







République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi-Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de : Biologie Appliquée

---

## *Mémoire*

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master LMD

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Option :** Biologie moléculaire et cellulaire

# *Systeme CRISPR-cas9 et ses applications dans quelques pathologies humaines.*

**Présenté par**

*HADIDANE Chaima*

*NAIT HAMOUD Dorsaf*

**Devant le jury :**

<i>Dr. BENHAJ Mabrouka</i>	<b>Pr</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Présidente</b>
<i>Pr. MECHAI Abdelbasset</i>	<b>MAA</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Examinatrice</b>
<i>Dr. TOUMI Nassima</i>	<b>MCA</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Promotrice</b>

**Date de soutenance :** 09-06-2022

**Note :** ....

**Mention :** ....

# *Remerciements*

---

*Nous tenons à remercier toutes les personnes qui nous ont aidés lors de la rédaction de cette thèse.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier notre superviseur, le **Dr Toumi Nassima**, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils avisés qui ont permis d'alimenter notre réflexion.*

*Nous tenons également à remercier toute l'équipe pédagogique de la Faculté des sciences de la vie.*

*Nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance aux personnes suivantes :*

***Doctorant Abdelkarim Ben Khedir***

***Doctorant Bekkari Souhila***

***Doctorant Saker Hichem***

*Pour leur aide à la réalisation de ce mémoire :*

*Nous remercions également le directeur administratif de l'unité de l'information dans les universités égyptiennes et le délégué à l'université Beni Suef le **professeur Hossam Abdel Raouf Ali** pour son aide pour l'utilisation du programme de présentation (Prezi).*

*Enfin, nous ne pouvons pas terminer ces remerciements sans mentionner notre famille, à qui nous devons tant car avec leurs encouragements, leur soutien et leur amour, nous avons pu mettre fin à ce travail.*

# Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*A mon grand-père (Athamnia Said) et ma grand-mère (Athamnia. R).*

*A mes parents, surtout ma mère, la raison de mon bonheur (Athamnia.  
L).*

*A ma sœur, Assia pour son soutien dans toutes les situations et la  
princesse de la maison ma sœur Aya.*

*Jusque à la fin de ma vie, mes deux neveux (Saket Iyad et Saket  
Adem)*

*Pour tout ma famille*

*Tous mes amis.*

*Hadidane Chaima*

*Avant tout, je remercie Dieu de m'avoir donné la force, la santé, la  
volonté et le courage de faire le travail. Je dédie ceci à :*

*A Mon cher père **Djamel** qui m'a toujours encouragé.*

*A Ma chère et chère Mère **Fatma**, que tu as toujours apportez de  
l'amour.*

*A ma belle-sœur **Randa**.*

*A mon adorable frère **Badis**.*

*A mon amie **Chaima**.*

*A mes chers amis.*

*A ma grande famille **Nait Hamoud** et la famille **Haouam**.*

***Nait Hamoud Dorsaf***

## ملخص

تشكل التكرارات المتناوبة قصيرة متباعدة بانتظام (CRISPR) والبروتينات المرتبطة بها (CAS) للتسلسل المرتبط بـ (CRISPR) نظامًا دفاعيًا جديدًا مضادًا للفيروسات واسع الانتشار في بدائيات النوى.

يعمل النوع CRISPR-Cas9 مع gRNA الذي يوجه بروتينات Cas9 إلى الجينو المستهدف بحيث يكون gRNA مكملًا للجينوم المستهدف وبالتالي يضمن انشقاق التسلسل المستهدف بواسطة بروتينات Cas9.

على مر السنين، تم تطوير تقنية CRISPR-Cas9 لاستخدامها في المختبر كأداة لقطع الجينوم، بعد أن ثبت أن التقنية تقطع بشكل أكثر دقة وكفاءة. تم استخدامه في مجال العلاج الجيني، حيث تم تطبيقه على أكثر الأمراض شيوعًا في العالم (الأمراض أحادية الجين، والأمراض الفيروسية، وأمراض السرطان).

لذلك، تعد CRISPR-Cas9 أداة وراثية ثورية تشكل أملاً ووسيلة علاجية واعدة للبشرية في المستقبل للقضاء على أنواع أخرى من الأمراض.

**الكلمات المفتاحية: كريسبر، كريسبر-كاس 9، مرض جين واحد، مرض فيروسي، سرطان**

## *ABSTRACT*

---

Clustered regularly spaced short palindromic repeats (CRISPR) and their associated proteins (CAS for CRISPR associated sequence) constitute a new antiviral defense system widespread in prokaryotes.

The CRISPR-Cas9 type works with the gRNA that directs the Cas9 proteins to the target genome so that the gRNA is complementary to the target genome and thus ensures the cleavage of the target sequence by the Cas9 proteins.

Over the years, CRISPR-Cas9 technology was developed for use in the lab as a genome-cutting tool, after the technology was proven to cut more precisely and efficiently. It has been used in the field of gene therapy, as it has been applied to the most common diseases in the world (monogenic diseases, viral diseases and cancer diseases).

CRISPR-Cas9 is therefore a revolutionary genetic tool, which constitutes a hope and a promising therapeutic avenue for humanity in the future to eradicate other types of diseases.

**Keywords: CRISPR, CRISPR-Cas9, single gene disease, viral disease, cancer.**

## Résumé

Des répétitions palindromiques courtes regroupées régulièrement espacées (CRISPR) et leurs protéines associées (CAS pour CRISPR associated séquence) constituent un nouveau système de défense antivirale répandu chez les procaryotes.

Le type CRISPR-Cas9 fonctionne avec l'ARNg qui dirige les protéines Cas9 vers le génome cible afin que l'ARNg soit complémentaire du génome cible et assure ainsi la coupure de la séquence cible par les protéines Cas9.

Au fil des années, la technologie CRISPR-Cas9 a été développée pour être utilisée en laboratoire comme outil de découpe du génome, après que la technologie ait prouvé sa capacité à couper plus précisément et plus efficacement. Elle a été utilisée dans le domaine de la thérapie génique, telle qu'elle a été appliquée aux maladies les plus courantes dans le monde (maladies monogéniques, maladies virales et maladies cancéreuses).

CRISPR-Cas9 est donc un outil génétique révolutionnaire qui constitue un espoir et une piste thérapeutique prometteuse pour l'humanité à l'avenir d'éradiquer d'autres types de maladies.

**Mots clés : CRISPR, CRISPR-Cas9, maladie mono-géniques, maladie virale, cancer.**

*Table des matières*

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicaces</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Introduction</b>	01
<b>Chapitre I</b>	
I . Généralités sur CRISPR	02
I .1. Historique	02
I .2. Découverte de répétitions palindromiques chez les bactéries et archées	04
I .3. Découverte des gènes cas	05
I .4. Provenance des spacers (espaceurs)	06
I .5. Preuves expérimentales du Système Immunitaire Adaptatif (S.I.A) conféré par CRISPR-Cas	08
I .6. Découverte des CRISPR-ARN (crARN) et de leur maturation	10
I .7. CRISPR cible l'ADN	11
I .8. PAM ou protospacer adjacent motif	12
I .9. Découverte des ARN CRISPR trans-activant (tracr ARN) et la simplicité du système CRISPR-Cas	13
I .10. Reconstitution de CRISPR-Cas9 dans un organisme étranger	14
I .11. Étude de la cas9 in vitro	15
I .12. Du procaryote à l'eucaryote	16
<b>Chapitre II</b>	
II . Système CRISPR-Cas9	17
II .1. Introduction	17
II .2. Classification de système CRISPR et la diversité orthologue de Cas9	17

II .3. Relation structure-activité	19
II .3.1. Gène cas9	19
II .3.2. Protéines cas9	20
II .3.3. Structure de cas9 et le modèle de travail proposé pour la liaison d'ARN guide le gène d'ADN cible	21
II .3.3.1. Structure de bilobée de cas9	21
II .3.3.2. Liaison de la protéine à l'ARN guide puis à l'ADN	22
II .3.3.3. Structure du complexe ARN guide : ADN cible	23
II .4. Réparation de l'ADN	23
II .4.1. Non-Homologues End Joining Repair (NHEJ)	23
II .4.2. Homology Directed Repair (HDR)	24
II .5. Modification de l'ARN guide	25
II .5.1. Single guide ARN (sgRNA)	25
II .5.2. CRISPR multiplexe	26
II .6. Modification de la cas9	28
II .6.1. n cas9 ou cas9 nickase	28
II .6.2. d cas9 ou Dead cas9 : CRISPR interférence	28
II .6.3. d cas 9 fusion	29
II .6.3.1. d cas9 fusion régulatrice	29
II .6.3.2. d cas9 fusion pour l'imagerie génomique	33
II .7. Interaction protéines Cas9 génomes endogènes	34
II .8. Cas9 pour le ciblage de l'ARN	35
<b>Chapitre III</b>	
III . CRISPR-Cas9 et application dans quelques pathologies humaines	36
III .1. Introduction	36
III .2. Étude de la cible et sélection du gène à manipuler	36
III .3. Sélection de ARNg basée sur l'activité "on target" et "off target"	37
III .4. Synthèse et clonage d'ARNg	38

III.5. Vecteurs	38
III.6. Vecteurs CRISPR-Cas9 à l'intérieur de la cellule hôte	41
III.7. Validation	42
III.8. Application du CRISPR en pathologies monogénétiques	42
III.8.1. Maladie de Huntington	42
III.8.1.1 Définition	42
III.8.1.2. Arbre généalogique d'une famille présentant la maladie Huntington	43
III.8.1.3. Causes de la maladie Huntington	44
III.8.1.4. Application CRISPR sur la maladie de Huntington	44
III.8.2. Maladie de la mucoviscidose	45
III.8.2.1. Définition	45
III.8.2.2. Arbre généalogique d'une famille présentant la mucoviscidose	46
III.8.2.3. Cause de la maladie mucoviscidose	47
III.8.2.4. Application CRISPR sur la maladie de mucoviscidose	47
III.9. Applications du CRISPR en pathologies virales	48
III.9.1. Hépatite B	48
III.9.1.1. Définition	48
III.9.1.2. Cycle de vie de virus de l'hépatite B (HBV)	49
III.9.1.3. Cause de la maladie de l'hépatite B	49
III.9.1.4. Application du CRISPR sur la maladie de l'hépatite B	50
III.9.2. Maladies causées par le virus d'Epstein-Barr	51
III.9.2.1. Définition	51
III.9.2.2. Cycle de vie de virus EBV	51
III.9.2.3. Application du système CRISPR pour réduire les maladies liées aux virus EBV	52

## *Table de matières*

III.10. Application du CRISPR en cancérologie	53
III.10.1. Cancer du sein	53
III.10.1.1. Cancer du sein et ses principales causes	53
III.10.1.2. Supériorité de CRISPR – Cas9 dans la résolution de la résistance aux médicaments utilisés contre le cancer du sein	54
III.10.2. Cancer du poumon	55
III.10.2.1. Cancer du poumon et ses principales causes	55
III.10.2.2. Application du système CRISPR-Cas9 contre une des causes du cancer du poumon (les oncogènes)	56
Conclusion	58

*Liste des figures*

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Représentation schématique d'un système CRISPR.	06
02	Acquisition de nouveaux spacers dans CRISPR.	08
03	Illustration de la production des crARN à partir de la maturation des transcrits CRISPR.	11
04	Schéma montrant l'emplacement de cinq protospacers.	13
05	Représentation schématique du système CRISPR.	14
06	Régions minimales de tracrRNA et crRNA capables de guider le clivage de l'ADN médié par Cas9.	15
07	Organisation du locus CRISPR à partir des systèmes CRISPR de type II.	20
08	Gène codant spCas9.	21
09	Protéine Cas9.	22
10	Structure bilobée de Cas9	23
11	Illustration de réarrangements de la Cas9 après contact avec l'ARN guide.	24
12	Structure du complexe ARN guide : ADN cible.	24
13	Différentes stratégies pour introduire un double brin émoussé d'ADN.	25
14	Complexe Cas9-sgRNA.	26

15	Stratégie pour l'expression multiplex d'ARNg.	28
16	Diverses applications de l'édition multiplex du génome.	28
17	Stratégie d'interférence CRISPR (CRISPRi).	31
18	Système CRISPRi pour la répression de la transcription dans les bactéries et les cellules humaines.	31
19	Activation CRISPR (CRISPR a).	32
20	Présentation de l'imagerie CRISPR.	35
21	Plasmide pCRCT.	41
22	Construction finale de (pCRISP 22).	41
23	Vecteur pCRISP 22 avec un insert.	42
24	Plasmide CRIPSR-Cas9 à l'intérieur de la cellule hôte.	43
25	Arbre généalogique de la maladie Huntington.	45
26	Élimination de la mutation responsable de la maladie Huntington par CRISPR-Cas9.	47
27	Arbre généalogique de la mucoviscidose.	48
28	Stratégie de modification du génome à l'aide de CRISPR-Cas9 pour induire des cassures double brin dans le locus CFTR.	49
29	Correction de la mutation par recombinaison homologue.	50

30	Cycle de vie du virus de l'hépatite B.	52
31	Schéma de la stratégie de la suppression d'HBV par CRISPR-Cas9.	54
32	Cycle de vie de virus EBV.	55
33	Schémas supérieurs représentant l'expression CRISPR-Cas9 vecteur.	57
34	Application de CRISPR-Cas9 dans le traitement du cancer du poumon.	59

*Liste des abréviations*

**AAV:** Adeno Associated Virus

**ADN :** acide désoxyribonucléique

**ARN :** acide ribonucléique

**ARNg:** ARN guide

**Cas :** CRISPR associated sequence

**cccDNA :** ADN circulaire fermé par covalence

**CFTR:** Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

**CHB :** hépatite B chronique

**CrARN:** CRISPR-ARN

**CRISPR:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.

**CRISPR a :** activation CRISPR.

**CRISPR i :** Interférence CRISPR.

**csn2 :** Cas supplémentaires 2

**D cas9 :** Dead cas9

**dCas9 :  $\omega$  :** dCas9 est fusionné à la sous-unité  $\omega$  de RNAP.

**DDNA:** donor DNA

**DR:** direct repeat

**Dsb:** double stranded break

**CTD :** C Terminal Domain

**EBNA1 :** Antigène nucléaire 1 de l'EBV

**EBV:** virus d'Epstein-Barr

**E. coli:** Escherichia coli

**EGFP:** enhanced green fluorescent protein

**eGFP :** expression de la protéine fluorescente verte

**FISH :** fluorescence in situ hybridization

**FnCas9 :** Cas9 de *Francisella novicida*

**F508 :** exemple symbolique de la mutation de CFTR

**HBV :** Hépatite B virus

**HDR:** Homology Directed Repair

**HGT :** transfert horizontal de gènes

**HIV :** virus de l'immunodéficience humaine

**HNH :** un domaine d'endonucléase nommé pour les résidus caractéristiques d'histidine et d'asparagine

**HTT:** gène Huntington

**MH:** maladie de Huntington

**MV:** mucoviscidose

**N cas9 :** cas9 nickase

**NHEJ:** Non-Homologues End Joining

**NT :** non transcrit

**NUC :** lobe de nucléase

**PAM :** Protospacer Adjacent Motif

**PCR :** Polymérase Chain Réaction

**pCRISP22:** plasmids CRISPR 22

**PI :** domaine d'interaction avec PAM

**PR :** récepteur de la progestérone

**PSP1 :** plasmide protospacer1

**PUC18** : plasmide université de Californie

**REC** : recognition (domaines nucléase)

**RuvC**: un domaine endonucléase nommé d'après une protéine E. coli impliquée dans la réparation de l'ADN

**spCas9** : Cas9 de Streptococcus pyogènes.

**S.I.A** : Système Immunitaire Adaptatif

**SPIDR**: Spacers Interspaced Direct Repeats

**SP1** : protospacer1

**SgRNA**: single guide ARN

**TFBS**: transcription factor binding site

**TracrARN**: Trans activating CRISPR ARN

**RE** : récepteur des oestrogènes

**RNA P** : RNA polymérase

**rgRNA**: RNA-targeting guide RNA

**WED** : domaine de coin à dérive évolutive

**VHC** : virus de l'hépatite C

# *Introduction*

---

## Introduction

De nombreux procaryotes ont développé un mécanisme de défense naturel contre les plasmides et les virus connu sous le nom de système de nucléase CRISPR/Cas9. La manière la plus simple d'expliquer ce qui se trouve derrière l'acronyme difficilement prononçable CRISPR-Cas9 est : un ciseau moléculaire génétique (1).

Le système a été trouvé à ce jour dans de nombreux organismes archéens et bactériens et fait partie de leur réponse immunitaire qui met en œuvre efficacement un mécanisme de résistance acquise aux infections virales (2).

Le système CRISPR/Cas9 comporte deux composants. Le premier est représenté par les locus CRISPR. Ces locus comprennent des répétitions non contiguës qui sont interrompues par de courts segments de séquence appelés "espaceurs". La composition de la séquence de chaque espaceur est variable et correspond à la séquence d'ADN des éléments étrangers au génome procaryote en question tels que les phages et les plasmides. Le deuxième composant est représenté par les gènes de la nucléase Cas9 qui sont généralement proches des locus CRISPR (1).

Les loco CRISPR sont transcrits et transformés en ARN courts qui, à leur tour, guident les nucléases Cas9 vers les sites d'ADN étrangers à cliver. Grâce à sa simplicité conceptuelle et à sa puissance, le système a été rapidement adapté à de nombreuses utilisations dans les cellules des organismes supérieurs (2).

Pour implémenter expérimentalement le système CRISPR/Cas9 dans un but spécifique, il faut concevoir une séquence « guide », l'ARNg, qui mesure généralement 20 nt de long et est complémentaire de la cible visée. Une exigence supplémentaire est que la séquence ciblée soit suivie d'une séquence PAM telle que NGG, NAG, NNNNACA (N désigne l'un des quatre nucléotides A, C, G ou T) (3).

CRISPR est utilisé pour la première fois sur l'embryon humain et en clinique en 2016. Il est à la fois ce que l'homme désire, devenant ainsi l'outil d'édition le plus simple et le moins coûteux sur le marché. Le tout est empaquetable dans le vecteur de votre choix pour être introduit dans la cellule qui vous intéresse (1).

Actuellement, CRISPR promet des avancées sans précédent dans la piste de thérapie génique en ce qui concerne les maladies mono-génétiques, les maladies virales et le cancer (4).

# *Chapitre I*

---

## *Généralités sur CRISPR*

## **I. Généralités sur CRISPER**

La découverte du système CRISPR, est un mélange de hasard, de curiosité scientifique et de volonté d'innovation. Elle est le fruit de la convergence entre des travaux ayant pour objectif l'édition génomique et des recherches plus exploratoires dont le but était de percer les mystères d'une étrange structure génomique présente dans la nature (1).

Les humains ont voulu modifier la vie depuis des milliers d'années. Ils l'ont d'abord fait par reproduction sélective dans le but de renforcer certains traits de plantes et d'animaux. Mais nous n'avons que récemment compris les mécanismes moléculaires de ces modifications. Cette compréhension a débuté par l'élucidation des mécanismes de l'hérédité avec les travaux de Mendel et Morgan, puis il y a environ 70 ans elle s'est poursuivie avec la découverte de la structure en double hélice de l'ADN. En identifiant les éléments de base du code génétique, nous avons eu accès à une étude plus poussée du vivant (2).

### **I.1. Historique**

- Au début des années 1960, les scientifiques bombardaient des plantes avec des radiations dans l'espoir de causer des mutations aléatoires dans le code génétique et d'étudier leur impact. Puis au fur et à mesure les méthodes et les outils à disposition sont devenus plus précis
- À la fin des années 1970 les premiers séquençages génétiques apparaissent. L'avancée et l'accessibilité de ces techniques de séquençages permet peu à peu la réalisation de bases de données regroupant une grande partie des génomes de nombreux organismes, incluant l'homme. En parallèle l'utilisation et la découverte d'enzymes (ligases, polymérases et enzymes de restrictions) et de la PCR (Polymérase Chain Réaction) ont permis d'isoler les gènes et d'y introduire des mutations, que ce soit in vitro au sein des cellules, ou chez des modèles animaux. Grâce à ces techniques, la compréhension des mécanismes génétiques s'est approfondie et le génie génétique s'est développé.
- En 1987, un chercheur de l'université d'Osaka repère des séquences d'ADN un peu particulières dans le génome de bactéries *Escherichia coli*. Dans certaines Parties de ces séquences, les quatre lettres constitutives de l'ADN – adénine (A), guanine (G), cytosine (C) et thymine (T) – forment des suites immédiatement suivies des mêmes

suites en sens inverse : elles peuvent donc se lire dans les deux sens, formant ainsi des Palindromes. Ne sachant pas vraiment à quoi elles peuvent servir, ces énigmatiques séquences n'intéressaient personne dans un premier temps.

