



Université Batna 2
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie des organismes

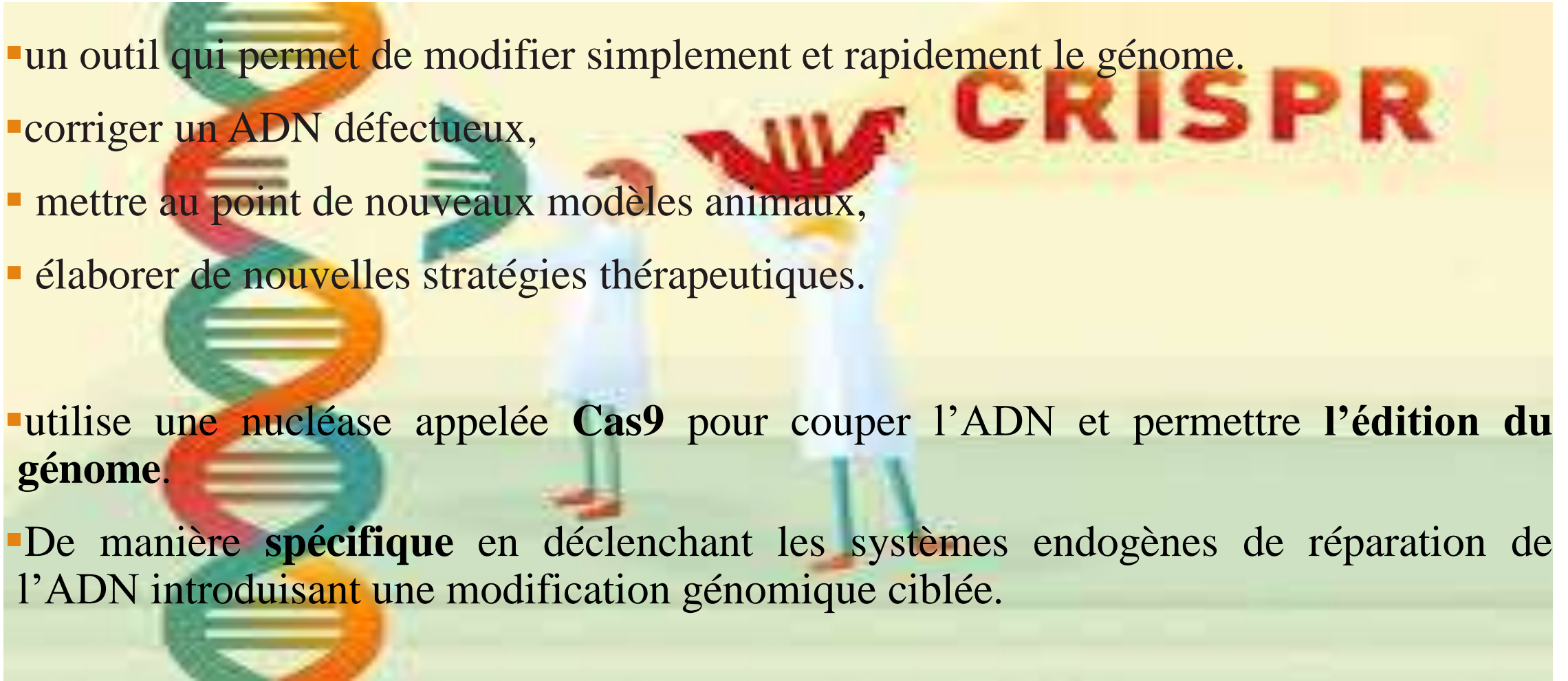
**TD DE
GÉNOMIQUE ET PROTÉOMIQUE FONCTIONNELLE
M2 BMC**

CRISPR CAS9:Un outil révolutionnaire pour l'édition du génome



CRISPR-Cas9:

- un outil qui permet de modifier simplement et rapidement le génome.
 - corriger un ADN défectueux,
 - mettre au point de nouveaux modèles animaux,
 - élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.
-
- utilise une nucléase appelée **Cas9** pour couper l'ADN et permettre **l'édition du génome**.
 - De manière **spécifique** en déclenchant les systèmes endogènes de réparation de l'ADN introduisant une modification génomique ciblée.



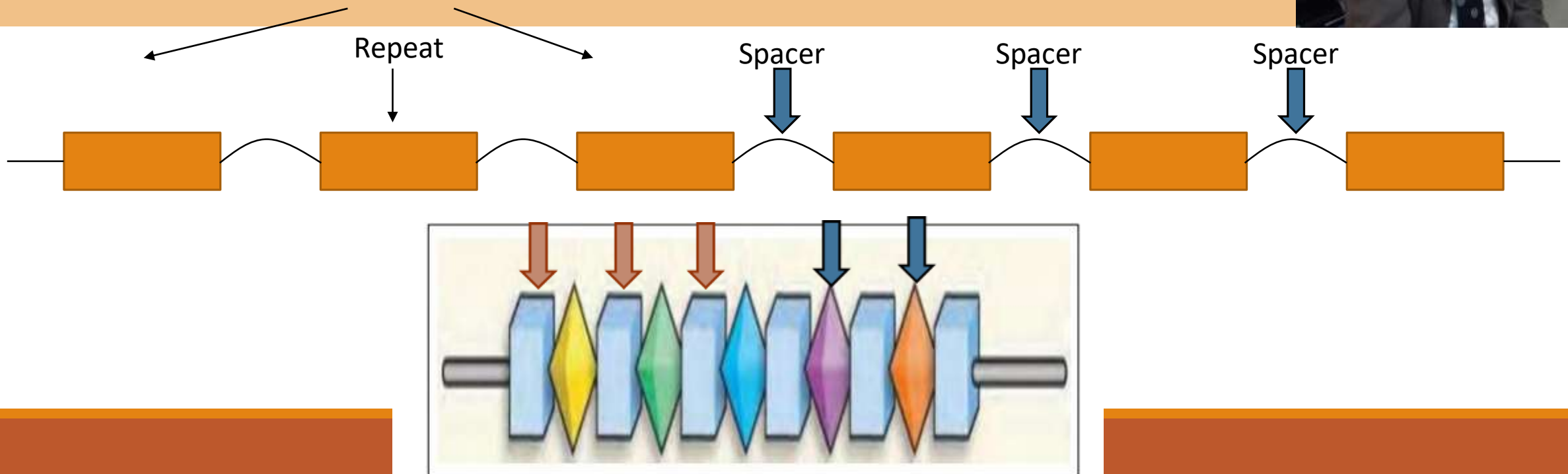
Découverte de CRISPR/Cas9:

Le chercheur Atsuo Nakata: des **séquences répétées** d'ADN dans le génome de la bactérie Escherichia coli.

