



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Génomique Végétale

Intitulé :

Nouvelle approche d'ingénierie génomique (CRISPR-Cas9)

Présenté et soutenu par : *GHERBI Adra*

Le : 27 juin 2018 ;

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme **GHILOUA-BOUCHTAB Karima** Maitre assistante à UFM Constantine.

Rapporteur : Mme **KACEM N. Sandra** Maitre de conférences à UFM Constantine.

Examineurs : Mr. **TEMAGOULTH Mahmoud** Maitre-assistant à UFM Constantine.

Année universitaire
2017 - 2018

Remerciement

*Je remercie Allah le tout puissant qui m'a donné la force
et le savoir de réaliser ce document,
sans Lui ce manuscrit n'aurait pu exister.*

*Mes vifs remerciements s'adressent en premier lieu à mon
encadreur qui a accueilli et dirigé ma recherche
et m'a toujours accordée leur soutien, madame **KACEM NADIA
SANDRA**, pour sa confiance, sa disponibilité,
ses encouragements et ses conseils; aussi,
pour sa ténacité dans le travail, son accueil chaleureux,
ses corrections continues, pour ses qualités humaines
et sa gentillesse.*

*Mes remerciements cordiaux s'adressent aussi aux membres
du jury pour avoir accepté de juger ce travail:*

*J'exprime ma reconnaissance et mon profond respect et gratitude
à Madame **GHIOUA KARIMA**, pour l'honneur qu'elle m'a fait
en présidant le jury de ce mémoire. Et Je voudrais ensuite remercier*

*monsieur **TEMAGOULT MOHAMED** pour avoir accepté
d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements les plus sincères à tous les **enseignants** durant
les années d'études.*

*Enfin je remercie mes très chers **parents**, toute ma **famille**,
tous ceux qui ont contribué par leur aide morale
de près ou de loin, et tous mes **amis** et tous ceux qui me sont chers
trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour leurs
encouragements.*

Merci

Dédicace

*À Mon père Gherbi Abdelhafid ma mère Souaker
Nora qui m'ont toujours encouragée et soutenue, qui
ont fait de moi aujourd'hui la femme que je suis.
Que Dieu leur prête encore une très longue vie de
paix et de bonheur,*

À toute la famille sans oublier personne,

À mon petit frère Ishak.

À Tous mes camarades de la promo

*À tous ceux qui m'aiment et à tous ceux qui me sont
chers.*

Adra

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Classification des mutations	04

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNdb	Acide Désoxyribonucléique double brin
ALS1	Acetolactate Synthase 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNg	Acide ribonucléique guide
BAC	Bacterial Artificial Chromosomes
Cas9	CRISPR associated protein 9
crARN	CRISPR ARN
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées)
CTD	C Terminal Domain
DB	Double Brin
DSB	Ddouble-Stranded Breaks
EMS	Ethyl Methane Sulfonat
EFSA	L'European Food Safety Authority
HDR	Homology-Directed Repair
NBT	New Breeding Techniques
NHEJ	Non Homologous End Joining

NPBT	New Plant Breeding Techniques
nt	Nucleotides
ODM	Oligonucleotide Directed Mutagenesis (la mutation dirigée par oligonucléotides)
PAM	Protospacer Adjacent Motif
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Poly Ethylène Glycol
pTi	Tumeur inducing plasmide
RdDM	RNA-dependent DNA Methylation
RT qPCR	Real-Time quantitative PCR
SDN	Site Directed Nuclease.
TALENs	Transcription activator-like effector nuclease (nucleases effectrices de type activateur de transcription).
T-DNA	Transfer DNA
tracrARN	trans-activating CRISPR RNA
ZFN	Zinc Finger Nucleases

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Taille des génomes d'organismes représentatifs.	02
02	Structure d'un gène avant et après le mécanisme de la transcription.	03
03	Action de l'enzyme de restriction EcoRI.	09
04	Principe de clonage dans un plasmide.	11
05	Différentes formes du génome du bactériophage λ , et sa structure.	12
06	Principales régions d'un plasmide Ti.	15
07	Transfère de l'ADN-T dans le génome de la plante par Agrobacterium.	16
08	Schéma d'un locus CRISPR.	25
09	Organisation des systèmes CRISPR/Cas de type II.	28
10	Processus de découpage de l'ADN a un endroit précis par la Cas9.	29
11	Biologie du système CRISPR-Cas de type II.	30
12	Fonctionnement du système CRISPR/Cas chez la bactérie.	31
13	Technologies d'édition génomique exploitent les machines de réparation d'ADN endogène.	32
14	Modifications des profils de maturation de la tomate.	34
15	SDN2 sur le promoteur de gène responsable de rendement en cas de stress hydrique chez le maïs.	34

18	Premier chien modifié par CRISPR-Cas9.	36
17	Deux singes jumeaux après modification de l'embryon par CRISPR-Cas9.	37

Sommaire

<i>Remerciement</i>	
<i>Dédicace</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Résumé</i>	
<i>Abstract</i>	
<i>مختصر</i>	
<i>Sommaire</i>	
<i>Introduction générale</i>	01
<i>Chapitre1 : Le génie génétique</i>	
I- Rappel sur la structure des génomes et de l'ADN	02
II- Origines de la biologie moléculaire	04
III- Le génie génétique	04
III-1 Quelques repères chronologiques	05
III-2 La fragmentation spécifique du génome par les enzymes de restriction	05
III-2-1 Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction	09
III-3 Les enzymes de modification	09
IV- Exploration et manipulation des gènes	10
IV-1 Le vecteur de clonage	10
IV-1-1 Les plasmides	10
IV-1-1-1 Un exemple de plasmide: le puc19	11
IV-1-2 Les bactériophages	12

IV-1-3 Les cosmides	13
IV-1-4 Les chromosomes artificiels bactériens	13
IV-1-5 Les chromosomes artificiels des levures	13
IV-1-6 Chromosomes artificiels dérivé de P1 "PAC"	13
IV-1-7 Les vecteurs viraux et rétroviraux	13
IV-2 La transformation génétique	14
IV-2-1 Les méthodes directes	14
IV-2-2 Les méthodes indirectes	15
<i>Chapitre 2 : Amélioration génétique des plantes et biotechnologie</i>	
I- Principe de base de l'amélioration génétique chez les plantes	17
II- Diversité des biotechnologies disponibles	18
II-1 La mutagenèse induite	18
II-2 La polyploïdisation	18
II-3 Le croisement interspécifique	19
II-4 Introgression de caractères	20
II-5 Manipulation des cytoplasmes	20
III- Des nouveaux outils de sélection végétale	20
III-1 La cisgénèse et l'intragénèse	20
III-2 Mutagenèse dirigée par oligonucléotide	21
III-3 Méthylation de l'ADN dépendante de l'ARN	21
III-4 Agro-infiltration	21
III-5 Sélection inverse	22
III-6 Le greffage sur des porte-greffes génétiquement modifiés	22
III-7 La biologie de synthèse	22

III-8 Les nucléase ciblées	22
III-8-1 Nucléase à doigt de zinc (ZFN)	22
III-8-2 les méganucléases	23
III-8-3 Les TALENs	23
III-8-4 Le système CRISPR	23
<i>Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome</i>	
I- Découverte de CRISPR	25
I-1 Découverte des gènes Cas	26
I-2 Création du SgRNA	27
II- Description du système CRISPR/Cas de type II	27
III- Principe de la technique	28
IV- Deux mécanismes de réparation de l'ADN	31
V- Applications de la technologie CRISPR-Cas9	32
V-1 Place de CRISPR-Cas9 dans l'amélioration des plantes	32
V-2 En thérapie génique	35
V-2-1 Quelques expériences chez les animaux	36
V-2-2 Chez l'être humain	37
VI- Débat bioéthique	38
VI-1 OGM	39
<i>Conclusion</i>	40
<i>Référence bibliographique</i>	41

Résumé

L'amélioration des plantes a évolué avec le développement des pratiques culturales et des découvertes scientifiques, telles que les outils du génie génétique, et la biotechnologie. CRISPR-Cas9 pour Clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR associated genes désigne une structure génétique procaryote dont l'expression confère aux bactéries et archées une immunité adaptative dirigée contre les virus. La curiosité de diverses équipes scientifiques a permis la compréhension et le détournement de ce système au profit de l'édition génomique. Ses applications sont multiples et de nombreuses preuves de concepts ont été développées. Chacune des applications correspond à un contexte scientifique mais aussi médical ou législatif. Ces contextes nous permettent de comprendre l'importance, les espoirs mais aussi les risques et les limites de ces applications.

Mots clé: biotechnologie, CRISPR-Cas9, amélioration.

Abstract

Plant breeding has evolved with the development of cultural practices and scientific discoveries, such as genetic engineering tools and biotechnology. The CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats – CRISPR associated) system is a prokaryotic genomic structure that confers an adaptive immunity to bacteria and archaea. Its investigation by multiple scientific groups allowed a comprehension of this novel system, enabling the manipulation of its capabilities for the purpose of genome editing. This tool, made of a protein and a guideRNA, can specifically target and cleave any nucleic acid sequence. Its applications are many, and several proofs of concept have been developed. Each of these corresponds to a specific scientific, medical, or regulatory context that allows us to understand its importance, its aspirations, its limits and its risks.

Keywords: biotechnology, CRISPR-Cas9, improvement.

الملخص:

تطورت عملية تحسين النباتات مع تطور الممارسات الثقافية والاكتشافات العلمية مثل أدوات الهندسة الوراثية والبيوتكنولوجيا CRISPR-cas 9. بمعنى تكرارات قصيرة متناظرة و متجمعة بانتظام مع جينات مجتمعة ، تمثل بنية وراثية لبدائيات النوى تعبيرها يعطي للبكتيريا و العلائق مناعة ضد الفيروسات. ساعد فضول مختلف الفرق العلمية فهم وتحويل هذا النظام لصالح تحرير الجينوم. تطبيقاته متعددة. وقد تم تطوير العديد من الأدلة والمفاهيم. كل التطبيقات تتوافق مع السياق العلمي والتشريعي مما يسمح لنا بفهم الأهمية والأمال وأيضا المخاطر والحدود لهذا النظام.

الكلمات المفتاحية: تحسين، بيوتكنولوجيا، CRISPR-cas 9

Introduction

Introduction générale

L'amélioration des plantes est l'art et la science de la création de variétés de plantes. Elle a commencé avec la domestication, à partir de la fin du XIXe siècle (Gallais, 2011).

Depuis la découverte de la structure de l'ADN, des progrès déterminants ont été faits pour comprendre le rôle clé joué par les gènes dans les fonctions cellulaires de tous les organismes vivants. Des outils puissants ont été mis au point pour décrypter la structure des génomes, permettant d'accéder à un grand nombre d'informations sur les variations, les altérations de séquences ADN et de définir et préciser leur rôle dans le développement des pathologies. Après la transgénèse, les techniques de manipulation du génome se succèdent à une grande vitesse, par exemple : mutagenèse dirigée par oligonucléotides, nucléases dirigées à doigt de zinc, méganucléases, Talen, Crispr-Cas9, etc (Jean-Yves et Procaccia, 2017).

CRISPR/Cas9 est une découverte majeure dans l'histoire des sciences de la vie qui souligne l'importance de la recherche fondamentale. Elle permet en effet de modifier le génome de toute cellule vivante : animale, humaine, et végétale de façon ciblée, simple, rapide, et de manière peu coûteuse. Elle devient ainsi relativement abordable de neutraliser des gènes et des séquences ADN ou de les remplacer pour ajouter de nouvelles caractéristiques (Debry, 2016).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail. Nous avons ainsi pour objectif, à travers cette synthèse bibliographique, d'aborder le savoir du génie génétique qui fera l'objet d'un **premier chapitre**. Le **deuxième chapitre** portera sur les principes de l'amélioration génétique des plantes et les nouveaux outils de sélection végétale. Le **dernier chapitre** retracera l'histoire de la découverte des CRISPR-Cas, et l'évolution des connaissances emmenant à son détournement comme outil d'édition génomique, il comprendra ensuite une représentation de l'importance de la technique CRISPR-Cas9, son impact, ses applications, ses promesses et ses limites.

Chapitre 1 : Le génie génétique

I- Rappel sur la structure des génomes et de l'ADN

Les tailles des génomes varient de quelques kilobases (10³ nucléotides ou kb) dans le cas de petits virus à plusieurs milliers de mégabases (10⁶ nucléotides ou Mb) (**Figure 1**). Tous ces génomes sont très fortement compactés *in vivo* (histones basiques organisées en nucléosomes chez les eucaryotes, protéines de type histone et polyamines chez les bactéries). *In vivo*, tous les ADN présentent un degré défini de superhélicité (Obae et West, 2012).

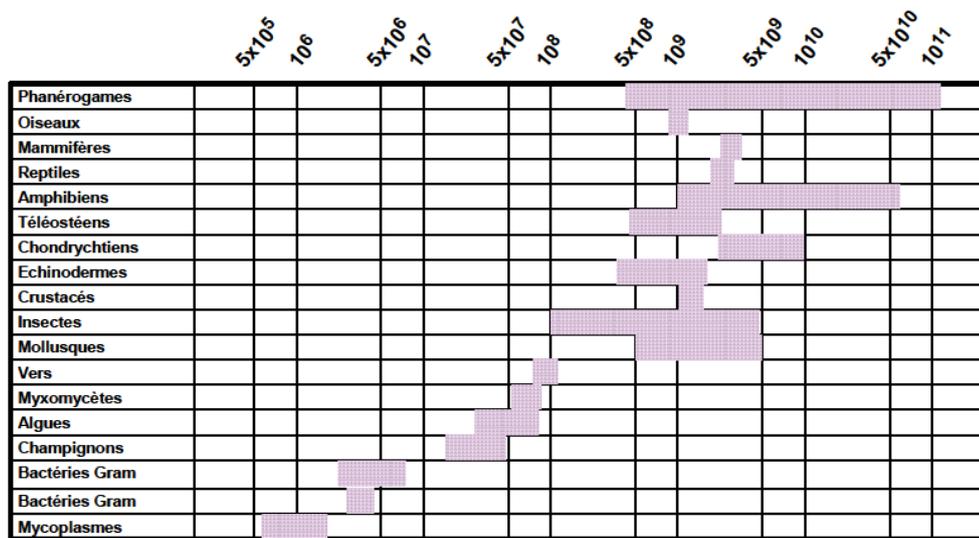


Figure 1: Taille des génomes d'organismes représentatifs en pb (Obae et West, 2012).

