

# Génétique

Electrophorèse d'ADN

Réf :117 260

**Kit étudier le diabète avec CRISPR Cas 9  
(électrophorèse d'ADN)**

Français – p 1

Version : 4208

## Sommaire

1 Présentation générale	2
2 Réactifs et matériels	3
3 Mode opératoire	4
4 Résultats et interprétation	5
5 Assistance technique	6

## Annexes

<b>Dossier scientifique et pédagogique</b>	<b>7</b>
« Etudier les diabètes grâce à des modèles murins produits par CRISPR-cas9 »	

## 1 Présentation générale

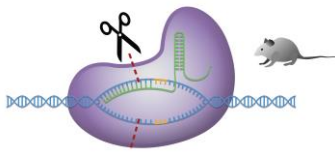
Dans le monde plus de 460 millions de personnes sont diabétiques. Le diabète de type 2 (DT2) représente 90% des cas de diabètes et accroît le risque de décès. La création de modèles animaux murins est nécessaire pour l'étude de ce DT2.

Cette activité expérimentale basée sur une électrophorèse d'ADN présente un double intérêt, elle va permettre d'aborder à la fois les aspects génétiques du diabète de type 2 et d'explorer les applications de l'édition génomique obtenue grâce au système CRISPR-Cas 9.

### 1.1 Le principe l'édition génomique et le système CRISPR-Cas 9

Pour la mise au point de la technique de biotechnologie CRISPR-Cas 9 Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna ont reçu le prix Nobel de chimie en 2020.

Dans la situation développée pour cette activité, l'édition génomique a permis de créer des modèles animaux (souris, lapins, moutons etc.), en modifiant le patrimoine génétique d'embryons, grâce au système CRISPR-Cas9, avant de les transférer chez des femelles. Auparavant ces opérations de mutations ciblées nécessitaient beaucoup de temps et d'argent. Les chercheurs peuvent désormais générer rapidement des modèles animaux variés et adaptés à l'étude du développement, de pathologies ou pour des essais thérapeutiques.



### 1.2 Situation pédagogique

L'activité propose d'étudier des mutations associant diabète et obésité précoce. Plusieurs *loci* associés à l'obésité et au diabète de type 2 ont été identifiés. Parmi eux on trouve le gène *LEP*, codant la leptine et le gène *LEPR*, codant le récepteur de cette hormone. Des mutations dans *LEP* ou *LEPR* entraînent une obésité précoce et une hyperglycémie accompagnée d'une résistance à l'insuline chez la souris. et également constatées chez l'humain. Des modèles murins porteurs de mutation *LEP* sont spécifiquement développés en utilisant la technique de l'édition génomique CRISPR-Cas9, ces animaux sont ensuite utilisés pour suivre *in vivo* les effets des traitements par exemples.

Le système CRISPR-Cas9 n'étant pas fiable à 100%, il est nécessaire déterminer leur génotype par PCR et électrophorèse d'ADN pour confirmer que leur phénotype résultent bien de la modification de leur génome par CRISPR-Cas9. C'est ce que réaliseront les élèves.

→ Dossier scientifique et pédagogique complet en annexe (p7)

### 1.3 Principe du TP

L'activité consiste à réaliser une électrophorèse de fragments d'ADN préalablement amplifiés par PCR. L'ADN amplifié provient de souris WT (« sauvage » WT pour *Wild Type*) et d'autres individus modifiés par CRISPR-Cas9, minces ou obèses.

L'utilisation de CRISPR-Cas9 ciblant le gène *LEP* chez des embryons de souris donne naissance à deux types de souris : des souris minces, équivalentes aux souris témoins WT non modifiées et des souris obèses.

#### ❖ Le principe de l'électrophorèse d'ADN en gel

En milieu légèrement basique, l'ADN se comporte comme une chaîne polyanionique (groupements phosphates ionisés). Placés dans un gel d'agarose et soumis à un champ électrique, des fragments d'ADN de tailles différentes migrent plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire. La charge relative des fragments étant la même, c'est essentiellement l'effet de tamisage exercé par le gel qui influe sur la migration. La vitesse de déplacement diminue donc avec la taille des fragments, celle-ci étant exprimée en nombre de paires de bases (pb) ou en kb (1 kb = 1000 pb).

## 2 Réactifs et matériels

### 2.1 Les solutions d'ADN

Les solutions ADN de ce kit, correspondent aux résultats (fictifs) de l'amplification par PCR de l'ADN à tester. **Les solutions d'ADN sont calibrées et ne nécessitent aucune préparation.**

**Format 40 élèves (20 binômes) :**

**20 tests complets soit 80 dépôts à analyser**

1 test correspond à identifier le gène LEP pour 4 souris, une souris témoins et 3 issues de la technique d'édition du génome **CRISPR-Cas9** :

- 1 dépôt souris WT (Témoin)
- 1 dépôt embryon souris test A
- 1 dépôt embryon souris test B
- 1 dépôt embryon souris test C

**+ 10 dépôts Echelle de poids moléculaire (jusqu'à 10 gels)**

1 dépôt échelle de poids moléculaire par gel électrophorèse

Durée globale de la séance 30 à 40 minutes

Dont migration électrophorèse : 20 minutes

### 2.2 Matériels et produits nécessaires

#### Composition du kit :

- Tube 1 souris WT 175 µL
- Tube 2 souris A 175 µL
- Tube 3 souris B 175 µL
- Tube 4 souris C 175 µL
- Marqueur de taille 90 µL

