

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Le système d'édition du génome CRISPR-Cas9

Présenté par : **Benathmane Bochra**
Meziani Salima

Le 27/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadrante : BOUBEKRI Karima (MCA, Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : BOUCHEHAM Anouar (MCA, Saleh Boubnider, Université 3).

Examinatrice 2 : BOULTIFAT Linda (MCB, Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire
2021- 2022

Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions **Dieu** Tout Puissant de nous avoir donné la force et la volonté de mener à bien ce travail.*

Ce mémoire a été rendu possible grâce à l'aide de plusieurs personnes à qui nous tenons à exprimer notre gratitude :

*Nous voulons tout d'abord adresser toute notre gratitude à la directrice de ce mémoire, **Dr BOUBEKRI Karima** (MCA, Université Frères Mentouri, Constantine 1) pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

*Nous voulons également remercier **les membres du jury Dr Boucheham Anouar** (MCA, Saleh Boubnider, Université 3) et*

***Dr Boultifat Linda** (MCB, Université Frères Mentouri, Constantine 1)*

pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour toutes leurs remarques et critiques.

*Un grand merci à **Souda Ibtiadj** pour les conseils concernant les bases de données, ils ont grandement facilité notre travail.*

*En fin, toute **personne** qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire est sincèrement remerciée ainsi que **les enseignants** qui ont participé à notre formation.*

Dédicace

Nous avons le grand plaisir de dédier ce modeste travail

À nos très chers parents

<<Benathmane Aziz, Sahnoune Fella>>

<<Meziani El Hadi, Bedjaoui EL JEYDA>>

Pour leurs soutiens, leurs patiences et leurs encouragements

Durant notre parcours scolaire.

À nos chers frères et sœurs.

À ma sœur Marwa pour avoir été toujours avec moi et pour m'avoir aidé dans le processus de ce mémoire. Merci pour l'appui moral que vous me donnez chaque jour de ma vie.

Amon petit frère Seifdine qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite.

À tous les membres de nos familles et toute personne qui porte le nom

<<Benathmane et Meziani>>

Liste des abréviations

VAA : Virus Adéno-Associé

ADNdb : ADN double brin

ARNsg : ARN guide unique

ASXL1 : Le gène supplémentaire sex combs-like 1

LB : Lymphome de Burkitt

Cas9 : Protéine à de courtes répétitions palindromiques regroupées régulièrement espacées (CRISPR-associated protein 9)

cccDNA : ADN circulaire fermé par covalence nucléaire

CCR5 : Le récepteur de la chimiokine 5

CDK11 : Cyclin-Dependent Kinase 11

RCTF : Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique

CIA : *Central Intelligence Agency*

CIB : Le Comité international de bioéthique

C-LDL: Cholestérol à lipoprotéines de basse densité

CRISPR: Courtes répétitions palindromiques regroupées régulièrement espacées

CTI: La calorimétrie par titrage isotherme

CSPi : Lignée de cellules souches pluripotentes induites issue de patients.

CDB : cassures double brin

CMD : La cardiomyopathie dilatée

DMD : La dystrophie musculaire de Duchenne

DTT : Le dithiothréitol

EGFR : Gène du récepteur du facteur de croissance épidermique

enu2 : Le gène de la phénylalanine hydroxylase (Pah) pour traiter la phénylcétonurie (PCU)

FA : L'anémie de Fanconi

FAH: l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase

Fancf : Le gène du groupe F de complémentation FA

FANCI : Gène de l'anémie de Fanconi

FnCas9 : l'endonucléase Cas9 de la bactérie Gram-négative Francisellanovicida, également connue sous le nom de FnCas9

HbS : une protéine hémoglobine S anormale

HDR : Réparation dirigée par homologie

HNH : Domaine dans le Cas-9 clive le brin complémentaire

HPVE6 : La protéine E6 est une protéine transformatrice majeure de nombreux types de papillomavirus.

HSPC : Les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques

HTT : Gène Huntingdon

INSERM : Comité d'éthique de l'Institut National de la Santé et de la Recherche médicale

JAK3: Janus Kinase

KLHDC4 : Kelch Domain Containing 4

KTA FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography

Ldlr : Le gène du récepteur des lipoprotéines de basse densité

LTR: Long Terminal Repeats

MA : La maladie d'Alzheimer

MCL-1: Le gène de la leucémie myéloïde -1

MCV: Les troubles cardiovasculaires.