- En 2002, ces séquences sont appelées CRISPR pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.
- En 2005, une découverte supplémentaire : les morceaux d'ADN intercalés entre ces palindromes sont souvent des morceaux d'ADN de virus capables d'infecter des bactéries.
- En 2007, l'agro-alimentaire s'implique, des chercheurs de l'entreprise danoise Danisco découvrent que, parmi les bactéries *Streptococcus thermophiles* utilisées pour fabriquer des yaourts et des fromages, celles qui ont des séquences CRISPR survivent mieux aux infections virales.
- Les bactéries semblent en effet garder en mémoire dans leurs séquences CRISPR, l'ADN des virus les ayant préalablement infectées, ce qui leur permet de les repérer et de les combattre.
- Au cours des cinq années suivantes, les travaux de différents laboratoires permettent de comprendre que les ADN viraux des séquences CRISPR sont copiés en plus petites molécules nommées ARN qui s'attellent à une enzyme nommée Cas9. Dans la bactérie, si un ARN viral CRISPR associé à Cas9 croise un virus à l'ADN correspondant, il s'apparie à cet ADN. Une fois l'accrochage effectué, la protéine Cas9 élimine le virus en découpant les deux brins de son ADN.
- En 2012, l'Américaine Jennifer Doudna de l'université californienne Berkeley, et la microbiologiste française Emmanuelle Charpentier de l'université suédoise d'Umeå, ainsi que les chercheurs de l'entreprise Danisco, démontrent que l'ARN viral peut être remplacé par n'importe quelle séquence d'intérêt et que la simple association entre l'ARN CRISPR et la protéine Cas9 permet de couper l'ADN correspondant.
- En 2013, Premier succès sur des gènes humains : des équipes réussissent à supprimer des gènes dans des cellules humaines. La technique est appliquée à toutes sortes de cellules et d'organismes : riz, mouche.
- En 2013-2018, la technique est même modifiée pour que la protéine Cas9 ne coupe pas le gène ciblé mais stimule son expression.

- A l'été 2014, c'est à une maladie génétique incurable que s'attaquent les chercheurs : la myopathie de Duchenne, une dégénérescence musculaire due à des mutations sur le gène codant pour la protéine indispensable au bon fonctionnement des fibres musculaires. Ils parviennent à corriger cette mutation dans des embryons de souris, puis les réimplantent dans des mères porteuses. Neuf mois après leur naissance, les muscles étaient parfaitement normaux (1) (3) (4).

Le système CRISPR-Cas9 constitue donc une formidable technique de détection d'une séquence d'ADN particulière, et une paire de ciseaux redoutable et précise. La porte est ouverte à la détermination de la fonction d'un gène choisi, à sa suppression et à son remplacement (3).

## **I.2. Découverte de répétitions palindromiques chez les bactéries et archées**

Ce que l'on connaît aujourd'hui sous le nom de système CRISPR a été observé à la fin des années 1980 par des microbiologistes qui s'intéressaient à l'exploration du génome de bactéries et archées. En 1987, Ishino et coll. Après la séquence du gène *iap* dans le génome d'*Escherichia coli*, Durant leurs efforts pour parvenir à le séquencer. Ils trouvèrent des mystérieuses séquences : est une structure constituée de la répétition de cinq séquences conservées de 29 nucléotides, séparées par des espaceurs ou spacers uniques de 32 nucléotides. Une seconde étude par cette même équipe montre que cette séquence n'est pas codante et qu'elle est retrouvée dans d'autres espèces proches. Sa signification biologique est inconnue. Des structures similaires sont observées au cours des dix années suivantes par différentes équipes, chez des bactéries et des archées (1) (2).

On leur donna d'abord le nom Spacers Interspaced Direct Repeats ou (SPIDR) Le terme « Locus » fut utilisé pour nommer les zones où ces séquences étaient regroupées, Et «Spacer » désigna les séquences séparant les courts enchaînements palindromiques. Leurs principales caractéristiques furent relevées : Au sein d'une espèce unique telle que *Mycobacterium tuberculosis*, on observe un unique locus SPIDR, tandis que d'autres espèces, comme *M. Jannaschii*, contiennent 20 loco différents. Les loco SPIDR sont encadrés par une séquence Leader de 300-500 pb qui est conservée au sein d'une même espèce, mais ne l'est pas entre espèces différentes (1).

Les répétitions, appelées DR « direct repeat », semblent par contre posséder un palindrome qui pourrait leur conférer un rôle biologique. La présence d'un palindrome et la localisation des CRISPR dans certains génomes d'archées conduisent à proposer un rôle dans la réplication ou dans le transfert d'ADN, mais ces hypothèses apparaîtront inexactes. L'étude publiée en 2002 par Tang et coll. démontre que la structure répétée est transcrite abondamment chez *Archaeoglobus fulgidus*. Au cours de l'exploration de petits ARN, souvent impliqués dans la régulation de l'expression de gènes, les auteurs observent des ARN d'une taille correspondant à un DR plus un spacer, ainsi que des multiples de ces ARN et hybridant à différentes positions sur trois locus CRISPR. Ils en concluent qu'un long transcrit précurseur est mûri par coupures progressives en petits ARN et proposent l'hypothèse selon laquelle ces molécules pourraient jouer un rôle dans le fonctionnement du CRISPR (2).

### I.3. Découverte des gènes cas

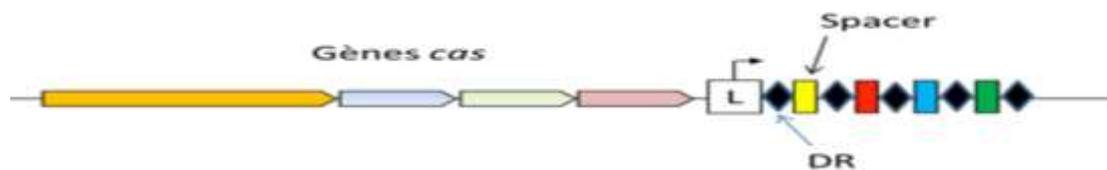
Dès 2002, Ansen et son équipe firent une découverte qui permettrait de mieux comprendre la biologie des séquences CRISPR. Ils observèrent qu'elles étaient toujours accompagnées par des familles de gènes qui étaient retrouvées seulement si les séquences CRISPR étaient aussi présentes. Ces gènes seraient appelés Cas, pour CRISPR Associated (1).

Parmi les gènes cas analysés dans cette étude, quatre gènes (Cas 1 à 4) sont conservés chez différentes espèces d'archées et de bactéries (2).

Un gène qu'ils nommèrent Cas1 était toujours associé aux CRISPR. L'étude des séquences des gènes Cas montra qu'ils codaient probablement pour des domaines hélicases et nucléases. La protéine codée par le gène cas3 montrait des motifs caractéristiques des hélicases de la superfamille 2, tandis que la protéine Cas4 comportait des motifs de la famille RecB des exonucléases (des domaines destinés à délier et à couper les acides nucléiques). Ces observations suggéraient que les protéines codées pouvaient être impliquées dans le métabolisme de l'ADN ou l'expression génique. La proximité géographique des séquences Cas avec les séquences CRISPR et la nature de leur produit amena à penser qu'il existait un lien entre les deux. Ils constitueraient le système CRISPR-Cas. L'étude montre que dans un génome possédant plusieurs CRISPR avec le même DR, un seul est associé au groupe de gènes cas. L'équipe décrit également le leader (300 à 500 pb),

une séquence flanquant le CRISPR sur un côté et possédant un motif TATA, et qui sera plus tard identifié comme le promoteur pour la transcription du CRISPR (Figure 1) (1).

Le séquençage de nouveaux génomes procaryotes conduit à découvrir la très grande diversité des gènes cas. Un travail de comparaison des protéines Cas présentes dans 200 génomes procaryotes complets permet à de proposer une première classification constituée de 45 familles et de multiples sous-types. Cette classification continuera à évoluer avec l'analyse de nouveaux génomes séquencés (2).



**Figure 01** : Représentation schématique d'un système CRISPR Cas. Le groupe de gènes cas est suivi du leader représenté par une boîte marquée. L et d'une succession de séquences DR (losanges noirs) séparés par les spacers (rectangles colorés) (2).

### I.4. Provenance des spacers (espaceurs)

En 2005 trois études montrant de manière indépendante que les spacers correspondent majoritairement à des séquences virales ou plasmidiques ont été publiées (2).

#### ✓ Etude de l'équipe de Francisco Mojica à l'Université d'Alicante :

Ils constatèrent que la séquence d'un spacer qu'ils avaient découvert chez une souche d'*Escherichia coli* était identique à celle du phage P1. Le Phage P1 est un virus bactériophage connu pour infecter de multiples souches d'*Escherichia coli*. Un détail allait avoir une importance majeure : la souche bactérienne sur laquelle ils enquêtaient était connue pour être résistante à ce phage. Après avoir répété cette procédure pour 4500 séquences spacers, 2% étaient similaires à des séquences connues, parmi elles les deux tiers correspondaient à des séquences virales ou à celles de plasmides. Les virus connus pour infecter les bactéries testées étaient ceux pour lesquels les spacers avaient la correspondance la plus complète. Selon eux : ces résultats pourraient impliquer une relation entre CRISPR et une immunité dirigée contre un élément envahisseur.

### ✓ **Etude de l'équipe d'Alexander Bolotin :**

L'équipe de Bolotin réalisa quelques mois plus tard des observations chez *Streptococcus* qui les conduisirent à des conclusions similaires. Ils montrèrent par ailleurs que la longueur des loci CRISPR est inversement proportionnelle au nombre de phages infectant la bactérie qui les contient. En résumé, plus la zone CRISPR contient de spacers, plus la bactérie est protégée contre un grand nombre de virus. L'hypothèse reliant CRISPR-Cas et défense immunitaire se confirmait. Cette équipe identifia deux nouveautés qui allaient par la suite prendre une importance majeure : la première était la structure inédite du système CRISPR-Cas chez *Streptococcus thermophilus*. Bien que ressemblant à ceux déjà observés, il ne possédait pas la plupart des multiples gènes Cas connus. L'un codant pour une grosse protéine dont l'activité prévue était une activité nucléase. Ils la nommèrent Cas9. Ils avaient découvert ce qui serait nommé dans la classification actuelle un système CRISPR de type II, le plus simple connu aujourd'hui. Par opposition à ce que nous appelons un système de type I dont l'activité repose sur un grand nombre de gènes et protéines Cas. La seconde nouveauté était l'observation d'une séquence conservée présente dans le génome des éléments envahisseurs. Cette séquence serait plus tard nommée PAM pour Protospacer Adjacent Motif et son rôle se révélerait indispensable au mécanisme du système.

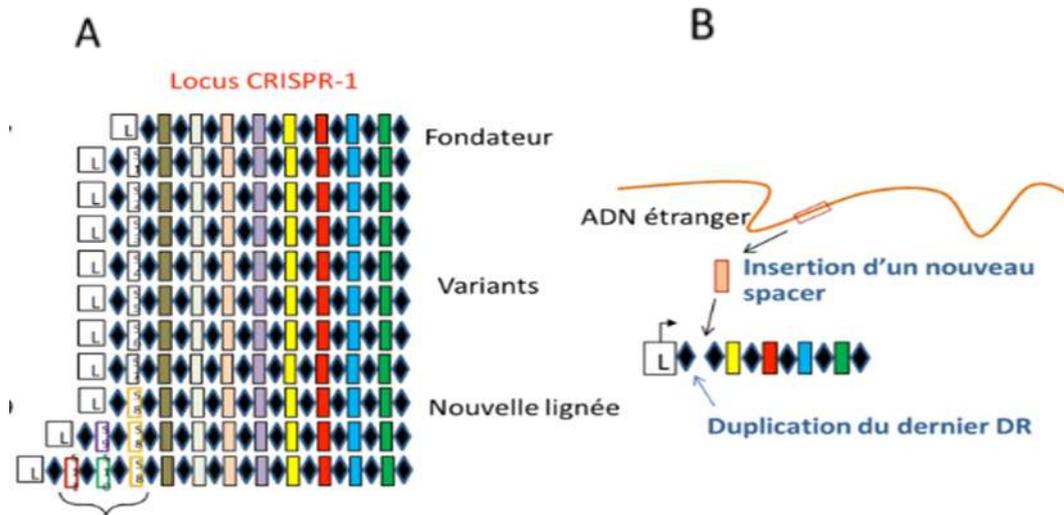
### ✓ **Étude de l'équipe de Christine Pourcel à l'Université Paris XI :**

La même année l'équipe de Christine Pourcel a identifié une évolution dynamique des séquences.

Ils identifièrent de «vieux» spacers ainsi que des nouveaux. Un portrait de l'évolution de ces CRISPR pouvait alors se dessiner. Ils montrèrent que l'addition de nouveaux motifs spacers se faisait de manière polarisée, c'est à dire proche d'une séquence leader (précédemment décrite par Jansen et son équipe). En terme d'activité, c'est à dire de nombre de nouveaux spacers acquis, le locus CRISPR le plus actif était majoritairement celui le plus proche des gènes Cas. Cette observation confirmait le rôle très probable des produits de ces gènes dans l'acquisition de nouveaux spacers et leur insertion.

En reliant les séquences des spacers à celles de prophages, les auteurs suggéraient que ce système faisait partie d'un mécanisme de défense capable de s'approprier des séquences d'éléments génétiques étrangers. Pour eux : ( CRISPR pourrait représenter la mémoire d'agressions génétiques passées). Ils montraient que ces séquences étaient collectées dans le but de lutter contre les virus dont elles provenaient en cas de réinfection. C'était un peu comme garder l'image de son ennemi dans sa poche. Leur publication dévoilait donc un

ensemble d'échanges dynamiques entre génomes viraux et les systèmes CRISPR des génomes bactériens. Il sera ultérieurement montré que d'anciens spacers sont perdus, et de nouveaux acquis, permettant ainsi à l'hôte de s'adapter dynamiquement aux infections par des virus nouveaux ou mutés.



**Figure 02 :** Acquisition de nouveaux spacers dans le CRISPR-1. **A :** organisation du CRISPR dans 11 allèles. Les spacers S1 à S11 sont nouvellement acquis pendant l'épidémie. **B :** mécanisme d'insertion d'un nouveau spacer près du Leader (L) (2).

### **I.5. Preuves expérimentales du Système Immunitaire Adaptatif (S.I.A) conféré par CRISPR-cas**

Tous les êtres vivants peuvent être soumis à l'action de parasites présents dans leur environnement. Les bactéries, qu'elles soient infectieuses ou non, sont susceptibles d'être infectées par certains types de virus : les bactériophages. De façon comparable aux organismes pluricellulaires possédant une immunité anti-infectieuse, les bactéries sont dotées de mécanismes de défense contre les bactériophages, appelé système immunitaire adaptatif (ou S.I.A) (1).

Plus généralement, ces mécanismes de défense protègent les bactéries de l'apport de matériel nucléaire exogène, qu'il soit issu de bactériophages ou d'autres bactéries (plasmides conjugalisé ou ADN libéré dans l'environnement et acquis par transformation naturelle) (4).

Cette fonction immunologiquement protectrice des CRISPR a été confirmée expérimentalement chez *Streptococcus thermophiles*, par des chercheurs affiliés à Danisco, une société produisant des starters bactériens pour l'industrie alimentaire. Les bactéries résistantes aux phages intéressent les entreprises qui produisent des souches de bactéries lactiques pour l'industrie laitière, car l'infection par les phages peut Ruiner les cultures industrielles. Depuis la découverte de leur fonction, les sociétés commerciales ont systématiquement créé des souches bactériennes résistantes aux phages par un processus apparenté à la vaccination : les bactéries sont exposées au phage et les bactéries survivantes sont criblées pour la présence de CRISPR. En raison de leurs histoires naturelles différentes et du fait que certaines souches commerciales peuvent avoir été intentionnellement vaccinées, les Loco CRISPR des bactéries du yogourt commercial produites industriellement peuvent différer, à la fois en taille et en identité d'espaceur, des loco CRISPR du yogourt traditionnel produit de manière traditionnelle. Le yaourt est généralement loué pour ses larges bienfaits pour la santé, mais les interactions des bactéries du yaourt avec le microbiome commensal ne sont pas entièrement caractérisées (5).

Le microbiome intestinal humain comprend un composant bactériophage qui varie d'une personne à l'autre ; le phage persistant peut être lié à des bactéries hôtes abondantes dans l'intestin. Les phages peuvent jouer un rôle clé dans la régulation de l'abondance bactérienne dans le microbiome. Si des bactéries avec des CRISPR les rendant résistantes à ces phages sont consommées, leur résistance pourrait potentiellement se propager aux bactéries commensales via un transfert horizontal de gènes, conduisant à une dysbiose (5).

Finalement ils découvrirent que CRISPR, en association avec les gènes Cas, conférait une résistance aux phages, la spécificité de celle-ci étant déterminée par la similarité entre les séquences spacers et celles des phages. Le retrait ou l'ajout d'un spacers pouvait modifier l'identité de cette résistance. Dans le cas où certains isolats de phages parviennent à vaincre cette immunité bactérienne, c'est parce que leurs séquences génomiques correspondant aux espaceurs diffèrent fortement, ne serait-ce que d'une seule base. Ce système immunitaire repose donc sur une adéquation précise entre la séquence des espaceurs et la cible virale (1).

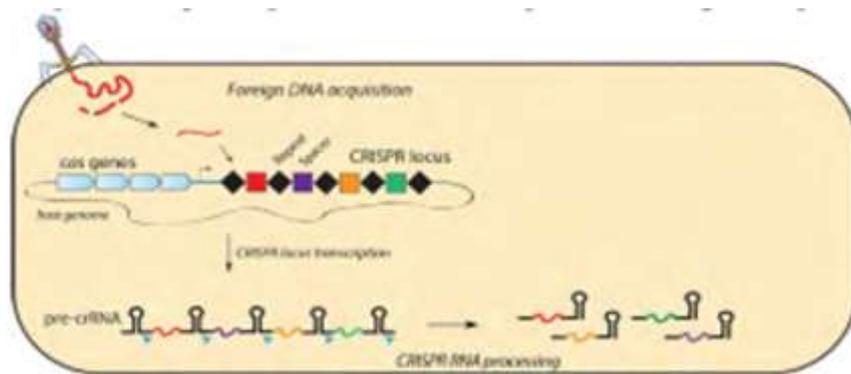
## **I.6. Découverte des CRISPR-ARN (crARN) et de leur maturation**

Les grappes de systèmes de défense à base de répétitions palindromiques courtes (CRISPR) protègent de nombreuses bactéries et archées contre l'invasion des plasmides conjugatifs, des éléments transposables et des virus. La résistance est acquise en incorporant de courtes étendues de séquences d'ADN envahissantes dans CRISPR. On pense que ces séquences intégrées fonctionnent comme une mémoire génétique qui empêche l'hôte d'être infecté par des virus contenant cette séquence de reconnaissance (7).

Le système *Escherichia coli* K12 CRISPR/cas comprend huit gènes cas : cas3, cinq gènes désignés cas ABCDE, cas1 et le gène endoribonucléase cas2. La purification par affinité du composant marqué a permis l'identification d'un complexe protéique composé de cinq protéines Cas : CasA, CasB, CasC, CasD et CasE, ce complexe est appelé Cascade. Afin d'étudier la fonction de Cascade. Les gènes cas en aval ou en amont, les cinq sous-unités Cascade et les pré-ARNcr K12 ont été exprimés dans *E. coli* BL21, dépourvu de gènes cas endogènes. Les résultats ont montré que des ARNcr d'environ 57 nucléotides n'étaient produits que dans les souches contenant le complexe Cascade. Les tests d'activité avec Cascade purifiée ont montré que le complexe est capable de cliver le pré-ARNcr de *E. coli* K12 en fragments d'environ 57 nucléotides *in vitro*. Ces fragments sont appelés CRISPR-ARN (crARN) Cependant, aucun clivage n'a été observé avec le pré-ARNcr de *E. coli* UTI89, qui contient des répétitions avec une séquence différente (6).