L'ADN est un polymère de bases désoxyribonucléiques, plus communément appelées nucléotides. Chaque nucléotide est constitué d'un groupement phosphate (ou acide phosphorique) lié à un sucre, le désoxyribose, lui-même lié à une base azotée (Turner et al., 2002).

Les bases azotées adénine et guanine appartiennent au groupe des purines alors que les bases thymine et cytosine appartiennent au groupe des pyrimidines. Les purines sont formées de deux cycles alors qu'il n'y en a qu'un pour les pyrimidines. Les bases azotées ne peuvent s'associer que deux à deux par leurs liaisons hydrogènes (deux

liaisons hydrogènes entre l'adénine et la thymine et trois liaisons hydrogènes entre la guanine et la cytosine).

Les nucléotides sont regroupés trois par trois « les codons ». Chaque codon produit un acide aminé particulier. Les acides aminés forment les protéines et chaque région de l'ADN qui produit une protéine fonctionnelle est appelée un gène.

Le gène est l'unité de base de l'information génétique car il contient les informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme, il se transmet en apportant des caractéristiques qui s'expriment ou pas, en fonction de l'environnement où il se trouve. C'est une portion d'ADN (**Figure 2**), qui se trouve dans toutes les cellules vivantes. Il commence et se termine par un codon particulier (Creveaux et al., 2013).

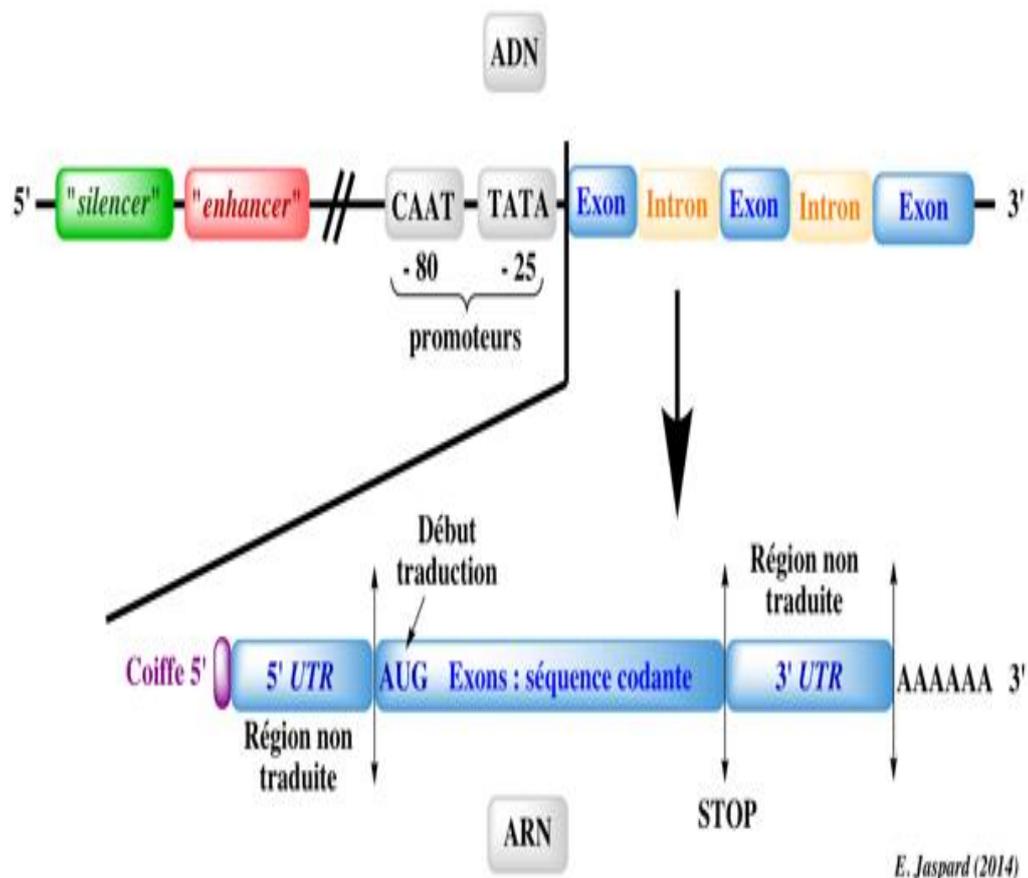


Figure 2: Structure d'un gène avant et après le mécanisme de la transcription.

II- Origines de la biologie moléculaire

L'histoire de la biologie moléculaire commence vraiment avec la rationalisation de ces savoirs et observations. Cette période est marquée par l'abandon de la théorie vitaliste et du principe de génération spontanée (Lionnet et Croquette, 2005).

La découverte de la structure de l'ADN, la connaissance du code génétique et de la génétique qui est la science du vivant qui étudie les fonctions chimiques des gènes et la transmission des caractères héréditaires entre les parents et leur descendance, la découverte des mécanismes de transcription des gènes qui permet la synthèse d'une molécule d'ARN à partir d'une molécule d'ADN complémentaire grâce à l'enzyme ARN polymérase, de la traduction de l'ARNm en protéine et la découverte du premier modèle de régulation de l'expression génétique ont fait acquérir à la biologie moléculaire ses bases les plus solides (Lionnet et Croquette, 2005).

III- Le génie génétique

Le génie génétique appelé également ingénierie génétique, est un ensemble de techniques permettant d'introduire et de faire exprimer dans un organisme vivant un ou des gènes provenant de n'importe quel autre organisme. Les organismes ainsi obtenus sont dits Organismes Génétiquement Modifiés (OGM). On distingue les techniques de biologie moléculaire qui permettent de préparer les séquences d'ADN qui seront introduites, on parle de construction génétique, et les techniques de transgénèse qui permettent de transférer le gène. La thérapie génique fait appel à ces techniques pour soigner ou prévenir des pathologies causées par des aberrations (mutations) dans l'ADN d'un individu (Maftah et al., 2007).

De nouvelles techniques plus précises, basées sur l'utilisation d'enzymes de restriction, sont apparues. Elles permettent une correction ciblée et stable du génome et suscitent de nombreux espoirs pour améliorer la thérapie génique. La découverte des enzymes de restriction a révolutionné la biologie moléculaire, en apportant aux chercheurs de merveilleux outils (des ciseaux moléculaires) pour la manipulation de l'ADN (Creveaux et al., 2013).

III-1 Quelques repères chronologiques

Il est intéressant de connaître les différentes étapes de la découverte de la structure chimique de l'ADN qui s'est effectuée tout au long du XIX^{ème} et XX^{ème} siècle, les définitions des gènes et de la génétique et les différents repères chronologiques des techniques du génie génétique. Le **tableau 01** retrace les principales étapes de la découverte, de l'élucidation de la structure de la molécule d'ADN, et de l'obtention des outils de génie génétique.

III-2 La fragmentation spécifique du génome par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases capables de reconnaître et de couper une séquence spécifique de l'ADN, leur utilisation permet d'obtenir des fragments d'ADN aux extrémités bien caractérisées, dont certains peuvent contenir des gènes. Elles sont produites par des bactéries afin de se protéger contre les infections par les bactériophages (Creveaux et al., 2013).

Tableau 1 : Repères chronologique de l'obtention d'ADN et des outils de génie génétique (Creveaux et al., 2013).

Les dates	Les événements
1866	Mendel découvre les "lois de l'hérédité" en étudiant la transmission de caractères dans des générations successives de pois. Cette théorie passe totalement inaperçue.
1879	observation de la chromatine
1882	Observation des chromosomes et de la mitose par Fleming.
1909	Wilhelm Johannsen crée le mot « gène »
1913	Expériences de Morgan sur la transmission de caractères et de mutations chez la drosophile: preuve de l'existence des gènes et de leur localisation chromosomique (hérédité liée au sexe et première carte génétique).
1943	La naissance de la génétique bactérienne.
1944	-Oswald Theodore Avery établi formellement le lien entre ADN et gène. -La nature chimique des gènes est démontrée par transformation de pneumocoques
1946	Découverte de la recombinaison génétique chez les bactéries par Joshua Lederberg et Edward Tatum.
25Avril 1953	Watson, Crick, Franklin et Wilkins établissent la structure 3D de l'ADN et le principe de réplication de l'information.
1956	Découverte de l'ADN polymérase (ADN pol I) par Arthur Kornberg. Cette enzyme intervient dans la synthèse de l'ADN.
1962	Découverte, par Werner Arber, des enzymes de restriction.
Début 1970	Le microbiologiste indien Ananda Chakrabarty invente, pour le compte de la General Electric Company, une bactérie génétiquement modifiée capable de dégrader les hydrocarbures.
1971	Première utilisation, par Daniel Nathans, des enzymes de restriction comme ciseaux moléculaires : découpage de l'ADN du virus SV40.
1972	L'Américain Paul Berg et ses collaborateurs ouvrent l'ère de la transgénèse en intégrant un fragment d'ADN du virus SV40 dans

	le génome d'une bactérie : c'est le premier OGM.
1975	- Mise au point, par Edwin Southern, d'une méthode de détection d'un gène par hybridation à l'aide d'une sonde nucléotidique complémentaire. Elle est baptisée Southern blot. - Invention des hybridomes, cellules immortelles qui synthétisent des anticorps dits monoclonaux, spécifiques d'une seule région de la molécule antigénique.
1978	- Invention, par Michael Smith, de la mutagenèse dirigée, méthode qui permet de remplacer à volonté un nucléotide par un autre dans un gène.
1977	Adaptation de la méthode Southern blot à la détection des acides ribonucléiques messagers (ARNm). Celle-ci reçoit le nom de Northern blot.
1980	Première utilisation de la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pour insérer un gène dans une cellule végétale.
1983	Kary Mullis, chercheur de la jeune firme de biotechnologie californienne Cetus, invente la polymérase chain reaction (PCR), une technique qui permet d'amplifier plusieurs millions de fois tout fragment d'ADN.
1989	Découverte des microsattellites, courts fragments d'ADN répétés.
juillet 1996	- Dans les laboratoires du Roslin Institute d'Édimbourg, d'une brebis très particulière, premier mammifère cloné - Premier génome eucaryote séquencé (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).
2001	Roger Kornberg élucide le mécanisme de la transcription chez les eucaryotes.
2002	Découverte par Elizabeth et Carol le rôle des télomères et la télomérase dans la protection des chromosomes.
2003	Le génome humain est séquencé.
2005	Mise au point de séquenceurs haut débit.
2009	Séquençage du génome du maïs.
2012	Découverte de la technique d'édition du génome CRISPR-CAS9.

La plupart des sites de restrictions sont des séquences palindromes de 4 à 8 paires de base. Si le site de coupure se situe sur l'axe de symétrie de la séquence, les deux extrémités produites sont dites franches, et si n'est pas le cas, on parle d'extrémités cohésives (**Figure 3**). Il existe trois types d'enzymes de restriction isolées des bactéries.

Type I : l'enzyme reconnaît sa séquence puis se déplace sur l'ADN et s'arrête de manière aléatoire 1000 à 5000 paires plus loin et libère quelques dizaines de nucléotides. Leur l'action nécessite la présence de Mg^{2+} , d'ATP comme cofacteur, et de S-adénosyle-méthionine. Leur site de coupure est éloigné de leur site de reconnaissance.

Type II : sont les plus nombreuses et les plus utilisées aux laboratoires de génie génétique à cause de leurs propriétés de coupure et de reconnaissance. Leurs sites de restrictions de 4 à 8 paires de bases, sont des séquences palindromiques. Les enzymes de restriction de type II provoquent 2 types de coupure.

Type III : après reconnaissance de la séquence spécifique, ces enzymes découpent l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin. La longueur des séquences reconnues est comprise entre 4 et 8 bases. Elle est identique sur les 2 brins.

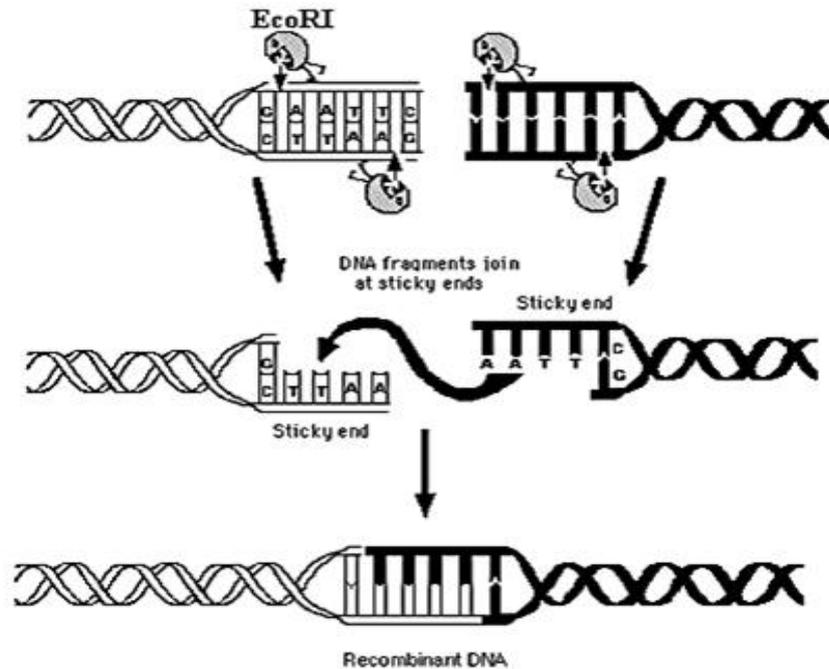


Figure 3 : Action de l'enzyme de restriction EcoRI.

