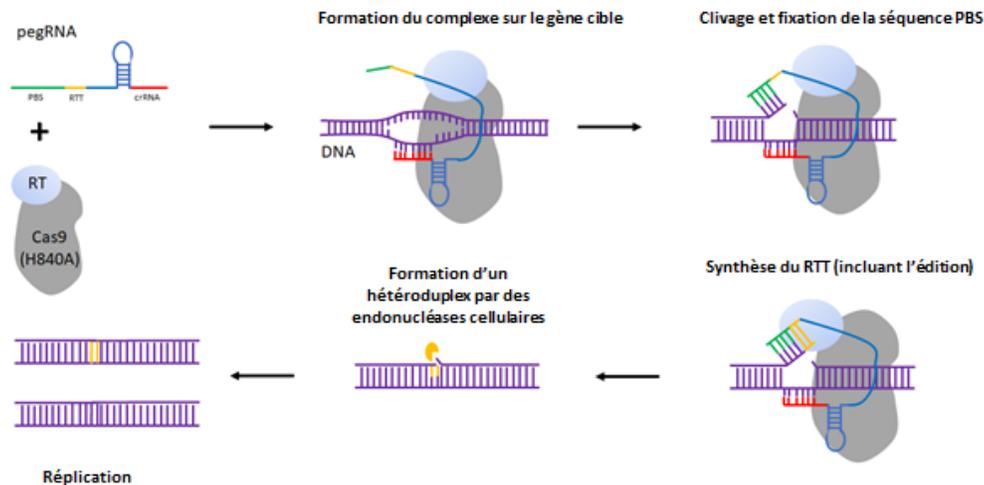


Les systèmes dérivés du CRISPR-Cas

I- L'édition primaires (ou « Prime editing »)

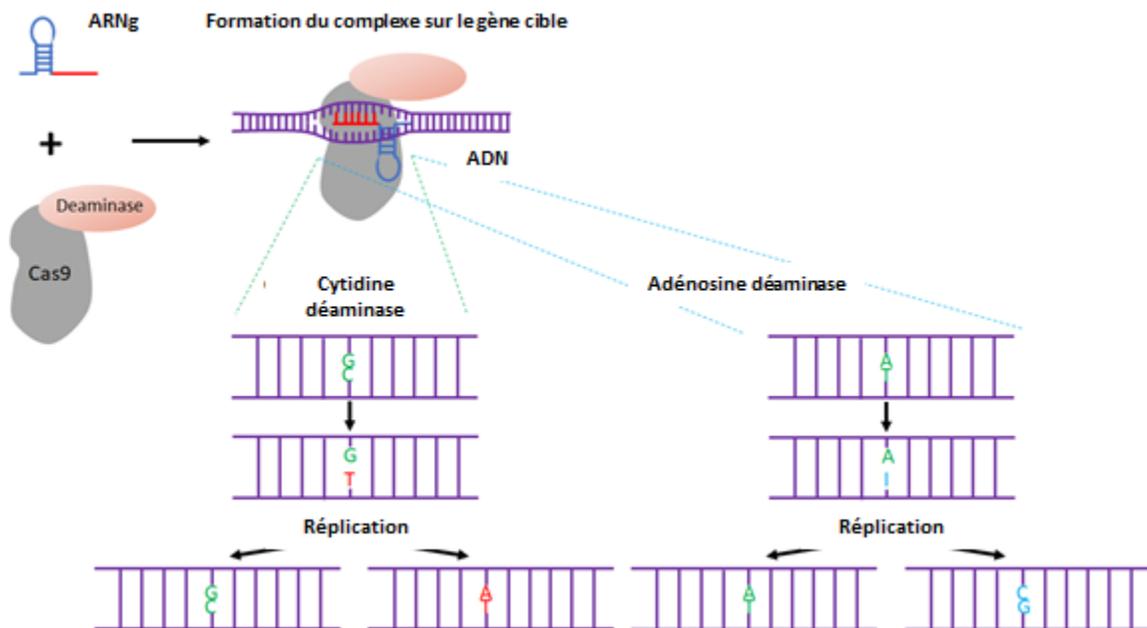
L'édition primaire (PE) conserve la spécificité de ciblage de CRISPR mais emporte avec lui une cargaison supplémentaire sous la forme d'un modèle d'ARN contenant des modifications en tant qu'extension contiguë de l'ARN guide (connu sous le nom de pegARN). Elle nécessite que la protéine Cas soit non seulement modifiée afin de ne cliver qu'un seul brin d'ADN Cas9 (H840A), mais soit aussi associée (PE1) ou fusionnée à son extrémité C-terminale (PE2) avec la transcriptase inverse M-MLV (RT) (H840A). L'utilisation de Cas9 (H840A), couramment appelée nickase Cas9, évite la formation d'une cassure d'ADN double brin (DSB) et coupe simplement le brin non complémentaire de l'ADN trois bases en amont du site PAM. Cela expose un lambeau d'ADN avec un groupe OH 3' qui se lie au site de liaison de l'amorce (PBS) de la matrice d'ARN, servant d'amorce pour la RT, qui étend le lambeau 3' en copiant la séquence d'édition du pegARN. Bien que ce lambeau 3' étendu soit thermodynamiquement moins susceptible de s'hybrider au brin complémentaire non édité par rapport au lambeau 5' non édité, la préférence inhérente de l'endonucléase endogène FEN1 pour exciser les lambeaux 5' conduit à favoriser l'hybridation du lambeau 3' édité, résultant ainsi en une édition de base très efficace.