MH : La maladie de Huntington

MLD : La maladie métabolique du foie

NHEJ : Jointure d'extrémité non homologue

NK : Cellules Natural Killer

NPC : Le carcinome naso-pharyngé

NSCLC : Cancer du poumon non à petites cellules

PAM: Motif Adjacent Protospacer

PCSK9 : Le gène de la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PSEN1 : préséniline 1

PSEN2 : préséniline 2

RHO : Rhodopsine

RP : La rétinite pigmentaire

RP1 : Gènes régulateurs

RPGR : RP GTPase

RVS: Une réponse virale soutenue

RuvC : Domaine dans le Cas-9 clive le brin non complémentaire

SC : L'anémie falciforme

SHC : SHC SH2-binding protéine 1 partie de la famille des homologues du collagène

ssRNA : ARN simple

TALEN : Les nucléases effectrices de type activateur de transcription

TNI3K : La troponine I de type 3

UPMC : Université Pierre et Marie Curie

VHB : Le virus de l'hépatite B

VHC : Le virus de L'hépatite C

VIH : Le virus de l'immunodéficience humaine

VPH : Le virus du papillome humain

ZNF : Les nucléases à doigt de zinc

β -ME : β -mercaptoéthanol

5'crRNA : Anti-CRSPR

Liste des figures

Figure 1 : Un diagramme schématique du système CRISPR-Cas9.....	4
Figure 2 : La Française Emmanuelle Charpentier et l'Américaine Jennifer Anne Doudna récompensées le prix Nobel de chimie 2020.	5
Figure 3 : L'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9.....	8
Figure 4 : Principe de conception d'un vecteur d'expression CRISPR/Cas9 pour la construction de bibliothèques à grande échelle.	10
Figure 5 : Schéma de la conception du système epiCRISPR.....	11
Figure 6 : Aperçu des procédures d'édition du génome <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> pour la thérapie clinique.	14
Figure 7 : Édition du génome <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> pour la thérapie clinique.....	15
Figure 8 : Un résumé de la méthode d'édition du génome Crispr-cas9.....	16
Figure 9 : protocole de purification de Cas9.....	18
Figure 10 : L'application de la technologie CRISPR-Cas dans une variété des domaines.	19
Figure 11 : Illustration schématique montrant la réparation fonctionnelle du CFTR par CRISPR-Cas9 dans les organoïdes de cellules souches intestinales acquis auprès de patients atteints de fibrose kystique	29
Figure 12 : L'abstrait d'une méthode d'utilisation CRISPR-Cas9 pour plusieurs maladies.	31
Figure 13 : Le Nombre des gènes modifiés à l'aide du système CRISPR-Cas dans le but d'améliorer les cultures.	32
Figure 14 : L'alignée de la première application du système CRISPR-Cas dans les cultures fruitières.	33
Figure 15 : Exploitation de CRISPR-Cas en l'élevage et les modèles d'animaux.....	36
Figure 16 : CRISPR-Cas9 à travers la presse.	42
Figure 17 : Nombre de publications CRISPR par an.....	45

Table des matières

<i>Remerciements</i>	<i>i</i>
<i>Dédicace</i>	<i>ii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>vi</i>
<i>ملخص</i>	<i>x</i>
<i>Résumé</i>	<i>xi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<i>Définition de CRISPR-Cas9</i>	<i>3</i>
1/Présentation du CRISPR/Cas9.....	3
2/Le prix Nobel de chimie 2020 distingue la découverte des « ciseaux génétiques » CRISPR-Cas9.....	5
3/La découverte du CRISPR-Cas9.....	6
4/Le principe de CRISPR-Cas9.....	6
5/Mécanismes de l'édition du gène CRISPR/Cas9.....	7
5-1/Mécanismes de réparation de la rupture à double brin.....	7
6/Stratégie de formulation et mécanisme de distribution (livraison) de CRISPR-Cas9.....	9
6-1/Stratégie de formulation.....	9
6-2/Mécanisme de livraison	12
7/Édition du génome pour la modélisation de maladies et la thérapie génique.....	13
8/Les avantages de CRISPR-Cas9.....	16
9/ Extraction et purification de CRISPR-Cas9	17
<i>Les applications de CRISPR-Cas9</i>	<i>21</i>
1/L'utilisation de CRISPR-Cas9 dans le domaine médicale	20
1-1/Soigner le cancer	20

