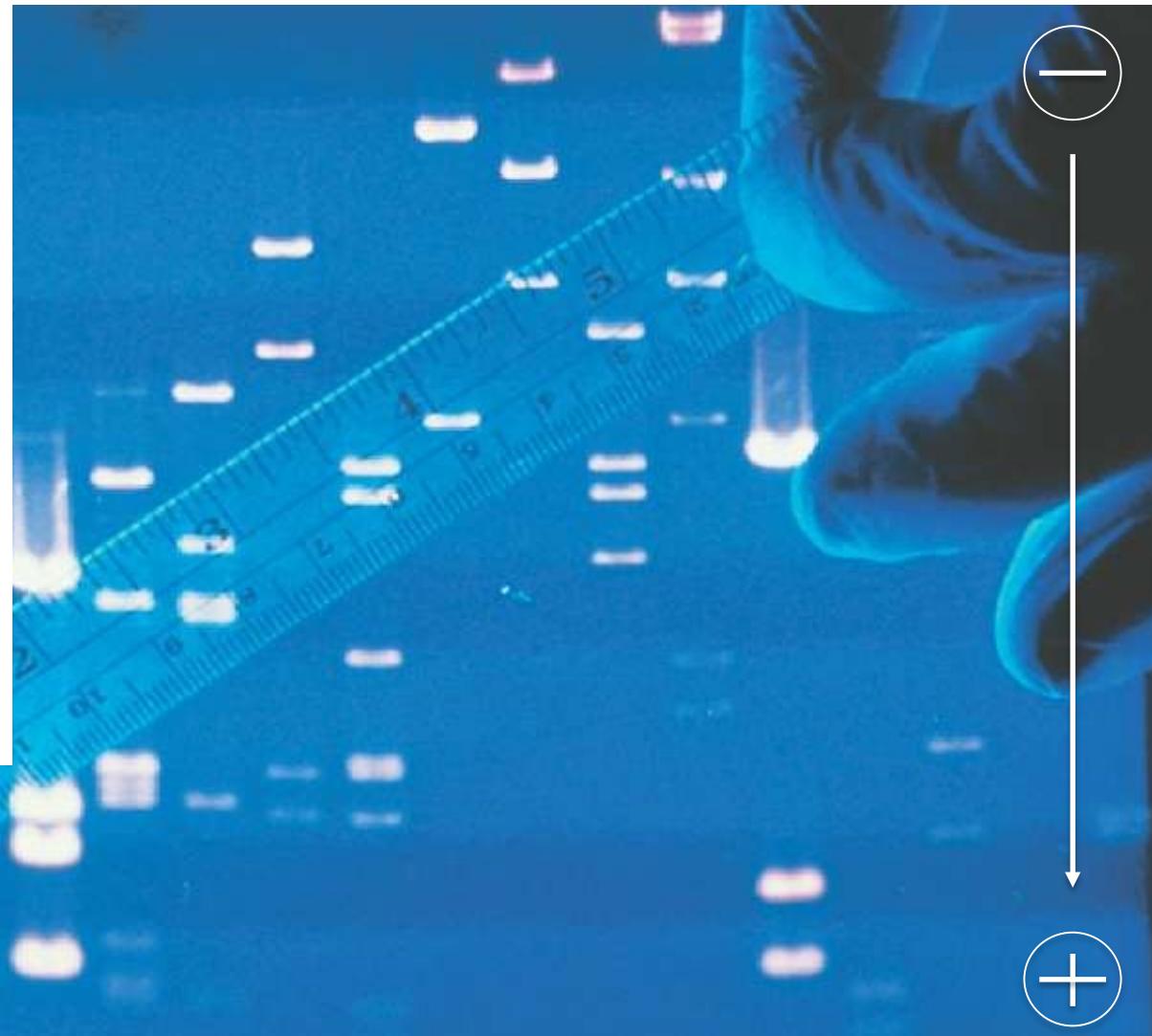
Exemple d'enzymes de restriction que l'on peut acheter en ligne