#### Consommables nécessaires (non fournis)

Agarose

Tampon TAE

Colorant GelGreen

Réf. 107 646 : cette référence regroupe tous les consommables indispensables pour réaliser 10 mini gels d'agarose pour système compact avec fluorescence (Agarose 4 g / TAE 10 x 200 mL / colorant GelGreen 30 µl)

#### Matériels complémentaires :

- Cuve à électrophorèse ADN
- Micropipettes 2-20 µl

### 3 Mode opératoire

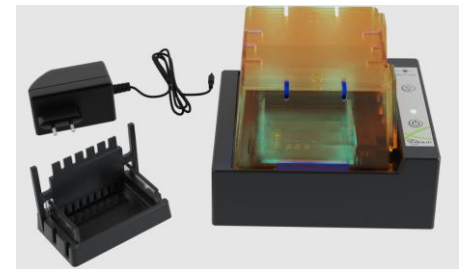
#### 3.1 Préparation des solutions

##### ❖ Préparation du tampon TAE 1X pour 1L :

- Le volume de tampon nécessaire par cuve est d'environ 150 mL (tampon migration).

Verser le contenu du flacon de tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) dans 900 ml d'eau distillée, bien mélanger.

*\* En fonction du nombre de gel et du nombre de système électrophorèse utilisés au cours du TP, le volume de TAE 1 X à préparer doit être adapté.*



Dispositif électrophorèse  
Tout-en-un

##### ❖ Préparation et coulage d'un gel d'agarose à 2% :

- Verser 15 mL de tampon TAE 1X dans un erlenmeyer de 50 mL.
- Peser 0,30 g d'agarose de type II dans une capsule et le verser en pluie fine dans le tampon TAE.
- Mettre l'erlenmeyer contenant le TAE et l'agarose au micro-onde pendant 20 à 30 secondes – stopper à l'apparition de l'ébullition - (ou sur un agitateur magnétique chauffant avec un turbulent jusqu'à dissolution complète).
- S'assurer que la solution est parfaitement translucide
- Ajouter 2 µl de colorant GelGreen à l'aide de la micropipette, bien agiter l'erlenmeyer
- Laisser l'erlenmeyer refroidir quelques instants sur la paillasse 2 à 3 min, puis verser dans le moule équipé du peigne à petites dents.

##### ❖ Préparation de l'ADN

- Les solutions sont directement prêtes à l'emploi, il convient à l'enseignant de faire des aliquots de chaque échantillon avant la séance.
- Avant la séance, décongeler les tubes Eppendorf.

Idéalement décongeler les contenants environ 5 minutes sous l'eau chaude, puis les plonger dans l'eau glacée pendant deux minutes. Cela permet, par chocs thermiques, de séparer les fragments qui auraient pu s'associer à nouveau et d'autre part d'éviter la nouvelle formation de bouts collés.

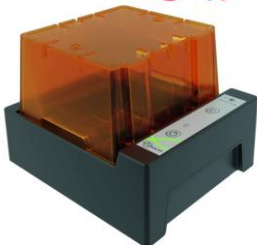
Le produit supporte aisément une succession de plusieurs alternances de congélation-décongélation sans perdre ses propriétés. Mais il faut réduire au minimum la durée de décongélation pendant laquelle une dégradation occasionnelle par des micro-organismes est possible.

#### 3.2 Dépôt de l'ADN

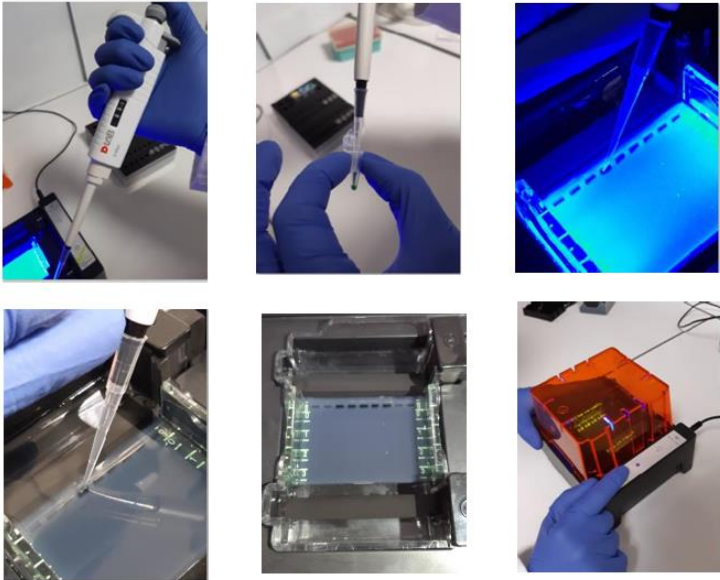
A l'aide d'une micropipette, déposer :