1-2/Soigner la maladie causée par le virus du papillome humain (VPH)	22
1-3/Soigner l'allergie et les troubles immunologiques	23
1-4/Soigner la maladie causée par le virus de l'hépatite B (VHB)	23
1-5/Le Système CRISPR/Cas9 pour le traitement de la cardiomyopathie dilatée	24
1-6/Le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)	24
1-7/Soigner les troubles cardiovasculaires (MCV).....	25
1-8/Soigner la tyrosinémie de type I	26
1-9/Soigner les troubles neurologiques.	26
1-10/Dégradation de cholestérole.	27
1-11/Soigner les troubles métaboliques.	27
1-12/Soigner la maladie causée par le virus de l'hépatite C (VHC)	28
1-13/Soigner la maladie du fibrose kystique.	28
1-14/Soigner les troubles liés au sang.....	29
1-15/Soigner l'immunodéficience humaine (VIH)	30
1-16/Soigner les troubles liés aux yeux.....	30
2/L'utilisation de la technologie d'édition CRISPR/Cas9 des gènes dans l'agriculture et les cultures fruitières	31
2-1/L'édition du génome chez le bananier	32
2-2/L'utilisation du système PTG/Cas9 pour réaliser un montage kiwi à haute efficacité	32
2-3/Modification du génome du Riz	33
2-4/Autres applications en agriculture	34
3/CRISPR-Cas la technique d'édition du génome humain	34
4/L'élevage.....	35
5/Premiers bébés génétiquement modifiés	36
<i>Les éthiques, les risques et les enjeux juridiques du système CRISPR-Cas9.....</i>	38
1/L'éthique derrière la modification génomique humaine	38
2/Les risques de l'édition du génome par le système CRISPR-Cas9.....	39
3/Les avis des chercheurs partisans et opposants sur la technologie CRISPR-Cas9.	40

4-1/Régime juridique en vigueur en Belgique.....	43
4-2/Régime juridique en vigueur en France.	44
4-3/Régime juridique canadien en vigueur.....	44
5/Les Solutions suggérées pour éviter les dangers de la technologie CRISPR-Cas9	46
5-1/fonctionnement de CasOT.....	46
Conclusion.....	49
Références Bibliographiques.....	50

ملخص

الكرسبر كاس 9 هو نظام جديد لتحرير الجينوم، مشتق من الجهاز المناعي للبكتيريا، والذي يدافع عن البكتيريا العائل ضد هجوم العائيات. بسيط سريع وفعال لقطع الحمض النووي في أي خلية، وهو يتألف من الحمض النووي الريبي الإرشادي الذي يستهدف تسلسل الحمض النووي منقوص الأكسجين و المرتبط بالإنزيم كاس 9 الذي يشبه المقص الجزئي، يقطع الحمض النووي، وبذلك يمكن أن يعطل الجين أو يتحكم في تعبيره أو يعدله . كما يعالج الأمراض الوراثية، أو يزيد من غلة المحاصيل، أو يعيد إحياء الأنواع المنقرضة، ويعطي الحياة لأطفال في صحة تامة . ومع ذلك، فإن تطبيق هذه الأساليب يثير عددا من المشاكل (الفنية، التنظيمية، الإقتصادية، الأخلاقية والقانونية بشكل خاص.) بمجرد حل هذه المشكلات يمكن أن يكون كريسبر كاس 9 أداة بسيطة وموثوقة لتحرير المادة الجينية . هناك حاجة إلى مزيد من البحث لفهم قدرات كريسبر بشكل أفضل واستكشاف خصائصه . يجب أن يركز البحث على خصوصية الأداة وتأثيراته على الدنا الغيرامستهدف و كيفية ادماجه داخل الخلية . على سبيل المثال، ستكون نتائج التسلسل العميق للجينوم مفيدة في إختيار المواقع المستهدفة الصحيحة، وتطوير الحمض النووي الريبي الإرشادي عالي الانتقاء.

الكلمات المفتاحية : جهاز المناعة البكتيري، كريسبر كاس 9 ، تحرير الجينوم، الأخلاقيات، الحمض النووي الريبي الإرشادي، الأمراض الوراثية.