ADN dans un gel d'agarose



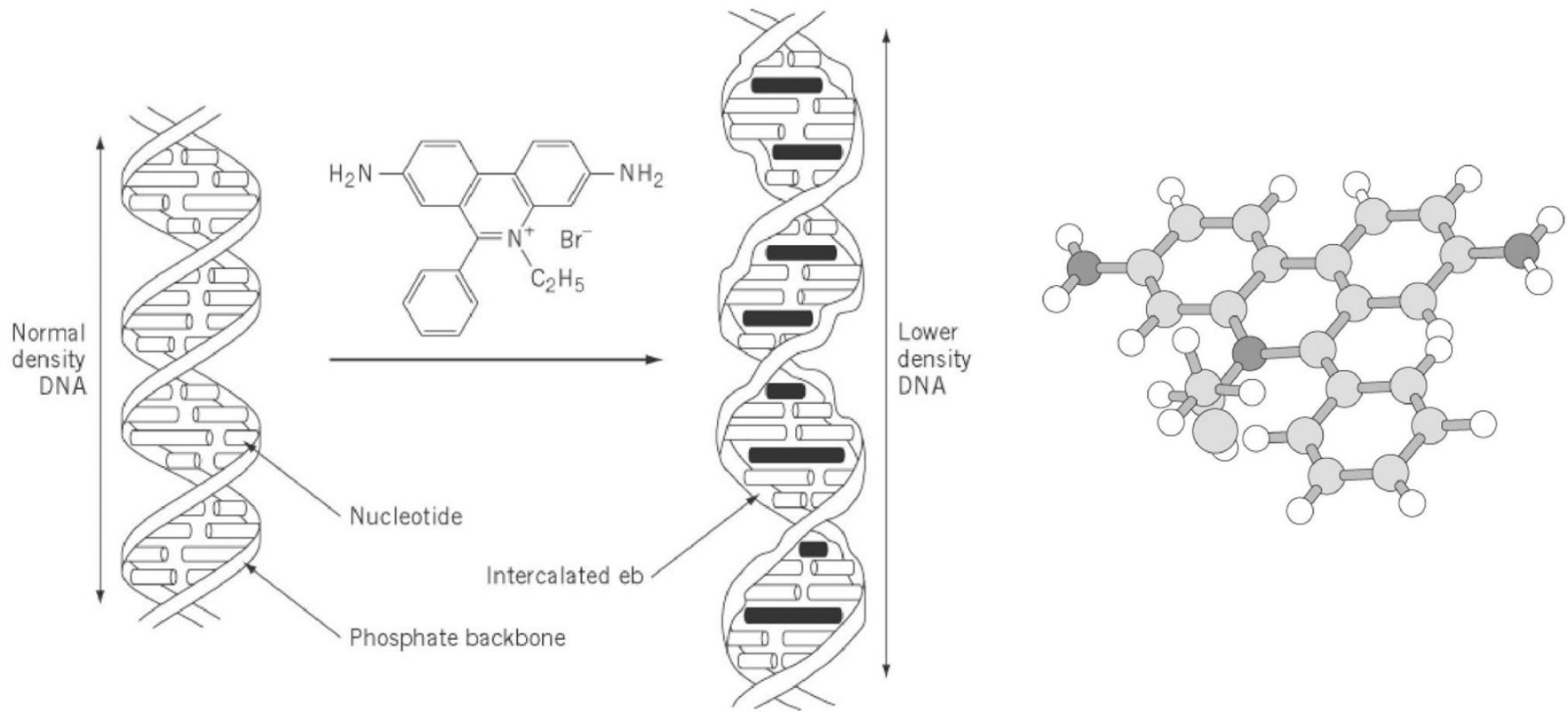
(b) Partial chemical structure

©min Cummings.



ADN double brin rendu fluorescent par intercalation de **bromure d'éthidium**.

Le bromure d'éthidium s'intercale dans l'ADN



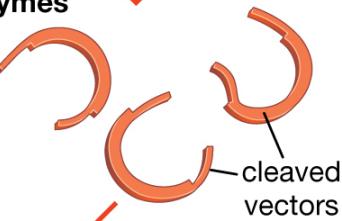
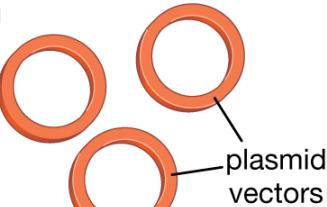
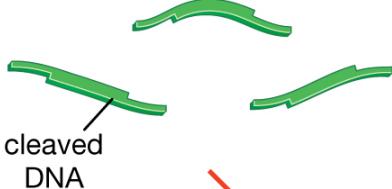
À l'origine, le bromure d'éthidium (BE) a été développé à la fin des années 1940 comme agent antitrypanosomique, antimicrobien, antibactérien et antiviral (1). Il est généralement reconnu que ces effets biologiques sont dus au fait que le médicament se lie de manière spécifique à l'ADN. Ceci a pour conséquence directe l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques. Le BE inhibe l'ADN polymérase et se lie *in vitro* à la fois à l'ARN et à l'ADN. L'étude du mécanisme de liaison de l'EB à l'ADN a permis de découvrir que le médicament (et de nombreuses autres molécules apparentées) se lie par un mécanisme appelé intercalation. Ce processus a été largement étudié au cours des trois dernières décennies, et les changements photophysiques qui accompagnent l'intercalation ont été appliqués avec succès pour quantifier et élucider la structure de l'ADN.

Genetically modified organism

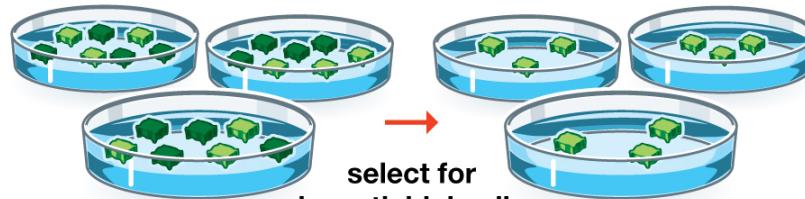
insecticide gene created
using recombinant
DNA technology



digestion with
restriction enzymes



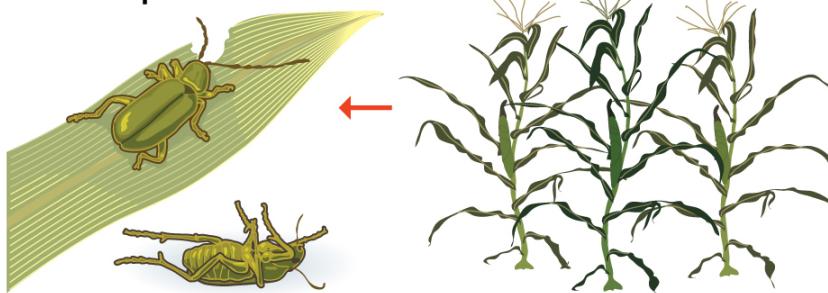
growing plant cells
take up insecticide gene
from plasmid vectors