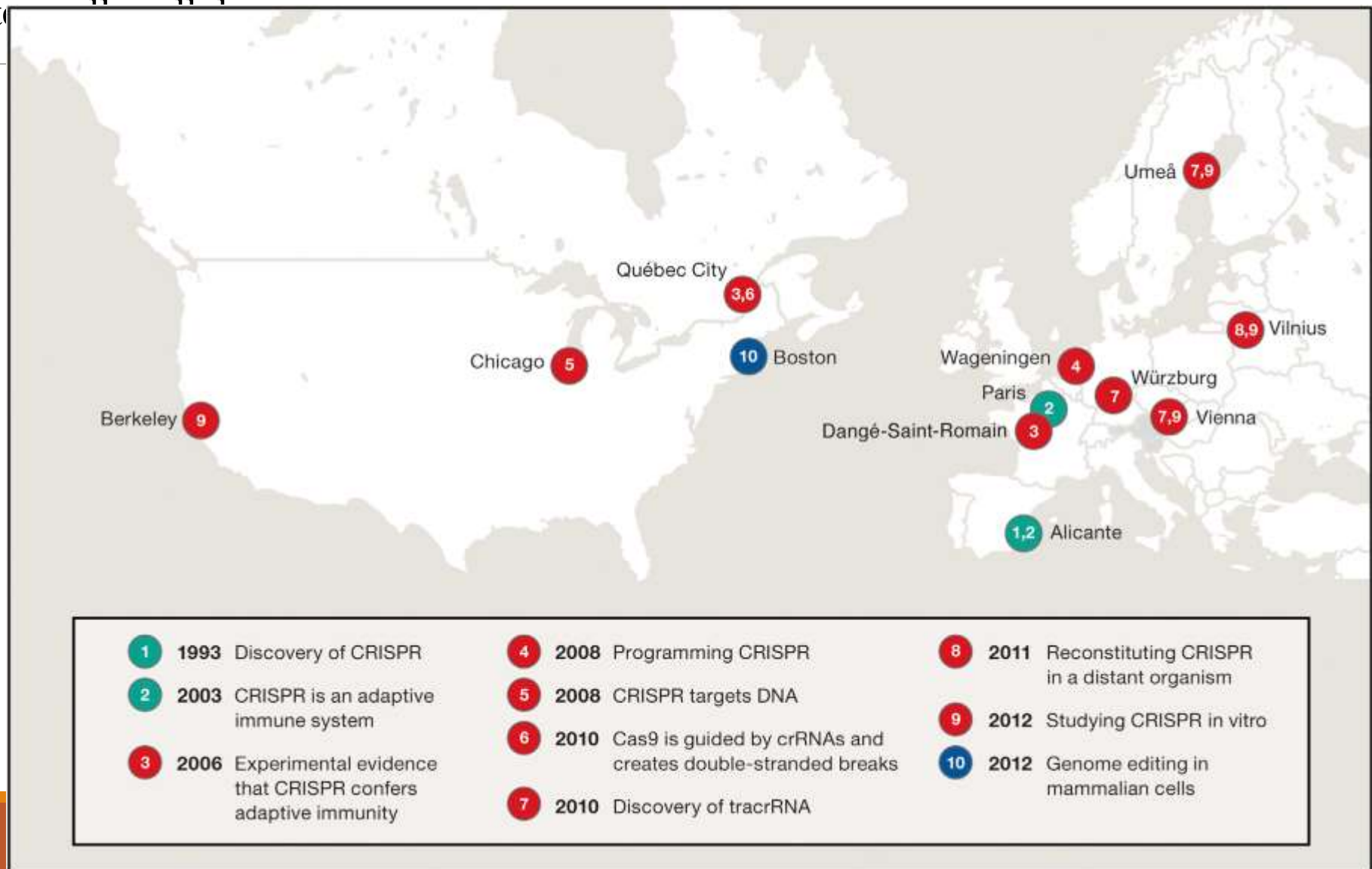
Il trouva des mystérieuses séquences de 29 nucléotides répétées espacées par 32 nucléotides:

Clustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats

Répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées et groupées

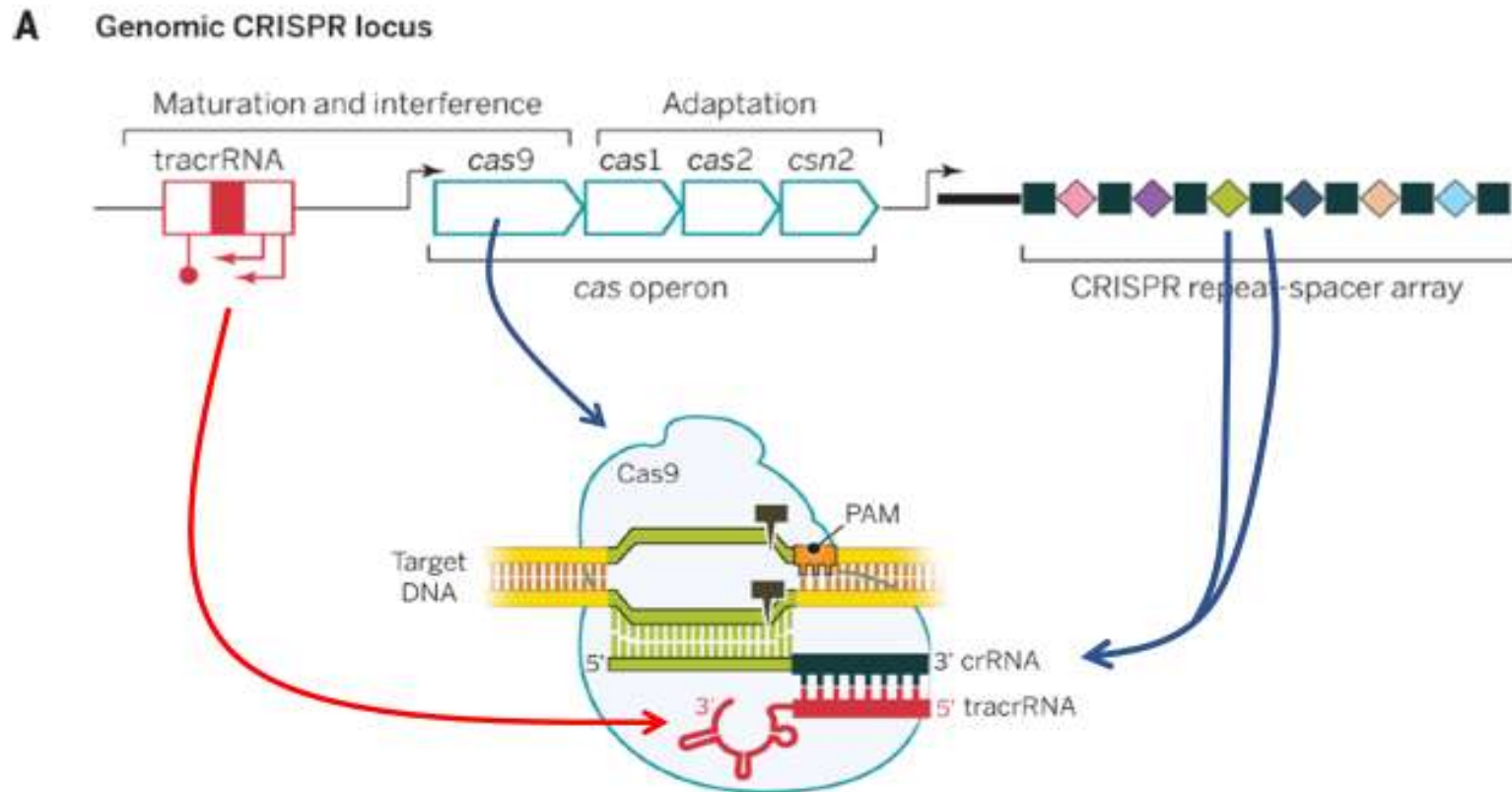


En 2012, les chercheuses Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna s'inspirent d'une réaction de défense bactérienne pour la détourner et en faire de véritables **ciseaux moléculaires** capables de cibler des endroits **précis** du génome de n'importe



Le système CRISPR-Cas est constitué de :

- **Locus *CRISPR***, de l'anglais *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* :
- **Gènes *cas* (*CRISPR-associated*)** : gènes codant les **endonucléases** associées à CRISPR.



Locus *CRISPR*

composé de courtes séquences nucléotidiques répétées intercalées de courtes séquences nucléotidiques variables et souvent uniques (*espaces/ spacers*)

Le gène cas 9

Le gène qui code la protéine Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Après transcription et traduction les propriétés physico-chimiques des acides aminés codés vont conditionner le repliement et la fonction de cette protéine .

Le crARN

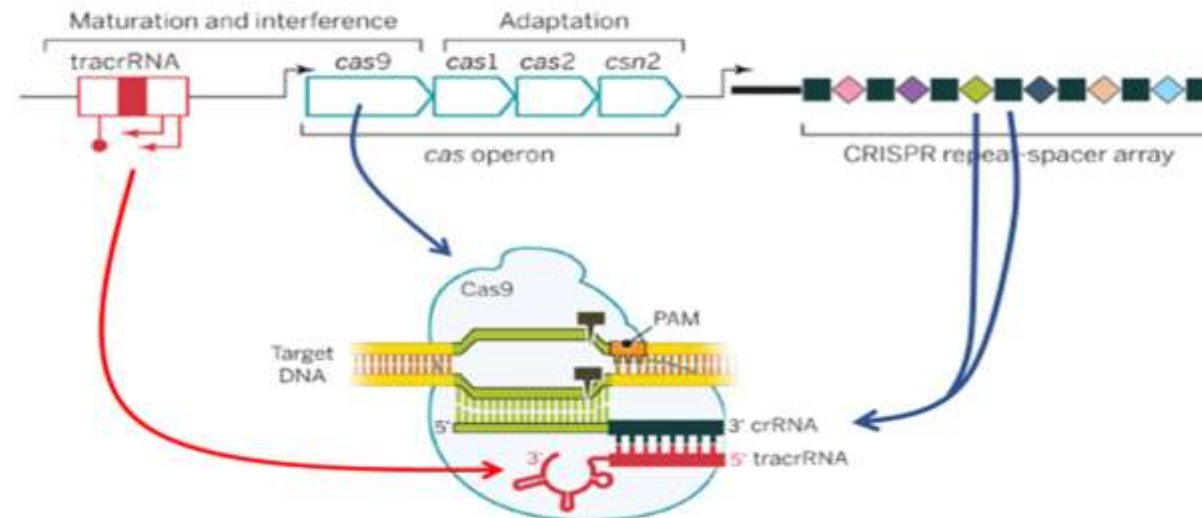
Composé d'un ARN provenant de la transcription de l'ADN sauvegarde dans la matrice CRISPR et d'une partie d'une répétition.

Le tracrRNA

(*trans-activating crRNAs*)

Sa structure comporte deux parties fonctionnelles utilisées respectivement pour la liaison du crRNA et de la protéine Cas9.