Résumé

Le CRISPR/Cas9 est un nouveau système d'édition du génome dérivé du système immunitaire bactérien, qui défend les bactéries hôtes contre l'agression des bactériophages. Simple, rapide et efficace pour couper l'ADN à un endroit précis du génome, dans n'importe quelle cellule. Ce mécanisme est constitué d'un ARN guide, qui cible une séquence d'ADN particulière, associé à l'enzyme Cas9, qui, comme des ciseaux moléculaires, coupe l'ADN. Il permet d'inactiver un gène, en contrôlant l'expression ou en le modifiant, de guérir des maladies génétiques, doper le rendement des cultures, ressusciter des espèces disparues ou donner vie à des bébés parfaits. Cependant, l'application de cette outil soulève un certain nombre de problèmes d'ordre technique, réglementaire, économique, éthique, et surtout légal.

Une fois ces problèmes résolus, CRISPR/Cas9 a le potentiel d'être un outil fiable et simple pour l'édition du matériel génétique. Pour mieux comprendre les capacités de CRISPR/Cas9 et explorer ses caractéristiques, des recherches supplémentaires sont nécessaires qui devraient porter sur la spécificité de l'outil, les effets hors cible et les modalités d'administration. Par exemple, les récents résultats du séquençage profond à l'échelle du génome seront utiles pour choisir les bons sites cibles et développer des ARNg hautement spécifiques.

Les mots clés : système immunitaire bactérien CRISPR-Cas9, édition du génome, cas9, ARNg, maladies génétiques

Abstract

CRISPR/Cas9 is a new genome editing system derived from the bacterial immune system, which defends host bacteria against bacteriophage attack. It is simple, fast and efficient to cut DNA at a precise location of the genome in any cell. This mechanism consists of a guide RNA, which targets a particular DNA sequence, associated with the Cas9 enzyme, which, like molecular scissors, cuts the DNA. It inactivate a gene, by controlling its expression or by modifying it, to cure genetic diseases, to boost the yield of crops, to resurrect extinct species or to give life to perfect babies. However, the application of this technique raises a number of problems (technical, regulatory, economic, ethical, and especially legal). Once these issues are resolved, CRISPR/Cas9 has the potential to be a reliable and simple tool for editing genetic material.

To better understand the capabilities of CRISPR/Cas9 and explore its features, additional research is needed that should address the specificity of the tool, off-target effects, and delivery modalities. For example, recent results from genome deep sequencing will be helpful in selecting the right target sites and developing highly specific gRNAs.

Keywords: bacterial immune system CRISPR-Cas9, genome editing, cas9, gRNA, genetic diseases

Introduction

La génomique fonctionnelle tente de comprendre le génome en perturbant le flux d'informations de l'ADN à l'ARN et aux protéines, afin d'apprendre comment le dysfonctionnement des gènes conduit à la maladie. La technologie CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associâtes Protein 9 soit en français courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées associées avec protéine 9) est l'outil le plus récent de la boîte à outils du généticien, permettant aux chercheurs de modifier l'ADN avec une facilité, une rapidité et une précision sans précédent, et représentant un nouveau moyen pour effectuer des criblages génétiques à l'échelle du génome afin découvrir la fonction des gènes (Hartenian & Doench, 2015).

Des millions de personnes souffrent de maladies génétiques graves comme le cancer, la dystrophie musculaire, la fibrose kystique, la drépanocytose, la maladie de Huntington et bien d'autres. Considérez la douleur et la souffrance qui pourraient être évitées (sans parler des coûts des soins de santé) si nous pouvions simplement réécrire le code génétique du patient pour guérir ces maladies. CRISPR-Cas9, une technologie d'édition de gènes promet de faire exactement cela. Depuis l'avènement du génie génétique dans les années 1970, l'outil d'édition de gènes CRISPR-Cas9 a été salué comme l'avancée la plus prometteuse de la recherche biomédicale. Elle nous a ouvert un monde de possibilités pour mieux comprendre et traiter les maladies humaines et animales. Il a le potentiel de révolutionner la recherche médicale et agricole.