Les ARNcr servent d'ARN guide pour les enzymes Cas en permettant la reconnaissance spécifique de matériel génétique étranger ayant une séquence complémentaire. L'hybridation de ces ARNcr à une séquence génétique étrangère induit le clivage de cette séquence par les protéines Cas, aboutissant à sa dégradation, ce qui est appelé phase d'interférence. Ainsi, en induisant la dégradation du matériel génétique étranger, le système CRISPR/Cas confère une résistance à la bactérie (4).

Les résultats démontrent qu'un complexe de cinq protéines Cas est responsable de la maturation du pré-ARNcr en petits ARNcr qui sont essentiels à la médiation d'une réponse antivirale (figure 3). L'ARNcr lié à la cascade sert de guide pour diriger le complexe vers les acides nucléiques viraux pour méditer une réponse antivirale. Il a été conclu que la transcription des régions CRISPR et le clivage du pré-ARNcr en ARNcr matures par les protéines Cas est la base moléculaire de l'étape de défense antivirale du système CRISPR/cas qui fournit une résistance acquise aux virus chez les procaryotes (6), (7)



**Figure 03 :** Illustration de la production des crARN à partir de la maturation des transcrits CRISPR (1).

### I.7. CRISPR cible l'ADN

Le transfert horizontal de gènes (HGT) consiste en un échange direct de matériel génétique d'une lignée à une autre. Il est très fréquent chez les procaryotes (les bactéries et les archées) (8).

Les trois principaux mécanismes de transfert de gènes sont les suivantes : la transformation par acquisition d'ADN directement de l'environnement, la conjugaison qui est enclenchée par des plasmides conjugaux ou par des transposons conjugaux et la transduction par transfert d'ADN par phage. Cette dernière est particulièrement importante pour la propagation de la résistance aux antibiotiques. Des locus de répétition palindromique courts (CRISPR) regroupés, régulièrement espacés confèrent une immunité dirigée contre les phages. La fonction CRISPR ne se limite pas à la défense des phages, mais englobe plutôt un rôle plus général dans la prévention de l'HGT et le maintien de l'identité génétique (9).

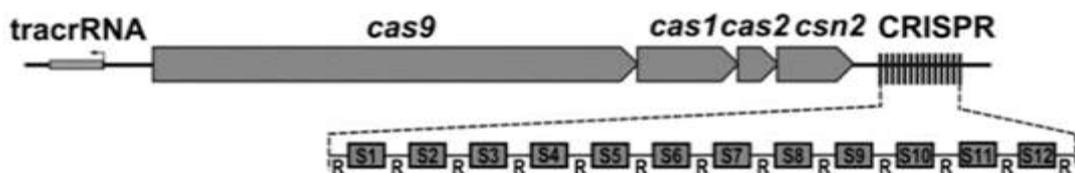
Un isolat clinique de *Staphylococcus epidermidis* abrite un espaceur CRISPR qui correspond au gène nickase présent dans presque tous les plasmides conjugatifs staphylococciques. Ici, nous montrons que l'interférence CRISPR empêche la conjugaison et la transformation plasmidique chez *S. epidermidis*. L'insertion d'un intron auto-épissant dans la nickase bloque les interférences malgré la reconstitution de la séquence cible dans l'ARNm épissé, ce qui indique que la machinerie d'interférence cible directement l'ADN. Les locus CRISPR neutralisent plusieurs voies de HGT et peuvent limiter la propagation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes (8).



## I.9. Découverte des ARN CRISPR trans-activant (tracrARN) et la simplicité du système CRISPR-cas

C'est à Vienne que Charpentier a pensé pour la première fois à CRISPR. Au début des années 2000, il s'agissait d'un domaine de niche : seule une poignée de microbiologistes prêtaient attention à l'étendue d'ADN nouvellement découverte et aux motifs curieux appelés CRISPR dans le génome de certaines bactéries. Différents systèmes CRISPR ont différentes manières d'organiser cette attaque ; tous les systèmes connus à l'époque impliquaient une molécule d'ARN appelée CRISPR RNA (8).

Charpentier s'intéressait à l'identification de sites dans le génome de *S. pyogènes* qui produisaient des régulateurs ARN et a découvert que la bio-informatique ne l'avait amenée que jusqu'à présent. Elle a donc noué une collaboration avec le microbiologiste moléculaire Jörg Vogel, qui a développé des méthodes de cartographie à grande échelle des ARN dans un génome. Il a accepté de cartographier *S. pyogènes* et en 2008, il avait des séquences de tous les petits ARN générés par la bactérie. La première a choisi que les chercheurs ont remarqué une surabondance d'un nouveau petit ARN qu'ils ont appelé ARN CRISPR trans-activant (tracrARN). D'après sa séquence et sa position sur le génome - c'était à un endroit que la bio-informatique de Charpentier avait prédit Comme étant proche du site CRISPR (figure 5), ils ont réalisé qu'il était très probable qu'il soit impliqué dans un système CRISPR qui n'avait Pas été décrit précédemment (12).

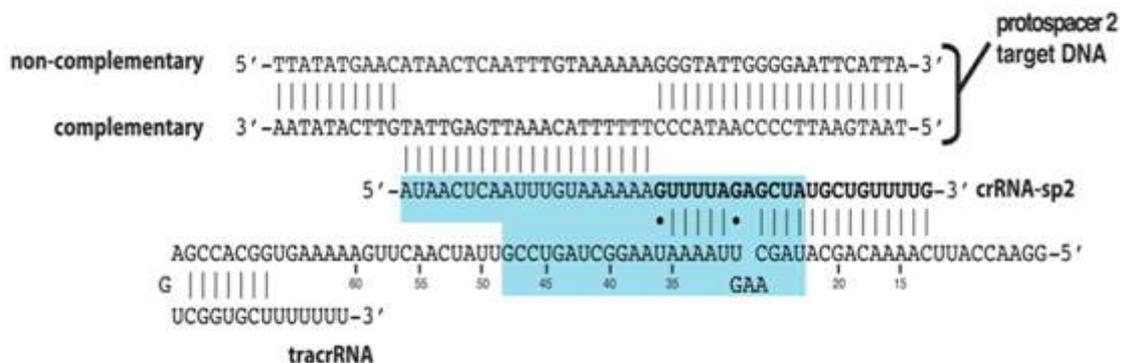


**Figure 05 :** Représentation schématique du système CRISPR/Cas9. Quatre gènes cas (*cas9*, *cas1*, *cas2*, *csn2*) sont situés en amont du réseau d'espaces répétés CRISPR, composé de 13 séquences répétées (R) et de 12 espaces uniques (S1 à S12). Le tracrRNA, est situé en amont du gène *cas9*. (Représenté par une flèche) par rapport aux autres éléments de ce système (08).

Charpentier soupçonnait que les deux ARN pourraient en fait interagir l'un avec l'autre pour guider Cas9 vers une séquence d'ADN particulière dans le virus. Le concept était radical ; ce type de travail d'équipe est courant pour les protéines, mais pas pour les ARN. Mais Charpentier « a toujours cherché l'inattendu plutôt que l'attendu dans un génome », dit Tuomanen. "C'est une personne très contre-culturelle"(12).

D'autres études prouvent que l'ARNc mature qui est apparié en bases à l'ARNc trans-activant (tracrARN) forme une structure à deux ARN qui dirige la protéine Cas9 associée à CRISPR pour introduire des cassures double brin dans ADN cible. (Figure 6)(14).

Charpentier et ses collègues ont commencé une longue série d'expériences pour explorer ce système, identifiant qu'il n'avait que trois composants - le tracrARN, l'ARNCRISPR et la protéine Cas9. Ce fut une surprise : "D'autres systèmes CRISPR impliquaient un seul ARN et de nombreuses protéines, et personne n'avait vraiment pensé que deux ARN pourraient être impliqués", explique Charpentier. Le système était si exceptionnellement simple qu'elle s'est rendu compte qu'il pourrait un jour être utilisé comme un puissant outil de génie génétique (12).



**Figure 06 :** Régions minimales de tracrRNA et crRNA capables de guider le clivage de l'ADN médié par Cas9 (région ombragée en bleu) (14).

## I.10. Reconstitution de CRISPR-Cas9 dans un organisme étranger

La vaccination d'E. Coli contre les plasmides et les phages a été effectuée via le système hétérologue CRISPR/Cas. Il existe des preuves solides suggérant que les systèmes CRISPR/Cas peuvent se déplacer entre des espèces distinctes chez Bactérie et Archée via un transfert horizontal de gènes (14).

Premièrement, le contenu CRISPR/Cas d'espèces ou de souches étroitement apparentées peut différer, tandis que d'autre part, des espèces évolutives éloignées (même à travers Bactérie et Archée) peuvent héberger des systèmes CRISPR similaires. Deuxièmement, il existe souvent un biais de codon et/ou une différence marquée de contenu en GC entre les locus CRISPR/Cas et le reste du chromosome. De plus, les éléments génétiques mobiles tels que les séquences d'insertion sont généralement situés à proximité des systèmes CRISPR/Cas, tandis que certains systèmes CRISPR/Cas sont situés sur de grands plasmides (> 40 kb) et même des prophages (14).

La première preuve expérimentale montrant que le système CRISPR /Cas de l'espèce Gram positive *S. thermophiles* peut être cloné dans un plasmide et transféré à un hôte Gram négatif *E. coli*. De plus, nous montrons que le système hétérologue offre une résistance contre les plasmides entrants et les phages qui portent des séquences de proto-espaces et des PAM correspondants. Cette découverte illustre que les systèmes CRISPR/Cas peuvent fonctionner comme des cassettes de gènes mobiles qui surmontent les barrières entre les espèces distantes. Ce transfert réussi d'un système CRISPR/Cas fonctionnel dans un hôte phylogénétiquement distant ouvre de nouvelles possibilités d'applications pratiques, notamment le transfert de systèmes CRISPR/Cas actifs entre espèces afin de "vacciner" des bactéries contre des virus ou des plasmides (15).

### I.11. Étude de la cas9 in vitro

Le complexe Cas9-ARNc clive l'ADNdb dans le protospacer. Pour tester l'activité in vitro du complexe Cas9-ARNc purifié, l'oligoduplex SP1 contenant une séquence protospacer (protospacer 1) identique à spacer 1 dans le réseau CRISPR. Pour tester si le complexe Cas9-ARNc peut reconnaître le protospacer in vitro et couper l'ADN dans de longs substrats d'ADN imitant in vivo l'ADN étranger envahissant, les chercheurs ont analysé le clivage de pSP1 portant le protospacer 1 et le PAM qui l'accompagne. En présence du complexe Cas9 – ARNc, la forme super-enroulée du plasmide pSP1 a été convertie en une forme linéaire, indiquant un clivage de l'ADN, mais le plasmide pUC18 dépourvu de protospacer 1 n'a pas été clivé. Ainsi, les deux brins du plasmide pSP1 ont été clivés spécifiquement dans la région du protospacer. Ensuite le séquençage direct a été effectué pour déterminer les extrémités de la molécule d'ADN linéaire générée par le clivage de l'ARNc Cas9. Les résultats du séquençage ont confirmé que le clivage de l'ADN plasmidique s'est produit à 3 nt de

l'extrémité terminale de l'espaceur adjacent à la séquence PAM, comme on le voit dans le clivage de l'oligoduplex SP1. La position de clivage identifiée dans les expériences in vitro pour le système CRISPR/Cas de *S. thermophiles* est identique à celle in vivo pour le système déterminé CRISPR/Cas de *S. thermophiles* (13).

## **I.12. Du procaryote à l'eucaryote**

La découverte du système CRISPR-Cas9 dans les archées et les bactéries a ouvert la voie et a conduit les scientifiques à imiter la même technique et le même mécanisme pour introduire des modifications délibérées et spécifiques dans le génome des cellules eucaryotes (10).

La première application de CRISPR à une cellule eucaryote est réalisée par Feng Zeng et Gorge Church qui ont utilisé la technologie CRISPR pour éditer des cellules de mammifères (16).

La capacité d'effectuer l'édition multiplex du génome chez les mammifères cellules permet des applications puissantes à travers la science fondamentale, la biotechnologie et la médecine (10).

Des scientifiques chinois ont réussi à cloner 5 singes macaques génétiquement modifiés pour induire des symptômes de trouble du sommeil (16).

En effet, la découverte de CRISPR a ouvert la voie à des applications illimitées, les scientifiques ont utilisé ces techniques pour éditer, supprimer, ajouter avec précision et remplacer la séquence d'ADN et désactiver le gène d'intérêt de différents organismes allant du procaryote à l'eucaryote (15).

# *Chapitre II*

---

## *Système CRISPR- Cas 9*

## **II. Systeme CRISPR-cas9**

### **II.1. Introduction**

Les bactéries et les archées se défendent contre l'ADN invasif à l'aide de systèmes immunitaires adaptatifs comprenant des loci CRISPR et des gènes associés à CRISPR (Cas). En association avec les protéines Cas, les petits ARN CRISPR (ARNcr) guident la détection et le clivage de séquences d'ADN complémentaires (19).

Il existe trois types de système CRISPR (CRISPR type I, CRISPR type II, CRISPR type III). Dans ce chapitre, nous discuterons plus profondément le deuxième type de système CRISPR (CRISPR-Cas9) (relation structure-activité, structure de cas9 et le modèle de travail proposé, réparation de l'ADN, modification de l'ARN guide et le Cas9 ... etc)

### **II.2. Classification de système CRISPR et la diversité orthologue de cas9**

Les génomes peuvent avoir un ou plusieurs loci CRISPR et, chez certaines espèces, ces loci peuvent constituer une partie importante du chromosome. Tous les locus CRISPR n'ont pas de gènes cas adjacents et reposent plutôt sur des facteurs transcodés (18).

Les protéines Cas forment un groupe très diversifié. Beaucoup sont prédits ou identifiés pour interagir avec les acides nucléiques ; par exemple. Comme les nucléases, les hélicases et les protéines de liaison à l'ARN. Les protéines Cas1 et Cas2 sont impliquées dans l'adaptation et sont pratiquement universelles pour les systèmes CRISPR-Cas. D'autres protéines Cas ne sont associées qu'à certains types de systèmes CRISPR-Cas. La diversité des protéines Cas, la présence de plusieurs locus CRISPR font de la classification une tâche complexe (18).

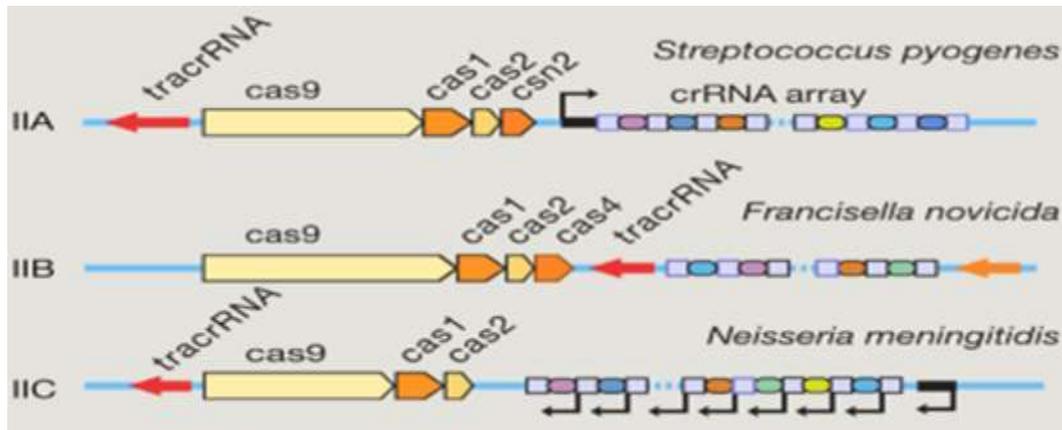
La classification la plus adoptée identifie les systèmes CRISPR-Cas de type I, II et III, chacun ayant plusieurs sous-groupes. Différents types de systèmes CRISPR-Cas peuvent coexister dans un même organisme. Récemment, un système de type IV a été proposé, qui contient plusieurs gènes Cascade mais pas de CRISPR, cas1 ou cas2. Le complexe de type IV

serait guidé par l'interaction protéine-ADN, non constitué par l'ARNc, et en tant que système immunitaire inné pré-régulé pour attaquer certaines séquences (17).

- ✓ Les systèmes de type I sont définis par la présence de la protéine signature Cas3, une protéine à la fois hélicase et DNAase responsable de la dégradation de la cible. Actuellement, six sous-types du système de type I sont identifiés (type I-A à type I-F) qui ont un nombre variable de gènes cas. Hormis cas1, cas2 et cas3, tous les systèmes de type I codent un complexe de type Cascade, Cascade lie le crRNA et localise la cible.
- ✓ Les systèmes CRISPR-Cas de type II codent Cas1 et Cas2, la protéine de signature Cas9 et parfois une quatrième protéine (Csn2 ou Cas4). Cas9 aide à l'adaptation, participe au traitement du crRNA et clive l'ADN cible assisté par le crRNA et un ARN supplémentaire appelé tracrRNA. Les systèmes de type II ont été divisés en sous-types II-A, II-B et II-C mais récemment a été proposé les gènes csn2 et cas4, tous deux codant pour des protéines impliquées dans l'adaptation sont présents respectivement dans le type II-A et le type II-B, tandis que le type II-C est dépourvu d'un quatrième gène.
- ✓ Les systèmes CRISPR-Cas de type III contiennent la protéine signature Cas10 dont la fonction n'est pas claire Fait intéressant, alors que tous les systèmes de type I et II sont connus pour cibler l'ADN, les systèmes de type III ciblent l'ADN et/ou l'ARN.

Cas9 est exclusivement associé au locus CRISPR de type II. La classification des sous-types des locus CRISPR de type II est basée sur l'architecture et l'organisation de chaque locus CRISPR. Cependant, cette classification ne reflète pas la diversité structurale des Protéines Cas9, qui présentent une homologie de séquence et une variabilité quelle que soit la classification du sous-type de leur locus CRISPR parental. Sur > 1 000 nucléases Cas9 identifiées à partir de bases de données de séquences (UniProt) basées sur l'homologie, et la longueur de protéine allant approximativement de 900 à 1600 acides aminés. La distribution de longueur de la plupart des Cas9 les protéines peuvent être divisées en deux populations centrées autour 1 100 et 1 350 acides aminés de longueur. Il est à noter qu'une troisième population de grandes protéines Cas9 appartenant au sous-type IIA, contient généralement environ 1500 acides aminés acides (18).

Malgré la diversité apparente de la longueur des protéines, toutes les protéines Cas9 partagent une architecture de domaine similaire, consistant en domaines RuvC et HNH nucléase et REC, une région riche en hélice  $\alpha$  avec une hélice de pont riche en Arg (18).

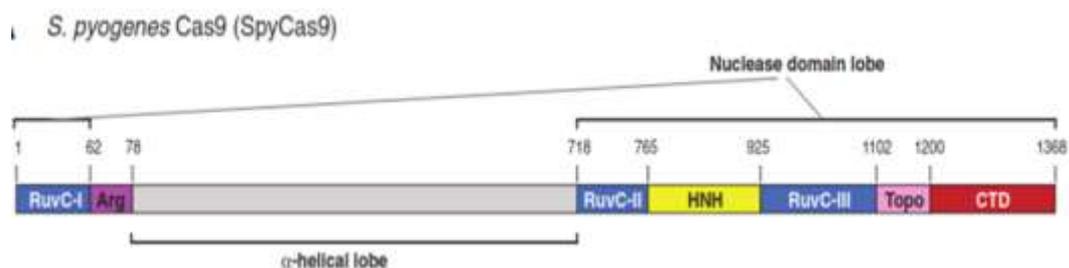


**Figure 07 :** Organisation du locus CRISPR à partir des systèmes CRISPR de type II. Qui peuvent être classés en IIA-IIC en fonction de leurs groupes de gènes cas. Alors que les locus CRISPR de type IIC contiennent l'ensemble minimal de cas9, cas1 et cas2, IIA et IIB conservent leurs gènes signatures csn2 et cas4, respectivement (18).

### II.3. Relation structure-activité laisse le rouge

#### II.3.1. Gène cas9

La figure 08 représente le gène qui code la protéine Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (19).