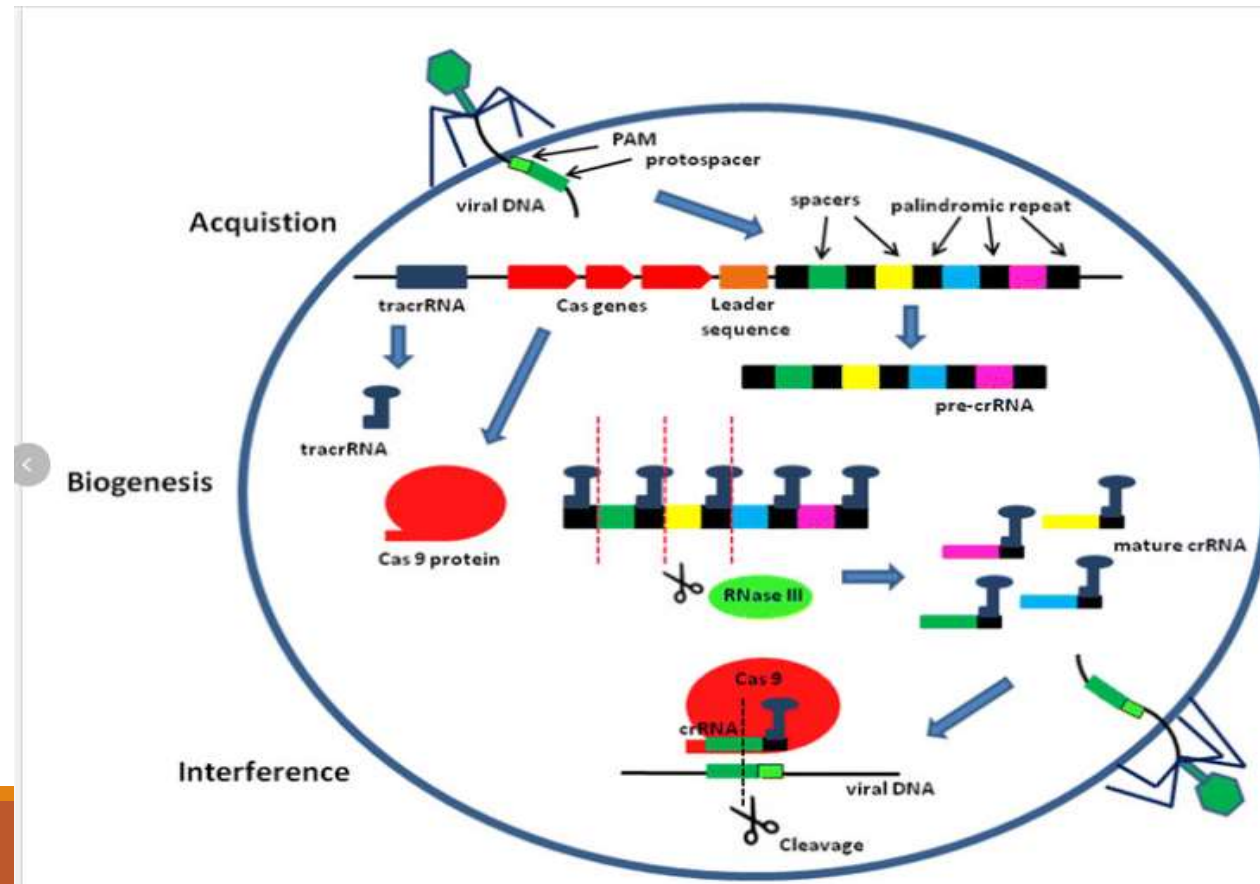
A Genomic CRISPR locus



Phase 1 : Acquisition des *spacers*

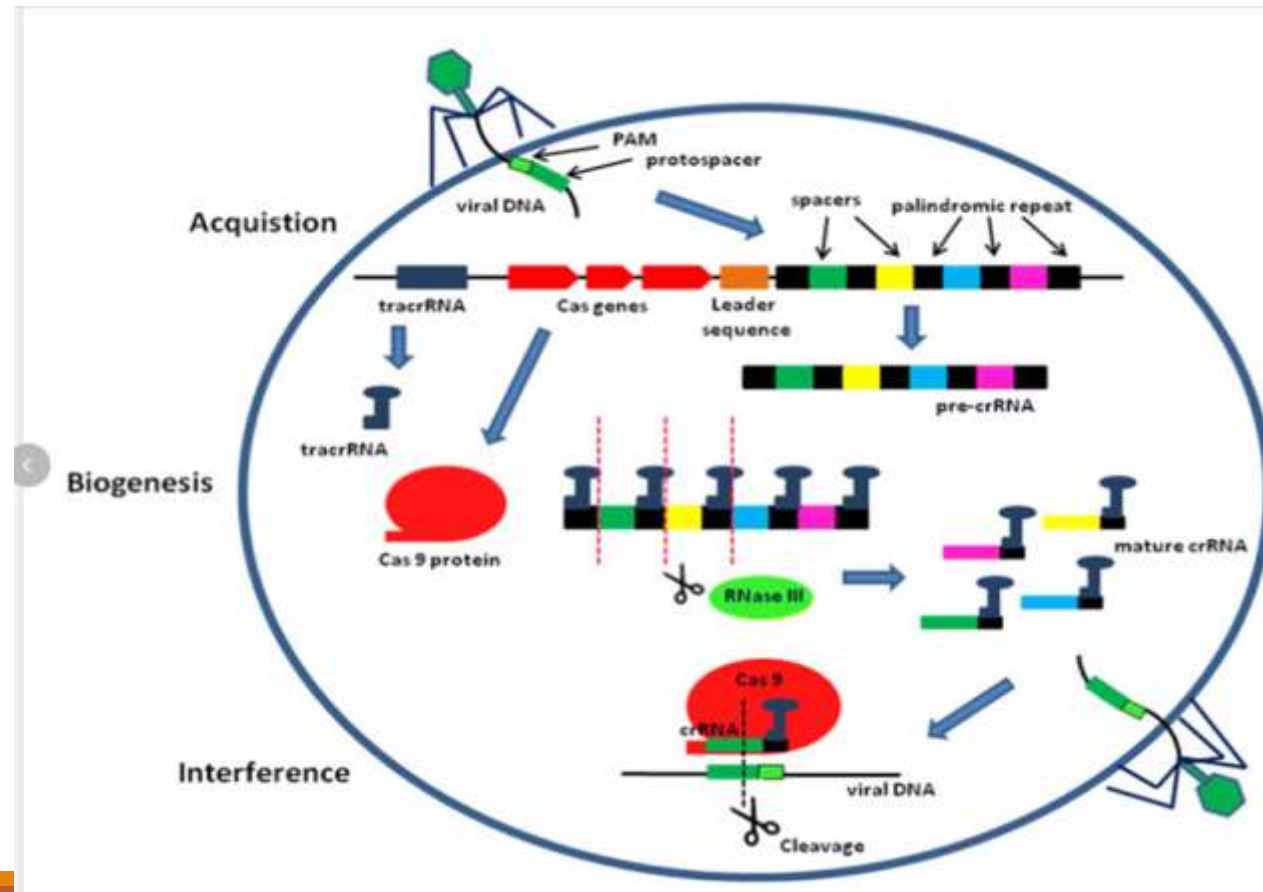
la détection, puis l'intégration d'un fragment d'ADN étranger d'environ 30 nucléotides dans le génome de la cellule hôte:

- La sélection de cette séquence dépend de la présence à son extrémité 5' d'un motif de **deux à cinq** nucléotides appelé **PAM (*protospacer adjacent motif*)**, spécifique de chaque orthologue de Cas9.
- Cette portion d'ADN étranger est ensuite reconnue par un complexe formé de dimères des deux **intégrases Cas1 et Cas2**, ce complexe va ensuite permettre l'insertion de cette séquence dans le locus CRISPR, encadrée par des portions d'ADN répété .