Tout a commencé en 2012 (Savić & Schwank, 2021) par une étude du système immunitaire des bactéries. Plusieurs espèces, en effet, enregistrent des traces virales sous forme de petits fragments d'ADN dans une bibliothèque CRISPR. Ces archives contiennent également les gènes qui codent pour les enzymes Cas, comme Cas9. Lorsqu'un virus refait surface, le système CRISPR est activé et son génome est décodé à un endroit précis. Cependant, il est nécessaire d'avoir un guide (ARNsg) (Mangin, 2020). Alors : qu'est-ce que l'outil CRISPR/Cas9 qui est capable de couper l'ADN à volonté ? Quelles sont ses applications technologiques ? Quel est son potentiel ? Comment sont-ils utilisés dans le laboratoire ? Peut-il être utilisé librement ? Est-il important de prendre en compte les conséquences et les risques qu'il génère ? À quel point est-il capable de révolutionner l'humanité ? À quels dangers expose-t-il les êtres humains ? Quelle est la meilleure manière de l'appréhender ?

Dans le cadre de cette recherche bibliographique nous mettrons en lumière la technologie CRISPR Cas9 et le brillant avenir de ce système fascinant dans la recherche fondamentale et

les applications thérapeutiques. Nous déterminons les barrières juridiques et éthiques qui s'opposent au développement et à l'exploitation de cette technologie.

Pour cela, le premier chapitre aborde la définition du système CRISPR-Cas9 et démontre les deux lauréates du prix Noble qui ont inventé cet outil pour éditer le génome du vivant dans divers types d'organismes. Cette nouvelle technologie sera entamée en détail dans ce chapitre.

Le deuxième chapitre discute les applications potentielles du CRISPR-Cas9 dans divers domaines et sa principale utilisation pour traiter les maladies irréversibles, améliorer les cultures et améliorer la génétique humaine.

Pour finaliser cette étude, le dernier chapitre identifie les dangers et les problèmes juridiques liés à son application en général et sur l'homme en particulier, en plus, ce chapitre nous donne des avis de la communauté scientifique concernant cette technologie et son avenir et comment améliorer la spécificité du système et quels défis reste à surmonter.

Chapitre 1

Définition de CRISPR-Cas9

1/Présentation du CRISPR/Cas9

CRISPR-Cas9 est une technologie d'ingénierie du génome (ou d'édition du génome), qui permet d'ajouter, de modifier ou de supprimer une séquence ciblée du génome (Lassalas & Borges, 2018). CRISPR et sa protéine associée (Cas-9) sont l'outil d'édition du génome le plus efficace et le plus précis dans toutes les cellules vivantes (Asmamaw & Zawdie, 2021). Cet outil permet la correction des erreurs génétiques ainsi que l'activation ou la désactivation des gènes dans les cellules et les organismes d'une façon très rapide et à moindre coût avec une relative facilité. CRISPR/Cas9 est une technique d'édition de gènes qui implique deux composants clés : un guide ARN pour faire correspondre un gène cible souhaité et une Cas9 endonucléase qui provoque la rupture d'un ADN double brin, permettant des altérations génétiques (Figure 01) (Redman *et al.*, 2016).

L'outil d'édition de gènes CRISPR/Cas-9 a un large éventail d'utilisations dans une variété de domaines, y compris la médecine, l'agriculture et la biotechnologie. En agriculture, il peut être en mesure d'aider au développement de nouvelles céréales à plus haute valeur nutritionnelle. En médecine, il fait l'objet de recherches sur les tumeurs malignes, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les thérapies génétiques telles que ¹la drépanocytose, la fibrose kystique et la dystrophie musculaire de Duchenne. En raison de l'altération avancée de la protéine Cas-9, la technologie est également utilisée dans la régulation de certains gènes. Cependant, l'immunogénicité, les systèmes d'administration efficaces, les effets hors cible et les problèmes éthiques ont tous été des obstacles majeurs à l'expansion de la technologie dans les applications cliniques. Malgré le fait que CRISPR/Cas-9 inaugure une nouvelle ère de biologie moléculaire et joue d'innombrables rôles allant de la recherche moléculaire fondamentale aux applications cliniques (Asmamaw & Zawdie, 2021).