- 8 µL d'ADN
- 8 µl pour l'échelle de poids moléculaire

phorEasy



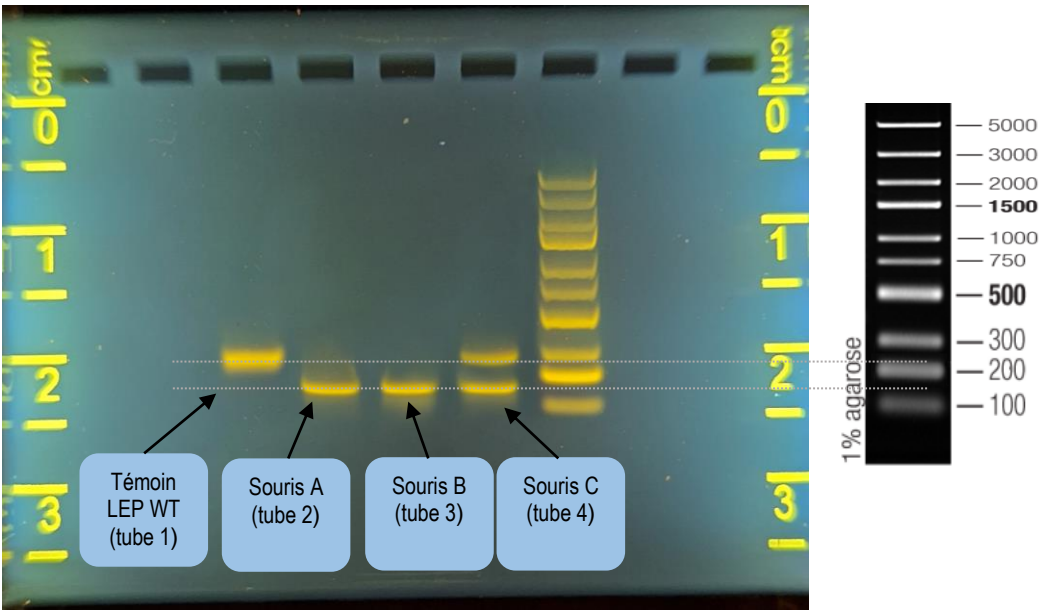
8 µl par puits



Durée de migration 15 à 20 minutes pour les systèmes compacts  
Révélation → Transilluminateur intégré = révélation en temps réel

4 Résultats et exploitations

Résultats attendus : Le fragment LEP WT amplifié aura une taille de 219pb  
et le fragment *LEP KO*, une taille de 140pb.



Souris	Fragments amplifiés		génotype	Phénotype
témoin	219 kb	Homozygote	LEP WT / WT	Mince
Test 1	140 kb	Homozygote	LEP KO / KO	Obèse
Test 2	140 kb	Homozygote	LEP KO / KO	Obèse
Test 3	219/ 140 kb	Hétérozygote	LEP WT / KO	Mince



## **5 Assistance Technique**

Pour tous réglages, et renseignements contacter le **Support Technique** au  
**09 69 32 02 10 (prix d'un appel local, non surtaxé).**

**JEULIN – S.A.V.**  
468 rue Jacques Monod  
CS 21900  
27019 EVREUX CEDEX France

## ANNEXES

### Dossier scientifique et pédagogique

#### ETUDIER LES DIABETES GRACE A DES MODELES MURINS PRODUITS PAR CRISPR-CAS9

##### INTRODUCTION

L'obésité, définie par l'OMS comme étant « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé » est caractérisée par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30. Sa prévalence, estimée en France à 16% en 2013, a doublé dans le monde au cours des 30 dernières années<sup>3</sup>. L'obésité est un facteur de risque majeur de nombreuses pathologies, notamment le diabète de type 2 (ou DT2). Plus de 460 millions de personnes dans le monde sont diabétiques. Le DT2 représente 90% des diabètes et constitue l'un des principaux facteurs de risque de décès par maladie. Ses impacts, tant en termes de santé que de dépenses publiques, justifient la création de modèles animaux, outils indispensables pour aborder les pathologies liées à l'obésité et au diabète mais aussi pour développer de nouveaux traitements ou des approches préventives<sup>1</sup>.

##### UTILISER CRISPR-CAS9 POUR PRODUIRE DES MODELES ANIMAUX

Plusieurs loci associés à l'obésité et au diabète de type 2 ont été identifiés. Parmi eux on trouve le gène *LEP*, codant la leptine et le gène *LEPR*, codant le récepteur de cette hormone. Des mutations dans *LEP* et *LEPR* ont été rapportées chez l'homme et elles sont associées à une obésité précoce et à une hyperglycémie accompagnée d'une résistance à l'insuline.

##### La leptine et ses récepteurs

La leptine (codée par le gène *LEP*) est une hormone régissant la satiété, décrite pour la première fois en 1994. Elle est notamment sécrétée par les adipocytes. À partir de la fin des années 1990, des mutations homozygotes, ont été identifiées chez des patients sévèrement obèses. Ces mutations sont à l'origine d'une perte de fonction de la leptine ou une réduction de sa production, ou encore une altération de la signalisation induite par son récepteur, le *LEPR*. Le tableau clinique de ces patients, déficients pour les gènes *LEP* ou *LEPR* associe une hyperphagie, une réduction du tonus nerveux sympathique, un hypogonadisme, une légère hypothyroïdie et une immunité lymphocytaire altérée<sup>3</sup>.