L'utilisation d'un gRNA supplémentaire (PE3) favorise la réparation par PE mais augmente les effets hors cibles. Les cellules ont de multiples systèmes de réparation de l'ADN. Parmi ces derniers, le DNA Mismatch Repair (MMR) perturbe parfois le PE. L'inhibition du MMR *via* l'expression du répresseur MLH1d dans une approche de type PE2 est appelée PE4 et PE5 dans une approche de type PE3.



II- L'édition de base (ou « Base editing »)

Plus récemment, l'édition de base (BE), une adaptation du système CRISPR, s'est développée. Cette méthode d'édition précise consiste à changer un nucléotide unique. Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter la rupture des brins d'ADN, ce qui évite les insertions et délétions associées à cette rupture. Le BE n'est approprié que pour une édition précise, mais s'avère très efficace pour ce type d'édition. La différence d'action vient de la fusion d'une enzyme de type déaminase : la Cytidine déaminase convertira une cytidine (C) en uracile (U) alors que l'Adénosine déaminase convertira une adénosine (A) en inoside (I). La réplication cellulaire terminera le travail en associant, dans un premier temps, un C à l'inoside ou un A à l'uracile et, dans un second temps, une guanosine (G) au néo-C et une Thymidine (T) au néo-A. La cytidine du début est devenue une thymidine et l'adénosine, une guanosine.



III- Le criblage : CRISPRi et CRISPRa

Le système d'inactivation du gène CRISPR-Cas9 a également été adapté aux technologies de modulation génique connues sous le nom d'interférence CRISPR (CRISPRi) et d'activation CRISPR (CRISPRa). Ces technologies utilisent Cas9 désactivé par nucléase (dCas9) et fusionné avec un

régulateur transcriptionnel qui se lie à la région génomique cible avec la même efficacité que Cas9 *via* un gARN. Cette version de Cas9 ne peut pas générer de DSB et entraîne à la place un contrôle transcriptionnel dirigé par l'ARN de la région cible. CRISPRi utilise dCas9 fusionné avec un répresseur et un ARN guide standard pour cibler les régions promotrices pour la répression transcriptionnelle. En revanche, CRISPRa utilise dCas9 fusionné à un activateur transcriptionnel, qui sera dirigé vers des régions promotrices par l'ARN guide standard qui recrutent des effecteurs supplémentaires pour l'activation transcriptionnelle et l'expression accrue du gène cible.