Six types différents de systèmes CRISPR-Cas ont été découverts à ce jour ; trois d'entre eux (types I, III et IV) ont été classés comme systèmes de classe 1, tandis que les trois autres (types II, V et VI) relèvent de la classe 2. En raison de la structure simple des effecteurs, les systèmes de classe 2 ont fait l'objet d'études, de conceptions et d'applications approfondies pour l'édition de gènes ; parmi eux, les systèmes de classe 2 de type II (Cas9) sont les plus connus et les plus utilisés (Wang *et al.*, 2020).

¹**La drépanocytose :** La drépanocytose est une maladie génétique caractérisée par la présence d'une hémoglobine anormale circulant

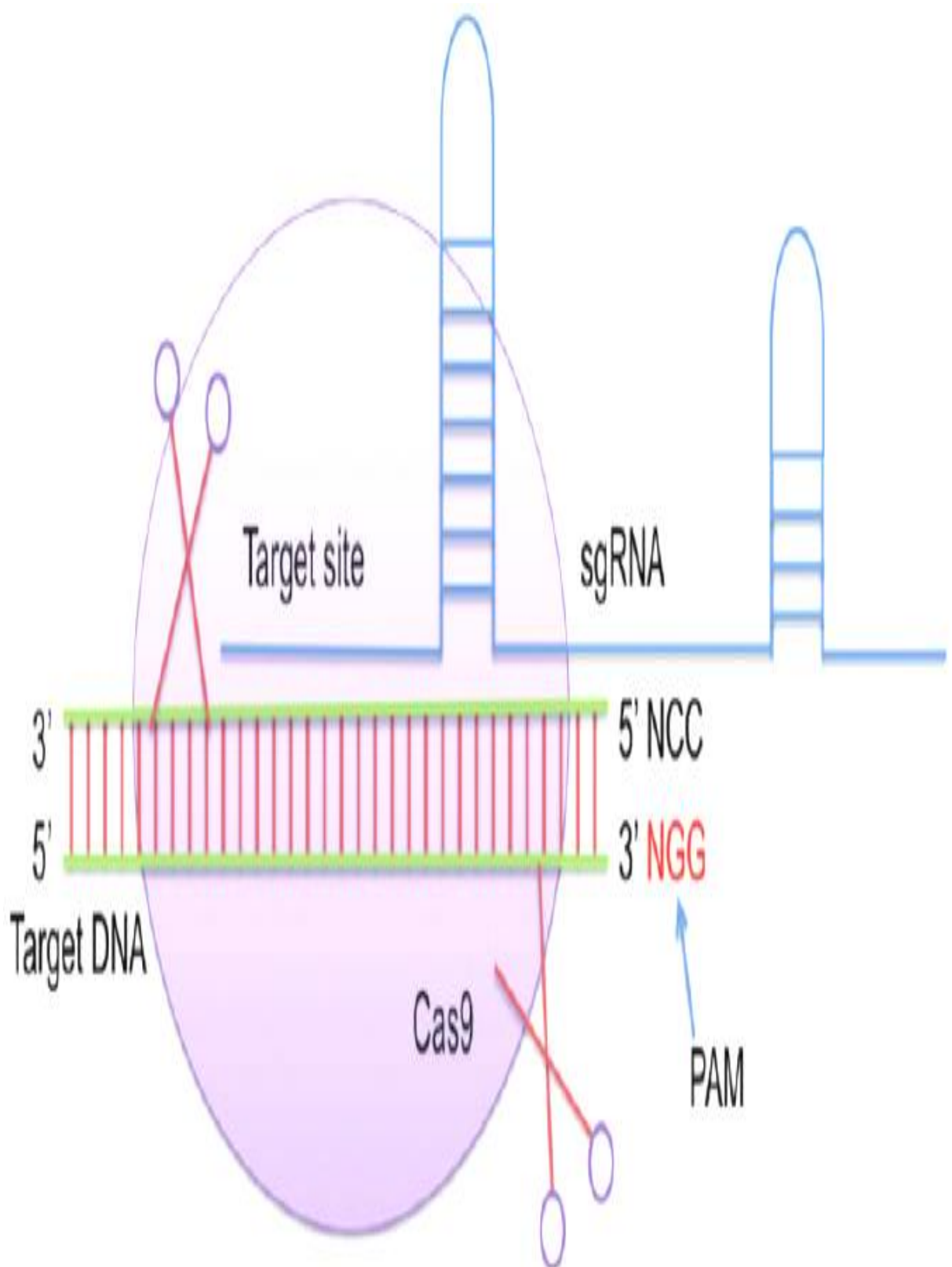


Figure 1 : Un diagramme schématique du système CRISPR-Cas9 (Kaur *et al.*, 2015).