La leptine est un peptide de 167 acides aminés principalement produit dans le tissu adipeux -mais aussi par l'estomac-. Lorsque la leptine entre dans la circulation sanguine, le peptide signal, qui permet le passage de la protéine au travers d'une membrane, est éliminé. La leptine a alors une longueur réduite à 147 acides aminés<sup>1</sup>.

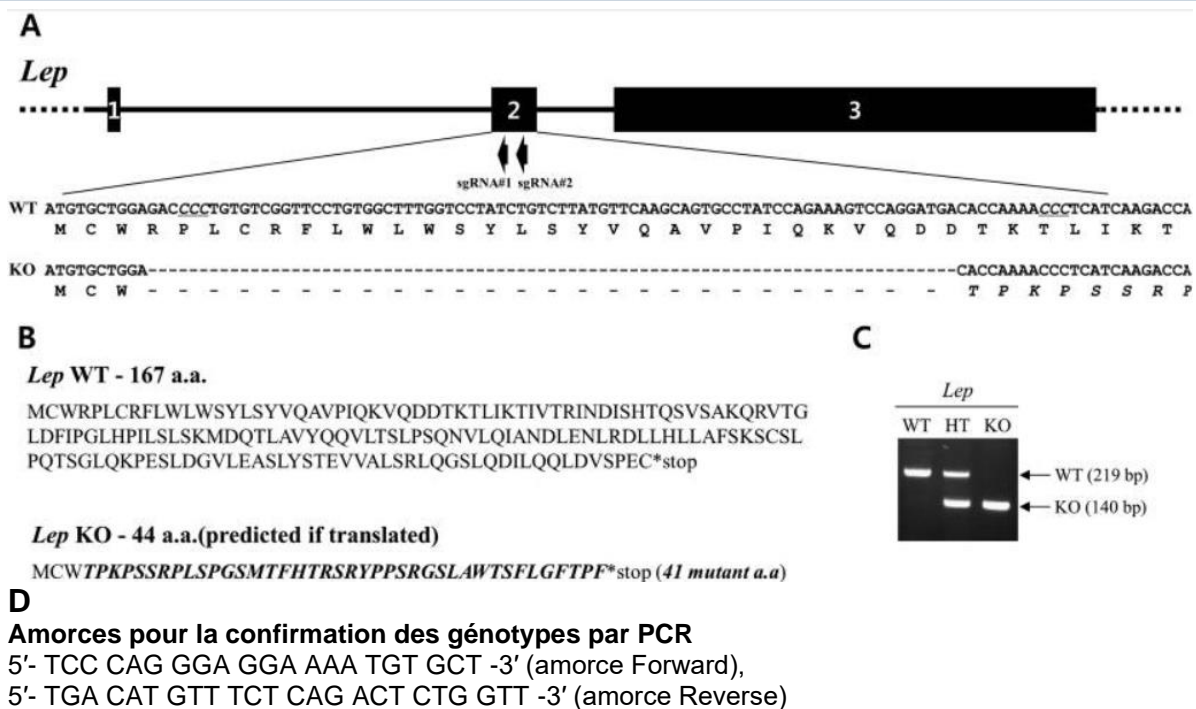
Les récepteurs à la leptine possèdent un seul domaine transmembranaire. Sept isoformes résultant d'un épissage alternatif de l'ARN pré-messager ont été décrites. Elles se distinguent entre elles par la longueur de leur domaine intracellulaire. D'une façon générale, les isoformes longues du récepteur à leptine sont principalement exprimées dans l'hypothalamus, alors que les isoformes courtes sont exprimées dans tout le corps<sup>1</sup>.

Chez l'humain, le gène *LEP* codant la leptine et le gène *LEPR*, codant son récepteur, sont respectivement localisés sur le chromosome 7 et sur le chromosome 1.



En utilisant le système CRISPR-Cas9, il est possible de générer des modèles de souris « LEP et LEPR knockout (KO) », c'est-à-dire présentant des mutations rendant impossible une synthèse correcte des protéines.

En 2018, l'équipe coréenne dirigée par Jae-il Roh a conçu une paire d'ARNg indépendants ciblant l'exon 2 du gène LEP. L'utilisation de ces deux ARNg avec le système CRISPR-Cas9 sur des embryons de souris a provoqué la suppression de 79pb au sein du gène LEP (figure 1A). Cette mutation par délétion, induite par le système CRISPR-Cas9, provoque un décalage du cadre de lecture de l'ARNm par les ribosomes faisant apparaître un codon stop prématuré. Ainsi, par rapport à la protéine LEP de type sauvage (ou WT pour Wild Type), composée de 167 acides aminés, le peptide mutant non fonctionnel n'est formé que de 44 acides aminés dont seuls les trois premiers correspondent à ceux de la protéine WT. Les génotypes de ces souris LEP KO sont alors confirmés par PCR et électrophorèse d'ADN grâce à une paire d'amorces (Figures 1C et 1D).