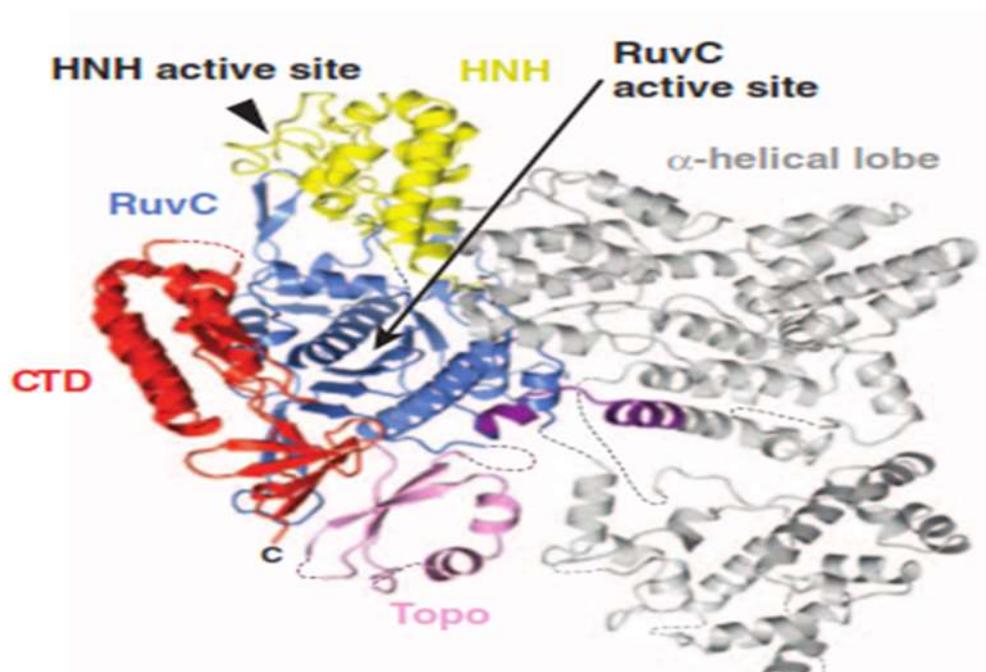


**Figure 08.** Gène codant spCas9 (19).

Les deux domaines nucléases sont RuvC et HNH, le domaine RuvC en bleu est composé de trois segments discontinus (RuvC-I à RuvC-III), un lobe  $\alpha$ -hélicoïdal (en gris) inséré entre le premier et le deuxième segment. En jaune le domaine HNH inséré entre le deuxième et le troisième segment. Le site Arg. en violet, région riche en arginine. La séquence Topo en rose est un domaine présentant des homologies avec les topo-isomérases. Le CTD, C Terminal Domain représenté en rouge (19).

### II.3.2. Protéines cas9

Les protéines Cas9 sont abondantes dans tout le règne bactérien, mais varient considérablement en séquence et en taille. Toutes les enzymes Cas9 connues contiennent un domaine HNH qui clive le brin d'ADN complémentaire de la séquence d'ARN guide (brin cible) et un domaine de nucléase RuvC nécessaire pour cliver le brin non complémentaire (brin non cible), produisant des ruptures d'ADN double brin. De plus, les enzymes Cas9 contiennent une région riche en arginine (riche en Arg.) hautement conservée précédemment suggérée pour méditer la liaison de l'acide nucléique (figure 09) (19).



**Figure 09** : Protéine Cas9 (19).

### **II.3.3. Structure de cas9 et le modèle proposé pour la liaison d'ARN guide et le gène d'ADN cible**

#### **II.3.3.1. Structure de bilobée de cas9**

Cas9 adopte une architecture bilobée composée d'un lobe de nucléase (NUC) et d'un lobe de reconnaissance  $\alpha$ -hélicoïdale (REC) (Figure 10). Le lobe NUC contient le domaine de nucléase HNH, le domaine de nucléase de type RuvC, un domaine d'interaction avec PAM (PI) et un domaine de coin à dérive évolutive (WED). Les domaines de la nucléase RuvC et HNH utilisent respectivement un mécanisme à deux métaux et un mécanisme à un seul métal pour cliver chacun des doubles brins d'ADN. Le domaine PI interagit avec la région PAM de l'ADN par une interaction spécifique à la base et contribue à la spécificité de la cible ADN de Cas9. Le domaine WED est important pour la reconnaissance de sgARN (la forme fusion du tracrARN et du crARN), et il interagit également avec le squelette de la région PAM. Le lobe REC hélicoïdal est également diversifié parmi les différents Cas9, et il contient des régions qui contribuent à la reconnaissance des hétéro-duplexes ARN guide-ADN cible (21).

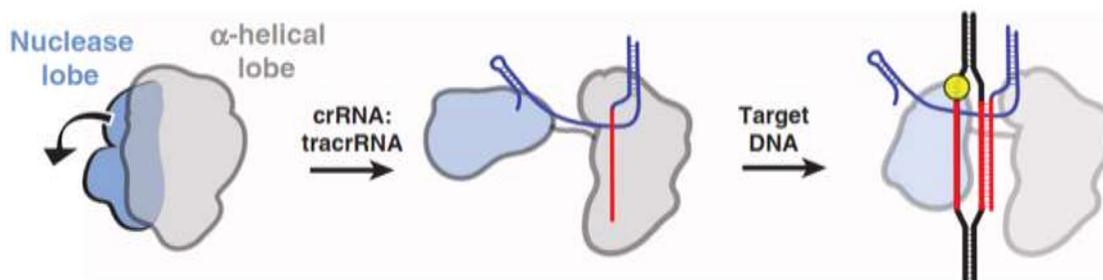


**Figure 10** : Structure bilobée de cas9. Lobe de nucléase (NUC) (en bleu), Lobe de reconnaissance  $\alpha$ -hélicoïdale (REC) (en gris) (19).

### II.3.3.2 Liaison de la protéine à l'ARN guide puis à l'ADN

Des études structurales de SpCas9 ont permis de mieux comprendre le mécanisme de clivage. Les structures cristallines de SpCas9 dans son état non lié, SpCas9 en complexe avec un seul ARN guide et SpCas9 en complexe avec l'ARN guide et son ADN cible ont révélé que SpCas9 subissait un réarrangement conformationnel lors de l'association avec l'ARN guide (20).

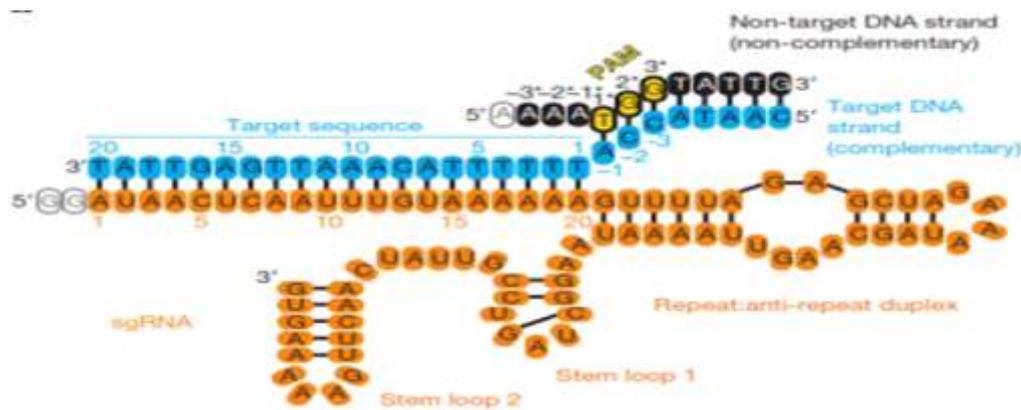
Lors de la liaison du guide crRNA : tracrRNA, les deux lobes structuraux de Cas9 se réorientent de telle sorte que les deux fentes de liaison d'acide nucléique se font face. Cela génère un canal central de liaison à l'ADN, qui permet d'accéder à l'ADN cible. La liaison à l'ADN cible dans le canal central et la formation de boucles R(ou l'hybride ARN-ADN) dépendantes de PAM entraînent un autre réarrangement structural. Ici, le lobe du domaine de la nucléase subit une rotation supplémentaire par rapport au lobe  $\alpha$ -hélicoïdal, enfermant complètement la cible d'ADN, et les deux domaines de la nucléase engagent les deux brins d'ADN pour le clivage (19).



**Figure 11 :** Illustration des réarrangements de la Cas9 après contact avec le guide ARN. En rouge : séquence ARN complémentaire à l'ADN cible et portion du double brin d'ADN contenant cette séquence complémentaire. En jaune : séquence PAM, en Noir double brin d'ADN non ciblé (19).

### II.3.3.3. Structure du complexe ARN guide : ADN cible

Dans ce schéma (Figure 12), nous montrons la structure du complexe ARN guide : ADN cible.



**Figure 12** : Structure du complexe ARN guide : ADN cible. L'ARN guide est coloré en orange, le brin d'ADN cible en bleu clair et le brin d'ADN non cible en noir. Le tri nucléotide 59-NGG-39 PAM dans le brin non cible est sur ligné en jaune (22).

## II.4. Réparation de l'ADN

Le clivage des deux brins d'ADN se produit par Cas9, Créer des cassures double brin (DSB), Si elle n'est pas réparée, la rupture induite entraînera la mort cellulaire. Heureusement, les cellules peuvent compter sur de deux distinctes de réparation de l'ADN pour survivre : (23)

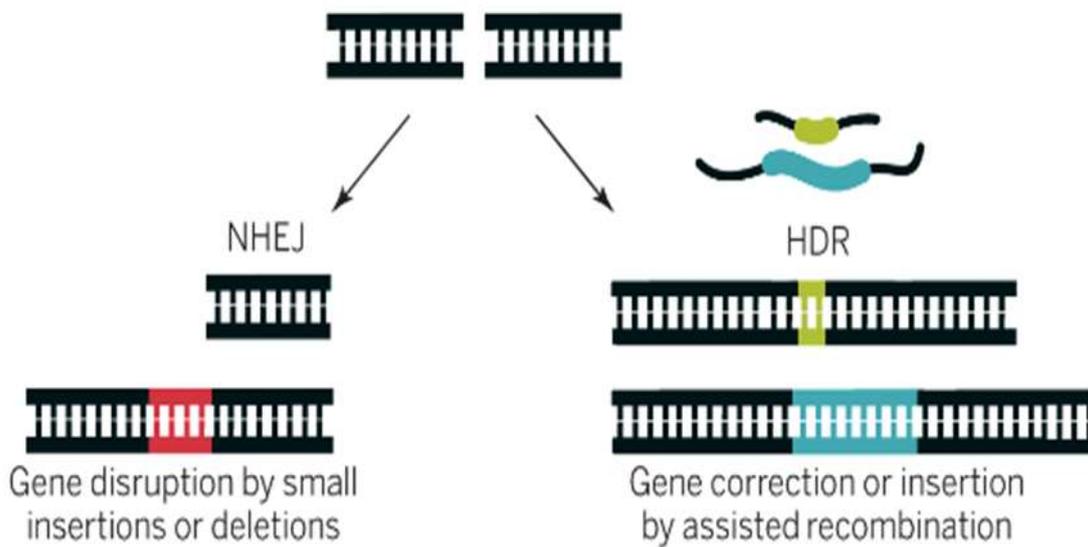
### II.4.1. Non-Homologues End Joining Repair trouver la traduction en fran (cais NHEJ)

Cette approche ligature les extrémités clivées directement sans l'utilisation de modèles homologues alors qu'en HDR, elle nécessite une séquence homologue aux deux extrémités pour guider les réparateurs.

Lorsque l'absence de l'ADN du donneur, cela conduit à l'inactivation du gène / à la suppression du gène. Alors que la présence d'ADN donneur aidera à l'insertion du gène. Cependant, c'est une méthode sujette aux erreurs par rapport aux autres (24).

### II.4.2. Homology Directed Repair (HDR)

HDR insère une séquence homologue contenant un modèle donneur dans le locus cible. Les cellules utilisent les informations contenues dans les modèles du donneur pour réparer les cassures double brin. IL en result UN Knock in (une modification génétique) (24).



**Figure 13 :** Différentes stratégies pour introduire un double brin émoussé d'ADN, qui va se diviser en locus génomiques deviennent des substrats pour réparation endogène de l'ADN cellulaire machines qui catalysent des non-homologues fin de jonction (NHEJ) ou réparation dirigée par homologie (HDR) (25).

## II.5. Modification de l'ARN guide

### II.5.1. single guide ARN pour (sgRNA)

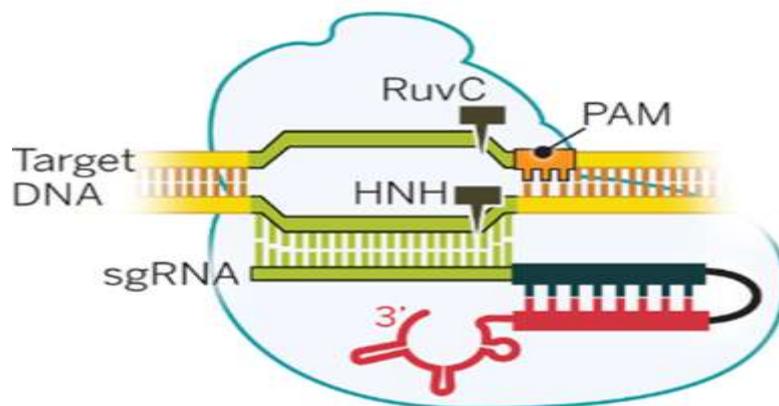
La capacité de programmer Cas9 pour le clivage de l'ADN sur des sites spécifiques définis par des ARN guides a conduit à son adoption en tant que plate-forme polyvalente pour l'ingénierie du génome .où Cas9 génère des DSB spécifiques au site, lorsqu'il est dirigé vers des locus cibles par des guides (crRNA, tracrRNA) Cas9 génère des DSB spécifiques au site (19).

Le crRNA programmable et le tracrRNA fixe sont fusionnés pour former un single-guide RNA (sgRNA) (26).

SgRNA se compose de trois régions principales 5 à 3 : le guide ARN - région de réplication de brin d'ADN cible où la base d'ARN s'apparie avec l'ADN cible, une antirépétition double face qui représente une région d'hybridation entre le crARN et le tracrARN, et des épitopes souches supplémentaires se trouvent dans le tracrRNA au locus CRISPR endogène.

Le complexe Cas9 – sgRNA reconnaît sa cible ADN grâce aux interactions d'appariement de bases entre le sgRNA et l'ADN cible et à travers les interactions de Cas9 avec le PAM adjacent au site de ciblage du sgRNA (21).

Et à partir de là dirige Cas9 vers le site souhaité et catalyse efficacement le clivage des deux brins d'ADN (26).



**Figure 14 :** Le complexe Cas9 – sgRNA (25).

## **II.5.2. CRISPR multiplexe**

L'édition multiplex permet des applications sophistiquées pour l'ingénierie du génome, y compris les knock-out multigènes, la suppression et la translocation chromosomiques, l'activation de gènes ou de promoteurs, l'activation et la répression de gènes, ou les modifications d'épigénome, etc. Plusieurs groupes de recherche ont développé différentes façons d'exprimer efficacement plusieurs ARNg pour tirer parti de ces techniques d'édition améliorées. En général, les boîtes à outils d'édition multiplex sont divisées en systèmes qui expriment plusieurs ARNg avec leur propre promoteur et terminateur, ou en systèmes qui expriment plusieurs ARNg via un seul promoteur et un seul terminateur. Chacune de ces Stratégies présente ses propres avantages et inconvénients, notamment en ce qui concerne la facilité de clonage, le nombre d'ARNg pouvant être exprimés et l'efficacité de l'édition **(40)**.

L'approche la plus courante pour la production de plusieurs ARNg consiste à exprimer chaque ARNg individuel par son propre promoteur et terminateur, comme illustre la Figure 15. Plusieurs laboratoires ont utilisé cette approche et généré des boîtes à outils pour l'expression de plusieurs ARNg avec ces cassettes individuelles dans les plantes. La taille d'une cassette d'expression peut varier entre 500 et 800 Pb selon la séquence promotrice utilisée. Le développement de l'édition du génome CRISPR/Cas9 et sa capacité à effectuer une édition multiplex avec une grande efficacité a ouvert les portes à une pléthore d'applications passionnantes en biologie végétale et en sélection des cultures. Par exemple, la capacité de muter plusieurs gènes à la fois permet l'analyse de familles de gènes dont les membres peuvent avoir des fonctions redondantes. De gros fragments de gènes ou de chromosomes peuvent être supprimés lorsque deux ARNg sont introduits simultanément. CRISPR/Cas9 multiplexé permet même une activation ou une répression plus robuste du gène, car plusieurs activateurs ou répresseurs peuvent être recrutés sur le gène cible. La figure 16 fournit une représentation stylistique de ces applications **(40)**.



## **II.6. Modification de la cas9**

### **II.6.1. n cas9 ou cas9 nickase**

Le système CRISPR-Cas9 est un outil d'édition du génome puissant et révolutionnaire pour les génomes eucaryotes. Ici, nous avons étudié l'utilisation du système *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome de *Clostridium cellulolyticum*, un micro-organisme modèle pour la recherche sur la bioénergie (27).

Les ruptures double brin induites par Cas9 de type sauvage étaient mortelles pour *C. cellulolyticum* en raison de l'expression minimale de composants de jonction d'extrémité non homologue (NHEJ) dans cette souche. Pour contourner cette létalité, la nickase Cas9 qui découle de la mutation de l'un des deux domaines de nucléase Cas9 (domaine de nucléase HNH, et domaine de nucléase de type RuvC) et clive un seul brin d'ADN, a été appliquée pour développer une stratégie de recombinaison homologue déclenchée par une seule entaille, qui permet une édition précise en une étape aux locus génomiques prévus en transformant un seul vecteur. Cette stratégie a une efficacité d'édition élevée (> 95 %) même en utilisant des bras homologues courts (0,2 kb), est capable de délivrer des gènes étrangers dans le génome en une seule étape sans marqueur, permet une édition précise même sur deux sites cibles très similaires. Et a une densité de sites cibles très élevée (21)(27). Ensemble, ces résultats démontrent qu'une stratégie de nickase appariée multiplex est efficace pour la modification de plusieurs gènes *in vivo*, avec un minimum de dommages. Où l'on s'attend à ce que les nickases Cas9 induisent peu ou pas de dommages au génome (28).

### **II.6.2. d cas9 ou Dead cas9 : CRISPR interférence**

Cas9 contient deux domaines de nucléase : un domaine de nucléase HNH qui clive le brin cible d'ADN (complémentaire à l'ARN guide) et un domaine de nucléase de type RuvC qui clive le brin non cible. La mutation des deux domaines de nucléase génère dCas9, qui n'a pas d'activité nucléase mais conserve son activité de liaison à l'ADN guidée par l'ARN. Cela permet à dCas9 d'être fusionné à d'autres effets pour médier la régulation génétique et épigénétique spécifique au site sans cliver l'ADN cible, ou pour coupler Cas9 à la fluorescence comme Reporters de liaison à l'ADN pour l'imagerie en direct (21) (29).