select for
insecticidal cells

cells used
for plant
propagation

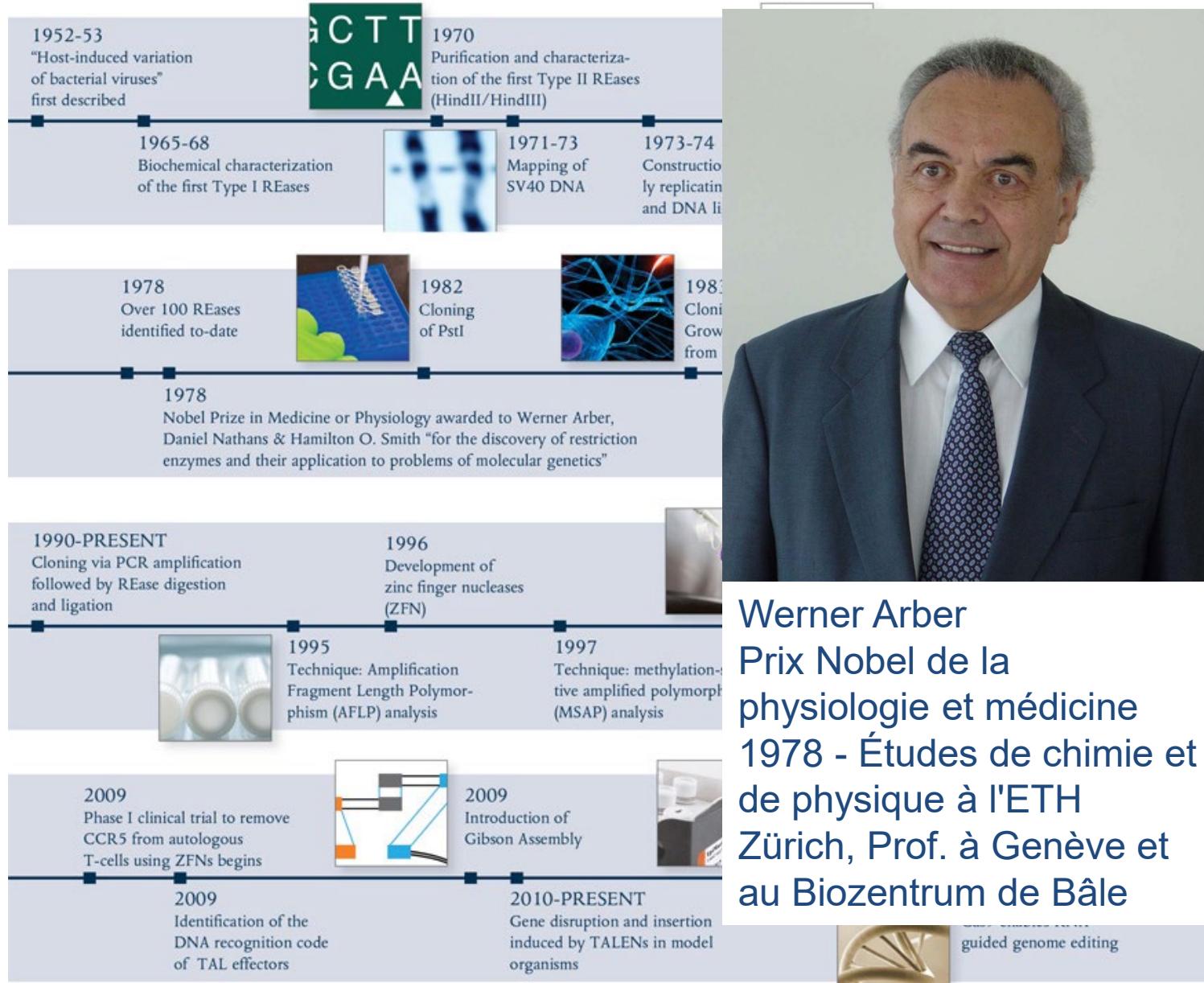
insects that feed on
the plants will die



