



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com


Éditorial

CRISPR-Cas9 : la révolution dans l'édition du génome dans les maladies rhumatologiques[☆]



I N F O A R T I C L E

Mots clés :
 CRISPR-Cas
 Rhumatologie
 Histoire
 Technologie
 Ingénierie du génome

Depuis longtemps, les chercheurs travaillent sur des méthodes d'ingénierie du génome pour modifier de façon contrôlée des séquences génomiques choisies, pour des utilisations en recherche fondamentale ou pour des applications thérapeutiques ou biotechnologiques. Ce fut le cas par exemple des nucléases artificielles à doigts de zinc (ZFN) et des *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN). En 2013, ces technologies ont été détrônées par la technologie CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* [CRISPR] et *CRISPR-associated proteins* [Cas]) qui s'inspire d'un mécanisme naturel de défense immunitaire développé par les bactéries.

1. Un peu d'histoire

Cette révolution technologique repose sur une longue histoire faite de découvertes successives dans des domaines aussi variés que les bactéries marines ou l'industrie du yaourt [1,2]. Tout débute en 1987 avec la première description d'une structure génomique particulière chez la bactérie *Escherichia coli* composée de séquences répétées palindromiques d'environ 30 paires de bases qui encadrent des fragments d'environ 36 paires de bases. Ces régions, ensuite appelées CRISPR, seront ensuite décrites dans de nombreuses souches bactériennes et trouvées associées à des gènes spécifiques, les gènes Cas. Une analyse bioinformatique des fragments d'ADN encadrés par les séquences répétées montre qu'ils proviennent de virus bactériens (dits phages) pour lesquels les bactéries sont devenues résistantes. Ainsi, naît l'idée que CRISPR est impliqué dans un système d'immunité adaptative où les fragments d'ADN encadrés par les séquences répétées sont des réminiscences d'infections virales passées, conservées par la bactérie au sein d'un

locus CRISPR pour contribuer à sa mémoire immunologique [3–5]. En 2007, plusieurs études apportent les évidences formelles que la fonction du système CRISPR-Cas est de conférer une immunité adaptative à la bactérie et démontrent la nécessité absolue de la nucléase Cas pour la mise en place de cette résistance aux infections [6]. La diversité des systèmes CRISPR-Cas est importante puisqu'ils sont retrouvés chez environ 50 % des bactéries et la quasi-totalité des archéobactéries. Cette diversité repose sur celle des protéines Cas. On distingue 2 groupes de CRISPR-Cas selon que le système fait appel à une seule (classe 2) ou plusieurs (classe 1) protéines Cas, qui sont divisés en plusieurs sous-types [7].

De manière générale, et quel que soit le type CRISPR-Cas, la première étape dite d'acquisition est initiée lors d'une première exposition de la bactérie à un ADN étranger (Fig. 1). Cet ADN étranger est reconnu par les nucléases Cas1 et Cas2, clivé et inséré dans le locus CRISPR du génome bactérien, entre des séquences répétées. Après transcription du locus CRISPR, un ARN précurseur (crARN pour CRISPR-ARN) est produit et s'hybride avec un petit ARN (tracrRNA pour *trans-activating CRISPR RNA*) par complémentarité de séquence avec les séquences répétées. TracrRNA permet à la ribonucléase III ou la Cas6 de cliver le précurseur crARN en fragments matures. L'ultime étape est la formation du complexe Cas/crARN/tracrRNA, appelé crRNP, qui assure la surveillance, la reconnaissance et enfin la coupure de l'ADN nouvellement introduit dans la bactérie lors d'une deuxième exposition. Cette coupure se produit à proximité d'une séquence spécifique appelée PAM, pour protospacer adjacent motif. L'acquisition successive de plusieurs ADNs étrangers dans le locus CRISPR permet ainsi à la bactérie d'acquies une résistance multiple à différentes infections virales et ainsi de construire une mémoire immunologique à long terme puisqu'intégrée à son génome.