## **II.6.3. d cas9 fusion**

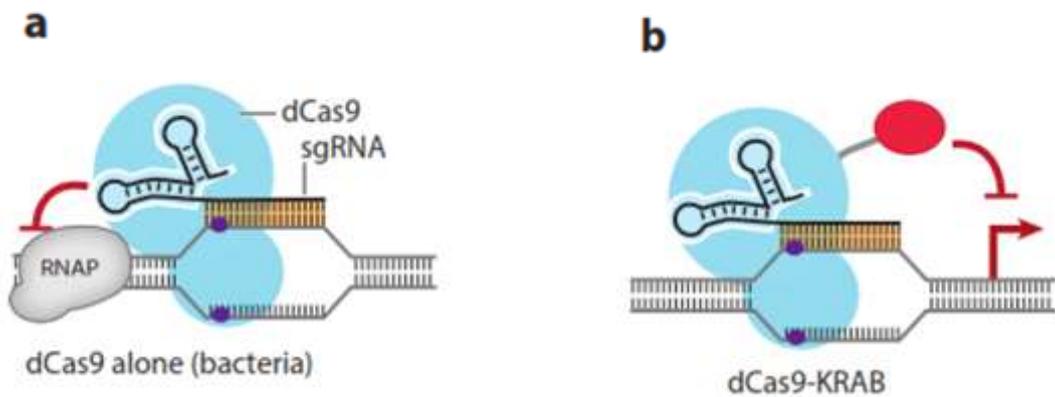
### **II.6.3.1. dCas9 Fusion régulatrice**

#### **A / Interférence CRISPR (CRISPR i) :**

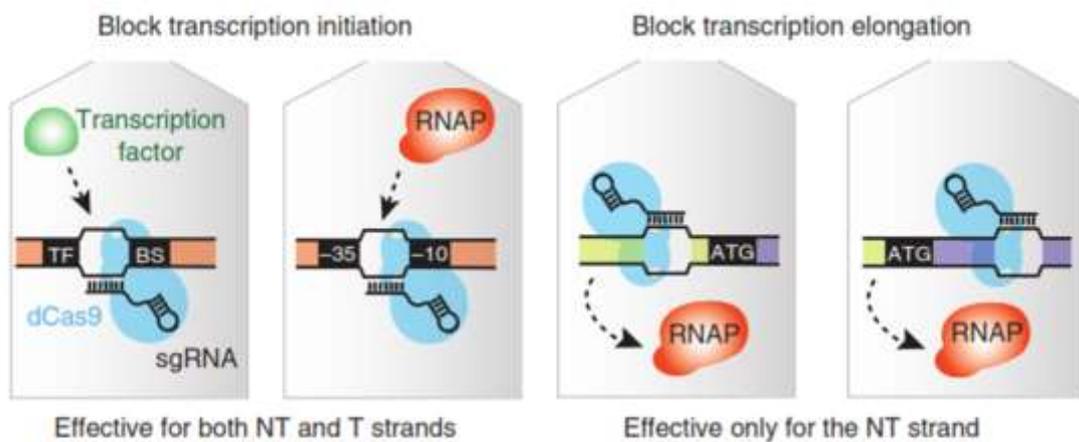
En plus de son activité nucléase, Cas9 peut servir de plateforme unique pour recruter des protéines et de l'ARN facteurs à un site d'ADN ciblé, et il a été conçu dans des outils puissants pour des séquences de spécifiques. Pour ce faire, des activateurs et des répresseurs transcriptionnels sont fusionnés à dCas9 ; dCas9 conserve sa capacité à se lier à la fois au sgRNA et à l'ADN ciblé, par conséquent, peut servir de plate-forme de liaison à l'ADN guidé par l'ARN spécifique à la séquence. Dans les cellules bactériennes, dCas9 seul peut inhiber efficacement la transcription de gènes ciblés par encombrement stérique de la machinerie transcriptionnelle (Figure 17 a). Cette nouvelle technique est appelée interférence CRISPR (CRISPRi) car elle interfère avec la transcription de l'ARN. Cette technique est dérivée du *Streptococcus pyogenes*. (21 ,30).

Bien que CRISPRi soit généralement très efficace chez les procaryotes, le complexe dCas9-sgRNA seul peut ne pas être très efficace pour faire taire l'expression des gènes dans les cellules de mammifères. Cependant, CRISPRi dans les cellules de mammifères peut être amélioré en fusionnant dCas9 à un domaine répresseur transcriptionnel (par exemple, le domaine KRAB de Kox1), ce qui conduit à une suppression réussie des gènes rapporteurs et endogènes. (Figure 17 b) (21).

Au final, il a été conclu que CRISPRi fonctionne pour la répression de la transcription dans les bactéries et les cellules humaines. (Figure 18) (30).



**Figure 17 :** Stratégies d'interférence CRISPR (CRISPRi). (a) La répression peut se produire avec dCas9 seul dans les bactéries, qui bloque stériquement l'élongation transcriptionnelle des ARN. (b) dCas9 peut être fusionné à un domaine répresseur tel que KRAB pour améliorer la répression (21).



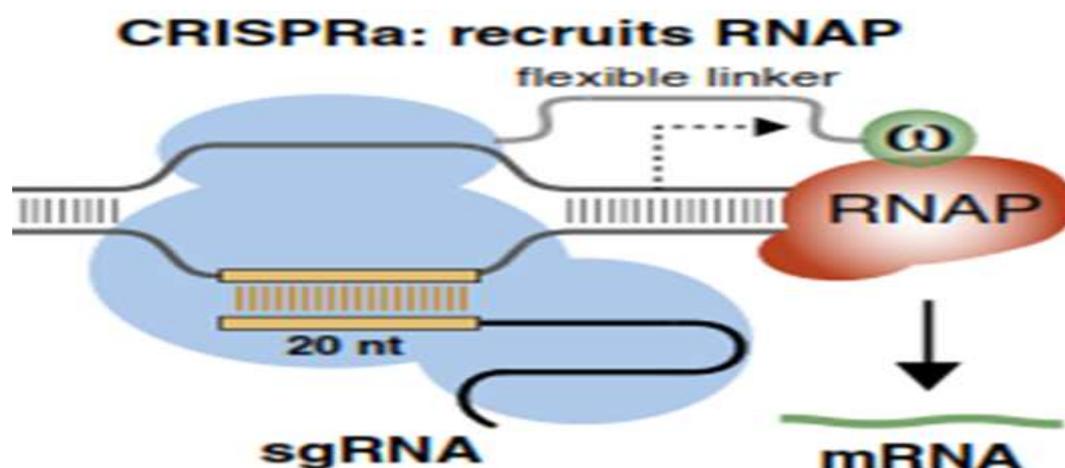
**Figure 18 :** Le système CRISPRi pour la répression de la transcription dans les bactéries et les cellules humaines.

Selon le locus génomique cible, CRISPRi peut bloquer l'élongation ou l'initiation de la transcription. Lorsque le complexe dCas9-sgRNA se lie au brin d'ADN non modèle (NT) de l'UTR ou à la région codant pour la protéine, il peut faire taire l'expression des gènes en bloquant les RNAP qui s'allongent. Lorsque le complexe dCas9-sgRNA se lie à la séquence du promoteur (par exemple, les boîtes -35 ou -10 du promoteur bactérien) ou au site de liaison du facteur de transcription agissant en cis (TFBS), il peut bloquer l'initiation de la transcription en inhibant stériquement la liaison de RNAP ou facteurs de transcription au

même locus. Le silence de l'initiation de la transcription est indépendant du brin d'ADN ciblé (30).

### **B / CRISPR activateurs (CRISPR a)**

CRISPRa améliore la transcription des gènes cibles en utilisant un complexe dCas9-sgRNA modifié contenant des domaines activateurs pour recruter l'ARN polymérase en ADN promoteur. Dans le système *E. coli* CRISPRa existant, dCas9 est fusionné à la sous-unité  $\omega$  de RNAP (dCas9 :  $\omega$ ). (figure19) En présence d'un sgRNA approprié, l'ARNP est recruté à une position en amont du promoteur, activant ainsi la transcription. La répression se produit si (dCas9 :  $\omega$ ) est trop proche, et l'activation échoue lorsque (dCas9 :  $\omega$ ) est trop en amont. L'activation fonctionne mieux pour les promoteurs faibles. Un système CRISPRa bactérien optimisé pourrait être utilisé pour effectuer des criblages de gain de fonction à l'échelle du génome (sans avoir besoin de cloner des milliers de gènes), ou pour atténuer les effets polaires de CRISPRi (en ciblant les nombreuses séquences faibles de type promoteur dans régions). À la fin ce système nécessite une caractérisation et une optimisation plus poussées pour être largement applicable (31).



**Figure 19** : activation CRISPR (CRISPR a). dCas9 :  $\omega$ -sgRNA lié en amont des recues d'ADN promoteur RNAP via des interactions directes entre  $\omega$  et RNAP, activant la transcription (31).

### **C / stratégies pour améliorer l'efficacité de CRISPR a**

L'efficacité de CRISPRa peut être considérablement améliorée en recrutant plusieurs activateurs transcriptionnels pour réguler positivement la transcription génique. En plus d'utiliser plusieurs sgRNA en mosaïque le long du promoteur pour recruter plusieurs activateurs dCas9, d'autres stratégies ont été développées pour recruter plusieurs activateurs transcriptionnels sur un site de liaison dCas9. Par exemple, le système de médiateur d'activation synergique (SAM) utilise à la fois dCas9 et sgRNA comme échafaudages pour recruter plusieurs activateurs qui fonctionnent en synergie pour améliorer l'activation des endogènes gènes (21).

### **D / Avantages de CRISPR i/a et de leurs applications**

Ces systèmes CRISPRa/i sont remarquablement polyvalents les fusions dCas9 d'activation ou de répression peuvent réguler une seule cible ou être multiplexées pour réguler plusieurs cibles à la fois. Dans les cellules de mammifères, plusieurs ARNsg peuvent être utilisés dans la même cellule tout en régulant efficacement n'importe quelle cible. Cette capacité peut être utilisée pour réguler à la hausse ou à la baisse plusieurs gènes au sein de la même voie (32).

Dans l'interférence CRISPR (CRISPRi), dCas9 est ciblé pour bloquer la transcription et ainsi faire taire les gènes. Les améliorations incluent la fusion de dCas9 à des répresseurs transcriptionnels pour une efficacité de répression accrue (33).

L'activation CRISPR (CRISPRa) utilise des protéines de fusion dCas9 pour recruter des activateurs de transcription pour une activation ciblée des gènes. L'utilisation de systèmes d'activation dCas9 améliorés permet le recrutement de plusieurs activateurs avec un sgRNA (32).

dCas9 peut diriger des modifications épigénétiques à des emplacements génomiques spécifiques, grâce à l'utilisation de protéines de fusion dCas9 qui recrutent des modificateurs épigénétiques qui peuvent modifier les marques épigénétiques au niveau des activateurs et d'autres éléments régulateurs. CRISPRi et CRISPRa sont hautement spécifiques aux gènes. Les applications de dCas9 incluent actuellement les criblages de perte de fonction ou de gain

de fonction à l'échelle du génome, la régulation génique inductible et réversible et l'ingénierie du destin cellulaire (33).

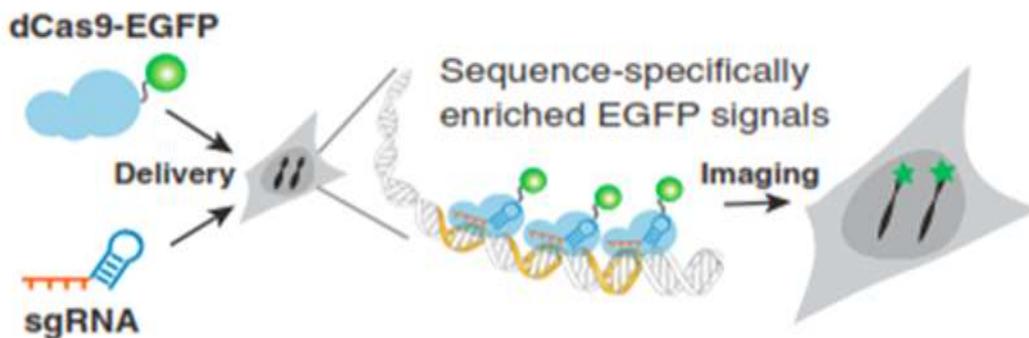
### **II.6.3.2. d cas9 fusion pour l'imagerie génomique**

La chromatine joue un rôle essentiel dans la régulation du génome une fonction. Cependant, la visualisation spécifique, endogène locus génomiques reste difficile dans les cellules vivantes (34).

Ainsi, les chercheurs ont développé une technique d'imagerie du génome qui combine la flexibilité des sondes d'acide nucléique et l'imagerie en dirigeant la capacité des protéines de liaison à l'ADN. Le type II CRISPR (courts regroupés régulièrement espacés système de répétitions palindromiques) dérivé de *Streptococcus pyogenes* fournit une plate-forme prometteuse pour atteindre cet objectif (35).

Ces chercheurs ont essayé d'utiliser CRISPR comme un outil universel et une plateforme flexible d'imagerie dynamique d'éléments génomiques spécifiques dans les cellules vivantes de mammifères. Ici, ils rapportent une technique basée sur CRISPR pour la séquence-visualisation spécifique d'éléments génomiques dans des cellules humaines vivantes (35).

Ce système d'imagerie se compose d'une protéine d'endonucléase désactivée (dCas9) marquée par EGFP et d'un sgRNA structurellement optimisé qui améliore son interaction avec la protéine dCas9. (Figure 20). Cette méthode CRISPR permet un suivi de la dynamique des télomères lors de l'allongement des télomères ou de la perturbation, et permet d'observer l'organisation cellulaire de la chromatine et dynamique tout au long du cycle. La technologie CRISPR offre une approche complémentaire à la technique d'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est un outil cytogénétique efficace et précis pour cartographier des séquences d'ADN à copie unique et répétitives sur les chromosomes (35). Ou l'utilisation de Protéines de liaison à l'ADN pour l'imagerie, fournissant une plate-forme générale pour l'étude de l'organisation et de la dynamique de la chromatine native des cellules humaines vivantes (34).



**Figure 20** : Présentation de l'imagerie CRISPR. L'enrichissement spécifique à la séquence des signaux de fluorescence par dCas9-EGFP dirigé par ARNs<sub>g</sub> permet l'imagerie de génomiques éléments dans les cellules vivantes (34).

## II.7. Interaction protéines Cas9 – génomes endogènes

Une compréhension globale des mécanismes à l'origine des fonctions du génome telles que la transcription et la régulation épigénétique nécessite l'identification des molécules qui se lient aux régions génomiques d'intérêt *in vivo* (36).

Les recherches précédemment développé en ce qui concerne les technologies d'immuno - précipitation de la chromatine (Chip) spécifiques au locus consistant en une puce insertionnelle (i Chip) et une puce médiée par une molécule de liaison à l'ADN pour la purification de molécules spécifiques. Régions génomiques pour identifier leurs molécules associées. Dans en Chip, une molécule de liaison à l'ADN modifiée et étiquetée est exprimée dans la cellule à analyser afin qu'elle reconnaisse une séquence d'ADN cible endogène. Ensuite, la région génomique cible (37).

Les recherches ont conduit à la découverte que le système de répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées (CRISPR) combiné à l'efficacité d' Chip isole des régions génomiques spécifiques pour l'identification de leurs protéines associées (36).

Dans cette forme d' Chip, des régions génomiques spécifiques sont immuno-précipitées avec une ou plusieurs étiquettes, qui sont fusionnées à une forme analytiquement inactive de Cas9 (dCas9) plus un ARN guide (ARN<sub>g</sub>) interagissant avec une séquence d'ADN endogène dans le génome (36).

En résumé, Chip est une nouvelle technologie permettant d'isoler des régions génomiques spécifiques pour une recherche non biaisée de molécules en interaction. Parce qu'il est très facile de générer de l'ARNg ciblant des régions génomiques spécifiques, Chip utilisant le système CRISPR serait un moyen pratique d'effectuer une analyse Chip. Chip pourrait faciliter la compréhension des mécanismes moléculaires d'un large éventail de phénomènes biologiques impliquant les fonctions du génome (37).

## **II.8. Cas9 pour le ciblage de l'ARN**

Les systèmes CRISPR (répétition palindromique courte régulièrement espacée en cluster)-Cas (associés à CRISPR) sont connus pour assurer la médiation de la défense bactérienne contre les acides nucléiques étrangers. Nous avons récemment démontré un rôle non canonique pour un système CRISPR-Cas dans le contrôle de l'expression des gènes endogènes (38).

Nous décrivons les études qui ont conduit à cette découverte, en commençant par un criblage impartial à l'échelle du génome pour identifier les gènes de virulence dans l'agent pathogène intracellulaire *Francisella novicida*. Un gène annoté comme codant pour une protéine hypothétique, mais dont on sait maintenant qu'il code pour la protéine Cas9, a été identifié comme l'un des plus critiques pour la capacité de *F. novicida* à se répliquer et à survivre lors d'une infection murine (39).

Des études ultérieures ont révélé un rôle pour cette protéine dans l'évasion de la réponse immunitaire innée de l'hôte. Cas9 de *Francisella novicida* (FnCas9) cible un ARNm bactérien, conduisant à la répression génique. Ici, les chercheurs montrent que FnCas9 peut être dirigé par un ARN guide ciblant l'ARN pour cibler et inhiber un virus humain RNA, le virus de l'hépatite C (VHC), qui n'a pas de stade ADN dans son cycle de vie (38).

De plus, ce ciblage entraîne une inhibition de production de protéines virales. Dans l'ensemble, programmable à médiation par Cas9 le ciblage de l'ARN viral représente probablement l'un des nombreux potentiels applications de FnCas9 dans le ciblage de l'ARN dans les cellules eucaryotes (39).

# Chapitre III

---

## *CRISPR-Cas9 et quelques Pathologies humaines*

### **III. CRISPR-Cas9 et application en quelques pathologies humaines**

#### **III.1. Introduction**

La thérapie génique pourrait améliorer certaines maladies génétiques humaines à l'avenir. Pour cette raison, ils pensent que la recherche orientée vers le développement de techniques de thérapie génique doit se poursuivre. Dans un avenir prévisible, (41) revoir l'emplacement Les nouveaux outils biologiques innovants font partie intégrante des avancées scientifiques. Le succès de tout outil biologique dépend de sa haute précision, de sa reproductibilité, de sa facilité d'utilisation, de sa rentabilité et de son utilité dans de multiples domaines de recherche. Il existe très peu de technologies qui ont eu un impact important en très peu de temps depuis leur découverte, en particulier dans le domaine de la santé transrationnelle. À cet égard, l'outil d'édition du génome CRISPR-Cas9, a révolutionné la science derrière la médecine de précision. Ces technologies de nouvelle génération ont énormément aidé à comprendre les mécanismes impliqués dans la progression de maladies (42).

#### **III.2. Étude de la cible et sélection du gène à manipuler**

La variabilité génétique des cellules ou embryons à l'origine d'un modèle peut être très riche et mal connue. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier la séquence du locus d'intérêt avant tout projet d'édition de génome. Cette séquence sera utilisée pour créer l'ARNg (ARN guide). Par conséquent, la région ciblée devrait être séquencée avant la conception des ARNg. La moindre variation entre l'ADN cible et l'ARNg pourrait influencer la spécificité. En plus de séquençage de la cible, il est nécessaire de sélectionner un gène pour la manipulation. Parce que pour manipuler un gène particulier il faut identifier le gène d'intérêt. Cependant, en fonction du résultat souhaité la région exacte du gène peut varier. Quelques exemples : - Pour activer ou réprimer un gène cible en utilisant des dCas9 activateur ou dCas9 répresseur, les gARN devront cibler le promoteur qui contrôle l'expression du gène d'intérêt. -Pour réaliser des Knock out génétiques, les ARNg devront de préférence cibler les exons exprimés de la région 5' pour réduire la probabilité que la région cible soit retirée des ARNm par épissage alternatif. Les Exons proches de la zone N-Terminale Sont à cibler, car une mutation déplaçant le cadre de lecture augmentera la chance de production d'une protéine non fonctionnelle. Les ARNg peuvent être créés pour cibler des exons qui codent pour des

domaines protéiques indispensables. L'objectif étant que la mutation (insertion ou délétion) qui résulte de la cassure double brin ait plus de chance d'altérer le fonctionnement de la protéine. Pour les expériences qui utilisent le processus d'HDR (Homology Directed Repair), il est essentiel que la séquence cible soit proche de la zone où on souhaite réaliser l'édition (43).

### **III.3. Sélection des ARNg basée sur l'activité "on target" et "off target "**

Un élément clé de CRISPR/Cas est l'ARN « guide » (ARNg) qui est d'environ 20 nucléotides de longueur et conçu pour être complémentaire au site cible prévu. Une exigence intégrale du système CRISPR/Cas est que le site cible soit suivi d'un motif adjacent protospacer (PAM) (44).

La séquence PAM est absolument nécessaire à la Cas9 pour se lier à l'ADN. Il est donc nécessaire d'identifier toute les séquences PAM au sein de la zone à cibler (le PAM pour spCas9 est 5' NGG 3'). Si aucune séquence PAM n'est présente dans cette zone, on peut se tourner vers une Cas9 d'une espèce différente ou provenant d'un variant de la même espèce, c'est le moment de choisir quel site sera à même de permettre le clivage le plus spécifique. Le gARN doit être complémentaire de la séquence cible, mais il est aussi obligatoire de vérifier qu'une séquence identique n'existe pas, quelque part, ailleurs dans le génome. Dans un monde idéal, l'ARNg ne correspondrait uniquement qu'à la séquence voulue. En réalité il est possible qu'un ARNg ait des sites additionnels pour lesquels une complémentarité partielle existe. Ces sites sont appelés "off-targets" ou hors-cible en français, et doivent être pris en compte pendant la construction des gARN expérimentaux. Mis à part l'activité hors cible, il est également important de tenir compte des facteurs qui favoriseront un clivage efficace du site désiré, c'est l'activité dite on-target. Deux gARN ciblant des séquences pour lesquels ils possèdent une homologie de 100% n'auront pas forcément le même rendement. Cette efficacité peut être augmentée ou diminuée en fonction des nucléotides qui composent la séquence. Par exemple un ARNg qui contiendrait un G en position 20 (soit 1Pb en aval du PAM) peut être plus efficace qu'une séquence contenant un C à cette position. Malgré le fait que ces deux séquences présentent une homologie parfaite avec leur cible. Il est donc nécessaire de tenir compte des prédictions d'effets on-target et off-target. Plusieurs logiciels de conception de ARNg par exemple (off spotter) ont été développés et sont capables

d'identifier les motifs PAM et séquences cibles puis de hiérarchiser les ARNg correspondants en se basant sur ces prédictions. La base des algorithmes est d'éviter les ARNg qui ont des complémentarités partielles hors cibles possédant moins de 3 mésappariements. Il est également possible d'acheter des ARNg préalablement validés (44).