Let's play clickers

tppoll.eu

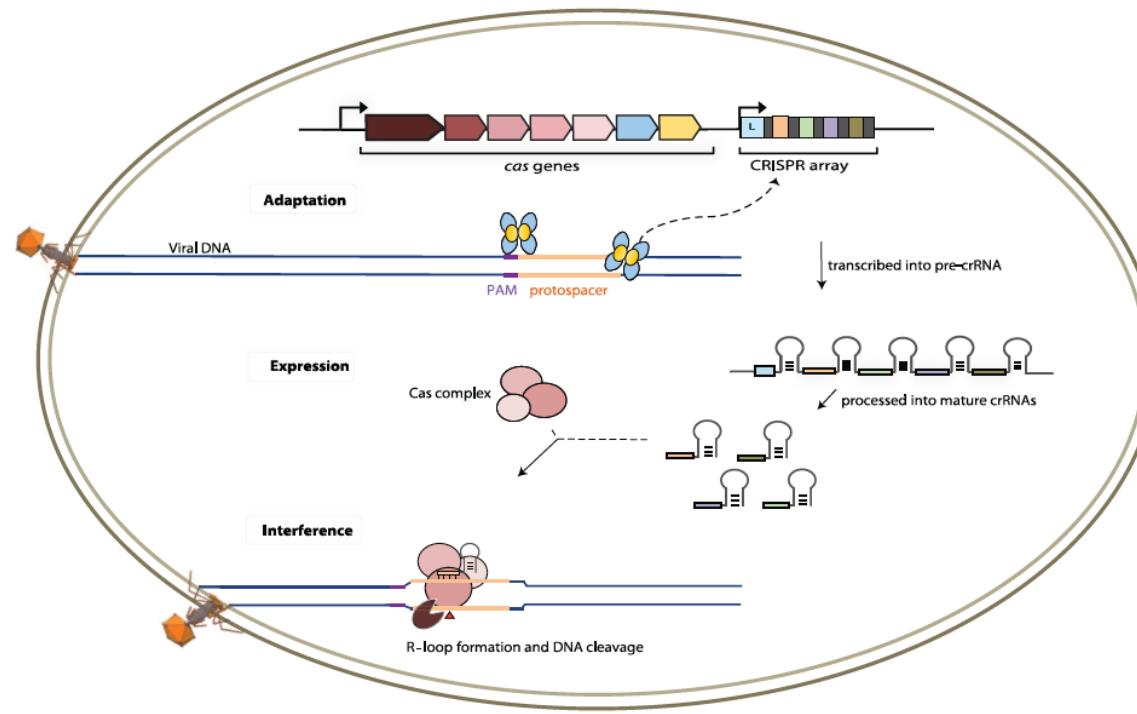
Session ID:
Freddy



CRISPR/Cas: Le système immunitaire des Bactéries et des Archaea

CRISPR: répétitions palindromiques courtes et régulièrement espacées

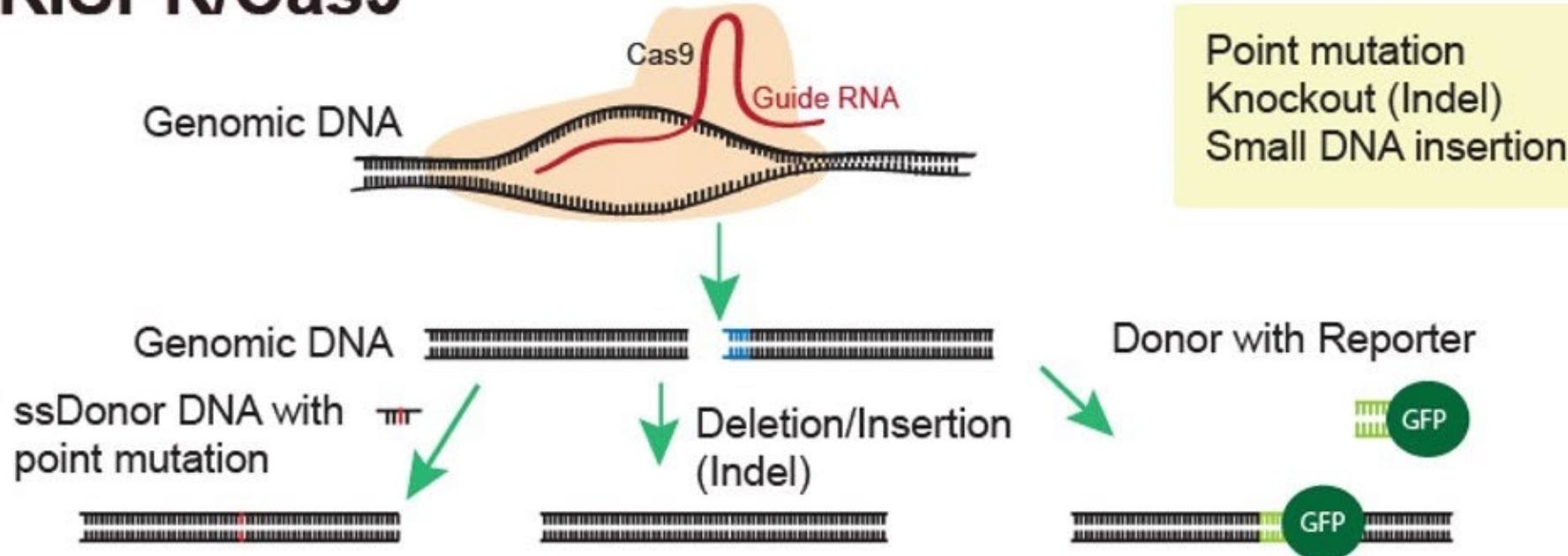
CAS: gènes associés à CRISPR



L'immunité adaptative du système CRISPR-Cas est assurée par les ARN CRISPR (crRNAs) et les protéines Cas, qui forment des complexes ribonucléoprotéiques CRISPR (crRNP). La première étape est l'adaptation, qui se produit lors de l'entrée d'un ADN étranger (dans ce cas, un génome viral). Les protéines Cas1 (bleu) et Cas2 (jaune) sélectionnent et traitent l'ADN envahisseur. Elles intègrent un morceau de l'ADN étranger, appelé protospacer (orange) à l'extrémité leader du brin d'ADN matrice CRISPR. Ces spacers, provenant de l'envahisseur, sont de taille similaire (couleurs multiples) et sont séparés par de courtes séquences répétitives (gris). Au cours de la deuxième étape, l'expression, le locus CRISPR est transcrit en pré-crRNA. Ensuite, le pré-crRNA est transformé en guides crRNA matures par des protéines Cas (par exemple, Cas6) ou non-Cas (par exemple, RNase III). Au cours de la dernière étape, l'interférence, le complexe Cas-crRNA balaye l'ADN envahisseur à la recherche d'acides nucléiques complémentaires. Une fois détecté, l'ADN cible est coupé par une protéine Cas Nuclease.