**Figure 1 : Principe de la conception des souris LEP KO par CRISPR-Cas9**

- Représentation de l'organisation du gène LEP et de la délétion induite par CRISPR-Cas9. Les exons sont indiqués par les cases noires et les introns par les traits noirs.
- Longueur et séquences des protéines WT et KO. Les acides aminés mutants sont indiqués en italique. L'astérisque indique le signal d'arrêt de traduction.
- Résultats du génotypage des souris par PCR et électrophorèse d'ADN (WT = type sauvage, HT = hétérozygote, KO = souris mutantes homozygotes). Le fragment amplifié correspondant au gène LEP sauvage (WT) a une longueur de 219pb, celui correspondant au gène LEP muté par CRISPR-Cas9 (KO) a une longueur de 140pb.
- Séquences des amorces utilisées pour la PCR.

## L'édition génomique et le système CRISPR-Cas9

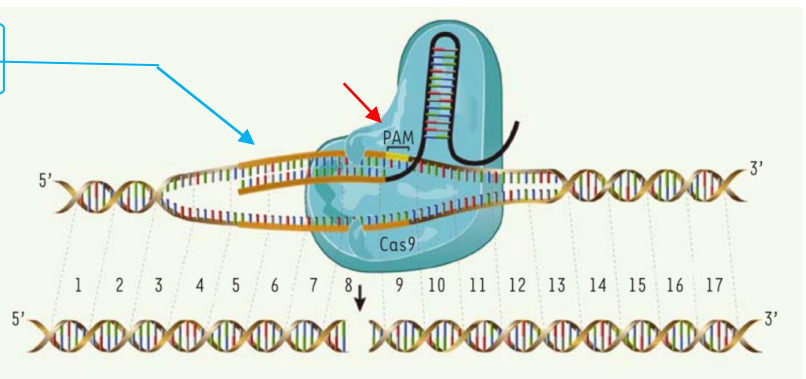
L'édition génomique permet de créer des modèles animaux (souris, lapins, moutons etc.), en modifiant le patrimoine génétique d'embryons grâce au système CRISPR-Cas9 avant de les transférer chez des femelles. Les chercheurs peuvent ainsi disposer à volonté de modèles animaux variés et adaptés à l'étude du développement, de pathologies ou pour des essais thérapeutiques<sup>5</sup>. Le prix Nobel de chimie 2020 a été attribué à Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna pour la mise au point de cette technique.

Le système CRISPR-Cas9 est naturellement présent chez les bactéries qui l'utilisent pour dégrader l'ADN des bactériophages (des virus de bactéries). C'est donc une sorte de « système immunitaire » bactérien qui leur permet de se protéger contre des infections virales.

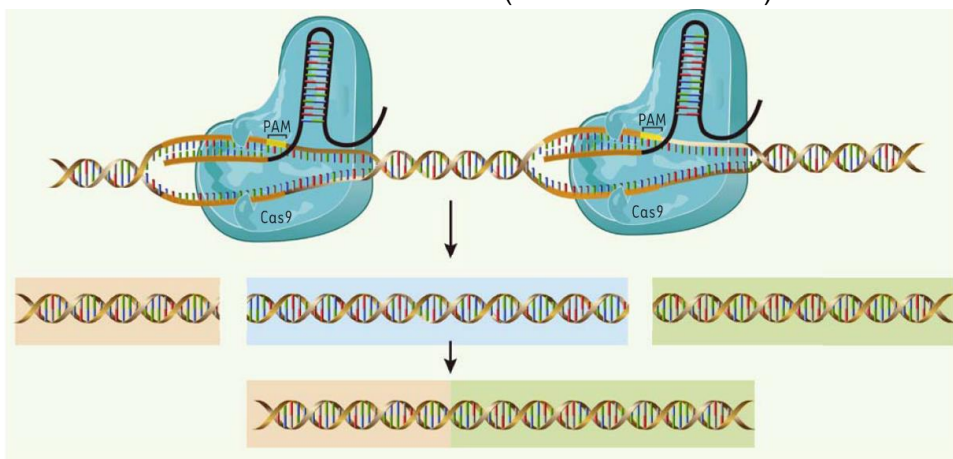
CRISPR-Cas9 est une enzyme -une nucléase- qui provoque des coupures dans l'ADN double brin en des endroits précis du génome. Il est utilisé avec un « ARN guide », noté ARNg, qui cible une séquence d'ADN particulière, associé à l'enzyme Cas9, qui, comme des ciseaux moléculaires, coupe l'ADN. Lorsque la séquence d'ADN est coupée, les systèmes de réparation cellulaire vont « recoller » les extrémités des deux morceaux d'ADN créés par la coupure. En l'absence de séquence modèle, le processus de réparation ajoute ou enlève quelques nucléotides à chacune des extrémités d'ADN afin de pouvoir les recoller ; cela provoque des « anomalies » dans la séquence d'ADN ciblée : le gène devient alors inactif mais peut aussi être aléatoirement revenir à l'état initial et être « réparé »<sup>6</sup>.

Voir la vidéo YouTube de l'INSERM : CRISPR/CAS9 ; une méthode révolutionnaire.  
<https://www.youtube.com/watch?v=RplWR12npqM&t=130s>

L'ARN guide (ARNg) est une séquence d'ARN de 17 à 20 nucléotides correspondant à l'ADN ciblé, suivie d'un motif de 3 nucléotides, que l'on appelle le « PAM » et qui est spécifique de la nucléase Cas9 utilisée. L'ARNg forme un complexe avec l'ADN et la nucléase Cas9. La coupure par la nucléase se fait exactement trois nucléotides avant le PAM<sup>4</sup>.