### **III.4. Synthèse et clonage des ARNg**

Après avoir conçu un oligonucléotide qui code pour l'ARNg, cet oligonucléotide doit être cloné à l'intérieur de vecteurs d'expression. Dans la plupart des cas, les séquences guides complémentaires sont achetées synthétisées, puis insérées dans des plasmides qui contiennent la séquence codant le reste de la structure de l'ARNg en utilisant des techniques de restriction-ligation. Les fragments reçus pourront ensuite être amplifiés. Par exemple par PCR. Ou à partir d'un kit de clonage plasmidique (par exemple pCR-Blunt II-TOPO). Ce Kit de clonage PCR Zéro Blunt TOPO fournit une stratégie de clonage en une étape très efficace de 5 minutes ("clonage TOPO") pour l'insertion directe de produits PCR à extrémités franches amplifiés avec des polymérases thermostables de relecture dans un vecteur plasmidique (45).

### **III.5. Vecteurs**

Il existe deux types de vecteurs de CRISPR : Les vecteurs viraux et le vecteur plasmidique

✓ Vecteurs plasmidiques :

Le vecteur CRISPR/Cas9 a été assemblé à l'aide de modules fonctionnels des plasmides p414 et pCRCT des laboratoires George Church et Huimin Zhao, respectivement. De plus, les éléments régulateurs de l'expression de l'ARNg ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique d'*A. Gossypii*.

Le plasmide pCRCT (plasmide de levure à copie élevée pour perturber les gènes par l'exprimant de cas9 avec un tracrARN et un ou plusieurs ARN CRISOR) contenant 2 origine de levure, les marqueurs AmpR et lacZ et l'ori bactérien Cole1, a été utilisé comme squelette (Figure 21).

✓ Tout d'abord, le marqueur URA3 de levure a été remplacé par le marqueur *A. gossypii* (G418R : est un antibiotique aminoglycoside produit par *micromanospora rhodorangea* et est similaire à la gentamicine B1. Il agit en



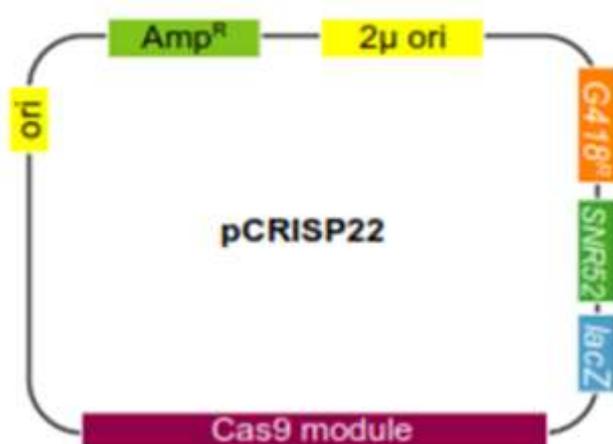


Figure 22 : construction finale de (pCRISP22) (46).

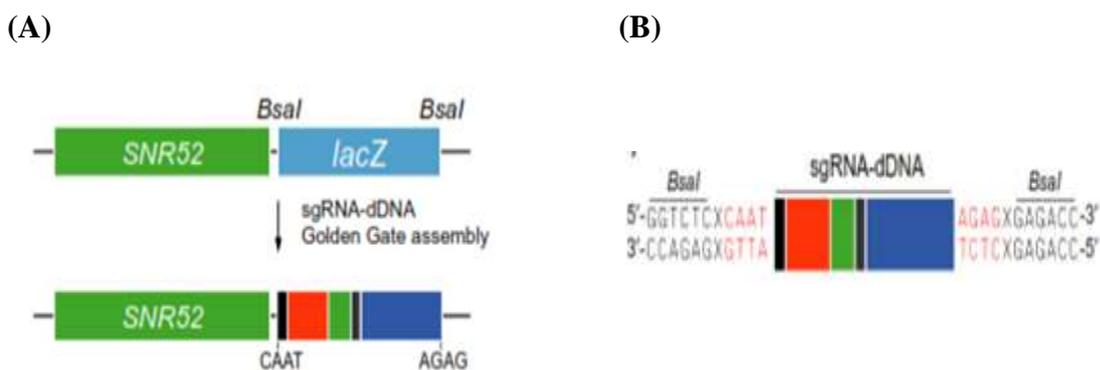


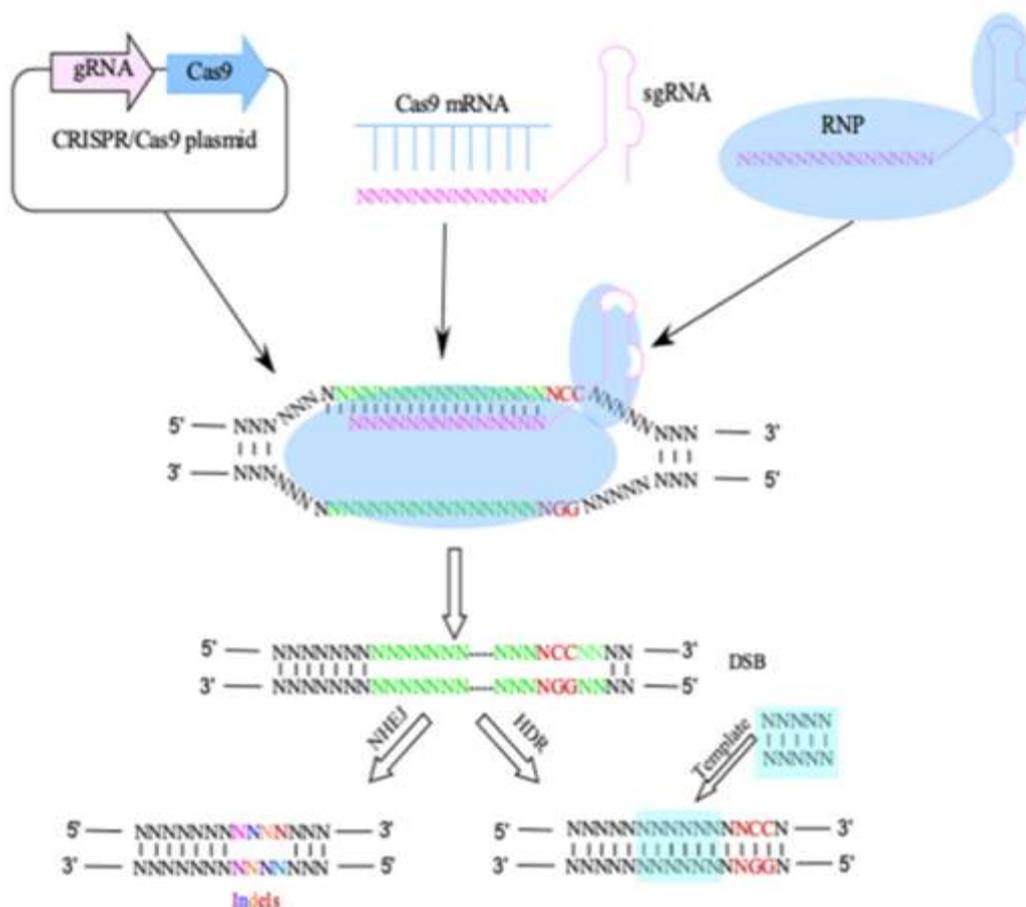
Figure 23 : vecteur pCRISP22 avec un insère (A) Représentation du clonage directionnel du sgRNA-dDNA module dans le pCRISP22. Les sites de restriction BsaI. (B) Organisation génétique de la séquence sgRNA-dDNA (46).

✓ Vecteurs viraux :

Ces vecteurs qui ont le potentiel de servir de véhicule aux composants nécessaires (Cas9, guides ARN, +/- séquences matrices d'un gène donneur en vue de réparation) sont nombreux : rétrovirus, lentivirus autoinactivant, adénovirus et AAV (AdenoAssociated Virus) (46).

### III.6. vecteur CRISPR-Cas 9 à l'intérieur de la cellule hôte

La figure suivante montre comment le plasmide CRISPR-Cas 9 fonctionne à l'intérieur de la cellule hôte.



**Figure 24 :** plasmide CRISPR-Cas9 à l'intérieur de la cellule hôte. Une fois que le sgRNA se lie au site cible de l'ADN génomique, la protéine Cas9 crée un DSB autour du site PAM. Indels aléatoires ou modifications précises introduites dans l'ADN génomique par la voie NHEJ ou HDR (63).

### **III.7. Validation**

Après l'insertion d'ARNg et de Cas à l'intérieur de la cellule, il faut vérifier si cette insertion a réussi et si les deux composés sont intracellulaires. Les méthodes de validation diffèrent d'une expérience à l'autre selon les molécules utilisées, mais le suivi du phénotype de la cellule cible reste la base du travail en comparant le type sauvage au type muté (qui a le système à l'intérieur). Mais bien que l'on prenne soin d'introduire ce système dans les cellules, un pourcentage des cellules conserve le type sauvage pour les raisons suivantes :

- Sous-expression de Cas9 et/ou RNAg.
- Absence de clivage efficace malgré l'introduction de cas9 et d'ARNg dans la cellule.
- Enfin, les expériences seront réalisées sur un groupe hétérogène de cellules (63).

### **III.8. Application du CRISPR en pathologies monogénique**

La communauté scientifique s'est lancée dans l'utilisation de CRISPRCas9 pour évaluer ses applications dans le traitement de maladies génétiques.

Voici une série des travaux pionniers dans le domaine des maladies monogéniques :

#### **III.8.1. Maladie de Huntington**

##### **III.8.1.1. Définition**

La maladie de Huntington (MH) La maladie de Huntington est une maladie autosomique dominante qui touche environ 400–600 personnes en Suisse (donner la prévalence en mode c'est mieux. Décrite au XIXe siècle par le médecin américain George Huntington, ce n'est qu'en 1993 que l'anomalie génétique responsable de la maladie est mise en évidence (48, 49).

La pénétrance de cette maladie dépend de l'âge des hétérozygotes. A la naissance, la pénétrance est nulle ; elle est de 50 environ à 40 ans, et est totale à 70 ans. (50). La maladie comprend diverses caractéristiques cliniques dont des troubles psychiatriques, des troubles moteurs (chorée, bradykinésie, dystonie) et des troubles cognitifs (48).

### III.8.1.2. Arbre généalogique d'une famille présentant la maladie Huntington

La figure ci-dessous (figure 25) représente une famille ayant des membres atteints de la maladie de Huntington

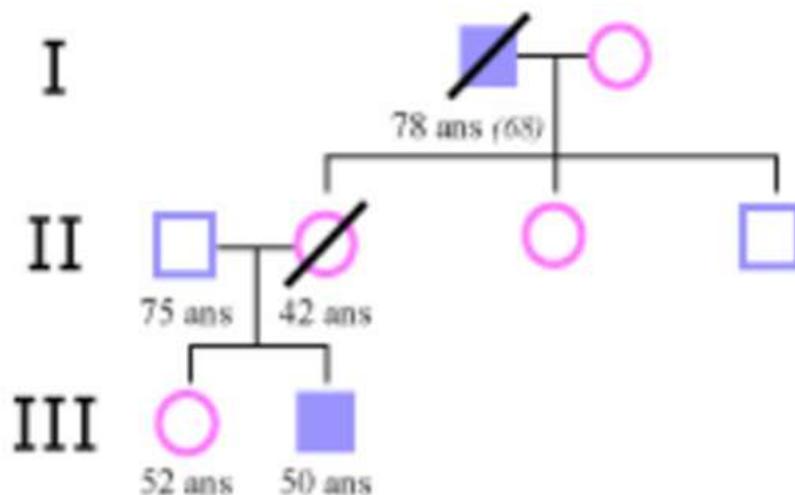


Figure 25 : l'Arbre généalogique de maladie Huntington (50).

Dans cette famille, le père (I-1) est mort à 78 ans après avoir débuté sa maladie à 68 ans. Son petit-fils (III-2) est atteint à l'âge de 50 ans. Sa fille (II-2) est décédée accidentellement à l'âge de 42 ans. Du fait de l'apparition tardive de la maladie, elle n'a pas développé de signes cliniques, mais elle portait l'allèle muté puisqu'elle l'a transmis à son fils. Ces observations sont conformes au mode autosomique dominant avec pénétrance incomplète. Chaque individu porteur de l'allèle pathologique a un risque de 50% de le transmettre à un enfant, et la maladie en même temps (50).

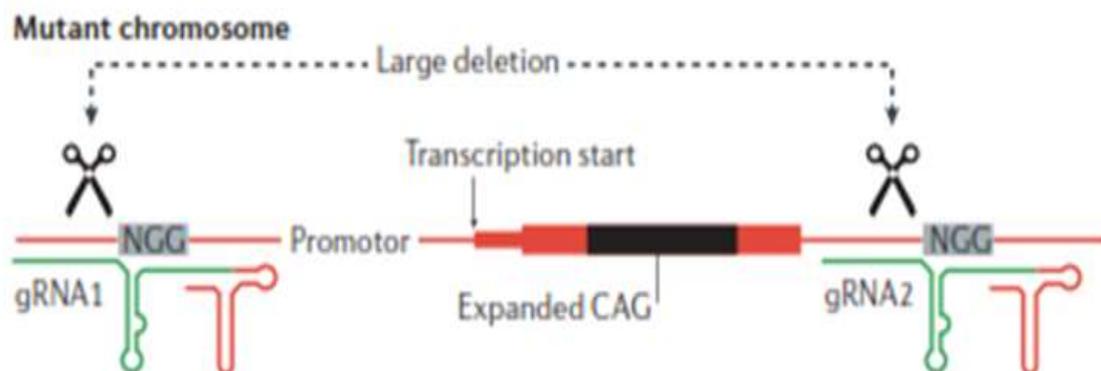
### **III.8.1.3. Causes de la maladie Huntington**

La maladie de Huntington est l'une des nombreuses troubles, dans lesquels une mutation provoque la maladie par un dominant effet de la protéine mutante. La mutation HD implique l'expansion d'une répétition CAG dans le gène Huntington (HTT) qui se traduit par un tractus de polyglutamine allongé dans la Huntington protéine. Les expansions répétées CAG supérieures à 35 élicitent les caractéristiques symptômes cliniques, compris mouvements involontaires, déclin cognitif et troubles psychiatriques chez une personne entièrement dominante mode. L'âge d'apparition des signes moteurs et l'âge au décès sont tous deux déterminé principalement par la taille de la répétition étendue. Grâce à une analyse d'association à l'échelle du génome, on a récemment découvert des locus génétiques significativement associés à la différence entre l'âge observé au début des signes moteurs et celui attendu basé sur la longueur de répétition CAG des sujets HD. Enfin, la présence de la protéine mutante est le principal déclencheur de cette maladie (51).

### **III.8.1.4. Application CRISPR sur la maladie de Huntington**

Une nouvelle approche d'édition de gènes basée sur CRISPR-Cas9 pour la maladie de Huntington (MH) peut inactiver l'allèle HTT mutant associée à la MH sans affecter l'allèle normal. La technique a empêché l'expression de la protéine Huntington mutée dans un certain nombre de lignées cellulaires. Les progrès récents de la technique d'édition de gènes CRISPR ont inspiré Jong-Min Lee et ses collègues à développer une nouvelle approche de thérapie génique dans la MH qui neutralisait sélectivement l'unique mutant HTT. La maladie de Huntington étant une maladie héréditaire dominante ; la suppression de l'allèle mutante dominante laisserait donc intacte un allèle normal, suffisant pour une fonction normale, et empêcherait l'expression de la protéine mutante et l'apparition de la maladie. Cependant, cette stratégie comporte une mise en garde : si la spécificité de l'allèle n'est pas parfaite, l'allèle normal serait également ciblé en permanence, ce qui pourrait entraîner des résultats indésirables. Pour que la nucléase Cas9 clive l'ADN, la séquence d'ADN cible CRISPR doit être suivie d'un motif adjacent au protospacer (PAM). Les chercheurs ont étudié les haplotypes HTT courants pour trouver PAM qui sont présents sur l'haplotype chromosomique

Mutant mais pas normal. Ils ont ensuite conçu deux ARN guides (ARNg) ciblant spécifiquement uniquement l'allèle HTT mutant. Les ARNg flanqueraient non seulement l'expansion répétée CAG associée à HD, mais également la région promotrice et le site de début de transcription pour assurer l'extinction complète du gène muté (Figure 26). L'édition CRISPR-Cas9 avec les ARNg spécifiques de l'allèle a empêché l'expression de la protéine Huntington mutante dans les fibroblastes primaires d'un patient atteint de MH. "Nos résultats démontrent que les approches CRISPR peuvent faire taire de manière permanente le HTT mutant d'une manière parfaitement spécifique à l'allèle", déclare Lee. Pour obtenir les meilleurs effets thérapeutiques, l'excision de l'allèle mutant responsable de la maladie devrait être effectuée avant l'apparition des symptômes. La technique aurait donc une promesse particulière dans la MH et d'autres maladies neurodégénératives tardives pour lesquelles un test génétique est disponible (51) (52).



**Figure 26 :** Elimination de la mutation responsable de la maladie de Huntington Par CRISPR-Cas9 (52).

## III.8.2. Maladie de la mucoviscidose

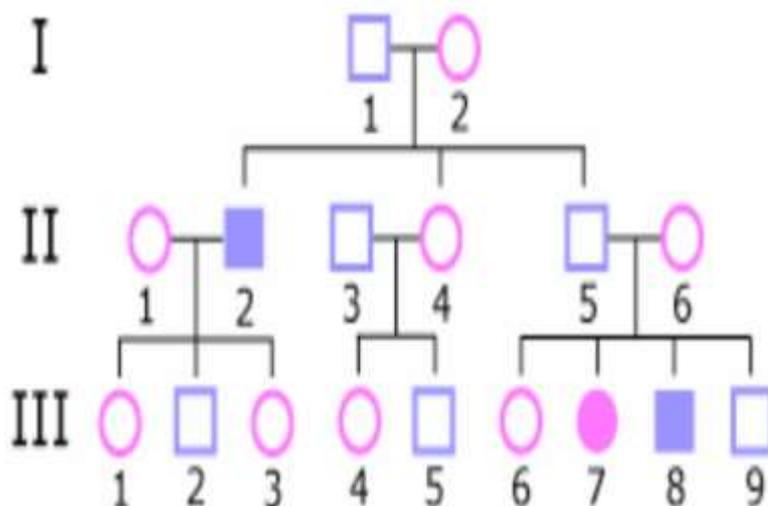
### III.8.2.1. Définition

La mucoviscidose (MV) est l'une des maladies multisystémiques chroniques héréditaires autosomiques récessives les plus fréquentes, qui, avec une espérance de vie limitée et une prévalence d'environ 1/2500, touche dans le monde entier près de 70 000 personnes. La maladie a été décrite pour la première fois en 1938. Bien que l'origine génétique soit connue depuis les années 1980, seul un traitement symptomatique des

conséquences du gène «Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator» (CFTR) défectueux était jusqu'à récemment disponible (53).

### III.8.2.2. Arbre généalogique d'une famille présentant la mucoviscidose

Dans la famille ci-dessous (Figure 27), III-7 et III-8 sont atteints de mucoviscidose, la maladie autosomique récessive la plus fréquente. Ils sont porteurs de deux allèles pathologiques, et leurs parents II-5 et II-6 sont hétérozygotes porteurs sains. Dans la plupart des cas, on observe très rarement d'autres individus atteints parmi les ascendants (comme ici II-2), aussi bien pour la mucoviscidose que pour toutes les autres maladies récessives qui sont plus rares qu'elle (Figure 27) (50).