III-2-1 Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction

L'ADN bactérien présente des sites de restriction susceptibles d'être repérés par les enzymes de restriction que possède la bactérie. Pour éviter une autodestruction, les enzymes de modification de l'ADN bactérien interviennent. Ces enzymes de modification sont des méthylases bactériennes (ou enzymes de méthylation). La méthylation de la cytosine (sur le carbone 5) ou de l'adénine (sur l'azote 6) appartenant à des sites de restriction aboutit à une inactivation de l'enzyme de restriction correspondante. Cette méthylation peut se réaliser sur une base ou sur plusieurs bases appartenant au site de restriction. Les méthylases bactériennes sont très spécifiques (Brek et al., 2005).

III-3 Les enzymes de modification

Les enzymes de modification sont extraites et purifiées de virus, bactéries ou cellules eucaryotes qui les utilisent. Par exemple, les ligases permettent de lier ensemble deux acides nucléiques, elles sont à la base de clonage puisqu'elles permettent de lier les fragments en créant une molécule recombinées (T4 DNA ligase); les kinases permettent

de changer ou d'ajouter un groupe phosphate à un nucléotide terminal 5' d'un acide nucléique mono ou double brin (T4 polynucléotide kinase) ; les phosphatases servent à retirer les groupements phosphate (phosphatase alcaline) ; et les polymérase synthétisent les acides nucléiques à partir de d'une matrice ADN ou ARN dans le sens 5' vers 3' (Creveaux et al., 2013).

IV- Exploration et manipulation des gènes

IV-1 Le vecteur de clonage

C'est un petit élément génétique à réplication autonome, utilisé pour produire de multitude de copie du gène d'intérêt. Ces vecteurs de clonage sont spécialement conçus pour permettre l'intégration de la portion d'ADN exogène dans un site spécifique sans que cela affecte sa propre réplication (Maftah et al., 2007).

Il existe plusieurs types de vecteurs pouvant introduire des molécules d'ADN recombinées dans les bactéries, les levures, les cellules végétales ou les cellules de mammifères et humaines. Cependant, un vecteur doit pouvoir :

- tolérer la présence d'un ADN étranger.
- présenter des sites de restriction uniques.
- être aisément sélectionnable dans un hôte cellulaire, lui-même cultivable facilement.
- être facile à séparer du reste du génome de l'hôte.
- exister si possible à l'état de copies multiples dans la cellule hôte.

IV-1-1 Les plasmides

Les plasmides sont des petits éléments génétiques circulaires, extra chromosomiques, double brin. La taille des plasmides varie de 1 kb à deux ou trois centaines de kb. Typiquement, ils comportent : une origine de réplication, des sites polylinker (site multiple de clonage), un ou deux marqueurs de sélection... (Maftah et al., 2007).

Les plasmides sont de bons vecteurs de clonage (**Figure 4**) chez les bactéries parce qu'ils se multiplient en nombre de copies important et qu'ils sont aisément

purifiables. Les marqueurs de sélection (Ex. gènes de résistance aux antibiotiques) permettent l'identification des bactéries recombinantes (transformées) qu'ils les portent.

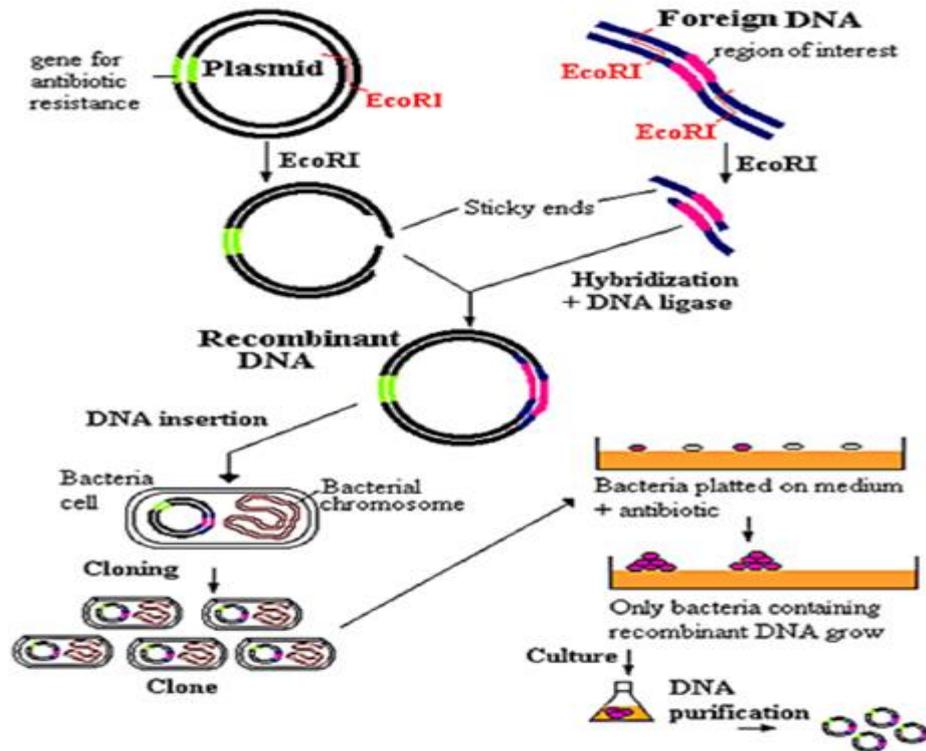


Figure 4: Principe de clonage dans un plasmide.

IV-1-1-1 Un exemple de plasmide: le puc19

Un plasmide classique est le pUC19. La séquence complète est connue (268 nucléotides) (Creveaux et al., 2013). Il comporte les particularités suivantes:

- Un gène de résistance à l'ampicilline (antibiotique). La présence de ce gène permettra à la bactérie porteuse de ce plasmide de ne pas être sensible à l'effet de cet antibiotique.
- Le gène lac Z qui code pour la b-galactosidase dans l'opéron lactose.
- Enfin, une région avec des sites multiples et uniques pour des enzymes de restriction connues. Cette région est appelée " polylinker ". Son rôle est de permettre l'insertion du fragment d'ADN étranger.

Ce type de plasmide est intéressant car il montre un système de sélection des bactéries ayant été transformées par les plasmides recombinants. Un système enzymatique appartenant à l'opéron lactose peut être utilisé à la place d'un second antibiotique.

L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide pUC 19 aboutit à l'inactivation du gène qui code pour la β -galactosidase. Pour vérifier la présence ou l'absence de l'activité enzymatique β -galactosidase, on utilise un galactoside dont la couleur passe de l'incolore au bleu quand il est clivé par la β -galactosidase, ce composé s'appelle *X-gal*.

IV-1-2 Les bactériophages

Les bactériophages ou les phages; sont des virus bactériens capables d'injecter leur matériel génétique dans une bactérie. Le phage λ et le phage M13 sont les plus utilisés. Le phage λ (**Figure 5**) a été découvert en 1950, dont l'ADN linéaire et bicaténaire. Il est environ 1000 fois plus efficace que les vecteurs plasmidiques pour clonner un grand nombre de fragments d'ADN. Le phage M13, dont l'ADN est circulaire simple brin (Brek et al., 2005).

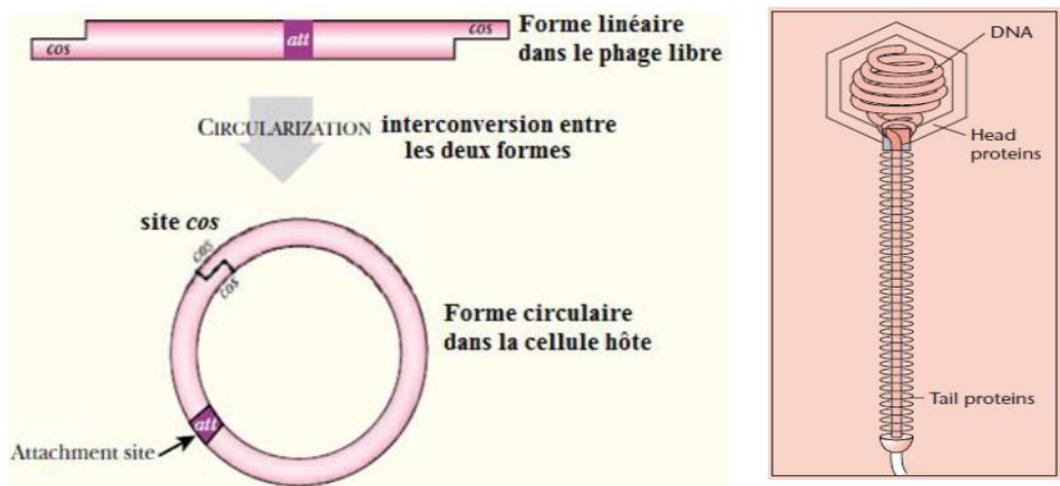


Figure 5: Différentes formes du génome du bactériophage λ , et sa structure (Primose et al., 2002).

IV-1-3 Les cosmides

Les cosmides sont des vecteurs artificiels constitués d'un plasmide classique auquel ont été ajoutées les séquences cos du phage λ . Ces vecteurs sont des molécules d'ADN circulaires hybrides (Maftah et al., 2007). Ils rassemblent à la fois les propriétés intéressantes des plasmides comme :

- L'origine de réplication.
- Gène de résistance à un antibiotique et celles du bactériophage.
- Encapsidation *in vitro* de grand fragment d'ADN.

IV-1-4 Les chromosomes artificiels bactériens

Les BACs sont des vecteurs de grande capacité, possédant les séquences permettant sa réplication et son maintien dans une bactérie. Ils peuvent porter des inserts d'ADN d'une taille proche de 300 kpb. Généralement, ils sont introduits dans les bactéries par électroporation (Maftah et al., 2007).

IV-1-5 Les chromosomes artificiels des levures

Les YACs peuvent recevoir de longs fragments d'ADN à cloner (de 200 jusqu'au 500 kb). Malgré que les YAC puissent porter de plus grand fragments (inserts) que les BAC, les problèmes de recombinaison et de réarrangement de l'ADN cloné sont plus importants avec la levure qu'avec *E. coli*. Ce qui rend les BAC plus utilisés que les YAC en clonage génomique (Creveaux et al., 2013).

IV-1-6 Chromosomes artificiels dérivé de P1 "PAC"

Ils sont construits par la combinaison des éléments du système P1, et du facteur F, les vecteurs PAC permettent de manipuler des inserts de 100 à 300 kb.

IV-1-7 Les vecteurs viraux et rétroviraux

Il y a plusieurs types de vecteurs viraux qui peuvent être employés pour livrer les acides nucléiques des cellules, y compris le rétrovirus, le lentivirus, l'adénovirus, le virus adeno-associé et le virus herpès simplex. Chacune de ces derniers a de seuls avantages et inconvénients pour des applications particulières. Ils sont utilisés dans la thérapie génique, et dans d'autres domaines. Ils autorisent le clonage de grands fragments d'ADN (Maftah et al., 2007).

Comme tous les virus, les rétrovirus recombinants sont capables d'infecter simultanément un grand nombre de cellules. Ils ont la capacité de s'intégrer très efficacement dans le génome de la cellule infectée d'une mode stable et permanente. La Transcriptase inverse dans le virus permet l'intégration dans le génome d'hôte (Lehn, 1990).

IV-2 La transformation génétique

La transformation génétique chez les végétaux a pour but l'introduction, l'insertion et l'expression de nouveaux caractères (ou la suppression de caractères) dans le génome des cellules végétales par d'autres moyens que la fusion de gamètes (Birch, 1997).

Il y'a plusieurs méthodes sont largement utilisées pour introduire l'ADN dans les cellules hôtes: les méthodes dites directes et les méthodes indirectes.

IV-2-1 Les méthodes directes

Les principales techniques de transformation directe sont la biolistique, la microinjection, l'électroporation, et le transfert utilisant le PEG.

La **biolistique** a été mise au point pour permettre la transformation génétique de plantes monocotylédones, plus difficiles à transformer par les méthodes indirectes que les dicotylédones. Elle consiste à projeter sur des tissus des microparticules de tungstène ou d'or recouvertes d'ADN, à l'aide d'un canon à particule (Creveaux et al., 2013).

La **micro-injection** du transgène dans le noyau de la cellule est la meilleure méthode de transfert de gène, mais aussi la plus délicate à mettre en œuvre (Creveaux et al., 2013). Il est possible de transférer des organites subcellulaires et de l'ADN grâce à la microinjection.

L'**électroporation** de protoplastes et de cellules intègres est basée sur la capacité qu'ont les macromolécules présentes dans le milieu extracellulaire (Fromm et al., 1985;

Lörz et al., 1985; Fromm et al., 1986; Arencibia et al., 1995) d'être acceptées à l'intérieur de cellules vivantes après un cours choc électrique (Neumann et al., 1982).

Elle consiste à appliquer un champ électrique sur les membranes ce qui augmente la perméabilité membranaire, l'ADN chargé négativement peut rentrer dans les cellules en migrant vers le pôle positif de la charge (Creveaux et al., 2013).

IV-2-2 Les méthodes indirectes

Les méthodes indirectes utilisent des agents pathogènes tels que les virus ou les bactéries. Les vecteurs les plus souvent utilisés sont les agrobactéries: *Agrobacterium tumefaciens* responsable de la galle du collet ou crown gall. Celle-ci renferme un plasmide, appelé plasmide Ti, et *Agrobacterium rhizogenes* responsable de la prolifération du chevelu racinaire ou hairy roots.

Les plasmides Ti d'*Agrobacterium* (Figure 4) est composé de différents éléments : un ADN-T (ADN de transfert) flanqué de RB et LB, une région de virulence comprenant des gènes vir permettant le transfert de l'ADN-T à la cellule végétale, de gènes servant au transfert de plasmides entre bactéries par conjugaison, d'une séquence servant à sa réplication, et de gènes impliqués dans le catabolisme des opines.