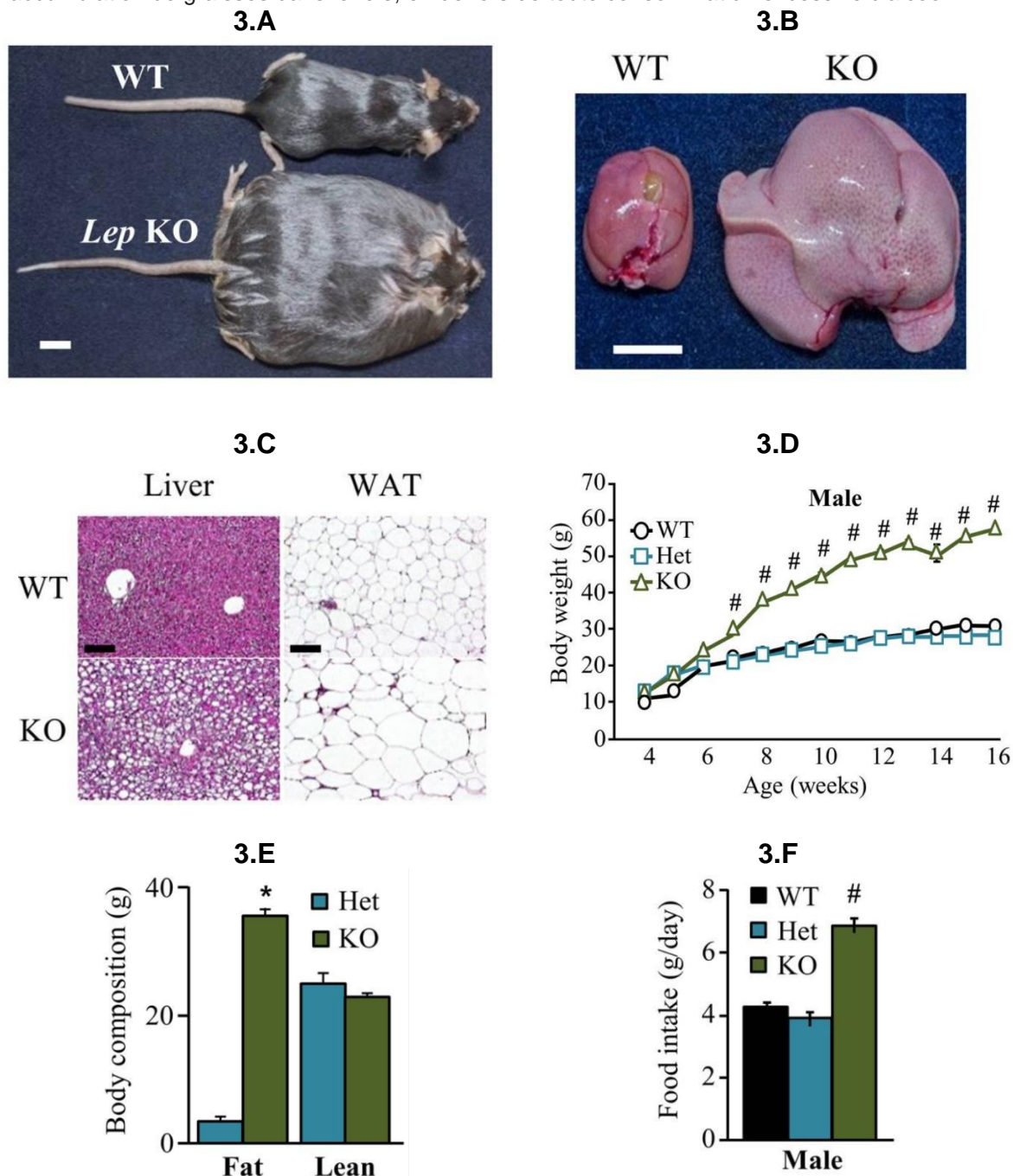
Par ailleurs, on peut utiliser le système CRISPR/Cas pour éliminer une séquence d'ADN. Il est possible de couper les deux brins d'ADN à deux endroits dans un même chromosome, en utilisant deux ARN guide (ARNg). Ceci permet d'enlever une séquence de quelques nucléotides ou même de centaines de milliers de nucléotides<sup>4</sup> (schéma ci-dessous).



