

Transcript – Innovirology session 8.1 Principes de base du système CRISPR

Diapositive 1 :

CRISPR est un système microbien de défense antiviral. La protéine CRISPR Cas9 a été largement utilisée comme outil d'édition génomique. Dans cette session, les bases du CRISPR en tant que mécanisme antiviral sont expliquées. Il sera montré comment CRISPR peut s'adapter à de nouvelles infections virales et combattre efficacement les virus. Dans la dernière partie de cette session, nous discuterons de quelle façon l'auto-immunité peut être évitée.

Diapositive 2 :

Les virus sont les entités les plus abondantes de cette planète et dépassent leur hôte par au minimum un facteur 10. Par conséquent, dans leur environnement naturel, les microbes sont constamment soumis au risque d'une infection virale. Pour se défendre de l'impact négatif possible de l'infection virale, les bactéries et les archées, comme les humains, ont développé différentes stratégies de défense. Cette diapositive résume les stratégies de défense virale connues : 1) blocage de l'adsorption, 2) avortement de l'infection, 3) blocage de l'absorption, 4) systèmes de modification restriction et 5) système CRISPR.

Le système CRISPR est présent dans environ la moitié des bactéries et la plupart des archées. Il existe différents types CRISPR dont le système Cas9 est le plus connu. Le mécanisme de base de défense est très similaire pour toutes les familles. Les différences reposent sur les différents gènes Cas associés au CRISPR utilisés pour classer les différentes familles. Certains systèmes ciblent l'ADN étranger d'autres l'ARN.

Diapositive 3 :

La découverte de CRISPR a débuté avec la première description des répétitions palindromiques régulièrement espacées dans les génomes des bactéries et des archées. Pendant longtemps, ces répétitions ont été considérées comme des régions génomiques inintéressantes, jusqu'à ce qu'en 2005 plusieurs groupes aient signalé simultanément que les « spacers » de ~ 30 pb entre ces répétitions palindromiques contiennent des séquences qui correspondent exactement à celles des génomes viraux. À ce moment, il a été proposé que ces CRISPR faisaient partie d'un système de défense antivirale. Cette diapositive présente un assemblage CRISPR typique. Les assemblages CRISPR peuvent contenir de 2 à plusieurs centaines de répétitions. Selon la famille CRISPR, la taille des « spacers » et des répétitions varient sensiblement. Plusieurs locus CRISPR différents peuvent être présents dans un seul génome bactérien ou d'archée. Chaque « spacer » est unique et correspond à un virus individuel ou à un élément extrachromosomique. Les gènes Cas sont souvent codés à proximité immédiate des locus CRISPR.

Diapositive 4 :

La première preuve que le CRISPR fonctionne en tant que système de défense antivirale provient de la recherche sur les souches bactériennes résistantes au phage dans l'industrie laitière. Les chercheurs ont montré que la seule différence entre une souche sensible et une souche résistante aux virus était la présence d'un « spacer » supplémentaire dans le locus CRISPR de la bactérie résistante, indiqué en rouge sur cette diapositive. Ce « spacer » correspondait à 100 % à une région du génome viral duquel la souche avait obtenu sa résistance. Cette région s'appelle « protospacer ». Le rôle du PAM sera expliqué dans la dernière diapositive.

L'ajout de nouveaux « spacers » compatibles avec un certain type de virus donnera la résistance à la souche dans le futur. Comme ces adaptations dans le locus CRISPR sont faites au sein du génome, cette résistance sera également transmise à la descendance de la souche. En tant que tel, le locus CRISPR fonctionne comme un système de défense adaptable et héritable.

Diapositive 5 :

Sur cette diapositive, la première phase du mécanisme de défense CRISPR est expliquée avec l'exemple de Cas9. La première étape de la défense médiée par CRISPR est définie comme la phase d'adaptation. Après l'infection par un virus, l'ADN étranger est reconnu et clivé par les protéines Cas. Une petite partie du génome est incorporée en tant que nouveau « spacer » dans le locus CRISPR. De nouveaux « spacers » sont généralement ajoutés dans le locus CRISPR, près de la séquence leader, qui est représentée en gris sur cette diapositive. Le système CRISPR donne un aperçu des rencontres faites avec des virus dans le passé. Les spacers sont parfois retirés du locus CRISPR par événements de recombinaison pouvant se produire au milieu ou à la fin du locus.

Diapositive 6 :

Dans la deuxième phase du mécanisme de défense CRISPR, le locus CRISPR est transcrit en une longue molécule d'ARN. Cas9 peut traiter l'ARN pré-CRISPR. Dans d'autres types de familles CRISPR, ce traitement d'ARN se produit par différentes protéines Cas. Le clivage de l'ARN pré-CRISPR se produit à l'aide d'un CRISPR-ARN trans-activant (tracrRNA). Ce tracrRNA s'hybride spécifiquement avec les répétitions dans l'ARN pré-CRISPR qui est lié par Cas9. Ces événements recrutent une ARNase codée par l'hôte qui finit par traiter le pré-crRNA en de petites séquences de guidage. Dans d'autres types de locus CRISPR, ce clivage peut également se produire grâce à une protéine Cas. La séquence d'ARN guide reste liée à la protéine Cas.

Dans la troisième phase du mécanisme de défense CRISPR, le génome du virus est ciblé et éliminé. Le complexe d'ARN Cas9-guide analyse l'ADN cellulaire en utilisant son crRNA contenant un seul spacer comme guide. Dès qu'il trouve une correspondance parfaite, l'ADN est clivé et l'infection virale est interrompue. Les séquences de ~ 30 pb fournissent suffisamment de spécifications pour ne pas cibler le génome bactérien ou d'archée. Cependant, en théorie, il existe une position avec une combinaison parfaite de crRNA dans le génome bactérien. C'est le locus CRISPR lui-même. Le ciblage de cette région pourrait conduire à une réaction auto-immune. Pour éviter l'auto-immunité, la séquence PAM est importante.

Diapositive 7 :

Sur cette diapositive, le mécanisme de PAM est expliqué. PAM représente le « protospacer adjacent motive ». Généralement, il ne s'agit que de quelques paires de bases. Il est situé à côté du protospacer dans le génome viral (indiqué en rouge). En règle générale, il n'est pas adjacent aux spacers dans le locus CRISPR. Le clivage de l'ADN par le complexe Cas chargé de crRNA ne se produit que lorsqu'un PAM est présent. Par conséquent, le PAM représente un mécanisme efficace pour éviter l'auto-immunité.