

8.2 CRISPR-Cas : De la biologie à l'outils

Diapositive 1 :

CRISPR-Cas est considéré comme l'une des plus grandes révolutions en biologie moléculaire depuis la PCR. Dans cette présentation, je vais vous montrer comment ce système immunitaire adaptatif bactérien a servi de base au développement d'un nouvel outil moléculaire puissant pour l'édition, la régulation et le ciblage des génomes. Aujourd'hui, la technologie CRISPR a des applications dans tous les domaines de génie génétique. Le succès de la technologie est dû à sa simplicité, son efficacité et sa polyvalence.

Diapositive 2 :

La technologie CRISPR est basée sur des nucléases guidées par l'ARN qui clivent l'ADN de manière dépendante de la séquence. Le mode d'action est composé de trois étapes distinctes. Dans la première étape, la phase d'acquisition, les acides nucléiques étrangers sont intégrés comme nouveaux « spacers » dans le locus CRISPR, séparé par des séquences répétées. Dans l'étape suivante, le stade d'expression, des crRNA matures sont générés et contiennent des séquences partielles de spacers associées à des répétitions partielles. En outre, le tracrRNA qui a une complémentarité avec les régions répétées des transcrits de crRNA, ainsi que les protéines Cas sont exprimés. Dans l'étape d'interférence, un hybride crRNA-tracrRNA se forme par liaison de la région répétée complémentaire. Cet hybride ARN guide la nucléase Cas vers la séquence d'ADN complémentaire, ce qui conduit au clivage de l'élément génétique envahissant.

Diapositive 3 :

La combinaison du crRNA et du tracrRNA en un sgRNA a constitué l'étape cruciale dans le développement de la technologie CRISPR. Le système le plus largement utilisé dans l'ingénierie du génome est le système CRISPR / Cas de type II de *Streptococcus pyogenes*. Comme d'autres systèmes de classe II, il ne nécessite qu'une seule endonucléase, Cas9, pour séparer l'ADN ciblé.

Diapositive 4 :

CRISPR-Cas9 est aujourd'hui utilisé pour modifier les génomes de beaucoup de cellules et d'organismes, y compris les bactéries, les parasites, le *Zebra fish*, les souris et les cellules humaines. La coexpression de la nucléase Cas9 avec des sgRNAs contenant la séquence complémentaire entraîne des ruptures des doubles brins d'ADN qui seront par la suite réparés via une jonction d'extrémités non homologues ou une recombinaison homologue.

Lorsque des paires de bases aléatoires de la jonction d'extrémités non homologues sont insérées ou supprimées, ceci provoque un *knock-out* du gène par perturbation. D'autre part, la recombinaison homologue avec un ADN donneur peut être utilisée pour modifier un gène en introduisant des mutations précises ou pour introduire un nouveau gène entier dans le génome.

Diapositive 5 :

La possibilité de programmer Cas9 pour lier n'importe quelle séquence souhaitée peut être exploitée pour d'autres applications, telles que le contrôle de la transcription, la modification des épigénomes ou l'imagerie des chromosomes.

Pour l'imagerie dans les cellules vivantes, une protéine Cas9 modifiée, appelée dCas9, a été construite. Dans cette protéine, les domaines des nucléases sont désactivés, résultant en une protéine de liaison

spécifique d'une séquence d'ADN. La protéine modifiée est fusionnée à un marqueur fluorescent, comme l'eGFP, et ensemble avec un sgRNA synthétique, sert à visualiser le génome dans des cellules individuelles. Cette capacité améliore les technologies actuelles pour étudier la dynamique conformationnelle des chromosomes natifs dans les cellules vivantes.

D'autre part, la protéine modifiée dCas9 peut également être utilisée pour la régulation des gènes à l'échelle du génome. Dans un processus connu sous le nom de CRISPRi, l'accès de l'ARN polymérase à l'ADN est bloqué par dCas9, ce qui entraîne une répression de la transcription. De plus, en générant des versions chimériques de dCas9 fusionnées à des domaines de régulation, tels que la sous-unité ω de l'ARN polymérase, l'expression génique peut être efficacement activée.

Diapositives 6 :

La découverte et le développement de la technologie CRISPR sont le travail de nombreux scientifiques à travers le monde. Bien que la technologie soit une découverte relativement récente, les premiers rapports remontent à 1987. Les scientifiques d'une université japonaise avaient découvert un segment inhabituel d'ADN qui consistait en des répétitions courtes et directes flanquées par de courtes séquences uniques. Ils avaient écrit que « la signification biologique des séquences n'est pas connue ». Près de trois décennies plus tard, en 2002, ces répétitions ont été appelées CRISPR et leurs protéines associées ont été appelées Cas. En 2005, les spacers CRISPR étaient adaptés à de l'ADN étranger.

Diapositive 7 :

Au cours des deux années qui ont suivi, CRISPR s'est avéré être le système immunitaire adaptatif des bactéries utilisés pour éviter l'infection par les phages. En 2011, les scientifiques ont découvert que, pour ce mécanisme de résistance au phage, deux molécules d'ARN, appelées CrRNA et tracrRNA, sont nécessaires. En 2012, les caractéristiques biochimiques du système CRISPR ont montré que Cas9 pouvait être guidé par ces crRNAs pour cliver l'ADN cible *in vitro*. De plus, les crRNA ont été fusionnés aux tracrRNA pour former des sgRNA, réduisant le système de trois à deux composants. À partir de ce point, CRISPR / Cas9 a été utilisé comme nouvel outil d'édition de gènes.

Diapositive 8 :

Au cours des années suivantes, de nombreuses études ont montré le potentiel de cette nouvelle technique dans l'ingénierie génétique. En 2013, le système CRISPR / Cas9 a été utilisé pour éditer des gènes ciblés dans les cellules humaines et de souris en utilisant des crRNAs fabriqués. Un an plus tard, en Chine, des chercheurs ont rapporté la conception des premiers singes avec mutations ciblées, un grand pas en avant dans la réalisation de modèles de recherche plus réalistes sur les maladies humaines. En outre, les premières tentatives de modification du génome au sein des embryons humains afin d'éliminer des maladies génétiques ont été effectuées. Cependant, les chercheurs ont été incapables de réparer efficacement le désordre génétique et de nombreux clivages ont été observés hors de la cible.

Diapositive 9 :

En 2016, le premier essai humain de l'utilisation de l'édition de gènes par CRISPR a été approuvé aux États-Unis. Ce premier essai est de petite échelle et n'a pour ambition que de tester l'innocuité de CRISPR chez l'homme. Dans le futur, la technique pourrait être utilisée pour traiter le cancer.

Comme le montre la chronologie, la technologie CRISPR est une technologie innovante en biologie moléculaire, et de nombreuses nouvelles études et applications seront certainement encore disponibles dans les prochaines années.

Diapositive 10 :

Vous trouverez toutes les références utilisées pour cette présentation dans la liste suivante