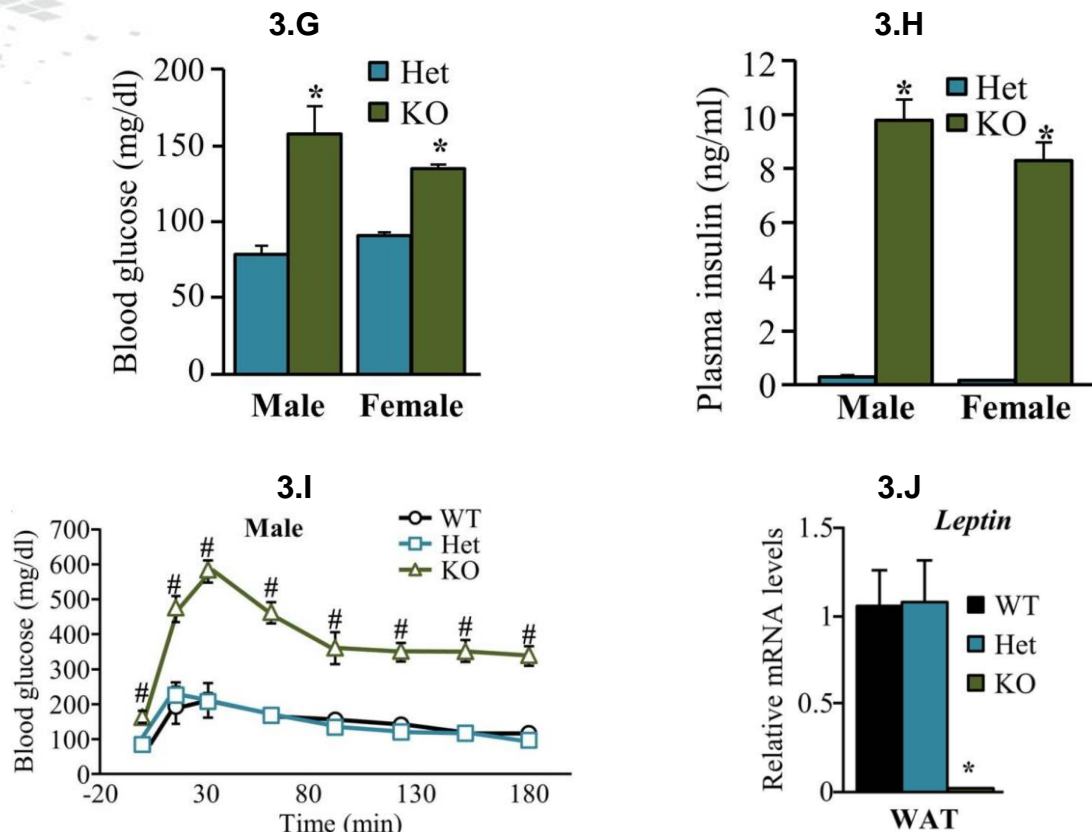
## LES RESULTATS EXPERIMENTAUX OBTENUS

Chez les souris LEP KO, la leptine est insuffisamment produite et, de ce fait, la prise alimentaire est exacerbée (figures 3J et 3F). Ces souris sont obèses et présentent une stéatose hépatique\* (figures 3A, 3B, 3C, 3D, 3E) dès la première génération. Les données indiquent également une hyperglycémie et une résistance à l'insuline (figures 3G, 3H, 3I). Ces résultats suggèrent donc que la mutation *Lep* induite par CRISPR-Cas9 est suffisante pour provoquer l'obésité chez ces souris et que le modèle de souris LEP KO est un modèle efficace pour la recherche sur l'obésité et le diabète de type 2.

\*accumulation de graisses dans le foie, en dehors de toute consommation excessive d'alcool.







**Figure 3 : Données anatomiques, histologiques et physiologiques obtenues chez les souris**

A : photographies des souris âgées de 9 mois, B : aspect macroscopique du foie chez des animaux de 9 mois, C : coupes histologiques du foie et du tissu adipeux blanc chez des animaux âgés de 16 semaines, D : évolution de la masse corporelle, E : composition du corps en tissus gras et maigres chez des animaux âgés de 15 semaines, F : prise alimentaire moyenne chez des animaux âgés de 8 semaines, G et H : glycémie (G) et insulïnémie (H) chez des souris âgées de 14 semaines après 16 h de jeûne, I : Résultat d'un test de tolérance au glucose injecté à t0 chez des animaux âgés de 14 semaines et qui ont préalablement jeûné pendant 16 h, J : taux d'ARNm transcrit à partir du gène Lep dans le tissu adipeux blanc d'animaux âgés de 10 semaines.

WT = souris de type sauvage, Het = souris hétérozygotes, KO = souris mutantes homozygotes, barre blanche = 1cm, barre noire = 100µm, Liver = foie, WAT = tissu adipeux blanc, Fat = graisse, Lean = tissu maigre, food intake = prise alimentaire

Source : CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models, Jae-il Roh et al. Janvier 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955754/>

## LA SITUATION PEDAGOGIQUE ET L'ACTIVITE PROPOSEE

La leptine est une hormone de nature protéique contrôlant la sensation de faim. Cette hormone est codée par le gène LEP. Chez l'humain, des mutations du gène LEP sont associées à une obésité précoce et un diabète de type 2. En utilisant le système CRISPR-Cas9 sur des embryons de souris, il est possible de donner naissance à des animaux « LEP KO », c'est-à-dire présentant une mutation du gène LEP rendant impossible la synthèse correcte de la leptine. Ces animaux sont ensuite utilisés comme modèle pour l'étude de l'obésité et du diabète chez l'humain.

L'utilisation de CRISPR-Cas9 ciblant le gène LEP chez des embryons de souris donne naissance à deux types de souris : des souris minces, équivalentes aux souris témoins non modifiées (WT, pour Wild Type) et des souris obèses (photographies de la figure 4).