CRISPR/Cas9



HDR

NHEJ

HDR

First discovery of interspaced short repetitive sequences

1987

The term "CRISPR" for the first time

2002

CRISPR mediates adaptive immunity

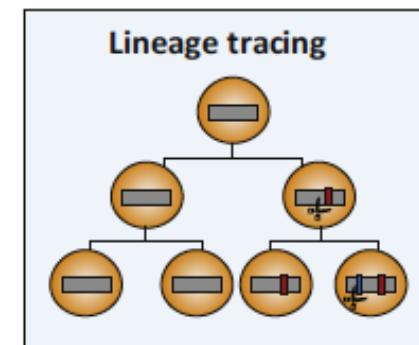
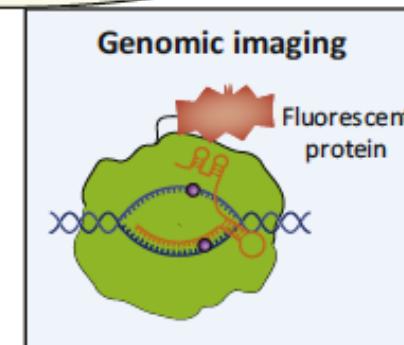
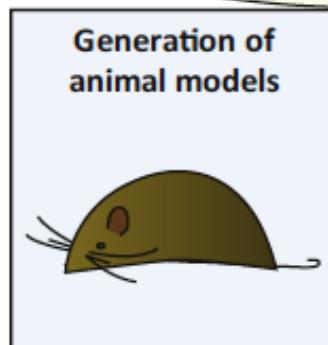
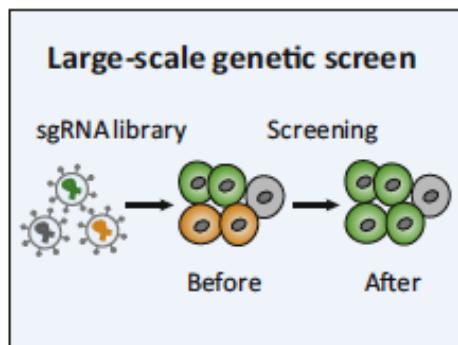
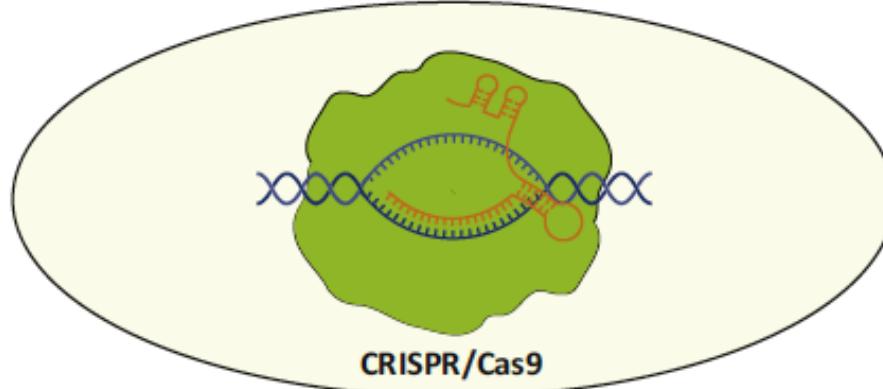
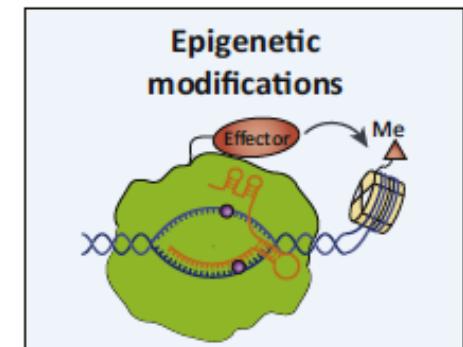
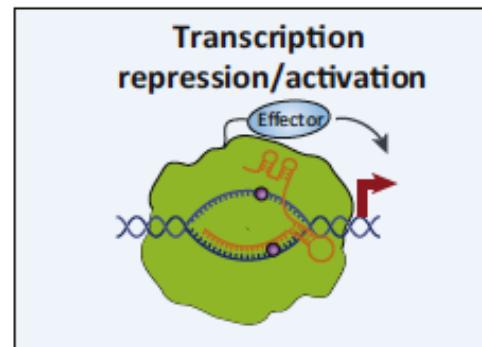
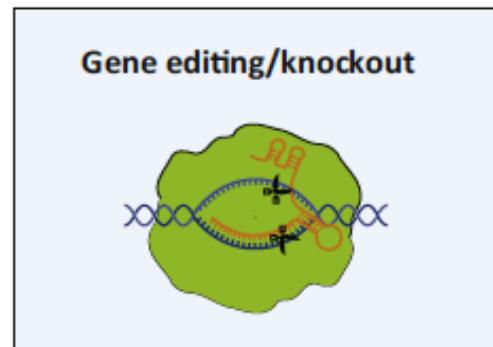
2007

