

Les systèmes CRISPR-Cas9

Découverts dans des bactéries, les systèmes CRISPR (pour « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat ») forment un système immunitaire chez ces dernières. Des laboratoires ont su utiliser son mécanisme afin de le mettre au service de l'édition du génome. Avant CRISPR, les approches d'édition du génome telles que les nucléases à doigts de zinc (Zinc Finger Nuclease, ZFN) ou les nucléases effectrices de type activateur de transcription (Transcription Activator-Like Effector Nuclease, TALEN) obligeaient les scientifiques à concevoir et à générer une nouvelle paire de nucléases pour chaque cible génomique. En raison de sa simplicité relative et de son adaptabilité, CRISPR est rapidement devenu l'approche d'ingénierie du génome la plus populaire.

Les systèmes CRISPR contiennent deux composants : un ARN guide (ARNg) et une endonucléase associée à CRISPR (protéine Cas). L'ARNg est un ARN synthétique court composé d'une séquence de 80 nucléotides nécessaire à la liaison Cas (tracrRNA) et d'une séquence d'environ 20 nucléotides définie par la personne utilisatrice, qui spécifie la cible génomique à modifier (crRNA). Ainsi, on peut changer la cible génomique de la protéine Cas en changeant simplement le crRNA présent dans l'ARNg.

CRISPR a été utilisé à l'origine pour éliminer les gènes cibles dans divers types de cellules et d'organismes, mais les modifications apportées à diverses enzymes Cas ont étendu CRISPR pour inclure la possibilité d'activer/de réprimer sélectivement les gènes cibles, purifier des régions spécifiques de l'ADN, imager l'ADN dans les cellules vivantes et éditer avec précision l'ADN et l'ARN. De plus, la facilité de génération d'ARNg fait de CRISPR l'une des technologies d'édition du génome les plus évolutives. Cet avantage rend CRISPR parfait pour les criblages à l'échelle du génome.

I- Le « knock-out » pour supprimer définitivement l'expression d'un gène

Vous pouvez utiliser CRISPR pour générer des cellules ou des animaux « knock-out » en co-exprimant une endonucléase comme Cas9 ou Cas12a (également connue sous le nom de Cpf1) et un ARNg spécifique au gène ciblé. La cible génomique peut être n'importe quelle séquence d'ADN d'une vingtaine de nucléotides, à condition qu'elle remplisse deux conditions :

- La séquence est unique par rapport au reste du génome;
- La cible est présente juste à côté d'un « Protospacer Adjacent Motif » (PAM).

La séquence PAM sert de signal de liaison pour Cas9, mais la séquence exacte dépend de la protéine Cas que vous utilisez. Ainsi, le PAM de SpCas9 est NGG, celui de NmCas9 NNNNGATT et celui de Cpf1 TTTN. Nous utiliserons le populaire *S. pyogenes* Cas9 (SpCas9) comme exemple ici, mais pour vos projets, notre choix dépendra de la disponibilité et de l'efficacité des ARNg dans la région que vous souhaitez cibler.

Une fois exprimées, grâce au tracrRNA, la protéine Cas9 et l'ARNg forment le complexe ribonucléoprotéique capable de s'hybrider au gène cible, étant donné que la séquence de la

crRNA est complémentaire à une séquence présente dans le gène cible. Une fois que le complexe Cas9-gARN se lie à une cible d'ADN putative, Cas9 change de conformation et, si elle détecte un PAM, elle clivera la séquence d'ADN double-brin du gène cible 3 paires de bases en amont du PAM. À noter que Cas9 ne clivera un locus donné que si la séquence de l'ARNg partage une homologie suffisante avec l'ADN cible d'au moins 8 bases depuis le PAM. C'est pourquoi des clivages non spécifiques peuvent être observés. Le terme « off-target » est couramment utilisé pour évoquer ces clivages non désirés. Heureusement, il existe des logiciels capables d'identifier les sites « off-target » potentiels. Il nous est donc possible d'aller vérifier ces sites après un CRISPR.

Le DSB résultant est ensuite réparé par l'une des deux voies de réparation générales :

- La voie de jonction d'extrémité non homologue (NHEJ), efficace mais sujette aux erreurs;
- La voie de réparation dirigée par homologie (HDR), moins efficace mais de haute fidélité.