Phase 2 : Biogenèse des crRNA

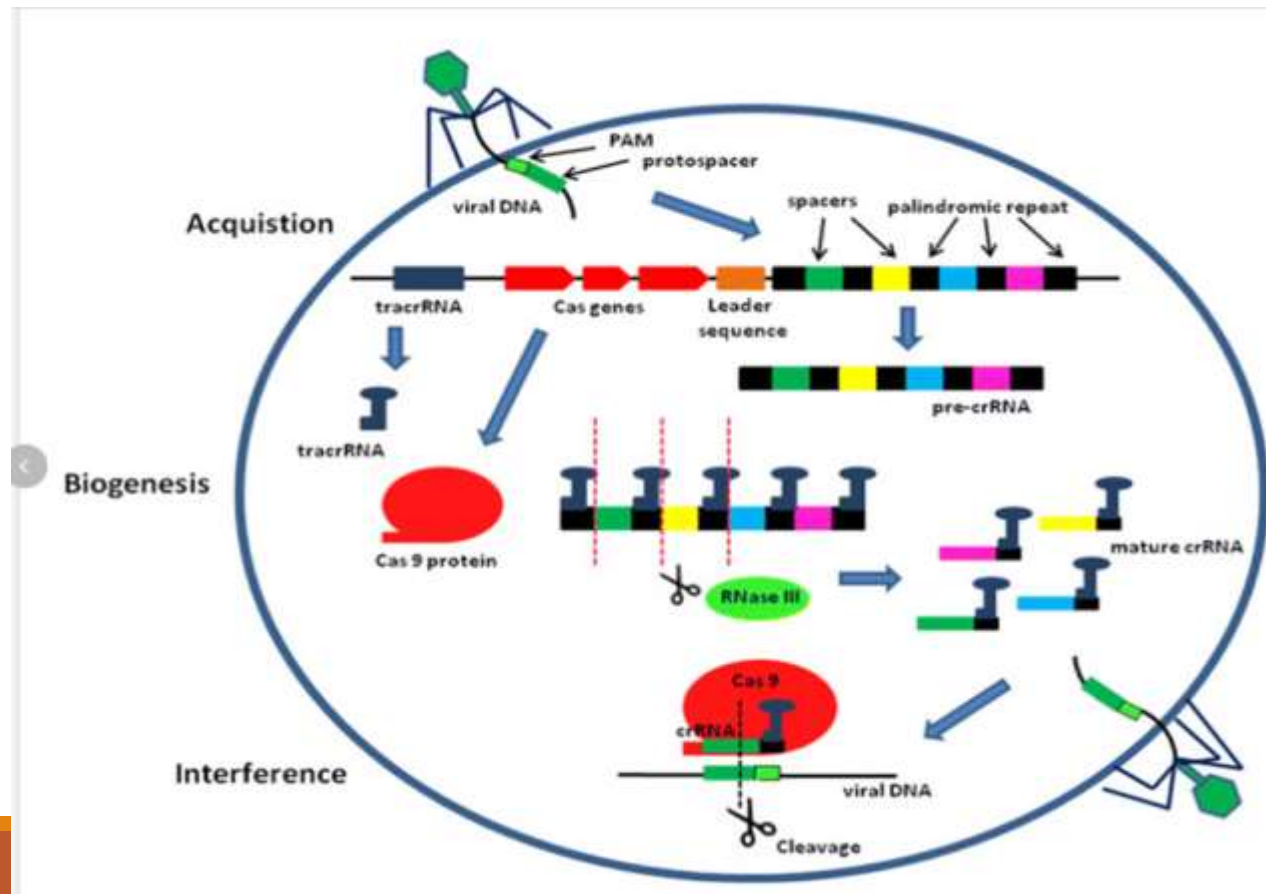
La matrice CRISPR (ensemble des séquences répétées - et des séquences espaceurs) est transcrite en un long transcrit primaire appelé **pre-crRNA**. Celui-ci est maturé en un ensemble de courts fragments d'ARN appelés **crRNAs** ("**CRISPR RNAs**") : chacun d'entre eux contient une séquence unique complémentaire d'un fragment d'ADN invasif.



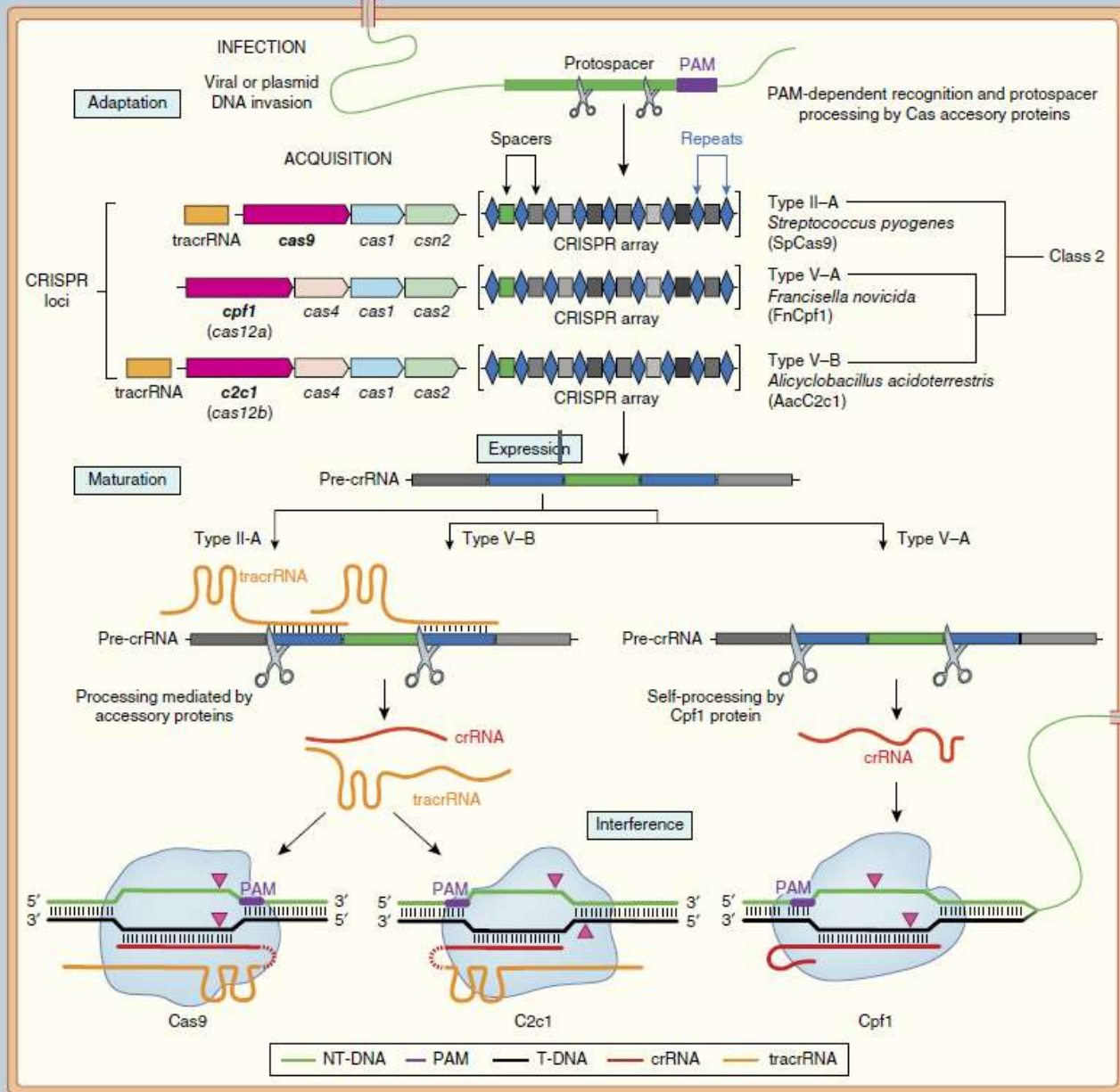
Phase 3 : Interférence avec la séquence cible