First application of the CRISPR-mediated genome editing in mammalian cells

First human CRISPR/Cas9 trial

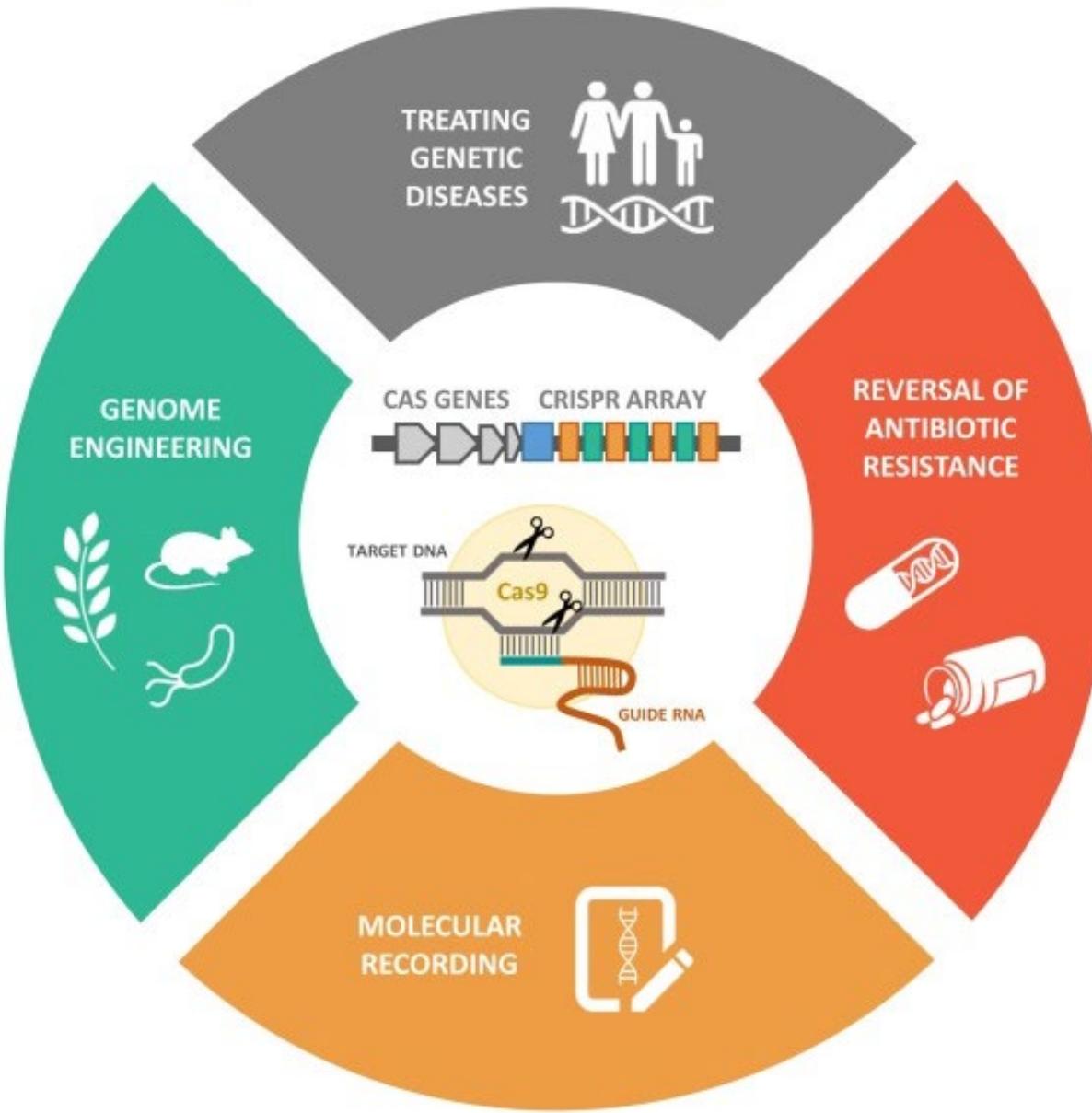
2016

Applications du CRISPR/Cas9 dans la recherche en biologie cellulaire

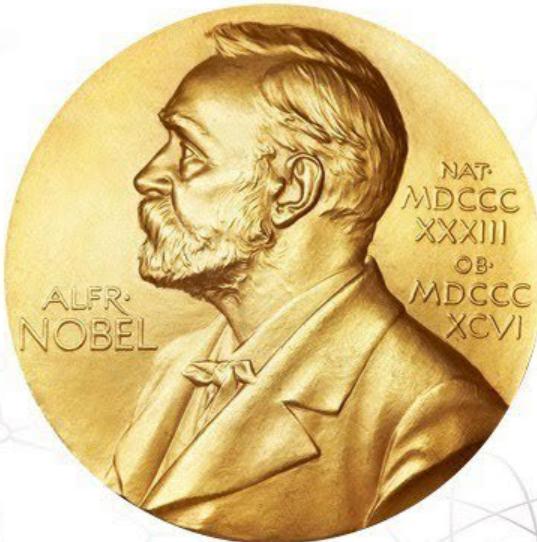


CRISPR-Cas system

Key elements and applications



2020 Nobel Prize in Chemistry



Jennifer A.
Doudna
(UC Berkley)