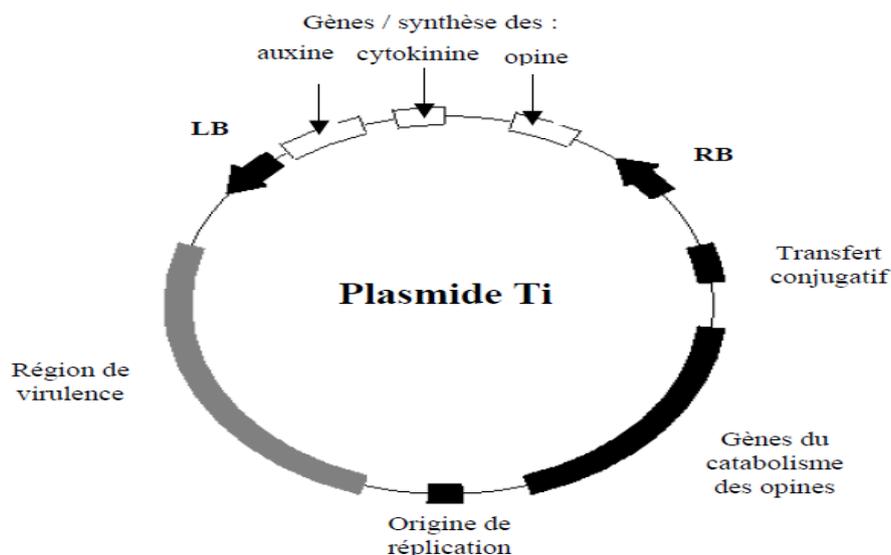


Figure 6 : Principales régions d'un plasmide Ti (Lièvre, 2004).

Les transformations utilisant *Agrobacterium tumefaciens* (**Figure 7**) présentent beaucoup d'avantages sur les méthodes directes. Le nombre de copies du transgène transféré à la plante est réduit, ce qui diminue le risque potentiel de co-suppression et d'instabilité du transgène (Hansen et al., 1997).

C'est aussi un système où une cellule unique est transformée, ce qui évite ainsi l'obtention de plantes chimères comme c'est très souvent le cas en transformation directe.

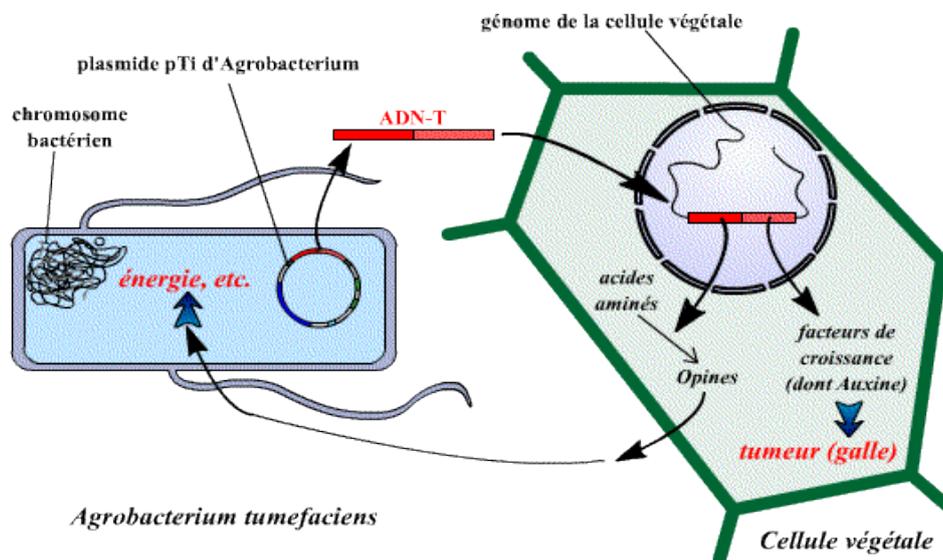


Figure 7 : Transfère de l'ADN-T dans le génome de la plante par *Agrobacterium* (Weidner et Furelaud., 2016).

Chapitre 2 : Amélioration génétique des plantes et biotechnologie

I- Principe de base de l'amélioration génétique des plantes

La sélection au début était plus un art qu'une science et se basait surtout sur le jugement du sélectionneur et sur sa capacité à identifier les génotypes supérieurs. De nos jours et avec le développement des sciences biologique, elle est devenue plus une science qu'un art (Zahour, 1992).

L'amélioration des plantes est un outil extrêmement puissant pour accroître la productivité et la qualité de nos cultures. Depuis le début de l'agriculture, l'homme a cherché à améliorer les plantes par rapport à des critères de qualités ou de rendement correspondants à ses besoins. D'un point de vue génétique, il s'agit de réunir dans un même génotype, ou groupe de génotypes, la variété, le maximum de gènes favorables. Pour mettre en œuvre ce processus d'amélioration.

C'est l'art et la science de la création de variétés de plantes ayant des caractères bien définis. Elle a commencé avec la domestication, s'est poursuivie essentiellement à partir de la fin du XIXe siècle par l'amélioration dirigée des plantes intégrant de plus en plus dans ses méthodes et ses outils les progrès des connaissances (Gallais, 2011).

L'objectif principal de l'amélioration des plantes est la création des cultivars. Ces cultivars ou variétés agricoles doivent avoir un ensemble de caractéristiques leur permettant d'être cultivés avec profit par le producteur et d'être appréciés par le consommateur (Zahour, 1992).

Par l'utilisation de la sélection, des systèmes de reproduction et des biotechnologies. Il s'agit de réunir dans une même variété le maximum de gènes favorables pour avoir des objectifs principaux une productivité, une adaptation et une qualité meilleures (Gallais, 2011 ; Gallais, 2015).

Le sélectionneur doit tenir compte non seulement de la productivité, mais aussi de caractères plus qualitatifs, comme la valeur nutritive, les propriétés organoleptiques et la composition des produits, l'esthétique, la résistance, la facilité de récolte, de transport, de conservation, le rendement à l'usage. Ainsi, le sélectionneur doit se fixer un idéotype,

c'est-à-dire une image idéale de la plante qu'il souhaite créer. Un idéotype très précis est cependant utopique, parce que trop de facteurs souvent contradictoires interviennent, entre lesquels un équilibre doit être trouvé.

II- Diversité des biotechnologies disponibles

Les chercheurs apportent de nouvelles approches de l'amélioration des cultures, telles que la transgénèse, le génie génétique, la génétique et la biotechnologie végétale (Demarly et Sibi, 1996).

La réalisation de cultures de cellules et de tissus végétaux, au cours des vingt dernières années, a permis de faire passer du champ au laboratoire une partie du travail de sélection. Grâce à l'extension de la recherche, de nouvelles disciplines, tels la «biotechnologie végétale» et le «génie génétique», se sont mises au service de la sélection des plantes (Cucchi, 2016).

Ces techniques sont fondées sur la totipotence cellulaire, c'est-à-dire la faculté qu'ont des organes isolés (méristèmes), des fragments de tissus, des cellules isolées et des protoplastes de recréer une plante entière et florissante. Ces fragments sont cultivés dans des conditions aseptiques dans des tubes à essai sur des milieux artificiels de composition chimique connue, dans des conditions strictement contrôlées. On parle de la culture *in vitro* (Novak et Brunner, 1992).

II-1 La mutagenèse induite

La mutagenèse induite consiste à exposer des tissus végétaux à des agents mutagènes les radiations ionisantes ou des produits chimiques comme l'EMS. Du fait de sa simplicité de mise en œuvre, a été utilisée sur de multiples espèces et dans de nombreux pays dans le but de créer de la variabilité (Periquet et al., 2007).

II-2 La polyploïdisation

L'induction de la polyploidie a été rendue possible dès 1937 avec la découverte de l'action mitoclasique de la colchicine (Blakeslee, 1937). Cet alcaloïde a pour effet de bloquer la mitose après la phase de doublement du stock chromosomique. Par

la suite, d'autres substances ont été découvertes telles que le protoxyde d'azote. La polyploïdisation a été utilisée principalement pour obtenir de nouveaux caractères mais aussi comme aide à la réussite de croisements interspécifiques.

II-3 Le croisement interspécifique

Les premières expériences de croisement interspécifique sont probablement faites par Linné, dans le but d'établir la classification des espèces. Le sélectionneur est toujours à la recherche de variabilité. Le sélectionneur est toujours à la recherche de variabilité. Une des voies pour accroître la variabilité est d'essayer d'exploiter la variabilité des espèces phylogénétiquement proches. Dans certains cas, les croisements interspécifiques se font assez facilement. C'est le cas par exemple du maïs qui se croise sans trop de difficultés avec la téosinte, de la betterave avec les betteraves sauvages et du colza avec la navette. Mais cette situation est loin d'être générale (Zahour, 1992).

Les sélectionneurs ont dû déployer des techniques très diverses pour contourner les barrières empêchant les croisements interspécifiques. Certaines d'entre elles empêchent la fécondation. Le grain de pollen peut être incapable de germer sur le style de la fleur d'une autre espèce ou le tube pollinique émis par le grain de pollen peut être trop court (croissance trop lente ou style trop long) pour pouvoir atteindre l'oosphère (Periquet et al., 2007).

Les sélectionneurs ont pu surmonter ce type de barrières antérieures à la fécondation en changeant par exemple les sens de croisement, en utilisant du pollen mentor, en déposant le pollen sur des styles coupés préalablement et enfin de manière plus radicale, en ayant recourt à l'hybridation somatique. Dans d'autres cas, souvent du fait d'une différence du nombre et de la forme des chromosomes entre les deux espèces croisées, l'embryogenèse de l'hybride ne se déroule pas normalement et conduit à un avortement. Dans d'autres cas, l'hybride se forme, se développe mais s'avère complètement stérile. Les techniques de sauvetage d'embryons et de polyploïdisation ont aidé à la réussite de nombreux croisements. Le croisement interspécifique a été utilisé pour créer des nouvelles espèces mais aussi pour transférer des caractères d'intérêt des espèces sauvages aux espèces cultivées (Periquet et al., 2007).

II-4 Introgression de caractères

Le sélectionneur a souvent souhaité introduire un caractère d'intérêt présent dans des espèces sauvages dans une variété qui possède de bonnes caractéristiques agronomiques. La méthodologie suivie consiste à réaliser une hybridation puis une série de rétro-croisements avec la variété d'intérêt. Cette stratégie a permis de modifier en profondeur certaines espèces, notamment en ce qui concerne l'introduction de résistances aux maladies (Causse et al., 2000).

II-5 Manipulation des cytoplasmes

Lors de la reproduction sexuée, l'embryon hérite d'une information génétique nucléaire mixte entre les deux parents et d'une information génétique cytoplasmique d'origine maternelle. Il peut être intéressant de manipuler les informations génétiques contenues dans les organites présents dans le cytoplasme. Ceci a été rendu possible grâce à l'hybridation somatique, méthode qui consiste à fusionner des protoplastes issus de cellules somatiques. Des méthodes de culture in vitro permettent ensuite de régénérer une plante entière à partir des produits de fusion. La production de cybrides (pour hybrides cytoplasmiques), plantes dont l'information génétique provient d'une substitution (cas en particulier des chloroplastes) ou d'une recombinaison (cas des mitochondries) des génomes dits cytoplasmiques est à l'origine de la correction de la stérilité mâle (Pelletier et al., 1983).

III- Des nouveaux outils de sélection végétale

De nouvelles techniques d'amélioration des plantes émergent rapidement des progrès de la recherche génomique, pour une application dans l'amélioration des cultures (Gouache, 2017 ; Lüthi et al., 2016). Ils permettent des changements précis, ciblés et fiables dans le génome (Pelletier et al., 1983; Pelletier et al., 2007), ils sont différents des OGM, ils ont un potentiel significatif pour l'intensification durable de l'agriculture et de la sécurité alimentaire, et ils comprennent:

III-1 La cisgénèse et l'intragénèse

La cisgénèse et l'intragénèse reposent toutes deux sur l'échange de matériel génétique entre des variétés d'une même espèce ou d'espèces pouvant se croiser

naturellement. La première consiste à transférer un gène entier, sans modification. La seconde correspond au transfert de portions incomplètes de gènes, mais qui suffisent à modifier l'expression ou le fonctionnement d'un ou plusieurs gènes. Dans le cas de la cisgénèse, les gènes insérés, les introns associés et les éléments régulateurs sont contigus et inchangés. Dans le cas de l'intragénèse, l'ADN inséré peut être une nouvelle combinaison de fragments d'ADN de l'espèce elle-même ou d'une espèce compatible. Les deux approches visent à conférer une nouvelle propriété à la plante modifiée (Lusser et al., 2011).

III-2 Mutagenèse dirigée par oligonucléotide

L'ODM est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides pour l'induction de mutations ciblées dans le génome de la plante, habituellement d'un ou de quelques nucléotides adjacents.

Les modifications génétiques qui peuvent être obtenues à l'aide l'ODM comprennent l'introduction d'une nouvelle mutation l'inversion d'une mutation existante ou l'induction de délétions courtes (Lusser et al., 2011).

III-3 Méthylation de l'ADN dépendante de l'ARN

La Méthylation de l'ADN ARN-dépendante (RdDM) permet aux sélectionneurs de produire des plantes qui ne contiennent pas de séquences d'ADN étrangères et dans lesquelles aucune modification ou mutation n'est effectuée dans la séquence nucléotidique, mais dans laquelle l'expression génique est modifiée par épigénétique. La RdDM induit le silence de gène transcriptionnel (TGS) des gènes ciblés via la méthylation de séquences promotrices (Lusser et al., 2011).

III-4 Agro-infiltration

Une suspension contenant des agrobactéries génétiquement modifiées et dans lesquelles des gènes spécifiques ont été introduits, est pulvérisée sur les feuilles des plantes. Les bactéries transmettent ces gènes aux cellules de la plante, lesquelles transforment cette information génétique en produits géniques correspondants. L'expression du transgène est limitée et dans le temps et localement. Cette technique permet d'une part de savoir rapidement si un produit génique est fonctionnel

Chapitre 2 : Amélioration génétique des plantes et biotechnologie

dans une plante, et d'autre part de synthétiser des protéines haut de gamme (Lusser et al., 2011).

III-5 Sélection inverse

La sélection inverse est une méthode dans laquelle l'ordre des événements conduisant à la production d'une variété végétale hybride est inversé. Elle facilite la production de lignées parentales homozygotes qui, une fois hybridées, reconstituent la composition génétique d'une plante hétérozygote d'élite, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer un rétrocroisement et une sélection (Lusser et al., 2011).