**Figure 27 :** Arbre généalogique de la mucoviscidose (50).

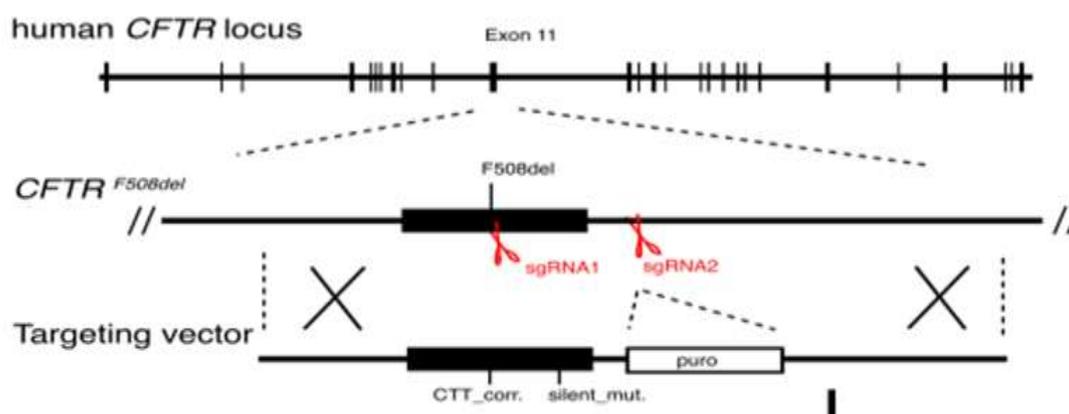
Dans cette famille, aucun des parents d'un malade n'est atteint par la maladie, il n'y a pas de personnes malades à toutes les générations. Les hommes et les femmes sont également atteints. Ces observations sont conformes au mode autosomique récessif. Le risque de "transmettre" la maladie pour une personne homozygote malade (a/a) ou pour une personne apparenté Sain hétérozygote (A/a) dépend du statut de son conjoint. Le risque de "transmettre" la maladie pour une personne homozygote saine (A/A) est nul (50).

### III.8.2.3. Causes de la maladie de mucoviscidose

La cause de la maladie est une mutation du gène CFTR présent sur le chromosome 7 cela entraîne la mutation de la protéine canal CFTR (cysticfibrosistransmembrane conductance régulateur). Ce canal transporte les ions chlorures et thiocyanates, sa mutation entraîne la dysrégulation du transport des fluides épithéliaux dans les poumons, le pancréas et d'autres organes. Cette mutation se situe précisément au niveau de l'exon 11 du gène CFTR, son exemple symbolique (F508) (53).

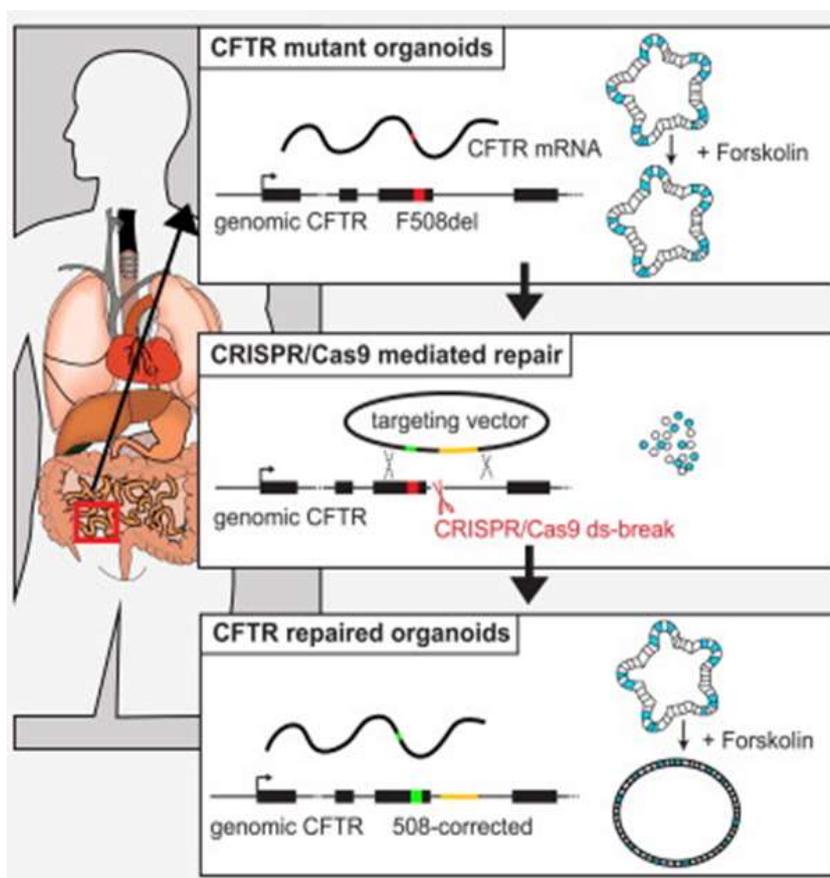
### III.8.2.4. Application CRISPR sur la maladie de mucoviscidose

En 2013, une preuve de concept utilisant Cas9 dirigé par ARNg a corrigé la mutation du gène CFTR par recombinaison homologue. La première étape consiste à induire des cassures double brin dans le locus CFTR. À l'aide de cas9 dirigée par ARNg. Ensuite, un Vecteur de ciblage, qui contient les éléments suivants (correct F508del (addition CTT) et la cassette de sélection de puromycine). (Figure 28) a été utilisé. Enfin, la mutation est corrigée par recombinaison homologue (Figure 29) (54).



**Figure 28 :** Stratégie de modification du génome à l'aide de CRISPR/Cas9 pour induire des cassures double brin dans le locus CFTR.

La ligne du haut, structure du gène CFTR. Les boîtes noires illustrent les exons et les traits fins illustrent les introns. Les ciseaux rouges montrent les sites de clivage de sgRNA1 et sgRNA2, et la boîte blanche dans le vecteur de ciblage indique la cassette de sélection de puromycine. Une mutation silencieuse de 2 pb est introduite en aval de la correction F508del (addition CTT) et permet un test PCR allèle-spécifique (54).



**Figure 29** : correction de la mutation par recombinaison homologue.

La couleur Rouge est le lieu de mutation (F508del), La couleur verte est le correct F508, couleur Jaune cassette de sélection de puromycine (54).

### **III.9. Applications du CRISPR en pathologies virales**

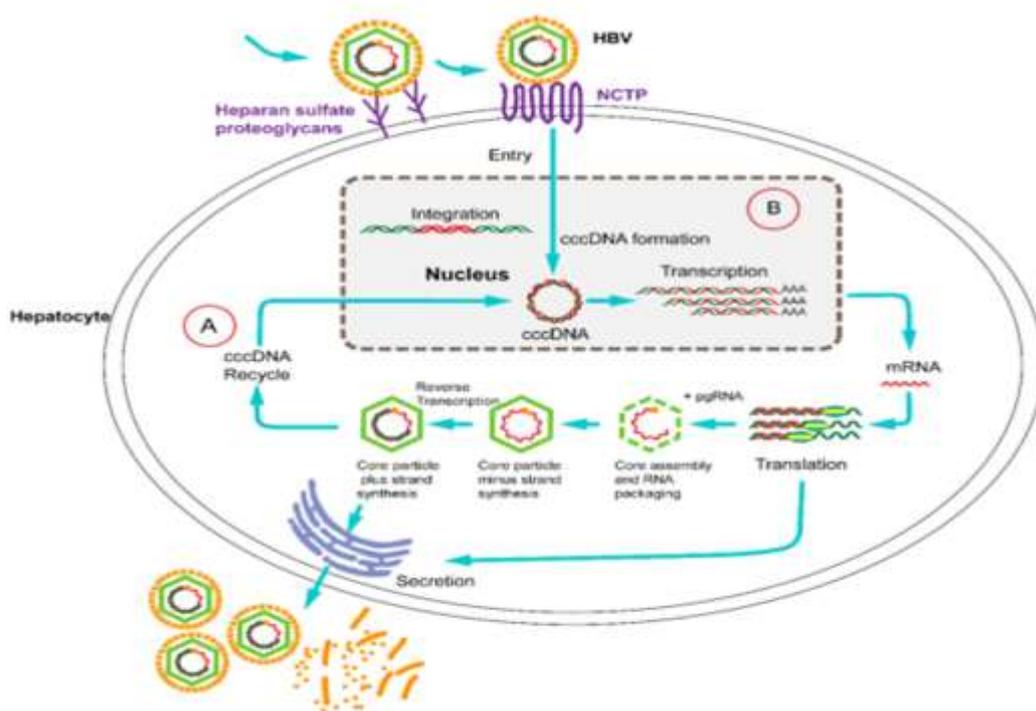
#### **III.9.1. Hépatite B**

##### **III.9.1.1. Définition**

L'hépatite B est une maladie infectieuse d'origine virale qui se traduit par une inflammation hépatique. Majoritairement asymptomatique, elle peut cependant être à l'origine d'un tableau clinique grave aux séquelles parfois irréversibles. La protection contre le virus de l'hépatite B, extrêmement contagieux, constitue un enjeu de santé publique à l'échelle internationale (55).

### III.9.1.2. Cycle de vie de virus de l'hépatite B (HBV)

Le VHB se lie aux récepteurs de surface et pénètre dans l'hépatocyte. Les particules virales migrent vers le noyau cellulaire, où les génomes du VHB sont convertis en un ADN circulaire fermé par covalence (cccDNA) qui sert de matrice pour la transcription virale. La traduction de l'ARNm viral dans le cytoplasme entraîne la production des protéines de noyau (C), de polymérase (P), de surface (S). Ensuite, l'ARN viral génomique est empaqueté dans les capsides virales de la descendance. La particule centrale peut soit être encapsulée et sécrétée par l'hépatocyte, soit être réimportée dans le noyau pour être transformée en cccDNA (Figure 30) (57).



**Figure 30 :** Cycle de vie du virus de l'hépatite B (VHB) (57).

### III.9.1.3. Causes de la maladie de l'hépatite B

L'hépatite B est causée par une infection par un virus de l'hépatite B (VHB) est un virus à ADN appartenant à la Famille de virus Hepadnaviridae qui se répliquent par transcription inverse d'un ARN intermédiaire. Le VHB a un petit génome circulaire détendu de 3,2 kb avec des cadres de lecture ouverts qui se chevauchent qui contiennent également des

sites de liaison pour les facteurs de transcription nécessaires à l'expression des protéines virales. L'infection des hépatocytes entraîne la conversion du génome de l'ADN en un ADN circulaire fermé de manière covalente (Ccc DNA pour covalently closed circularDNA)) qui réside dans le noyau cellulaire. CccDNA est la matrice pour la transcription des gènes viraux. C'est le moyen de persistance du VHB dans le foie infecté et, par conséquent, il représente la base moléculaire de l'hépatite B chronique (CHB) (59).

Des séquences d'ADN et de protéines du virus de l'hépatite B ont été détectées dans les tissus extra hépatiques de patients atteints d'infection aiguë et chronique. Le virus qui se transmet par contact avec le sang ou d'autres fluides biologiques de l'individu infecté peut atteindre et se répliquer dans de nombreux tissus différents (56).

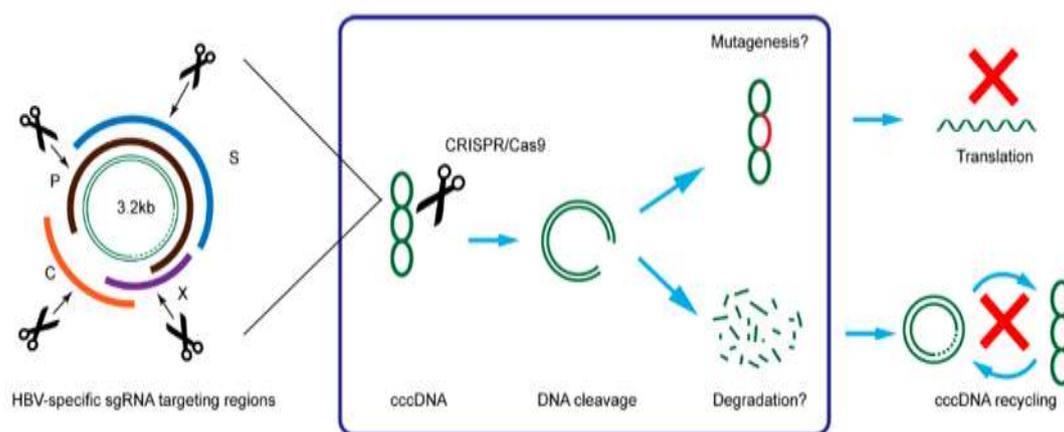
Les maladies du foie associées à une infection persistante par le virus de l'hépatite B (VHB) restent un problème de santé majeur avec un impact mondial (57).

### **III.9.1.4. Application du CRISPR sur la maladie de l'hépatite B**

Les inhibiteurs de la polymérase virale, bien qu'ils empêchent la transcription inverse (la formation d'ADN génomique viraux à partir des transcrits d'ARN pré-génomique) ne parviennent pas à atteindre le cccDNA. Le cccDNA est la partie du génome viral qui persiste dans le noyau des cellules infectées. De plus, l'ADNccc du VHB présente une stabilité stupéfiante et décline lentement sous traitement antiviral. La persistance de l'ADN circulaire fermé par covalence (ADNccc) du virus de l'hépatite B (VHB) sous traitement antiviral actuel est un obstacle majeur à l'éradication de l'hépatite B chronique (HCB) (58).

Par conséquent, il y a un grand intérêt pour la recherche d'une solution qui permettrait d'éliminer l'ADNccc dans le but d'obtenir une première thérapie curative. C'est donc naturellement que le système CRISPR-Cas9 est apparu comme un candidat potentiel. Le génome VHB possède 4 cadres de lecture ouverts (Surface, Coré, Polymérase et protéine X) qui seront traduits en seulement 7 protéines. Ces protéines sont hautement importantes pour la réplication du virus. Cibler une protéine supprimée à l'aide du duo Cas9/ARNg pourrait être suffisant pour supprimer les gènes viraux liés à l'expression et à la réplication. Les premières expériences in vivo et in vitro démontrant l'efficacité d'une approche CRISPR-Cas. Le retrait du HBV définitivement des cellules hépatiques a été réalisé en 2014. Lin et son équipe insérèrent l'ADN HBV et l'association Cas9/ARNg spécifique du cccADN dans des

hépatocytes de souris par injection hydrodynamique. Ils montrèrent que l'endonucléase guidée pouvait cliver HBV et permettre son élimination des cellules et faciliter sa clairance hors de l'organisme, entraînant la diminution des antigènes HBV de surface. Enfin, ils ont confirmé que la technologie CRISPR pourrait jouer un rôle dans l'élimination de l'hépatite B (60).



**Figure 31** : Schéma de la stratégie de suppression d'HBV par CRISPR-Cas9. Gènes C : core ; P : polymérase ; S : surface ; X : HBx (58).

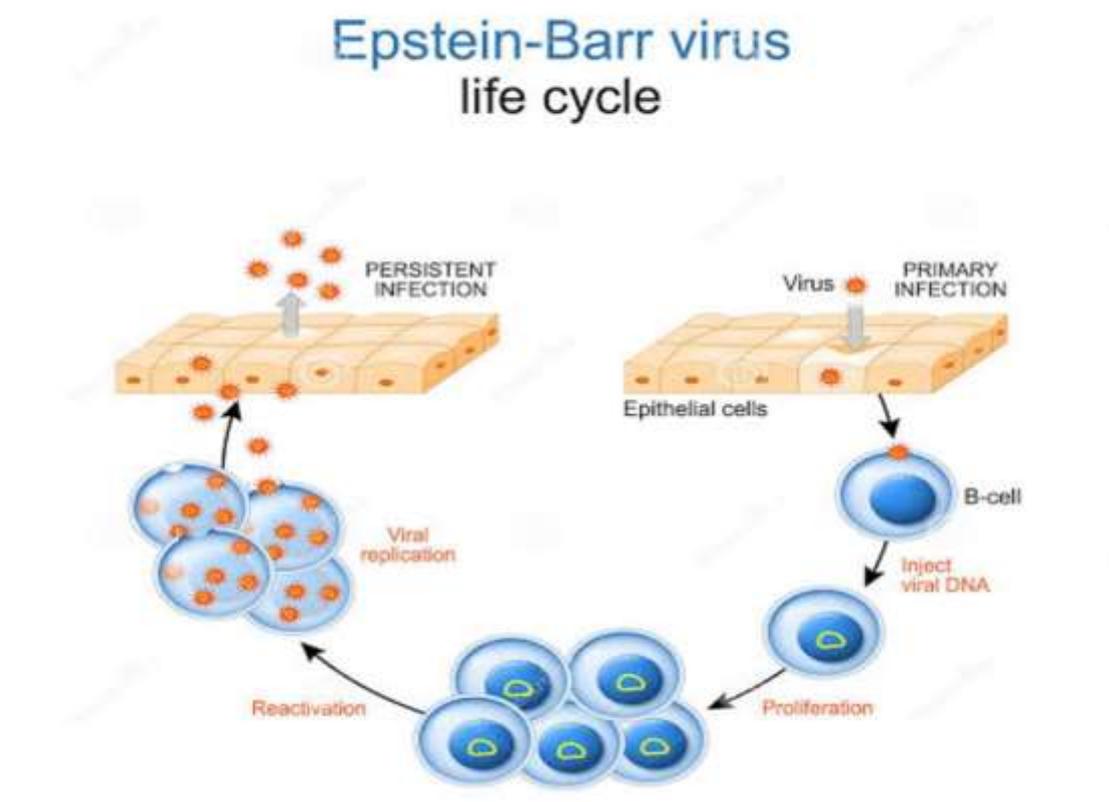
### III.9.2. Maladies causées par le virus d'Epstein-Barr.

#### III.9.2.1. Définition

Le virus d'Epstein-Barr appartient à la famille des Herpèsvirus et est présent, sous forme latente, chez une grande majorité des adultes dans le monde. Il provoque de nombreuses maladies, dont la mononucléose infectieuse, et était suspecté d'être le déclencheur de la sclérose en plaques (61) et est fortement associé à de multiples tumeurs malignes y compris le carcinome du nasopharynx, la maladie de Burkitt lymphome, lymphome de Hodgkin (62).

#### III.9.2.2. Cycle de vie de virus EBV

La figure suivant représente le cycle de vie du virus depuis son entrée dans la cellule jusqu'à sa sortie sous forme de groupe (reproduction)



**Figure 32** : Cycle de vie de virus EBV(61).

### **III.9.2.3. Application du système CRISPR pour réduire les maladies liées aux virus EBV**

Étant donné que l'EBV peut servir de cible pour l'édition du génome CRISPR/Cas9, ils sont présentés que le ciblage des facteurs génétiques viraux impliquait de manière critique dans le maintien de l'état du gène virus, entraînant sa perte à partir de cellules infectées de manière latente. Ils ont donc conçu des ARNg ciblant le virus Antigène nucléaire 1 de l'EBV (EBNA1) et plusieurs zones de l'origine de réplication de l'EBV (OriP), qui sont toutes impliquées dans le maintien et la réplication des épisomes. Comme système modèle, ils ont utilisé les Cellules Akata-Bx1 du lymphome de Burkitt portant un EBV recombinant l'expression de la protéine fluorescente verte (eGFP) sous contrôle du promoteur CMV. Par conséquent, (l'eGFP) sert de marqueur de la présence d'EBV dans ces cellules. Lors de la

transduction des cellules Akata-Bx1 avec des ARNg ciblant EBNA1, ils ont observé une perte d'expression de l'eGFP dans 40 à 60 % de cellules. Ces résultats indiquent que le ciblage par CRISPR/Cas9 des régions essentielles dans l'ADNdb de l'EBV réduit efficacement le contenu du génome viral dans les cellules infectées de manière latente. En conséquence, CRISPR-cas9 est un mécanisme prometteur pour éradiquer les maladies liées à l'EBV (62).