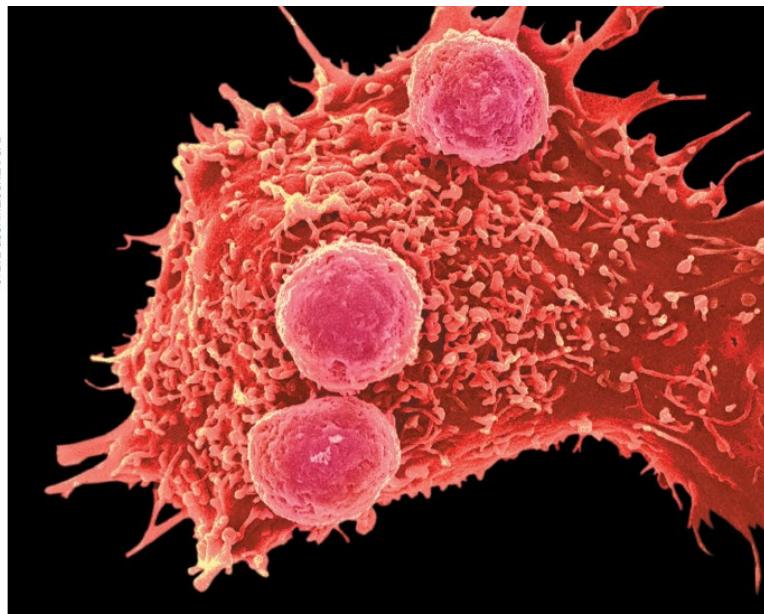
Emmanuelle
Charpentier
(Max Planck Berlin)

First trial of CRISPR in people

Chinese team approved to test gene-edited cells in people with lung cancer.

476 | NATURE | VOL 535 | 28 JULY 2016

STEVE GSCHMEISSNER/SPL



Gene editing could improve the ability of immune cells (spherical) to attack cancer.

BIOTECHNOLOGY

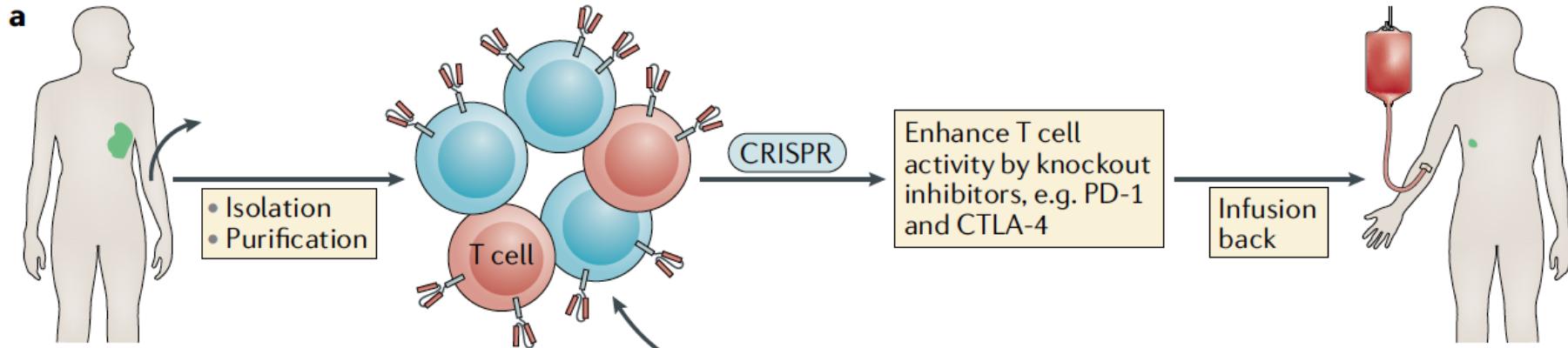
CRISPR gene editing tested in a person

Trial could spark biomedical duel between China and US.

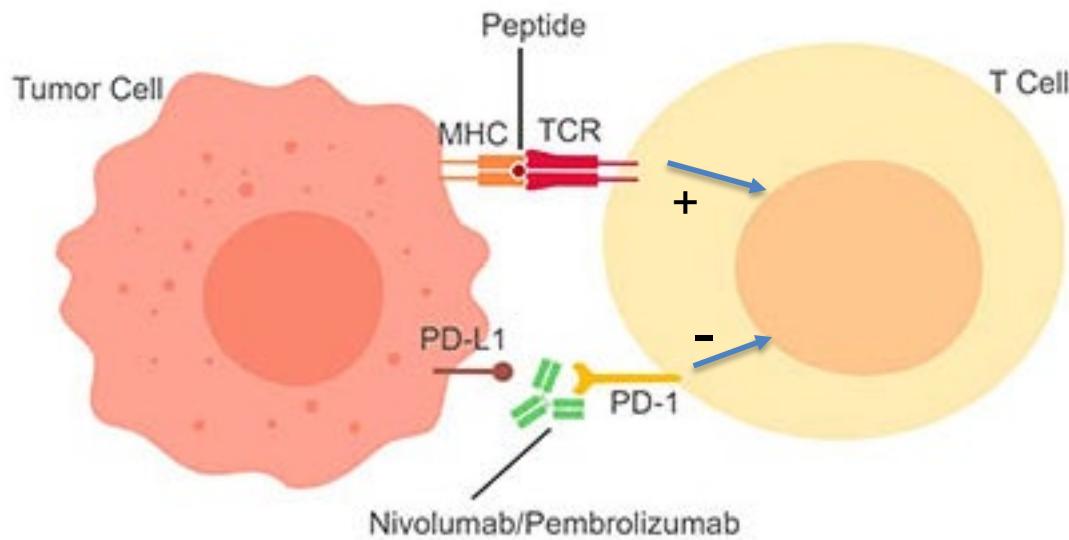
The researchers removed immune cells from the recipient's blood and then disabled a gene in them using CRISPR–Cas9, which combines a DNA-cutting enzyme with a molecular guide that can be programmed to tell the enzyme precisely where to cut. The disabled gene codes for the protein PD-1, which normally puts the brakes on a cell's immune response: cancers take advantage of that function to proliferate.