Dans le système CRISPR/Cas de type II, la première étape dans l'interférence avec **le protospacer** consiste en la formation d'un complexe entre **le duplex crRNA:tracrRNA** et la protéine Cas9. Ce complexe va ensuite balayer l'ADN à la recherche de séquences étrangères complémentaires présentant un motif PAM adjacent. L'interaction entre Cas9 et PAM provoque une déstabilisation de l'ADN double brin à proximité, facilitant l'appariement du **crRNA** à la séquence d'ADN étrangère complémentaire..

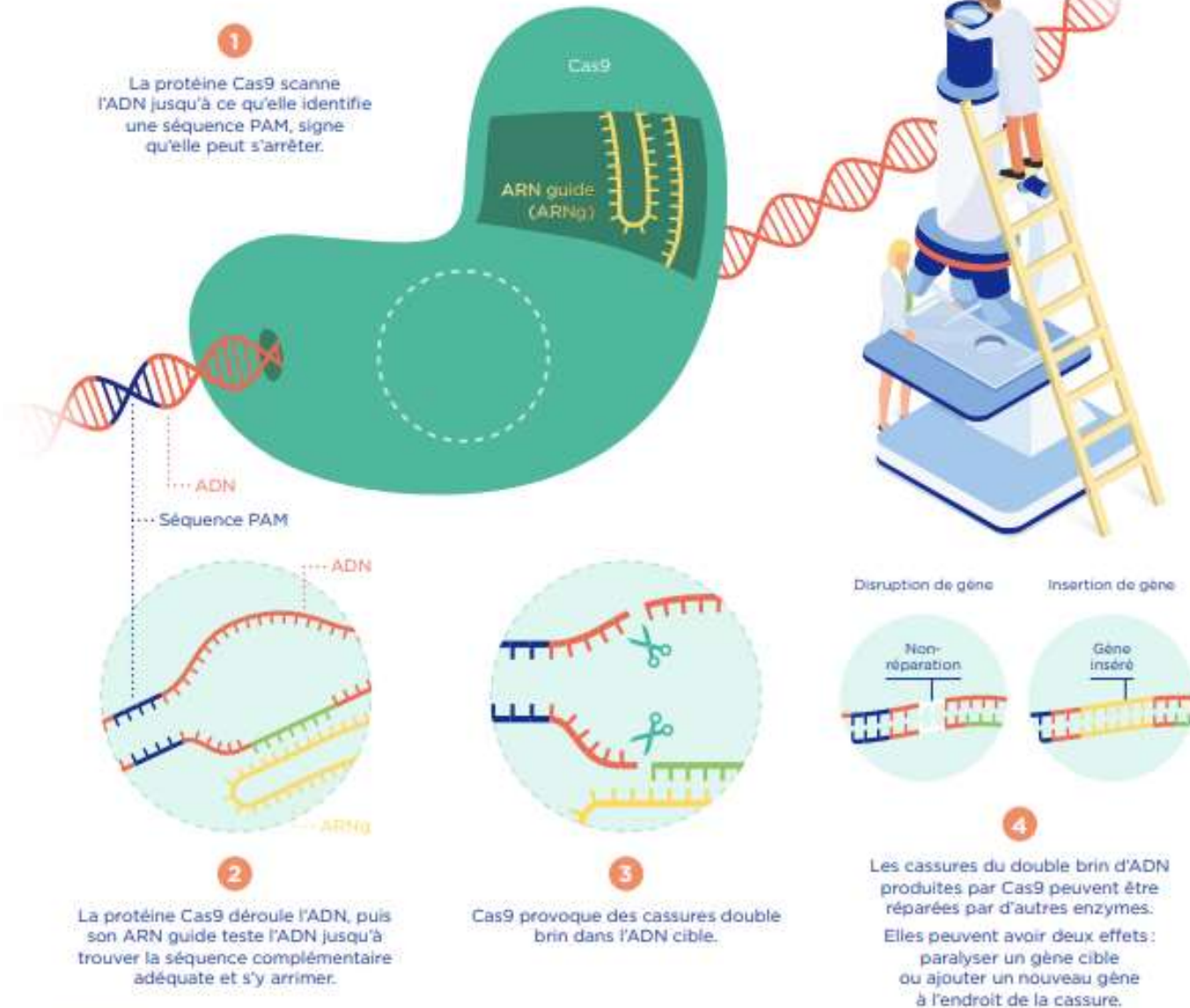
Cet évènement provoque un changement conformation de la Cas9 et le clivage des deux brins d'ADN (celui hybridé au **crRNA** et son complémentaire) par les domaines nucléases **HNH et RuvC**.