À partir de 2008, avec la démonstration de la possibilité de reprogrammer l'immunité bactérienne grâce au système CRISPR-Cas [8] apparaît la proposition d'utiliser le système pour de l'ingénierie du génome. Mais il a fallu attendre 2012 avec la démonstration que les composants nécessaires et suffisants au fonctionnement du système CRISPR-Cas9 de type II sont Cas9, le crARN et le tracrARN [9,10] et que la séquence variable du crARN peut être modifiée à volonté pour cibler une séquence choisie. Cette démonstration a été faite simultanément dans deux systèmes bactériens : l'étude d'Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna sur le système CRISPR de la bactérie *Streptococcus pyogenes* [10] et celle de Philippe Horvath, Rodolphe Barrangou et Virginijus Siksnys sur *Streptococcus thermophilus* [9]. C'est alors le démarrage d'une

DOI de l'article original : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbbspin.2016.09.012>.

[☆] Ne pas utiliser, pour citation, la référence française de cet article mais la référence anglaise de *Joint Bone Spine* avec le DOI ci-dessus.

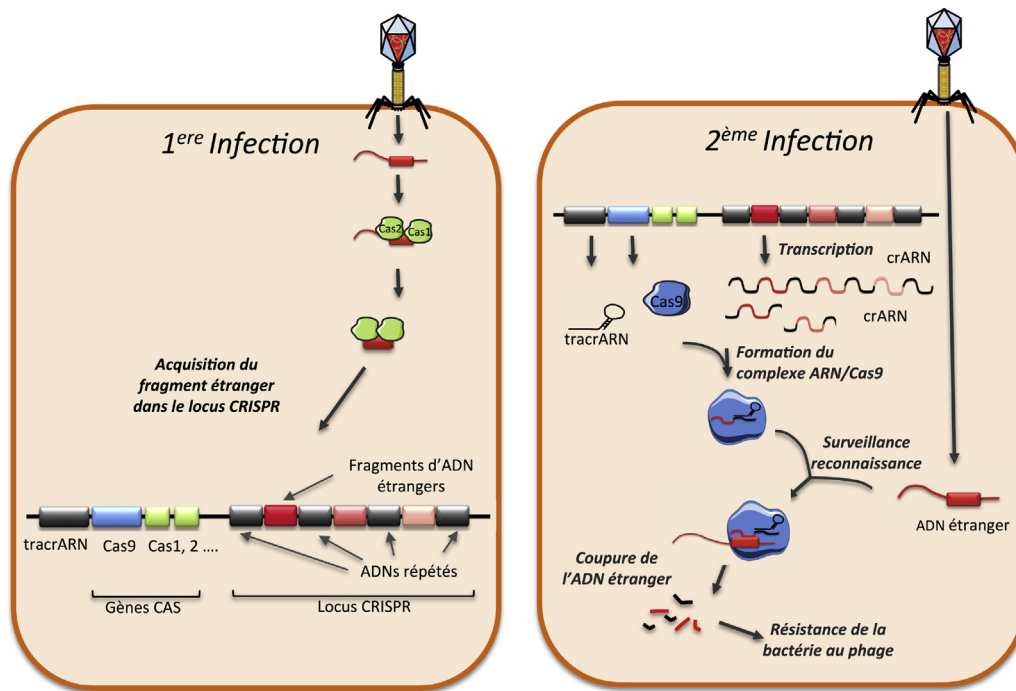


Fig. 1. Système CRISPR-Cas9 et immunité adaptative des bactéries.

nouvelle ère d'exploration des possibilités multiples qu'offre ce système pour des applications d'édition (c'est-à-dire de retouche) du génome dans des systèmes eucaryotes. À partir de 2013, l'utilisation et les applications du système CRISPR se sont multipliées de façon exponentielle dans tous les domaines de la biologie pour modifier de façon contrôlée le génome dans des cellules somatiques, germinales ou embryonnaires, depuis la levure jusqu'à l'Homme.