III-6 Le greffage sur des porte-greffes génétiquement modifiés

Une jeune pousse d'une plante conventionnelle est placée (greffée) sur un porte-greffe d'une plante génétiquement modifiée. Il est ainsi possible d'attribuer de nouvelles propriétés au porte-greffe, sans que les fruits de la plante ne contiennent des séquences d'ADN étrangères. Si un greffon GM est greffé sur un porte-greffe non GM, les tiges, les feuilles, les fleurs, les graines et les fruits seront transgéniques (Lusser et al., 2011).

III-7 La biologie de synthèse

La production de biocarburants, de produits pharmaceutique et la bioremédiation de la pollution environnementale devraient constituer les premières applications commerciales de cette nouvelle technique.

III-8 Les nucléase ciblées

III-8-1 Nucléase à doigt de zinc (ZFN)

Les ZFN sont des protéines hybrides créées à partir de la fusion de gènes codant pour les protéines à doigts de zinc, qui permettent l'interaction avec une séquence d'ADN définie, avec celui codant pour la région catalytique de l'enzyme de restriction FokI, qui apporte l'activité enzymatique. Chaque doigt de zinc reconnaît une courte séquence spécifique (trois nucléotides) mais l'association de plusieurs domaines doigts de zinc appropriés permet de cibler de manière unique la séquence d'intérêt. Sont des nucléase qui coupent l'ADN double brin. La raison d'être de la mise au point de la technologie ZFN

Chapitre 2 : Amélioration génétique des plantes et biotechnologie

pour l'amélioration des plantes est la création d'un outil qui permet l'introduction de mutations spécifiques au site dans le génome de la plante ou l'intégration spécifique des gènes (Lusser et al., 2011).

III-8-2 les méganucléases

A la fin des années 1990, les méganucléases sont apparues comme un outil prometteur pour la modification du génome. Ce sont des enzymes naturelles capables de reconnaître de longues séquences d'ADN (séquences de 12 à 40 paires de bases). Elles peuvent générer des coupures double-brin. Cette propriété confère donc aux méganucléases une forte spécificité d'action. Chaque méganucléase présente des variations dans son site de reconnaissance de l'ADN, il est très difficile de trouver l'enzyme nécessaire pour agir sur une séquence d'ADN donnée (Lusser et al., 2011).

III-8-3 Les TALENs

Les Transcription Activator Like-Effectors, sont des enzymes artificielles créées en fusionnant un domaine de liaison à l'ADN spécifique (succession de TAL effectors) et le domaine catalytique de l'enzyme FokI. Les TAL effectors sont des protéines sécrétées par la bactérie phytopathogène *Xanthomonas*, qui lient des séquences particulières du génome de la plante. La séquence protéique d'un TAL effector varie au niveau de deux acides aminés, qui sont impliqués dans la reconnaissance spécifique d'un nucléotide particulier dans le génome. Le domaine de liaison à l'ADN des TALENs peut reconnaître une séquence génomique d'intérêt. Comme pour les nucléases à doigts de zinc, deux TALENs, ciblant chacune des séquences d'ADN de part et d'autre du site où doit avoir lieu la coupure, sont utilisées pour modifier le génome et le rapprochement des deux domaines de FokI va permettre la cassure de l'ADN double brin (Lusser et al., 2011).

III-8-4 Le système CRISPR

C'est une nouvelle génération d'outils pour la réparation du génome. Cette méthode s'est développée de façon remarquable ces dernières années. Dans la nature, CRISPR est la base du système immunitaire adaptatif des bactéries

Chapitre 2 : Amélioration génétique des plantes et biotechnologie

et des archées (Gouache, 2017). De plus amples détails sur cette technique seront présentés dans la section qui suit.

**Chapitre 3 : L'outil
CRISPR-Cas9 dans
l'édition du génome**

I- Découverte de CRISPR

L'histoire du CRISPR commence en 1987, au Japon par le chercheur Atsuo Nakata qui découvre des séquences répétées d'ADN dans le génome de la bactérie *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987).

En 2001, plusieurs des chercheurs commencent à paraître des publications au sujet de ces répétitions. Mais ils les nommaient toutes de manière différentes. SPIDR (Spacers Interspaced Direct Repeats), STST (Short Regularly Spaced Repeats), ou encore LCTR (large cluster of twenty nucleotides repeats sequences). Pour éviter toute confusion, c'est l'acronyme CRISPR qui a été choisi en 2002.

Les séquences répétées seront baptisées « CRISPR », pour « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats », ou « courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées ». Mais on ne le sait pas encore à cette époque, elles sont en fait des séquences d'ADN de virus que les bactéries ont intégrées à leur propre génome (Mathien, 2016).

Il faudra attendre presque vingt ans après la publication du papier d'Ishino en 1987 pour que l'on s'aperçoive que les spacers dérivent des éléments génétiques étrangers, notamment des phages ou des plasmides (Bolotin et al., 2005 ; Mojica et al., 2005 ; Pourcel et al., 2005).

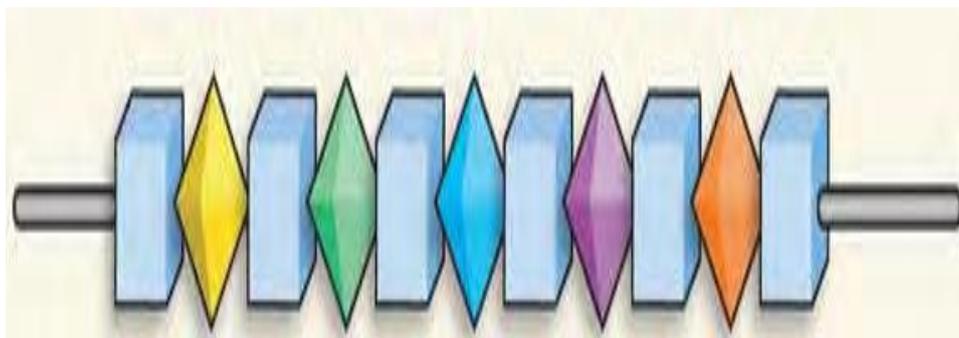


Figure8: Schéma d'un locus CRISPR. Les cubes bleus représentent les séquences palindromiques similaires répétées ou « repeats ». Elles sont séparées par les spacers (diamants colorés) qui représentent chacun une séquence différente de longueur proche.

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

En 2005, trois équipes découvrent en même temps que le site CRISPR possède des morceaux de bactériophage. Cependant rien ne permet de déterminer quelles sont les fonctions de ces gènes.

Mojica et ses collaborateurs ont fait des études et ils ont remarqués que chez les archées la présence de spacers empêche toute infection par un virus possédant une séquence génétique similaire (Mojica et al., 2005).

En 2006, ces ADN d'origine virale, issus de bactériophages spécifiques, sont considérés comme un maillon d'un mécanisme de défense bactérien, soit une sorte de « système immunitaire » au niveau de leurs ADN. Les bactéries se servent des CRISPR pour reconnaître et incorporer ces fragments d'ADN exogène lors d'une attaque virale qui est ainsi neutralisée (Debry, 2016).

Entre les années 2007 et 2010, une équipe de Philippe Horvath et Barrangou confirmèrent les résultats de Mojica et ses collaborateurs chez les bactéries en démontrant que, lors d'une infection, des fragments d'ADN phagique peuvent s'intégrer au sein du locus CRISPR, entraînant une résistance vis-à-vis d'autres phages présentant ces séquences (Barrangou et al., 2007).

Dans une étude publiée en 2012 dans science, Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier ont collaborées leurs deux équipes, et elles ont réussi à élucider une bonne partie du mécanisme par lequel fonctionne le système CRISPR/Cas9. Dès lors, les travaux s'enchaînent avec ce nouvel outil, relativement simple et peu onéreux à mettre en œuvre, avec l'avantage majeur d'éviter le recours à la transgénèse. Il permet d'éditer, de retirer, d'insérer ou de remplacer précisément des segments d'ADN dans un (Jinek et al., 2012 ; Gasiunas et al., 2012).

I-1 Découverte des gènes Cas

Dès 2002, à l'Université d'Utrecht, Jansen et son équipe firent une découverte qui permettrait de mieux comprendre la biologie des séquences CRISPR. En étudiant leur environnement ils observèrent qu'elles étaient toujours accompagnées par des familles de

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

gènes qui étaient retrouvées seulement si les séquences CRISPRs étaient aussi présentes. Ces gènes seraient appelés Cas, pour *CRISPR Associated*.

Les gènes Cas codent pour des enzymes capables de couper l'ADN de manière très ciblée. La protéine Cas9 agit en ciseau de coupe précise du segment du génome viral. Le locus CRISPR permet la transcription de l'ADN viral incorporé en deux ARN non codants qui servent de guide pour atteindre la cible. L'ARN est utilisé comme une sonde qui sert à reconnaître les virus. Si une infection survient, le virus sera donc reconnu et pourra ensuite être éliminé (Debry, 2016).

I-2 Découverte du SgRNA

Les deux équipes scientifiques de Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier débutèrent une collaboration transatlantique pour percer les mystères du fonctionnement des CRISPR-Cas9. Elles utilisèrent la Cas9 recombinante (Provenant de *Streptococcus* et exprimée chez *Escherichia coli*), deux ARN sont transcrits *in vitro* (un crARN et un tracrARN). Comme Siksnys, ils dévoilèrent que la Cas9 pouvait couper de l'ADN purifié *in vitro*, qu'elle pouvait être reprogrammée en utilisant des crARNs sur-mesures et que les deux domaines nucléases coupaient chacun un fragment opposé. Mais l'originalité de leur étude résidait dans la démonstration que, *in vitro*, ces deux ARNs pouvaient fonctionner sous forme fusionnée. Cet unique ARN guide serait appelé sgARN pour single-guide ARN (Roubin, 2017).

II- Description du système CRISPR/Cas de type II

En fonction de l'organisation du locus et de la machinerie protéique nécessaire pour le clivage de l'ADN exogène, de nombreuses études ont permis l'identification de différents systèmes CRISPR-Cas. Ces systèmes ont été répartis en classes, types et sous-types (Makarova et al., 2009 ; Shmakov et al., 2015).

C'est le système CRISPR/Cas de type II qui a été choisi par les chercheurs pour les applications biotechnologiques d'édition de l'ADN grâce à sa simplicité. Les gènes cas1 et cas2 (**Figure11 A**), communs à tous les types, le locus CRISPR de type II contient le

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

gène signature cas9 codant l'endonucléase du même nom, qui est impliquée dans l'acquisition des spacers.

Trois sous types du système CRISPR-Cas de types II existent (II-A, II-B et II-C) (**Figure9**). Les protéines Cas9 de type II-C sont les plus distinctes parce qu'elles la tendance à être plus petites que les protéines Cas9 provenant des systèmes de types II-A et II-B

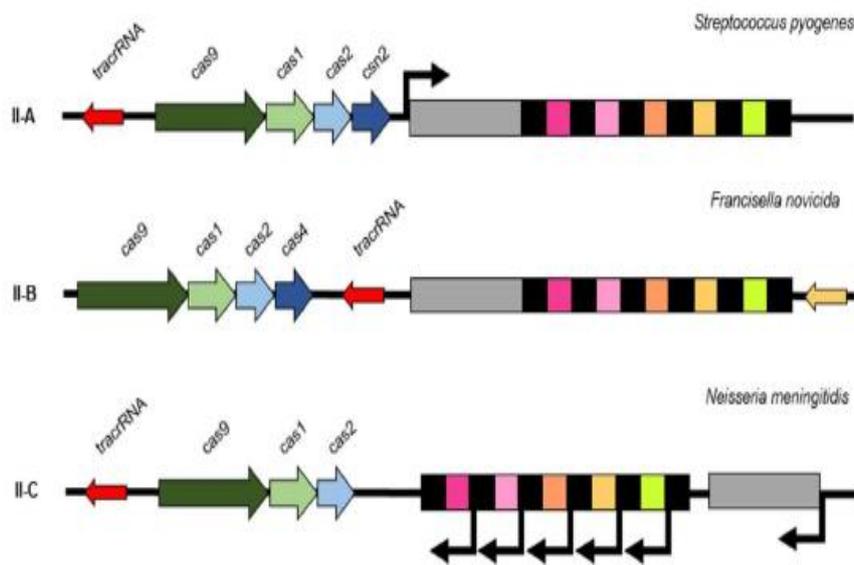


Figure9 : Organisation des systèmes CRISPR/Cas de type II (Guernet, 2017).

III- Principe de la technique

La méthode CRISPR-Cas9 repose en premier lieu sur un ARN guide (gRNA) composé de deux séquences de nucléotides. La première compte 42 éléments et la seconde, variable dans sa composition, en compte 20 (**Figure10**), mais elle est surtout complémentaire de la séquence d'ADN à découper. D'où la précision de la méthode et l'origine de l'appellation « guide » pour cet ARN-là. Le second élément est une enzyme, appelée la nucléase, elle spécifiquement capable de couper un ADN double brin. Il s'agit bien entendu de Cas9. Avec les deux éléments (ARN guide et Cas9), on peut réaliser une section double brin à un endroit précis du génome.

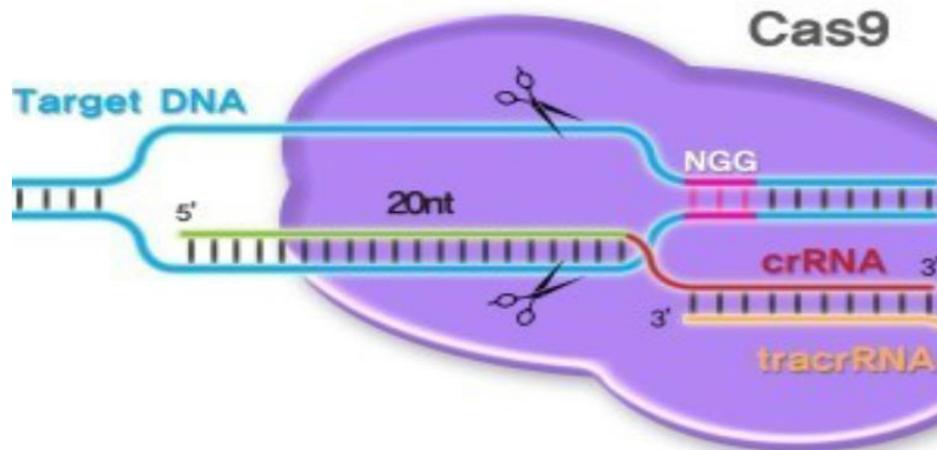


Figure 10 : Processus de découpage de l'ADN a un endroit précis par la Cas9 (Debry, 2016).