La voie de réparation NHEJ est le mécanisme de réparation le plus actif et provoque fréquemment de petites insertions ou délétions de nucléotides (indels) au site DSB. Le caractère aléatoire de la réparation DSB médiée par NHEJ a des implications pratiques importantes, car une population de cellules exprimant Cas9 et un ARNg entraînera un large éventail de mutations. Dans la plupart des cas, NHEJ donne lieu à de petits indels dans l'ADN cible qui entraînent des délétions, des insertions ou des mutations de décalage de cadre d'acides aminés conduisant à des codons stop prématurés dans le cadre de lecture ouvert (ORF) du gène ciblé. Le résultat final idéal est une mutation avec perte de fonction dans le gène ciblé. Cependant, la force du phénotype « knock-out » pour une cellule mutante donnée doit être validée expérimentalement.

II- Le « knock-in » pour introduire une mutation spécifique, un tag ou une cassette d'expression.

Certaines chercheuses ou chercheurs peuvent être intéressés à reproduire dans une lignée cellulaire une mutation identifiée chez une patiente ou un patient. Cette mutation peut être un SNP, une insertion ou une délétion de bases voire une délétion d'un exon. Bien que les approches permettant d'introduire ces mutations varient d'une mutation à une autre, ces modifications sont regroupées sous le terme de « knock-in ».

Cas9 génère des cassures double brin (DSB) grâce à l'activité combinée de deux domaines de nucléase, RuvC et HNH. Cas9 nickase, un mutant D10A de SpCas9, conserve un domaine nucléase et génère un SSB ADN plutôt qu'un DSB. Ainsi, deux nickases ciblant des brins d'ADN opposés sont nécessaires pour générer un DSB dans l'ADN cible. Cette exigence d'un système CRISPR à double entaille augmente considérablement la spécificité de la cible, car il est peu probable que deux coupures hors cible soient générées suffisamment près pour provoquer un DSB et peut permettre l'excision d'un exon.

Alors que la réparation DSB médiée par NHEJ perturbe souvent le cadre de lecture ouvert du gène, la réparation dirigée par homologie (HDR) peut générer des changements de nucléotide

spécifiques allant d'un changement de nucléotide unique à de grandes insertions comme l'ajout d'un tag ou d'une cassette d'expression.

Afin d'utiliser le HDR pour l'édition de gènes, un modèle de réparation d'ADN contenant la séquence souhaitée doit être livré dans le type de cellule d'intérêt avec le ou les ARNg et Cas9. Cette séquence est appelée donneuse. Le modèle de réparation doit contenir la modification souhaitée ainsi qu'une séquence homologue supplémentaire immédiatement en amont et en aval de la cible (appelée bras d'homologie gauche et droite.) La longueur de chaque bras d'homologie dépend de la taille du changement introduit, avec des insertions plus grandes nécessitant des bras d'homologie plus longs. Ainsi, pour modifier un SNP, une séquence ADN simple brin (ssODN) de 160 nucléotides sera privilégiée, alors que nous lui préférerons un plasmide pour introduire une cassette d'expression ou un tag avec deux bras d'homologie de 800 paires de base de part et d'autre de la séquence à introduire. Lors de la conception du modèle de réparation, il ne faut pas oublier de muter le PAM au risque de voir votre ARNg se fixer sur la séquence donneuse et la cliver. Si aucune mutation silencieuse du PAM n'est possible, il faut regarder s'il est possible d'avoir une mutation de la séquence de fixation du guide.

À noter que l'efficacité de la HDR est généralement faible (<10% avec un plasmide donneur). Elle est plus faible avec un ssODN, de l'ordre de 5%, et d'autant plus faible que le SNP est loin du site de clivage. Ainsi, au-delà de 10 paires de base du site de clivage, la chance de muter un SNP avec un ssODN est quasi nulle. De plus, étant donné que l'efficacité du clivage Cas9 est relativement élevée et que l'efficacité du HDR est relativement faible, une grande partie des DSB induits par Cas9 seront réparés via NHEJ. En d'autres termes, la population de cellules résultante contiendra une combinaison d'allèles de type sauvage, d'allèles réparés par NHEJ et/ou de l'allèle modifié HDR souhaité. Par conséquent, il est important de confirmer expérimentalement la présence de la modification souhaitée et d'isoler les clones contenant la modification souhaitée.