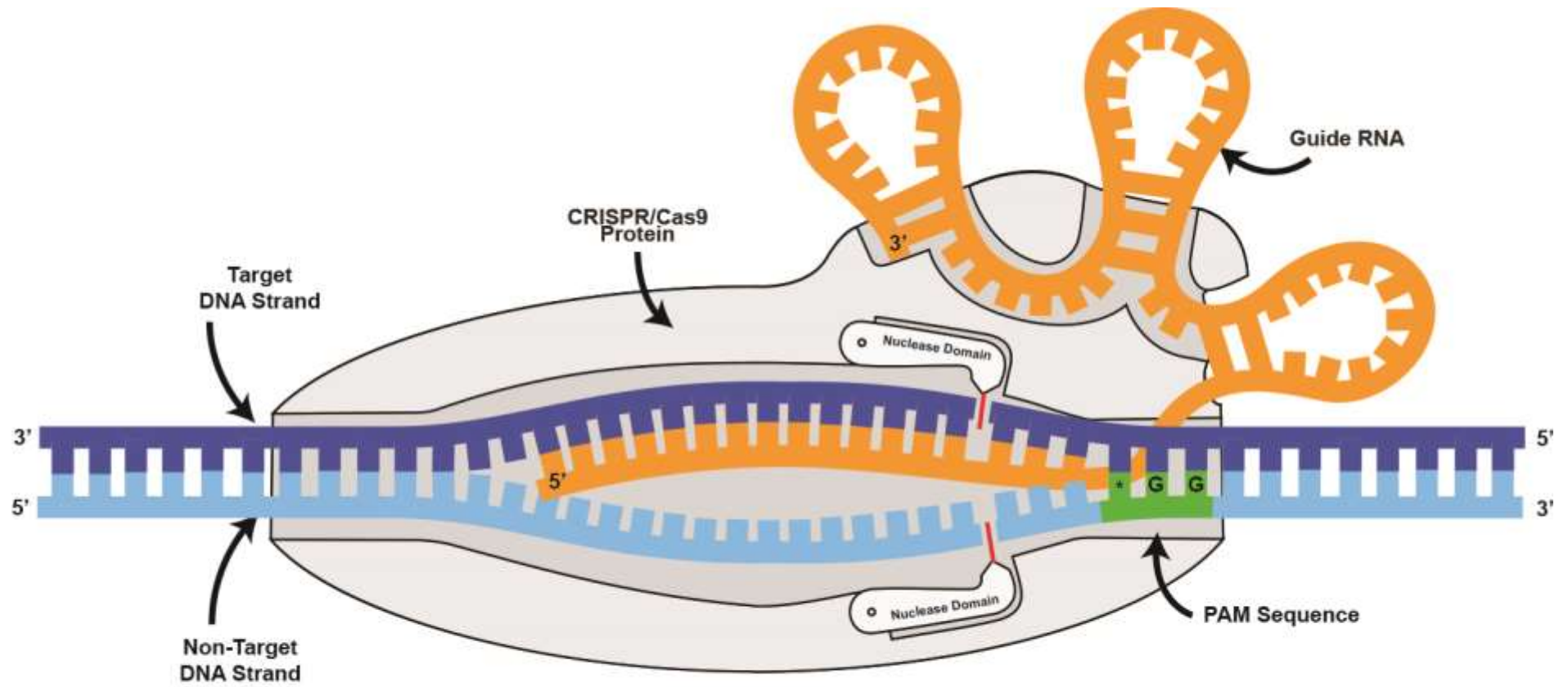


CRISPR..... is complicated.



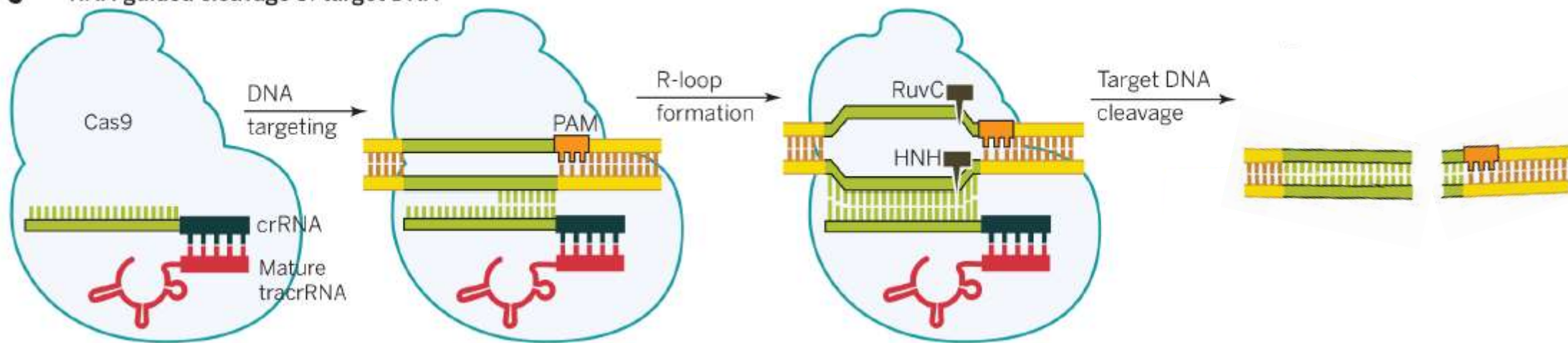
CRISPR-Cas9, L'OUTIL RÉVOLUTIONNAIRE POUR MANIPULER LE GÉNOME ?





CRISPR/Cas9 Protein

C RNA-guided cleavage of target DNA



Le système CRISPR-Cas est un système immunitaire adaptatif :

Une des particularités du système CRISPR-Cas, qui le différencie des autres mécanismes de défense contre les virus, est sa capacité à acquérir de nouveaux espaceurs (un système d'adaptation) et par le fait même de s'*immuniser* contre d'éventuelles infections.

Ce processus adaptatif se produit naturellement, grâce entre autres aux protéines Cas1 et Cas2 qui sont largement conservées dans les différents types de systèmes CRISPR-Cas. **Ces protéines agissent ensemble afin d'induire l'acquisition de nouveaux espaceurs dans le locus *CRISPR* à partir de l'ADN étranger. Cette acquisition n'est toutefois pas toujours aléatoire.**

Pour les systèmes de types I et II, de courts motifs (quelques nucléotides) adjacents aux proto-espaceurs, **les PAM (*protospacer adjacent motifs*)**, ciblent les régions qui sont susceptibles d'être intégrées dans le locus *CRISPR*. Ces motifs PAM, qui peuvent être différents selon le système CRISPR-Cas, seront également essentiels pour la coupure de l'ADN lors de l'étape d'interférence.

En effet, lorsque les bactéries sont exposées à des phages inactivés, la génération de bactéries résistantes à ces virus, grâce au système CRISPR-Cas, augmente proportionnellement. Ces virus défectueux créent en fait un environnement dans lequel l'ADN étranger peut entrer dans la cellule sans en causer la mort (par opposition à une infection virale normale), lui donnant ainsi tout le temps nécessaire à l'acquisition de nouveaux espaceurs. Cette étape rappelle étonnamment le processus de **vaccination** des humains !

Adaptation du système CRISPR à l'édition génomique:

- Pour la modification d'un gène avec la méthode CRISPR/Cas9 de façon ciblée, il faut composer à l'aide d'un ordinateur, puis synthétiser, une section d'ARN comportant au moins 18-20 bases et correspondant au brin d'ADN que l'on veut couper de façon complémentaire.
- En 2012, Jinek et ses collègues ont fusionné le crARN et le tracrARN de la bactérie *Streptococcus pyogenes* en un seul **ARN guide (ARNg)** qui induit de façon efficace le clivage par la Cas9. La Cas9 possède deux régions à activité nucléase, chacune permettant de cliver un brin de l'ADN cible.
- L'ensemble de l'ARN-guide et la protéine Cas9 font office de ciseaux moléculaires et coupent le génome à un endroit souhaité. Cela engendre une interruption de la double hélice et endommage l'ADN, qui doit alors être réparé.
- Dans un contexte d'édition de génome, une fois l'ADN double brin ciblé par l'ARNg coupé par Cas9, la cellule doit procéder à la réparation de son génome en utilisant ses systèmes de réparation.