La Cas9 va reconnaître tout d'abord une séquence conservée de 2 à 4 paires (PAM). Après fixation au PAM, elle interroge la séquence de l'ADN opposée à celui-ci à la recherche d'une complémentarité avec l'ARN guide. Si il y a complémentarité, avec les 12 premières bases, l'invasion de l'ARN peut avoir lieu en même temps que l'ADN se déroule pour former une boucle R (c'est à dire une boucle composé d'ADN simple brin formé par hybridation avec un ARN) (Doudna et Charpentier., 2014).

Pour la modification d'un gène avec la méthode CRISPR/Cas9 de façon ciblée, il faut composer à l'aide d'un ordinateur, puis synthétiser, une section d'ARN comportant au moins 18-20 bases et correspondant au brin d'ADN que l'on veut couper de façon complémentaire (Doudna et Charpentier., 2014). L'ensemble de l'ARN-guide et la protéine Cas9 font office de ciseaux moléculaires et coupent le génome à un endroit souhaité (**Figure 10B et 11C**). Cela engendre une interruption de la double hélice et endommage l'ADN, qui doit alors être réparé.

Si on veut corriger une séquence d'ADN mal construite, il faut ajouter la séquence correcte aux deux précédents éléments. Elle constitue la troisième pièce du montage à réaliser. Pratiquement, celle-ci ne doit pas dépasser 100 à 200 nucléotides de long. Parce que pour que l'ensemble puisse pénétrer les cellules du corps, il faut que le tout (ARN

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

guide, Cas9 et séquence correctrice) entre en entier dans un vecteur. La nature en produit spontanément : il s'agit le plus souvent de virus.

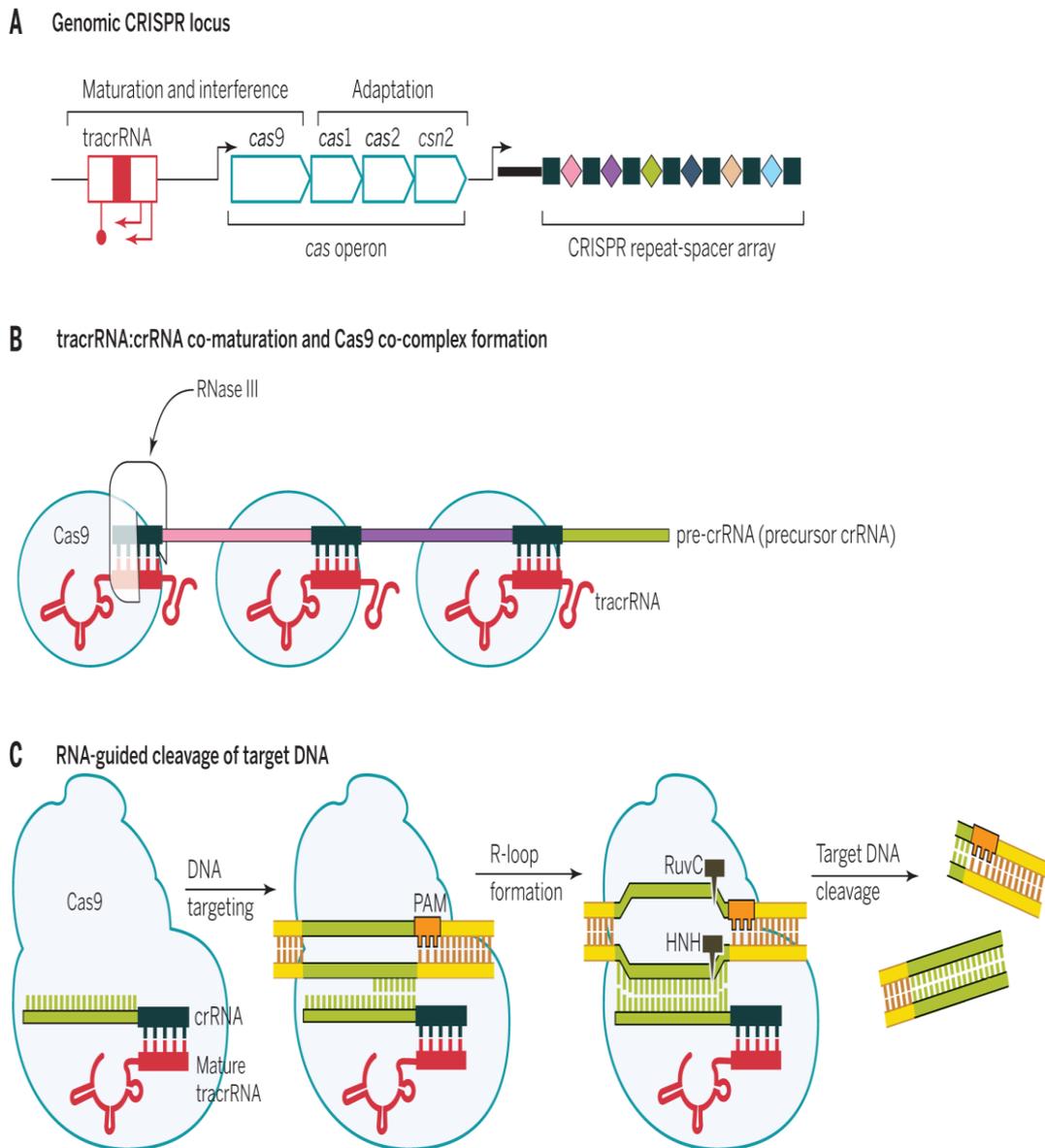


Figure 11: Biologie du système CRISPR-Cas de type II (Doudna et Charpentier., 2014). (A) L'opéron du gène cas avec l'ARN cible et le réseau CRISPR. (B) co-maturation de l'ARN cible et formation de co-complexe Cas9. (C) Détails du clivage naturel de l'ADN avec les deux ARN.

Dès que le virus retenu est débarrassé des quelques gènes responsables de sa virulence (**Figure12**), il reçoit le montage moléculaire réalisé, il est multiplié en culture et les nombreuses copies obtenues sont injectées dans le réseau circulatoire de l'individu à soigner (Doudna et Charpentier., 2014).

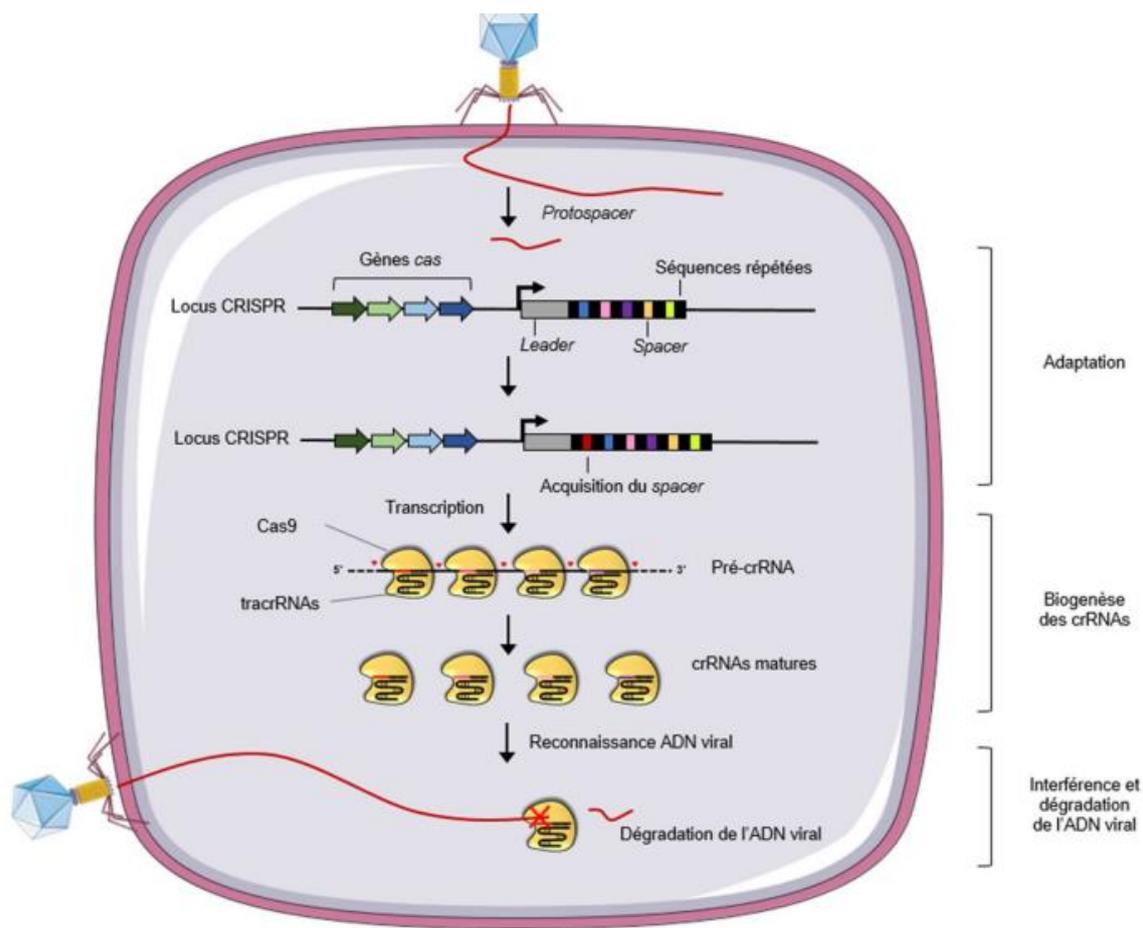


Figure12: Fonctionnement du système CRISPR/Cas chez la bactérie (Guernet, 2017).

IV- Deux mécanismes de réparation de l'ADN

Couper de l'ADN ça veut dire casser un chromosome, c'est un évènement dangereux qui peut entrainer la mort des cellules. Heureusement, il existe plusieurs mécanismes de réparation des cassures de l'ADN.

Les cellules eucaryotes disposent de deux mécanismes de réparation, le premier est une recombinaison homologue et le second une recombinaison non homologue. On peut choisir d'utiliser l'un ou l'autre selon la modification voulue dans l'ADN (Komor et al., 2016).

Les cassures du double brin d'ADN produites par la Cas9 peuvent être réparées spontanément par jonction d'extrémités non-homologues SDN1 (NHEJ) ou en présence

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

d'une séquence d'ADN donneur, par recombinaison homologue SDN2 (HDR) (**Figure 13**). Cet ADN donneur doit contenir, de chaque côté de la coupure de l'ADN ciblé, des séquences homologues allant de 50 à 2000 nucléotides. Entre ces deux séquences homologues, l'ADN donneur peut comporter une longue séquence de nucléotides à introduire dans le gène ciblé. Cette partie de l'ADN donneur permet ainsi d'induire une mutation dans le gène qui a été ciblé, ou d'introduire des nouveaux segments de gènes (Tremblay, 2015).

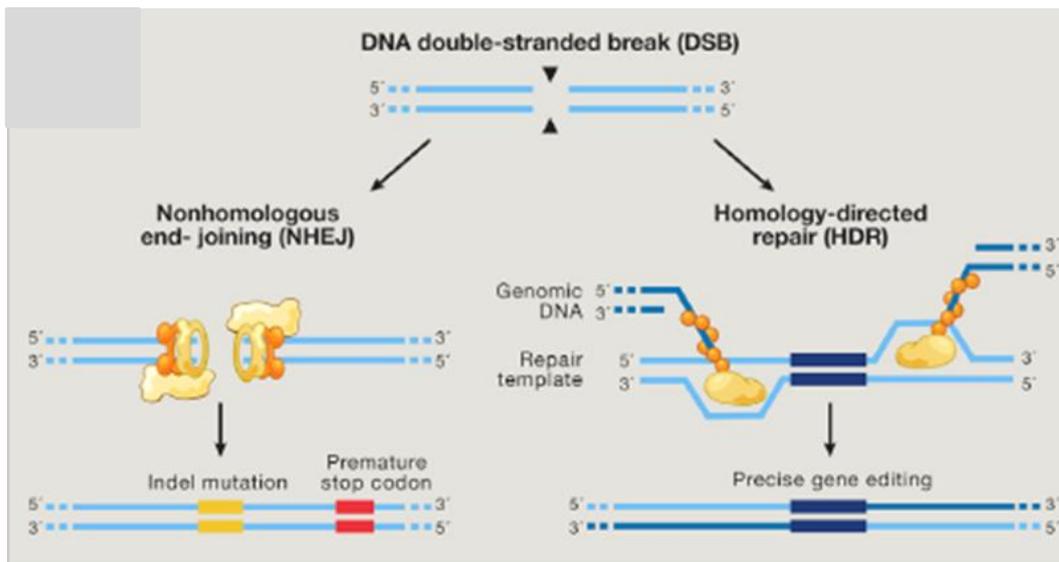


Figure 13: Technologies d'édition génomique exploitent les machines de réparation d'ADN endogène (Hsu et al., 2014).

V- Applications de la technologie CRISPR-Cas9

V-1 Place de CRISPR-Cas9 dans l'amélioration des plantes

Perçu comme étant plus précis, plus rapide, plus facile à mettre en œuvre et moins onéreux que toutes les autres techniques d'amélioration génétique des plantes, le système CRISPR-Cas9 a déjà été appliqué à une large gamme d'espèces végétales (Sovová et al., 2016).