Lu's team then cultured the edited cells, increasing their number, and injected them back into the patient, who has metastatic non-small-cell lung cancer. The hope is that, without PD-1, the edited cells will attack and defeat the cancer.

24 NOVEMBER 2016 | VOL 539 | NATURE | 479



Patient with Cancer



He Jiankui a déclaré en novembre 2018 qu'il avait aidé à produire les premiers bébés génétiquement modifiés au monde



Following last year's bombshell revelation, investigations mount and debates swirl about the future for gene-edited humans.

The Xinhua article confirms many details of the case for the first time: starting in June 2016, it says, He put together a team that, from March 2017, recruited eight couples consisting of an HIV-positive father and an HIV-negative mother. He's team edited the genes of embryos from at least two couples. (The Xinhua article does not specify what type of gene editing was done, although He claims that the embryos were edited to remove a gene that enables HIV to enter cells.) In addition to the woman who already gave birth, one other woman involved in the experiment is currently pregnant with a gene-edited embryo. Five other couples are not pregnant, the article reports, and one couple dropped out of the experiment.

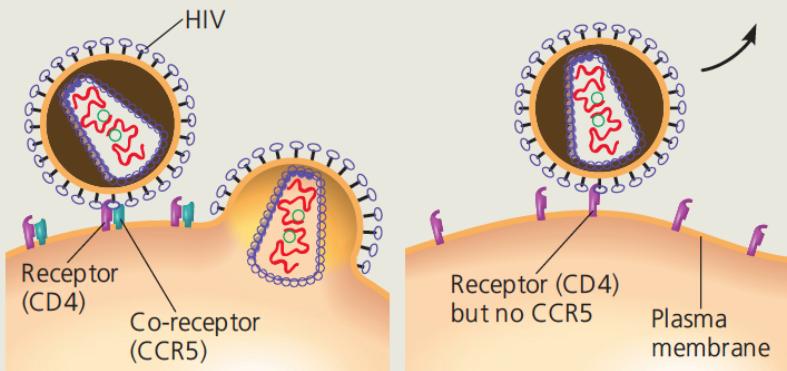
In the three months since He Jiankui announced the birth of twin girls with edited genomes, the questions facing the scientific community have grown knottier.

By engineering mutations into human embryos, which were then used to produce babies, He leapt capriciously into an era in which science could rewrite the gene pool of future generations by altering the human germ line. He also flouted established norms for safety and human protections along the way.

There is still no definitive evidence that the biophysicist actually succeeded in modifying the girls' genes — or those of a third child expected to be born later this year. But the experiments have attracted so much attention that the incident could alter research for years to come.

Blocking HIV Entry into Cells as a Treatment for HIV Infections

Despite multiple exposures to HIV, a small number of people do not develop AIDS and show no evidence of HIV-infected cells. Comparing their genes with the genes of infected individuals, researchers discovered that resistant individuals have an unusual form of a gene that codes for an immune cell-surface protein called CCR5. Further work showed that HIV binds to a main protein receptor (CD4) on an immune cell, but most types of HIV also need to bind to CCR5 as a “co-receptor” to actually infect the cell (below, left). An absence of CCR5 on the cells of resistant individuals, due to the gene alteration, prevents the virus from entering the cells (below, right).



HIV can infect a cell that has CCR5 on its surface, as in most people.

HIV cannot infect a cell lacking CCR5 on its surface, as in resistant individuals.

WHY IT MATTERS Researchers have been searching for drugs to block cell-surface receptors involved in HIV infection. The main receptor protein, CD4, performs many important functions for cells, so interfering with it could cause dangerous side effects. Discovery of the CCR5 co-receptor provided a safer target for development of drugs that mask CCR5 and block HIV entry. One such drug, maraviroc (brand name Selzentry), was approved for treatment of HIV infection in 2007.



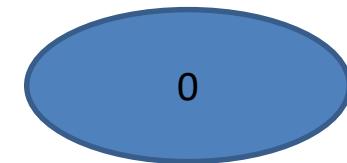
Pour quelles maladies connues CRISPR a-t-il été utilisé dans les essais cliniques?

- A. Fibrose kystique
- B. Syndrome de Down
- C. Maladie de Huntington
- D. Immunothérapie cancer du poumon

0

Quels risques possibles existe-t-il pour les modifications génétiques des bébés sur mesure?

- A. De nouvelles formes de maladies peuvent apparaître
- B. Peut supprimer certains gènes hors cible qui sont importants pour le développement et la croissance globale du bébé
- C. Les deux possibilités
- D. Aucune des deux options



Plan

- Les bactéries et leur système de défense
 - Enzymes de restriction
 - CRISPR-Cas

Objectifs du cours

- Quelle est la fonction physiologique des enzymes de restriction et du système CRISPR-Cas?
- Comment fonctionnent-ils? Et comment l'ADN bactérien est-il protégé contre la digestion par ses propres enzymes de restriction?
- Comment les ER et le système CRISPR-Cas sont-ils utilisés par les chercheurs en biologie moléculaire et les ingénieurs? Vous devriez connaître quelques exemples concrets.
- Pourquoi le système CRISPR-Cas est-il si intéressant pour la modification des gènes ? Et quel type de modification des gènes peut être effectué?