A

sgRNA-Cas9 double-strand DNA break

Non- Homologous
End Joining

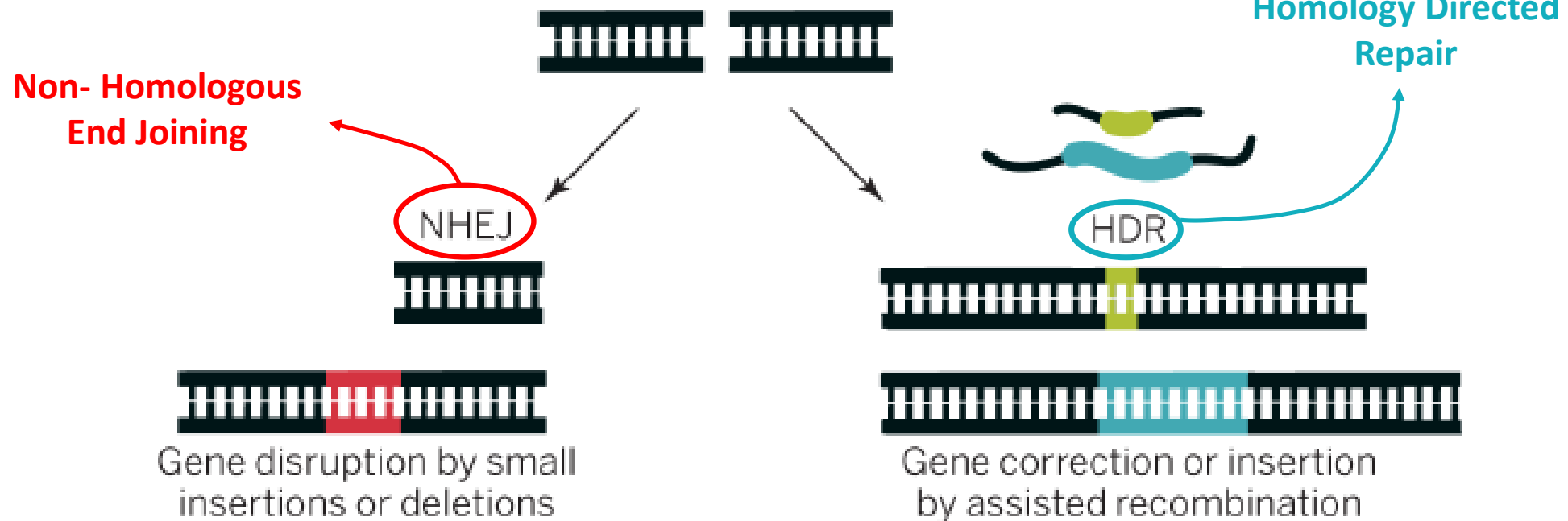
NHEJ

Homology Directed
Repair

HDR

Gene disruption by small
insertions or deletions

Gene correction or insertion
by assisted recombination



5. Les applications du système CRISPR :

- ❖ Ce système permet de **modifier spécifiquement** le gène cible dans des cellules de plantes, d'animaux et d'humains. Cette technologie peut donc être utilisée non seulement pour permettre de comprendre **le rôle d'un gène**, mais aussi de **développer des thérapies pour des maladies héréditaires et acquises**.
- ❖ Cette technique autorisée dans un but strictement **commercial** en avril 2016 par l'USDA (Département américain de l'agriculture) est applicable à de nombreux légumes ou fruits.
- ❖ Les possibilités d'inactiver les gènes de susceptibilité au mildiou de pommes de terre et de tomates, ou de susceptibilité à l'insecte pyrale du maïs, apparaissent, de manière plus pertinente, comme des progrès pour l'agronomie, entre autres pour limiter l'utilisation de fongicides et de pesticides.
- ❖ Cependant, les conséquences à long terme sur les espèces, les écosystèmes, voire l'alimentation, restent méconnues et justifient une attention soutenue.

- ❖ Les applications de la modification ciblée du génome, lorsqu'elles concernent le génome des cellules somatiques, ouvre la perspective de progrès en **thérapeutique humaine** (thérapie cellulaire avec des cellules souches hématopoïétiques corrigées du patient lui-même, traitement de cancers, de certaines infections virales...).
- ❖ Ainsi, plusieurs essais cliniques sont en cours notamment en Chine et aux Etats-Unis. Ils utilisent des lymphocytes T modifiés pour lutter contre des tumeurs (poumon, mélanome, myélome) ou des infections virales (inactivation du récepteur CCR5 dans l'infection **HIV**, comme évoqué), ainsi que des cellules souches hématopoïétiques modifiées dans le traitement de deux hémopathies, drépanocytose et β -thalassémie.
- ❖ Récemment, le traitement de la myopathie de Duchenne par thérapie génique somatique utilisant le modèle CRISPR-Cas 9 dans un modèle canin, si les résultats étaient confirmés, soulèverait de grands espoirs en termes de traitement de certaines maladies humaines.

Limites :

- **Eviter les mutations hors cible** : s'il est facile de cibler un gène spécifique avec CRISPR-Cas9, cela peut entraîner d'autres modifications non désirées en d'autres endroits du génome. Ces mutations non désirées peuvent modifier l'expression de gènes qui n'étaient pas ciblés, les inactiver, voire conduire à l'apparition de cancers.
- **Evaluer l'impact environnemental de la manipulation génétique** : l'édition du génome des moustiques est par exemple une solution étudiée pour éradiquer des maladies telles que le paludisme. Mais les scientifiques craignent que cette méthode échappe au contrôle et menace la biodiversité. Des gènes modifiés du moustique pourraient en effet être transmis à des insectes voisins, et donc stériliser des espèces vitales pour l'homme.
- **Régler les problèmes éthiques** : l'utilisation de ces **ciseaux génétiques** n'est évidemment pas sans réveiller le spectre de **l'eugénisme** et soulève donc un grand nombre de questions éthiques.

Le problème se pose avec d'autant plus d'acuité en matière de modification de cellules germinales (gamètes, par exemple), dont les mutations sont transmissibles.

Ces modifications sont strictement interdites par la convention d'Oviedo, signée en 1997, dans son article 13 concernant les interventions sur le génome humain. Pourtant, en 2018, un scientifique chinois, He Jiankui, a annoncé **la naissance de jumelles génétiquement modifiées**.