2. Comment cela fonctionne ?

Le principe d'action du système CRISPR-Cas peut être schématisé par un ciseau moléculaire guidé par l'ARN qui coupe l'ADN double brin. Ce système est basé sur l'induction d'une cassure double brin de l'ADN en un site choisi du génome grâce à l'utilisation d'une nucléase de la famille des Cas et d'une séquence d'ARN guide (gARN) homologue de la séquence d'ADN ciblée. Le gARN est naturellement constitué de 2 ARNs (tracrARN et crARN) mais peut être réduit à une seule construction ARN (aussi appelé sgARN pour single guide ARN) qui rend intramoléculaire l'interaction entre les séquences complémentaires du crARN et du tracrARN. L'endonucléase Cas9 spécifique des systèmes CRISPR de type II (Fig. 2a) contient deux domaines nucléase très conservés, RuvC et HNH. Le complexe gARN/Cas9 reconnaît la séquence cible sur l'ADN à partir d'un motif PAM (NGG pour la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* [S. py]). Au niveau du motif PAM, les brins de la double hélice de l'ADN cible sont séparés, suit la formation d'un hétéro-duplexe gARN/ADN cible. Les domaines HNH et RuvC de la Cas9 clivent respectivement les brins complémentaires et non complémentaires de l'ADN cible à exactement 3 paires de bases du motif PAM. Deux mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN sont alors sollicités : la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR) (Fig. 2b). Il est ainsi possible d'ôter, ajouter ou modifier à volonté le génome et par conséquent de générer des *knock-out* (KO) pour l'inactivation de gènes ou des *knock-in* (KI) pour l'addition ciblée de fonctions [11]. La génération de ces mutations ciblées peut être très efficace mais il est impossible d'exclure la possibilité de clivage de l'ADN dans un site non ciblé appelé effet « off-target ».

Plusieurs optimisations de la technique ont été développées afin d'améliorer la spécificité de la coupe sur l'ADN. Utiliser des algorithmes pour sélectionner une séquence de gARN optimale présentant un minimum d'effets « off-target » est évidemment très utile. Il existe aussi toute une famille de nucléases Cas9 issues de différentes espèces bactériennes avec des motifs PAM de taille différentes. Il a été montré qu'une Cas9 avec un PAM de 4 paires de bases telle que celle de *Staphylococcus Aureus* était plus spécifique que celle avec 2 paires de base de *S. py* [12]. Enfin, des variants de la Cas9 de *S. py* avec une plus forte spécificité ont été développés [13,14].

Les utilisations possibles du système CRISPR-Cas9 sont très diverses. Par exemple, on peut modifier plusieurs cibles simultanément en utilisant plusieurs guides [15]. Utiliser une version catalytiquement inactive de Cas9 (dCas9) ou des guides trop courts pour être capables d'activer l'activité nucléase permet de cibler en des régions choisies sur l'ADN des fonctions autres que la coupe, comme des activateurs ou des inhibiteurs de transcription (CRISPRa, CRISPRi) [16–19] ou d'introduire des protéines fluorescentes [20].

3. Les applications potentielles

La révolution technologique de l'approche CRISPR-Cas9 est venue détrôner toutes les autres approches d'édition du génome pour plusieurs raisons : sa facilité de mise en œuvre et son faible coût, associés à une très bonne efficacité. L'intérêt de cette technologie est à la fois scientifique et économique, avec des applications dans de nombreux domaines de la biologie, depuis l'acquisition de connaissances nouvelles jusqu'à des applications biotechnologiques dans l'agriculture et la médecine.

Dans le domaine de la recherche, l'utilisation du système CRISPR chez l'animal, les plantes ou dans des cellules permet de réaliser de façon relativement simple et rapide (quelques semaines) des études de génomique fonctionnelle dans un très grand nombre de systèmes biologiques et d'élucider des mécanismes fondamentaux du vivant. Il est également possible de reproduire chez l'animal une mutation responsable d'une maladie humaine afin de modéliser

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/5670115>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/5670115>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)