### **III.10. Application du CRISPR en cancérologie**

#### **III.10.1. Cancer du sein**

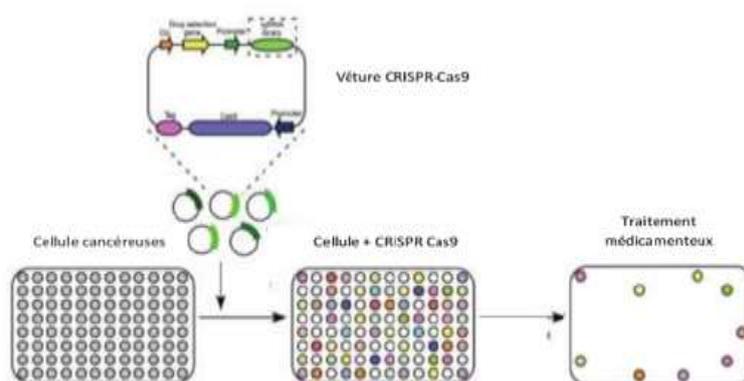
##### **III.10.1.1. Cancer du sein et ses principales causes**

Le cancer du sein est l'une des principales causes de décès liés au cancer chez les femmes dans le monde, ce qui représente environ 28 % des nouveaux cancers. Il s'agit d'une maladie très hétérogène, et de multiples voies de signalisation peuvent médier son initiation et sa progression. Selon les études de profil d'expression génique, différents sous-types du cancer du sein ont été identifiés sur la base de l'expression du récepteur des œstrogènes (ER) et/ou récepteur de la progestérone (PR). ER appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui a joué un rôle crucial dans le développement et l'évolution du cancer du sein. La Maladie de récepteur des œstrogènes est la plus courante des cancers du sein. Il représente près de 70 à 75 % de tous les cas. La voie ER est ciblées par des thérapies endocriniennes qui soit réprimer les fonctions ER ou épuiser le ligand (l'œstrogène). Les médicaments utilisés dans le traitement du cancer du sein comprennent des agents pharmacologiques pour l'hormonothérapie et la chimiothérapie conventionnelle (64).

Bien qu'il existe de nombreuses options thérapeutiques disponibles pour patientes atteintes d'un cancer du sein, la résistance aux médicaments est un problème pour la plupart des thérapies. La résistance rend le cancer du sein incontrôlable et provoque des décès (64).

### III.10.1.2. supériorité de CRISPR-Cas9 dans la résolution de la résistance aux médicaments utilisés contre le cancer du sein

Les gènes cellulaires qui ont muté en oncogènes ont un énorme potentiel en tant que cibles pour le traitement du cancer humain. La pharmacorésistance causée par la mutation/altération d'ER. Les oncogènes entraînent la prolifération cellulaire et stimulent les voies de signalisation cellulaire de manière appropriée. La mutation d'ER pourrait affecter la réponse à anti œstrogènes. Une récente étude de séquençage clinique chez des patients avec un cancer du sein ER avancé a identifié une mutation (D538G) au sein des urgences chez les patients résistants à l'hormonothérapie, provoquant un changement de l'acide aspartique en glycine en position 538 dans le domaine de liaison du ligand. Pour résoudre ce problème, un système CRISPR/Cas9 ARNg a été conçu pour cibler des séquences spécifiques dans la mutation d'ER pour réparer la mutation et donc, perdre son résistance acquise aux médicaments (Figure 33). Cette stratégie ciblera directement la cause de la maladie de manière personnalisée et permanente (64).



**Figure 33** : schémas supérieurs représentent l'expression CRISPR/Cas9 vecteur, y compris les bibliothèques d'ARN g (vert). La lecture est basée sur la mesure de la population cellulaire de l'individu puits après un traitement médicamenteux (64).

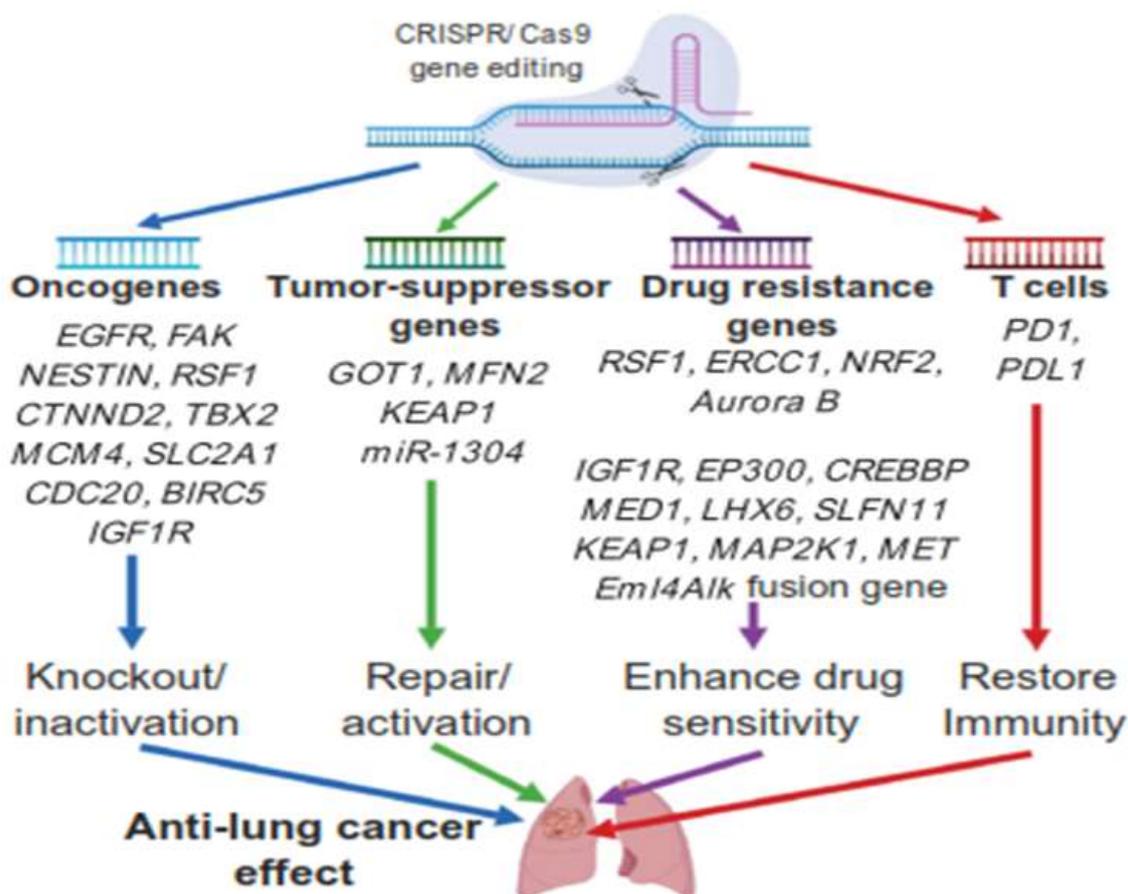
### III.10.2. Cancer du poumon

#### III.10.2.1. Cancer du poumon et ses principales causes

Le cancer du poumon est la cause la plus fréquente de décès liés au cancer dans le monde. Les patients atteints de cancer du poumon sont généralement diagnostiqués à des phases avancées. Le taux de survie à cinq ans chez les patients du cancer du poumon est d'environ 16 % (65).

Parmi les causes du cancer du poumon figurent les oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs, gènes de résistance aux médicaments et gènes liés au système immunitaire des tumeurs. (Figure 34). Malgré des décennies de recherche sur les traitements du cancer du poumon, les résultats cliniques sont encore très médiocres (65).

Ces dernières années, plusieurs études ont utilisé efficacement l'approche CRISPR-Cas9, où ce système peut éliminer toute cause de cancer du poumon de toute nature. Dans le prochain titre, nous découvrirons l'une des causes (oncogènes) et comment le système CRISPR-Cas9 l'élimine.



**Figure 34** : Applications de CRISPR/Cas9 dans les études sur le traitement du cancer du poumon. Les études portent sur des oncogènes ciblés, des gènes suppresseurs de tumeurs, des gènes de résistance aux médicaments et des gènes liés au système immunitaire de la tumeur (66).

### **III.10.2.2. Application du système CRISPR-Cas9 contre une des causes du cancer du poumon (les oncogènes) :**

Les oncogènes remplacent les contrôles réglementaires normaux et contribuent à la transformation maligne d'une cellule. Les produits oncogènes peuvent provoquer la croissance incontrôlée des cellules eucaryotes, comme observé dans les cellules cancéreuses. L'inhibition de la croissance suite à l'inactivation d'un seul oncogène dans les cellules tumorales est la base théorique de l'application de CRISPR/ Technologie Cas9 dans le traitement du cancer. La technologie d'édition de gènes CRISPR/Cas9 peut précisément reconnaître les séquences d'ADN et a rapidement été mis en œuvre pour reconnaître spécifiquement gènes surexprimant ou suractivés. Cette approche apporte de nouvelles idées pour le traitement de tumeurs. L'inactivation d'oncogènes cibles qui sont mutés, surexprimés ou suractivés peut être potentiellement thérapeutique dans le cancer. Ces dernières années, les oncogènes qui ont été étudiés dans le cadre de l'édition du gène CRISPR/Cas9 pour le traitement du cancer du poumon comprend le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), NESTIN, RSF1 et CTNND2. Le ou les récepteurs, qui ont été étudiés par des approches de mutation ou de surexpression, fonctionnent comme des oncogènes favorisant le développement du cancer du poumon et améliorer la capacité des cellules cancéreuses du poumon à envahir ou métastaser. L'utilisation de CRISPR/Cas9 knock-out de l'allèle EGFR mutant oncogène peut inhiber la croissance et prolifération des lignées cellulaires de cancer du poumon H1975, A549 et H1650, et réduire les volumes tumoraux chez des souris xénogreffes implantées avec des cellules H1975 ou A549 (cas9 spécifique à la mutation EGFR réduction de la taille de la tumeur de 81,5 % et 78,3 %). L'élimination de NESTIN dans les cellules A549 et H1299 peut favoriser l'apoptose, inhibent la prolifération et la formation de colonies et suppriment l'invasion cellulaire en inhibant la transition épithéliale-mésenchymateuse (37). De plus, un KO de RSF1 dans H460 et les cellules H1299 entraînent un arrêt du cycle cellulaire dans G1 ainsi qu'une apoptose accrue et une diminution de la migration et de la prolifération cellulaire [38]. La  $\delta$ -caténine agit comme un oncogène,

favorisant la malignité dans adénocarcinome pulmonaire. L'inactivation CRISPR/Cas9 du gène CTNND2 dans les cellules pulmonaires de Lewis et dans un modèle établi de cancer du poumon par xéno greffe chez des souris C57/B6 appauvries en protéine  $\delta$ -caténine dans les cellules cancéreuses a conduit à la perte de leur capacité tumorigène et métastatique (66).

# *Conclusion*

---

## Conclusion

CRISPR-Cas9 est une véritable innovation dans le domaine de biologie moléculaire.

Cet outil permet de modifier facilement, rapidement et à peu de frais le génome de n'importe quelle cellule. En principe, son utilisation dans tous les domaines de vie permet des applications scientifiques, agricoles, industrielles et surtout médicales. En effet, il a été appliqué à de nombreuses maladies, y compris les maladies monogéniques, les maladies virales et le cancer. Pour être classé premier au monde dans le domaine de la médecine humaine, Alors on l'appelle la baguette magique d'humains.

La plus grande preuve du succès de CRISPR-Cas9 est qu'il a remporté le prix Nobel de chimie 2020.

# *Références Bibliographies*

---

## Références Bibliographiques

1. Roublin, J. B. (2017). CRISPR/Cas9: histoire, méthode, potentiel & impact (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
2. Pourcel, C. (2017). Historique de la découverte des systèmes CRISPR-Cas. *Biologie Aujourd'hui*, 211(4), 247-254.
3. Guyon, A. (2021). Insertion d'une mutation protectrice pour la maladie d'Alzheimer dans le gène de la protéine précurseur de l'amyloïde via le système CRISPR/Cas9. .
4. Loesch, R. (2020). Étude in vivo via CRISPR/Cas9 de mutations fréquemment retrouvées au cours de la carcinogenèse hépatique : de la voie Wnt/b-caténine au remodelleur chromatinien ARID2 (Doctoral dissertation, Université de Paris).
5. Petrie, K. L. (2020). There're CRISPRs in My Yogurt: A Discovery-Based CURE at the Intersection of Industrial Food Production and the Human Microbiome. *Frontiers in microbiology*, 2642.
6. Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., ... & Van Der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960-964.
7. Kunin, V., Sorek, R., & Hugenholtz, P. (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genomebiology*, 8(4), 1-7.
8. Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *science*, 322(5909), 1843-1845.
9. Nguyen, D., Boc, A., & Makarenkov, V. (2005). HGT-Simulator: logiciel pour simuler des transferts horizontaux de gènes. *proceedings of the SFC2005, Montreal*, 215-219.
10. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
11. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733-740.

12. Abbott, A. (2016). A Crispr vision. *Nature*, 532(7600), 432-434.
13. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586.
14. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
15. Sapranauskas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275-9282.
16. Ibrahim, A., ÖZSÖZ, M., Tirah, G., & Gideon, O. (2019). Genome engineering using the CRISPR Cas9 system. *J Biomed Pharm Sci*, 2(2).
17. Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.
18. Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
19. Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., ...& Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997.
20. Nishimasu, H., Cong, L., Yan, W. X., Ran, F. A., Zetsche, B., Li, Y., ...& Nureki, O. (2015). Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*, 162(5), 1113-1126.
21. Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annual review of biochemistry*, 85, 227-264.
22. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569-573.
23. Lemay, M. L. (2019). CRISPR-Cas9 pour l'édition de génomes viraux et l'étude des gènes du phage virulent p2 (Doctoral dissertation, Université Laval).
24. Ramya, P. R., & Panicker, V. P. (2018). CRISPR GENOME EDITING.

25. Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
26. Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *The FEBS journal*, 281(23), 5186-5193.
27. Xu, T., Li, Y., Shi, Z., Hemme, C. L., Li, Y., Zhu, Y., ... & Zhou, J. (2015). Efficient genome editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 nickase. *Applied and environmental microbiology*, 81(13), 4423-4431.
28. Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., ...&Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature methods*, 11(4), 399-402.
29. Yang, W., Tu, Z., Sun, Q., & Li, X. J. (2016). CRISPR/Cas9: implications for modeling and therapy of neurodegenerative diseases. *Frontiers in molecular neuroscience*, 9, 30.
30. Larson, M. H., Gilbert, L. A., Wang, X., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature protocols*, 8(11), 2180-2196.
31. Peters, J. M., Silvis, M. R., Zhao, D., Hawkins, J. S., Gross, C. A., & Qi, L. S. (2015). BacterialCRISPR:accomplishments and prospects. *Current opinion in microbiology*, 27, 121-126.
32. La Russa, M. F., & Qi, L. S. (2015). The new state of the art: Cas9 for gene activation and repression. *Molecular and cellular biology*, 35(22), 3800-3809.
33. Dominguez, A. A., Lim, W. A., & Qi, L. S. (2016). Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature reviewsMolecularcellbiology*, 17(1), 5-15.
34. Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G. W., ... & Huang, B. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 155(7), 1479-1491.
35. De Jong, J. H., Fransz, P., &Zabel, P. (1999). High resolution FISH in plants–techniques and applications. *Trends in plant science*, 4(7), 258-263.

- 36.** Fujita, T., & Fujii, H. (2014). Identification of proteins associated with an IFN $\gamma$ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. *PLoS one*, 9(7), e103084.
- 37.** Fujita, T., & Fujii, H. (2013). Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochemical and biophysical research communications*, 439(1), 132-136.
- 38.** Sampson, T. R., & Weiss, D. S. (2013). Cas9-dependent endogenous gene regulation is required for bacterial virulence. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1407-1411.
- 39.** Price, A. A., Sampson, T. R., Ratner, H. K., Grakoui, A., & Weiss, D. S. (2015). Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6164-6169.
- 40.** Minkenberg, B., Wheatley, M., & Yang, Y. (2017). CRISPR/Cas9-enabled multiplex genome editing and its application. *Progress in molecular biology and translational science*, 149, 111-132.
- 41.** Friedmann, T., & Roblin, R. (1972). Gene Therapy for Human Genetic Disease? Proposals for genetic manipulation in humans raise difficult scientific and ethical problems. *Science*, 175(4025), 949-955.
- 42.** Ramakrishna, G., Babu, P. E., Singh, R., & Trehanpati, N. (2021). Application of CRISPR-Cas9 based gene editing to study the pathogenesis of colon and liver cancer using organoids. *Hepatology international*, 1-9.
- 43.** Chenouard, V. (2021). Caractérisation du système CRISPR/Cas9 et amélioration de l'édition de génome pour la génération d'iPS humaines et de rats génétiquement modifiés (Doctoral dissertation, Nantes).
- 44.** Pliatsika, V., & Rigoutsos, I. (2015). "Off-Spotter": very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biology direct*, 10(1), 1-10.
- 45.** Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, with One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli cells. Available at: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K280020>.

(Accessed: 15th December 2016)

- 46.** Jiménez, A., Muñoz-Fernández, G., Ledesma-Amaro, R., Buey, R. M., & Revuelta, J. L. (2019). One-vector CRISPR/Cas9 genome engineering of the industrial fungus *Ashbyagossypii*. *Microbial biotechnology*, 12(6), 1293-1301.
- 47.** Char, S. N., Neelakandan, A. K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M. H., ... & Yang, B. (2017). An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant biotechnology journal*, 15(2), 257-268.
- 48.** Brouillet, E., Peschanski, M., & Hantraye, P. (2000). Du gène à la maladie: la mort neuronale dans la maladie de Huntington.
- 49.** Gooda, J. M., Burgunderb, J. M., & Widera, C. (2015, October). Maladie de Huntington. In *Forum médical suisse* (Vol. 15, No. 44, pp. 1022-1026). EMH Media.
- 50.** OrphaSchool - Transmission des maladies génétiques  
Module de formation en ligne réalisé par Orphanet  
<http://www.orpha.net/orphaschool/elearn1.htm>
- 51.** Shin, J. W., Kim, K. H., Chao, M. J., Atwal, R. S., Gillis, T., MacDonald, M. E., ... & Lee, J. M. (2016). Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Human molecular genetics*, 25(20), 4566-4576.
- 52.** Malkki, H. (2016). Selective deactivation of Huntington disease mutant allele by CRISPR–Cas9 gene editing. *Nature Reviews Neurology*, 12(11), 614-615.
- 53.** Florian, S. (2017). Pneumologie: Nouvelles options thérapeutiques en cas de mucoviscidose.
- 54.** Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., ... & Clevers, H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell stem cell*, 13(6), 653-658.
- 55.** Malbos, D. (2020). Un diagnostic d'infection par le virus de l'hépatite B. *Actualités Pharmaceutiques*, 59(601), 27-28.
- 56.** Mason, A., Wick, M., White, H., & Perrillo, R. (1993). Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 18(4), 781-789.
- 57.** Dandri, M., & Lütgehetmann, M. (2014). Mouse models of hepatitis B and delta virus infection. *Journal of immunological methods*, 410, 39-49.

- 58.** Lin, G., Zhang, K., & Li, J. (2015). Application of CRISPR/Cas9 technology to HBV. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26077-26086.
- 59.** Seeger, C., & Sohn, J. A. (2016). Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Molecular Therapy*, 24(7), 1258-1266.
- 60.** Lin, S. R., Yang, H. C., Kuo, Y. T., Liu, C. J., Yang, T. Y., Sung, K. C., ... & Chen, P. J. (2014). The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3, e186.
- 61.** Bailly, S. (2022). D'Epstein-Barr à la sclérose en plaques. *Pour la Science*, 533(3), 19a-19a.
- 62.** van Diemen, F. R., Kruse, E. M., Hooykaas, M. J., Bruggeling, C. E., Schürch, A. C., van Ham, P. M., ... & Lebbink, R. J. (2016). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections. *PLoS pathogens*, 12(6), e1005701.
- 63.** Tian, X., GU, T., Patel, S., Bode, A. M., Lee, M. H., & Dong, Z. (2019). CRISPR/Cas9—An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology. *NPJ precision oncology*, 3(1), 1-8.
- 64.** Chen, Y., & Zhang, Y. (2018). Application of the CRISPR/Cas9 system to drug resistance in breast cancer. *Advanced Science*, 5(6), 1700964.
- 65.** Kordkheyli, V. A., Rashidi, M., Shokri, Y., Fallahpour, S., Variji, A., Ghara, E. N., & Hosseini, S. M. (2021). CRISPER/CAS System, a Novel Tool of Targeted Therapy of Drug-Resistant Lung Cancer. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 12(2), 262-273.
- 66.** Jiang, C., Lin, X., & Zhao, Z. (2019). Applications of CRISPR/Cas9 technology in the treatment of lung cancer. *Trends in molecular medicine*, 25(11), 1039-1049.