Une équipe de chercheurs de l'académie chinoise des sciences a réussi, à l'aide de l'outil CRISPR/Cas9, à inactiver simultanément les différentes copies d'un gène de

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

susceptibilité au mildiou présent trois fois dans le génome d'une variété de blé, ce qui fait six modifications au total (Gao et al., 2014).

La modification simultanée de plusieurs copies de gènes avec CRISPR/ Cas9 est particulièrement intéressante, car de nombreuses espèces cultivées ont connu des épisodes de duplication du génome et possèdent plusieurs copies de chaque gène (Jiang et al., 2013 ; Ma et al., 2015).

Une équipe a obtenu une certaine résistance à la maladie de l'oïdium chez le blé, en utilisant la technique CRISPR-Cas9 (Wang et al., 2014).

En 2014, des chercheurs ont examinés l'activité d'édition génomique transitoire du système CRISPR-Cas9 dans des protoplastes de tabac, et ils ont observés des mutations d'insertion et de délétion (indel) avec des différentes fréquences après transfection de l'ARN guide (ARNg) et de la nucléase Cas9 dans ces protoplastes. Ils ont montrés que le système CRISPR / Cas9 est un outil utile pour la mutagenèse ciblée du génome de la plante modèle *Nicotiana tabacum* et peut être considéré comme puissant outil d'édition du génome (Gao et al., 2014).

En 2015, des modifications des profils de maturation ont été fait par des chercheurs pour allonger la durée de conservation de tomate (**Figure14**), en utilisant le site directed nuclease (SDN1) sur le facteur de transcription RIN (Ito et al., 2015).



Figure14: Modifications des profils de maturation de la tomate. Tomate modifiée (à gauche), tomate naturelle (à droite) (Ito et al., 2015).

En 2016, le chercheur Shi et son équipe ont utilisés CRISPR-Cas9 pour augmenter le rendement en condition de stress hydrique chez le maïs (**Figure15**) en remplaçant le promoteur du gène ARGOS8 par GDS2 PRO en utilisant SDN2 (Shi et al., 2016).

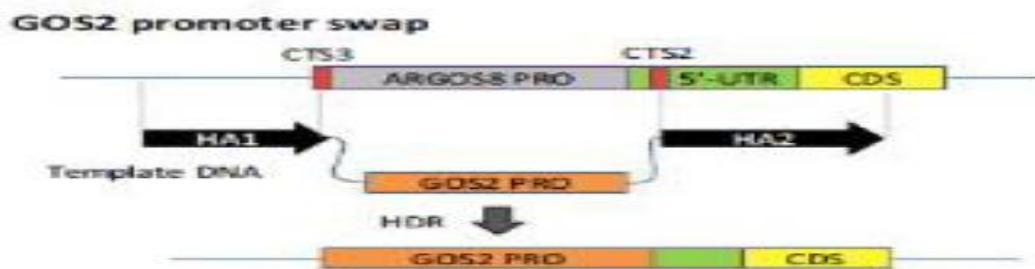


Figure 15 : SDN2 sur le promoteur de gène responsable de rendement en cas de stress hydrique chez le maïs (Shi et al., 2016).

Le chercheur Liang et ses collaborateurs de la Chinese Academy of sciences décrivent dans Nature Communications une méthode efficace et spécifique d'édition du

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

génomique des cultures de monocotylédones importantes (*Triticum aestivum* L.), en utilisant les génomes CRISPR-Cas9 ribonucléoprotéine (RBP) dans des protoplastes. Ils ont réussi à obtenir des mutants de plantes transgéniques. Malgré que la régénération de plantes à partir de protoplastes reste techniquement difficile chez les monocotylédones, les chercheurs estiment que la méthode d'édition de génome pourrait s'appliquer à la production d'autres plantes modifiées par le génome (Liang et al., 2017).

Une équipe de chercheurs de l'Université Purdue et de l'Académie des Sciences de la Chine a publié le 21 mai 2018 un article au titre aride, « Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity » (des mutations dans une sous-famille de gènes de récepteurs de l'acide abscissique promeuvent la croissance et la productivité du riz). L'équipe menée par Jian-Kang Zhu a utilisé la technologie d'édition des gènes CRISPR/Cas9 pour introduire des mutations dans 13 gènes associés à une phytohormone, l'acide abscissique, connue pour jouer un rôle dans la tolérance des plantes au stress et l'inhibition de la croissance. Dans deux tests distincts, les chercheurs ont constaté que les cultures génétiquement modifiées produisaient 25% et 31% de plus de grains qu'une souche de riz naturel (Miao et al., 2018).

V-2 En thérapie génique

La nouvelle méthode CRISPR-Cas9 présente un avantage réel par rapport à la thérapie génique, telle qu'elle a été proposée à l'origine. Il existe une très grande différence entre les deux (Debry, 2016).

D'abord, la différence est fondamentale pour remplacer un gène mutant par une version correcte, et corriger ce gène. Dans le cas de la thérapie génique, les deux copies discordantes restaient en place, ce qui permettait au gène « malade » d'entretenir ses effets pathologiques en cas de dominance. C'est désormais terminé, au moins pour toutes les cellules qui ont pu être ciblées par la correction apportée (Slaymaker et al., 2016).

La séquence correctrice est insérée au bon endroit, là où se trouve la section du gène à modifier. On bénéficie en outre des effets de l'environnement immédiat de l'ADN dont on sait qu'il peut agir sur l'expression des gènes proximaux (Kleinstiver et al., 2016).

V-2-1 Quelques expériences chez les animaux

Le système CRISPR/Cas9 permet également de générer des modèles transgéniques avec une plus grande simplicité, comparé aux méthodes précédentes. En effet, par une injection directement dans le zygote au stade d'une cellule, cette technique permet de s'affranchir des longues étapes de sélection de cellules souches embryonnaires contenant la mutation désirée et de croisement de souris chimères, nécessaires avec les méthodes précédentes (Cheng et al., 2013 ; Wang et al., 2013 ; Yang et al., 2013 ; Hsu et al., 2014). En particulier, ce type d'approche a ouvert la voie à la génération de modèles transgéniques dans des espèces non-murines, telles que le rat (Hu et al., 2013 ; Ma et al., 2014), la drosophile (Gratz et al., 2013), le lapin (Honda et al., 2015 ; Yuan et al., 2016), le cochon, la vache (Pinzon et al., 2016) et le singe (Niu et al., 2014).

L'équipe chinoise du Key Laboratory of Regenerative Biology aux Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health (GIBH) a créé des chiens avec le double de leur masse musculaire habituelle (**Figure16**), en éditant un gène appelé myostatine, qui donne normalement une protéine qui inhibe la croissance musculaire (Zou et al., 2015).



Figure 16: Premier chien modifié par CRISPR-Cas9. Le lévrier whippet de gauche est plus musclé et donc plus rapide que sont congénère de droite en détenant cette mutation naturelle du facteur de croissance myostatine (MIT) (Zou et al., 2015).

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

La plupart des méthodes alternatives nécessitent de faire une modification à la fois, par contre avec CRISPR-Cas9, on peut utiliser plusieurs ARN guide à la fois, ce qui permet de modifier plusieurs gènes en même temps. Chez le macaque crabier (*Macaca fascicularis*) deux gènes ont été modifiés simultanément ce qui a amené à la naissance de deux adorables singes jumeaux (**Figure 17**) (Taupo, 2015).



Figure 17: Deux singes jumeaux après modification de l'embryon par CRISPR-Cas9 (Taupo, 2015).

V-2-2 Chez l'être humain

Deux études ont été menées en Chine sur des embryons humains non viables, l'une en 2014 et l'autre en 2016. Les expériences ont été stoppées au stade 8-10 cellules, considéré comme le premier stade auquel les embryons sont considérés comme humains. Les embryons ont été mutés sur le récepteur CCR6 aux chémokines, impliqué dans le système immunitaire. Parmi les embryons mutés 4 avaient la mutation sans aucun effet off-target (Regalado et al., 2016 ; Hsu et al., 2014).

En mai 2015, des chercheurs en Chine, utilisent des embryons tripronucléaires (non fertiles mais capables de se diviser) provenant d'un centre de fertilité local. Ils montrèrent que la technologie pouvait être appliquée pour cliver le gène de la globine endogène. Remplacer ce gène par l'allèle β sain apporté sous forme d'oligonucléotides par recombinaison homologe s'avéra plus délicat, seule une faible portion des zygotes étant

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

modifiés avec succès et certains zygotes étaient mosaïques (plusieurs de leurs cellules possédaient des génotypes différents). Un nombre élevé de coupures hors cibles furent rapportées, plus élevé encore que celui observé pour les modèles animaux ou de cellules somatiques humaines (Liang et al., 2015).

VI- Débat bioéthique

Dans le but de nourrir rapidement une population mondiale de 10 milliards d'humains, il est clair que l'amélioration des plantes doit s'intégrer dans les programmes de développement. Ceci à la fois pour parvenir à une augmentation de la production totale, mais aussi afin de mettre au point des espèces répondant mieux aux défis à venir, et d'obtenir des espèces mieux adaptées et ainsi répondre aux nouveaux usages (Bréchignac et al., 2017).

En juin 2015, Jennifer Doudna, présentait devant le Sénat des États-Unis les conclusions d'une rencontre qu'elle avait co-organisée avec d'autres experts du domaine. Les points clés de son intervention recommandaient de continuer la recherche sur l'édition du génome afin de mieux en comprendre les risques et les bénéfices, tout en l'encadrant par des recommandations pour une utilisation éthiquement responsable. Finalement, la scientifique a souligné l'importance d'éduquer le public quant aux avantages et aux inconvénients de ces nouvelles technologies. Pour elle, c'est là une condition essentielle à la tenue d'un véritable débat réunissant tous les acteurs de la société, nécessaire pour déterminer quels sont les usages acceptables de l'édition génétique (Doudna, 2015).

Jusqu'à maintenant, le département de l'agriculture américain avait conclu que, si on ne pouvait distinguer une modification d'une mutation d'origine naturelle, il n'était pas nécessaire que la plante fasse l'objet d'une réglementation spécifique (Fladung, 2016).

Les avancées sur le système CRISPR-Cas9 ouvrent de grandes possibilités en matière de recherche et de développement. Cependant, les lois bioéthiques ne réglementent pas encore strictement les études menées avec ce système. De nombreux laboratoires

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

profitent des imprécisions de la législation et cela créer de nombreux débats en matière de bioéthique (Pierre, 2017).

VI-1 OGM

Actuellement, des discussions ont lieu à l'échelle internationale pour déterminer si les plantes modifiées à l'aide de la technique CRISPRCas9 doivent être considérées comme des OGM ou non. Il n'est pas clairement établi si ces plantes doivent être sous cette définition au sens des différentes réglementations en la matière puisqu'elles ne sont pas différenciables des plantes cultivées de manière conventionnelle (Brunelle, 2016).

En octobre 2007, la Commission européenne avait mis en place un groupe de travail sur la question des nouvelles technologies d'édition du génome. Elle avait également organisé un atelier, en septembre 2015, au cours duquel on comparait les systèmes réglementaires de l'Argentine, de l'Australie, du Canada, de l'Union européenne, du Japon et de l'Afrique du Sud. Les techniques d'édition du génome alors considérées étaient, par exemple, la mutagenèse dirigée par oligonucléotides, la cisgénèse, les nucléases à doigt de zinc et la technique TALEN, puisque CRISPR/Cas9 n'était pas encore d'actualité. L'European Food Safety Authority (EFSA) avait considéré que la cisgénèse et la technique de nucléase à doigt de zinc se trouvaient sous les mêmes réglementations que les OGM. Du côté de l'Union européenne, on considère souvent que quelque chose est génétiquement modifié si la modification ne se produit pas par multiplication ou par recombinaison naturelles (Jones, 2015).

En novembre 2015, le Conseil suédois de l'agriculture a indiqué que, les plantes dont le génome a été modifié par l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 ne tombent pas sous la définition européenne des OGM. Même pour l'Académie nationale des sciences Leopoldina, pour l'Académie allemande des technologies Acatech et pour l'Union des académies scientifiques allemandes, qui suggèrent que l'évaluation des risques soit basée sur les caractéristiques spécifiques des nouvelles plantes, et non sur leur méthode de production (Brunelle, 2016).

Chapitre3 : L'outil CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome

Aux États-Unis, en avril 2016, un premier champignon modifié par CRISPR/Cas9 a été déréglé afin qu'il soit autorisé à la commercialisation. Ce champignon blanc commun (*Agaricus bisporus*) résistant au brunissement est donc la première plante modifiée génétiquement par ce système à être autorisée. Le fait que ce champignon modifié génétiquement ne contient aucun ADN étranger est à la base de cette décision (Walt, 2016).

Conclusion

L'amélioration des plantes est un moyen important d'aider la société à répondre aux nombreux défis qui se posent pour l'humanité. La sélection et la création de nouvelles variétés ont constamment évolué avec le développement des pratiques culturales et des découvertes scientifiques.

La biotechnologie végétale a fait des progrès considérables qui ont été décrits dans de nombreuses publications. En particulier, de nouvelles techniques permettent un rapide accroissement de la création de nouvelles variétés et la création de lignées de conversion par l'utilisation des outils et des techniques du génie génétique.

Derrière l'acronyme CRISPR se cache une révolution technologique provenant des bactéries et qui rend possible, comme jamais auparavant, la manipulation génétique. Au-delà CRISPR-Cas9 permet une édition du génome rapide, précise, présentant une efficacité supérieure aux méthodes plus classique, et permettant la mise au point de nombreux nouveaux modèles d'études.

De nombreuses applications sont en cours pour la création et l'amélioration de variétés végétales. Certains pays ont décidé d'utiliser la technique à des fins de recherches. Certains groupes de recherche testent déjà les applications cliniques possibles. Pendant ce temps, une discussion sur les risques de l'utilisation de ces techniques et sur les aspects éthiques est commencée.