Le système CRISPR-Cas9 n'est pas fiable à 100%. Pour confirmer que le phénotype de ces souris résultent bien de la modification de leur génome par CRISPR-Cas9, il est nécessaire de déterminer leur génotype par PCR et électrophorèse d'ADN. L'utilisation d'amorces spécifiques va permettre d'amplifier le gène LEP. L'électrophorèse d'ADN révélera quelles versions du gène sont présentes chez les animaux testés. En effet, CRISPR-Cas9 provoque une délétion de 79 paires de bases au sein du gène LEP. Le fragment d'ADN correspondant au variant LEP KO sera donc plus court de 79pb que LEP WT et migrera plus loin sur le gel d'électrophorèse. Le fragment LEP WT amplifié aura une taille de 219pb et le fragment LEP KO, une taille de 140pb.

L'électrophorèse permettra également de révéler si des individus hétérozygotes, porteur à la fois de LEP WT et de LEP KO sont présents parmi ces souris modifiées. Par mise en relation avec leur phénotype, on en déduira si la mutation induite est récessive ou dominante.



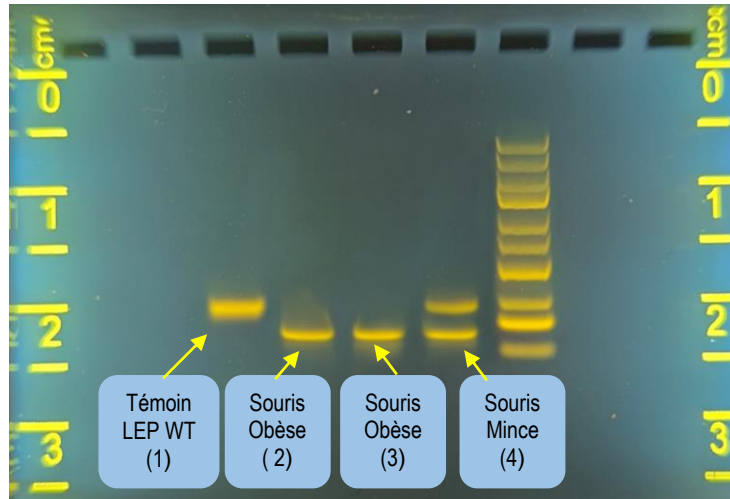
**Figure 4 : Les deux types de souris obtenus après utilisation du système CRISPR-Cas9 induisant une mutation du gène *LEP***

Photographies d'animaux âgés de 9 mois, barre blanche = 1cm

D'après *CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models*, Jae-il Roh et al. Janvier 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955754/>

L'activité consiste à réaliser une électrophorèse de fragments d'ADN préalablement amplifiés par PCR. L'ADN amplifié provient d'individus WT et d'animaux modifiés par CRISPR-Cas9, minces ou obèses.

Le résultat (figure 5) révèle que, parmi les animaux modifiés, les souris minces sont des hétérozygotes WT/KO et les souris obèses des homozygotes KO/KO. La mutation induite est donc récessive, ce que confirment les analyses physiologiques réalisées chez l'ensemble des souris.



**Figure 5 : Résultat de l'électrophorèse d'ADN**

### Sources documentaires

1. CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models, Jae-il Roh et al. Janvier 2018  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955754/>
2. Effets paracrines de la leptine produite par l'estomac, Marion Buyse et al. Med Sci, février 2004  
[https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full\\_html/2004/02/medsci2004202p183/medsci2004202p183.html#:~:text=La%20leptine%2C%20produit%20du%20g%C3%A8ne,estomac%20produisent%20%C3%A9galement%20la%20leptine](https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2004/02/medsci2004202p183/medsci2004202p183.html#:~:text=La%20leptine%2C%20produit%20du%20g%C3%A8ne,estomac%20produisent%20%C3%A9galement%20la%20leptine)
3. Du nouveau dans la génétique des formes monogéniques d'obésité et son impact pour mieux en comprendre la physiopathologie, Morgane Baron et al. Med Sci, octobre 2020  
[https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full\\_html/2020/08/msc200132/msc200132.html#F1](https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2020/08/msc200132/msc200132.html#F1)
4. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires, Jacques P. Tremblay, Med Sci, novembre 2015  
[https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full\\_html/2015/12/medsci20153111p1014/medsci20153111p1014.html](https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2015/12/medsci20153111p1014/medsci20153111p1014.html)
5. Edition génomique. Des ciseaux moléculaires pour modifier les génomes avec précision. INSERM, juin 2018  
<https://www.inserm.fr/dossier/edition-genomique/#:~:text=Modifier%20une%20s%C3%A9quence%20d'ADN%20de%20fa%C3%A7on%20cibl%C3%A9e&text=Cette%20technique%20de%20g%C3%A9nie%20g%C3%A9n%C3%A9tique,g%C3%A9nome%2C%20d%C3%A9pendant%20de%20sa%20s%C3%A9quence.>
6. CRISPR-Cas9. AFM-Téléthon, Juin 2022  
<https://www.afm-telethon.fr/fr/termes/crisprcas9#:~:text=Le%20syst%C3%A8me%20CRISPR%2FCas9%20est%20un%20nouveau%20syst%C3%A8me%20simple%2C%20rapide,mol%C3%A9culaires%2C%20coupe%20l'ADN>