Même si les applications qui en sont faite sont extrêmement variées et frisent par fois des limites éthiques, occasionnant un réel débat au sein de la communauté scientifique, CRISPR-Cas9 n'en demeure pas moins l'une des avancées majeures du débat du 20^e siècle.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

- 1- **Andrea L (2016)** CRISPR/CAS9 un ciseau génétique révolutionnaire. STOP OGM INFOS. Informations critiques de l'alliance suisse pour une agriculture sans génie génétique **64**.
- 2- **Arencibia A, Molina PR, de la Riva G, Selman-Housein G (1995)** Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Reports* **14**: 305-309.
- 3- **Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero D A, Horvath P (2007)** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709–1712.
- 4- **Birch R G (1997)** Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 297-326.
- 5- **Blakeslee A (1937)** Dédoublément du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chimique. *C. R. Acad. Sci. Paris*. **205**: 476-479.
- 6- **Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich S D (2005)** Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol. Read. Engl* **151**: 2551–2561.
- 7- **Brek L, Kaiser M, Scoti K, Darnell Z (2005)** *Biologie moléculaire de la cellule*. 3ème édition. (Ed) Boeck Université, p361-365.
- 8- **Bréchignac C, Candel S, Corvol P, Cossart P, Valleron A J et al. (2017)** Ciseaux génétiques et Éthique. *Actualités scientifiques, Séance de l'Académie des sciences* **1**. Quai de Conti – 75270 Paris.

Références bibliographiques

- 9- **Brunelle F (2016)** La transgénèse 2.0 avec CRISPR/Cas9: multiples modifications génétiques et édition du génome sans laisser de traces. Cellule de veille OGM. **40** : 3-4.
- 10- **Brunelle F (2016)** L'outil CRISPR-Cas9 ouvre la voie à la modification génétique de populations sauvages. Cellule de veille OGM. **39** : 1-2.
- 11- **Causse M, Caranta C., Saliba-Colombani V, Moretti A, Damidaux R, Rousselle P (2000)** Valorisation des ressources génétiques de la tomate par l'utilisation de marqueurs moléculaires. Cahiers Agricultures. **9**:197-210.
- 12- **Charpentier J (2015)** Les premiers chiens génétiquement modifiés en Chine [En ligne], Adresse URL: <https://actualite.housseniawriting.com/science/genetique/2015/10/20/les-premiers-chiens-genetiquement-modifies-en-chine/9750/>. Page consulté le (10/06/2018).
- 13- **Cheng A W, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen T W et al. (2013)** Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. Cell Res. **23**:1163–1171.
- 14- **Creveaux I, Bardot O, Blanchon L, Marceau J (2013)** La biologie moléculaire en 12 étapes. (Ed) Ellipses, paris cedex 15. Science **346** : 94-123.
- 15- **Cucchi M (2016)** Biotechnologies : le tout-génétique ou la fuite en avant réductionniste. Technique, médecine et santé. Assises Technologos-CRIIGEN, 2-4p.
- 16- **Debry J M (2016)** CRISPR–CAS 9 : quand l'arlésienne refait surface ou le retour de la thérapie génique – devenue correctrice – à l'avant-scène. Dossier de l'Institut Européen de Bioéthique. p 1-4.

Références bibliographiques

- 17- Demarly Y, Sibi M (1996)** Amélioration des plantes et biotechnologies. (Ed). John Libbey Eurotext **127**, avenue de la République, 92120 Montrouge, France, 15-16p.
- 18- Doudna A J, Charpentier E (2014)** The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**.
- 19- Fladung M (2016)** Cibus herbicide-resistant canola in European limbo. *Nature Biotechnology* **34**: 473-474.
- 20- Fromm, M, Taylor L P, Walbot V (1985)** Expression of genes transferred into monocotyledonous plant cells by electroporation. *Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **82**: 5824-5828.
- 21- Fromm M, Taylor L P, Walbot V (1986)** Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* **319**: 791-793.
- 22- Gallais A (2011)** Méthodes de créations de variétés en amélioration des plantes. (Ed) Paule Lacroix **79698** : 15-27.
- 23- Gallais A (2015)** Comprendre l'amélioration des plantes : Enjeux, méthodes, objectifs et critères de sélection. (Ed) QuaeParis, p240.
- 24- Gao J, Wang G, Ma S, Xie X, Wu X, Zhang X, Wu Y, Zhao P, Xia Q (2014)** CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. Springer Science+Business Media Dordrecht. *Plant Mol Biol* **87**:99–110.
- 25- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnyš V (2012)** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci* **109**: 2579–2586.

Références bibliographiques

- 26- Gouache C (2017)** Les nouvelles techniques d'amélioration des plantes : quelques éclairages du quatrième semencier mondial, Limagrain, sur l'innovation en agriculture. Réalités industrielles, p 35-37.
- 27- Gratz S J, Cummings A M, Nguyen J N, Hamm D C, Donohue L K, Harrison M M et al. (2013)** Genome Engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-Guided Cas9 Nuclease. Genetics. Aug **194**(4): 1029–1035.
- 28- Guernet A (2017)** CRISPR-barcoding pour l'étude fonctionnelle de mutations oncogéniques dans un contexte d'hétérogénéité intratumorale. Thèse de doctorat Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie Préparée au sein de l'Université de Rouen, 39p.
- 29- Hansen G, Shillito R D, Chilton M D (1997)** T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 11726-11730.
- 30- Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K, Izu H, Iguchi A et al. (2015)** Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. Exp. Anim. **64**: 31–37.
- 31- Hsu P D, Eric S, Lander E S, Zhang F (2014)** Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge Center, Cambridge, MA 02141, USA. Cell **157**. Elsevier Inc.
- 32- Hu X, Chang N, Wang X, Zhou F, Zhou X, Zhu X, Xiong J-W (2013)** Heritable gene-targeting with gRNA/Cas9 in rats. Cell Res **23**: 1322–1325.

Références bibliographiques

- 33- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987)** Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, **169**(12): 5429-5433.
- 34- Ito Y, Nishizawa-yokoi A, Endo M, Mikami M (2015)** Biochemical and Biophysical Research Communications CRISPR / Cas9-mediated mutagenesis of the *RIN* locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1–7p.
- 35- Jean-Yves M, Procaccia C (2017)** La révolution de la modification ciblée du génome (genome editing). Rapport sur les enjeux économiques, environnementaux, sanitaires et éthiques des biotechnologies à la lumière des nouvelles pistes de recherche. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques Et technologiques, République Française.
- 36- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks D P (2013)** Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* **41**: 188p.
- 37- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012)** Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- 38- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J, Charpentier E (2012)** A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **28**.
- 39- Jones H D (2015)** Regulatory uncertainty over genome editing. *Nature Plants* **1**: 3p.

Références bibliographiques

- 40- Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S et al. (2016)** High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* **529**: 490-495.
- 41- Komor A C, Kim B Y, Packer M S, Zuris J A, Liu D R (2016)** Programmable editing of a target base in genomic DNA without doublestranded DNA cleavage. *Nature* **533**: 420–424.
- 42- Lehn P (1990)** Vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes dans le tissu hématopoïétique in vivo **6** (8): 791-794.
- 43- Liang P et al. (2015)** CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprounuclear zygotes. *Protein Cell* **6**: 363–37.
- 44- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang, Wang Y, Zhao Q, et al. (2017)** Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes *Nature Communications* **8** (4261).
- 45- Lièvre K (2004)** Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (*Ruta graveolens*) par transformation génétique. Thèse Présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'INPL En Sciences Agronomiques.
- 46- Lionnet T, Croquette V (2005)** Introduction à la Biologie Moléculaire.
- 47- Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodríguez-Cerezo E (2011)** New plant breeding techniques. State of the art and prospects for commercial development. EUR 24760, 23-27p.
- 48- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R et al. (2015)** A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant* **8**: 1274–1284.

Références bibliographiques

- 49- Ma Y, Zhang X, Shen B, Lu Y, Chen W, Ma J, Bai L, Huang X, Zhang L (2014)** Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9. *Cell Res* **24**: 122–125.
- 50- Maftah A, Petit J M, Julien R (2007)** Mini manuel de biologie moléculaire. 2^{ème} édition. (Ed) DUNOD, 71-119p.
- 51- Makarova K S, Wolf Y I, Van D O, Koonin E V (2015)** Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biology Direct* **4**: 29p.
- 52- Mathien S (2016)** CRISPR : Une révolution génétique à portée de main. Programme de doctorat en biologie moléculaire. DIRE / Ficsum **25** (2).
- 53- Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X et al. (2013)** Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res* **23**: 1233–1236.
- 54- Miao C, Xiao L, Hua K, Zou C, Zhao Y, Bressan R A, Zhu J k (2018)** Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. *PNAS*
- 55- Mojica F J, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G (2000)** Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol* **36**: 244–246.
- 56- Mojica, F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E (2005)** Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol* **60**: 174–182.

Références bibliographiques

- 57- Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C (2009)** Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiol. Read. Engl* **155**: 733–740.
- 58- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider P H (1982)** Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal* **1**: 841-845.
- 59- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X et al (2014)** Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* **156**: 836–843.
- 60- Novak F J, Brunner H (1992)** Sélection des plantes: mutations induites pour de meilleures récoltes. *AIEA BULLETIN* **4** :25-29.
- 61- Obae S G (2012)** Nuclear DNA Content and Genome Size of American Ginseng Open Access Author Fund Awardees **8**.
- 62- Pelletier G, Durand-Tardif M, Doré C (2007)** Évolution des pratiques de l'amélioration des plantes cultivées. *Acta Botanica Gallica* **154** (3): 353-362.
- 63- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle P, Renard M (1983)** Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* **191**: 244-250.
- 64- Pierre B (2017)** CRISPR-Cas9. CAELIOS. Université Poitiers.
- 65- Pinzon C A, Snyder M, Pryor J, Thompson B, Golding M, Long C (2016)** Efficient Generation of Myostatin Promoter Mutations in Bovine Embryos Using the CRISPR-Cas9 System. *Reprod. Fertil. Dev* **29**: 212p.

Références bibliographiques

- 66- Periquet A, Boisset M, Casse F, Catteau, Lecerf J M, Leguille C, Veschambre D, Barnat S (2007)** Les Plantes Génétiquement Modifiées. Comité Sécurité Alimentaire d'APRIFEL, p8 -29.
- 67- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005)** CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiol. Read. Engl* **151**: 653–663.
- 68- Primose S B, Twyman R M, Old R W (2002)** Principles of Gene Manipulation. 6th (Ed). Blackwell Scientific Publishing, Oxford. UK, p319
- 69- Roublin J B (2017)** CRISPR/Cas9 : HISTOIRE, METHODE, POTENTIEL & IMPACT. Thèse de doctorat. Soutenue le 24 Mars 2017.
- 70- Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, Wolf Y I, Gootenberg J S et al. (2015)** Discovery and Functional Characterization of Diverse Classe 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell* **60**: 385-397.
- 71- Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, Scott D A, Yan W X, Zhang F (2016)** Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* **351**: 84-88.
- 72- Sovová T, Kerins G, Demnerova K, Ovesna J (2016)** Genome Editing with Engineered Nucleases in Economically Important Animals and Plants : State of the Art in the Research Pipeline. *Curr. Issues Mol. Biol* **21**: 41–62.
- 73- Taupo (2015)** CRISPR, la mutagénèse qui croustille [En ligne], Adresse URL: <https://www.podcastscience.fm/dossiers/2015/06/28/crispr-la-mutagenese-qui-croustille/> Page consulté le (29/05 /2018).

Références bibliographiques

- 74- Turner P C, Mc Lennan AG, Bates A D, White M R H (2002)** Biologie moléculaire. (Ed) BERTI, Paris, 4-10p.
- 75- Vilmorin J L (1923)** L'hérédité chez la betterave cultivée. Gauthier-Villars et Cie, éditeurs. Paris, p153.
- 76- Walt Z E (2016)** Gene edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature* **532**. Focus News.
- 77- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J (2014)** Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol*, 1-6p.
- 78- Wang H, Yang H, Shivalila C S, Dawlaty M M, Cheng A W, Zhang F, Jaenisch R (2013)** One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Casmediated genome engineering. *Cell* **153**: 910–918.
- 79- Weidner M, Furelaud G (2016)** La transgénèse grâce à *Agrobacterium tumefaciens*. Planet-Vie.
- 80- Xie K, Zhang J, Yang Y N (2014)** Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol Plant* **7**: 923–926.
- 81- Yang H, Wang H, Shivalila C S, Cheng A W, Shi L, Jaenisch R (2013)** One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **154**: 1370–1379.
- 82- Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Kotliansky V et al. (2014)** Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol* **32**: 551–553.

Références bibliographiques

83- Yuan L, Sui T, Chen M, Deng J, Huang Y, Zeng J, Lv Q, Song Y et al. (2016) CRISPR/Cas9-mediated GJA8 knockout in rabbits recapitulates human congenital cataracts. *Sci. Rep* **6**.

84- Zahour A (1992) Eléments d'amélioration génétique des plantes. (Ed) : Actes, p9-10.

**INTITULÉ : NOUVELLE APPROCHE D'INGÉNIERIE GÉNOMIQUE
(CRISPR-CAS9)**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Génomique Végétale

L'amélioration des plantes a évolué avec le développement des pratiques culturales et des découvertes scientifiques, telles que les outils du génie génétique, et la biotechnologie. CRISPR-Cas9 pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated genes désigne une structure génétique procaryote dont l'expression confère aux bactéries et archées une immunité adaptative dirigée contre les virus. La curiosité de diverses équipes scientifiques a permis la compréhension et le détournement de ce système au profit de l'édition génomique. Ses applications sont multiples et de nombreuses preuves de concepts ont été développées. Chacune des applications correspond à un contexte scientifique mais aussi médical ou législatif. Ces contextes nous permettent de comprendre l'importance, les espoirs mais aussi les risques et les limites de ces applications.

Mots clés : biotechnologie, CRISPR-Cas9, amélioration.

Laboratoire de recherche : Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale-UFM.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Mme. GHIOUA-BOUCHTAB* (Maitre assistante à UFM Constantine).

Rapporteur : *Mme. KACEM N. Sandra* (Maitre de conférences à UFM Constantine).

Examineur : *Mr. TEMAGOULT Mahmoud* (Maitre-assistant à UFM Constantine).

Date de soutenance : 27 Juin 2018