La molécule d'ARN guide (ARNg) dirige la protéine Cas9 vers l'ADN cible et Cas9 clive l'ADN génomique 3 à 4 Pb en amont du site PAM (protospacer adjacent motif)

2/Le prix Nobel de chimie 2020 distingue la découverte des « ciseaux génétiques » CRISPR-Cas9

Le prix Nobel de chimie a été décerné à deux généticiennes, l'une Française, Emmanuelle Charpentier, et l'autre Américaine, Jennifer Doudna, pour le développement des « cages moléculaires » CRISPR-Cas9. Cet outil, qui constitue une véritable avancée dans le domaine de la biologie moléculaire, permet d'éditer le génome rapidement, facilement et à moindre coût en principe, sur n'importe quelle cellule (Lannoy & Hermans, 2020).



Figure 2 : La Française Emmanuelle Charpentier (à gauche) et l'Américaine Jennifer Anne Doudna (à droite) récompensées le prix Nobel de chimie 2020 (Mangin, 2020).

Emmanuelle Charpentier est la cinquième Française à remporter un prix Nobel (le prix Nobel de chimie 2020), née le 11 décembre 1968 à Juvisy-sur-Orge, France a obtenu son doctorat à l'Institut Pasteur après avoir obtenu sa maîtrise à l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC, aujourd'hui Sorbonne Université, Paris). Microbiologiste, généticienne et biochimiste, elle poursuit un programme international dans diverses institutions américaines avant de revenir en Europe (Suède et Allemagne). Elle est actuellement professeur à l'Institut Max Planck des Sciences de pathogènes de Berlin, qu'elle a fondé et dirigé avec l'Américaine Jennifer Anne Doudna (Né le 19 février 1964 à Washington) professeur américaine de biochimie et de biologie moléculaire à l'Université de Californie à Berkeley. Elle est diplômée du Pomona College avec un diplôme en chimie en 1985. Sa thèse de doctorat en biochimie, qui portait sur l'étude des ribozymes, a été complétée à l'Université de Harvard. Elle a ensuite complété un stage postdoctoral à l'Université du Colorado à Boulder. C'est la première fois qu'un prix Nobel de science est partagé par deux femmes (Jordan, 2021).

3/La découverte du CRISPR-Cas9

Le système a été découvert « par événement », dans une recherche publiée en 1987, dans laquelle les auteurs ont détecté sans le savoir le premier locus génomique CRISPR chez *E. coli* lors du séquençage d'un gène appelé *iap*, qui code pour une enzyme protéolytique, potentiellement responsable de la transformation des lysozymes de la phosphatase alcaline. Ils ont découvert une portion d'une séquence bissée directe dans la région flanquant l'extrémité 3' du gène *iap*. Ensuite, plusieurs groupes ont commencé à étudier le locus CRISPR dans des types des bactéries, tentant d'apprendre le rôle de cet arrangement typique. En 2005, trois collègues ont réalisé une observation efficace : les espaceurs dérivant à partir de composantes génétiques étrangères. Ce caractère remarquable a été validé en 2007 avec les premières conséquences certaines de Barrangou et ses collègues : en opérant avec *Streptococcus thermophilus*, les auteurs ont défié les bactéries à bactériophages. Au début, ils employaient des bactériophages dont les génomes sont semblables à des séquences avec le locus CRISPR de *Streptococcus thermophilus*. Les bactéries résistivités qui se sont développées après l'épreuve n'avait aucune marque d'infection bactériophage. Ensuite, ils ont défié la bactérie une fois encore, avec des bactériophages sans séquences similaires aux espaceurs. Seules quelques bactéries ont survécu. Ils ont étudié le locus CRISPR des rares clones survivants et ils ont réalisé que de petites parties des séquences de bactériophages avaient été insérées dans le locus CRISPR de la bactérie qui a réussi à pousser. Ainsi, ils ont prouvé que les espaceurs CRISPR donnent une puissante résistance aux bactériophages pour lesquels ils ont des séquences d'ADN correspondantes, et que, à basse fréquence, les bactéries capables aussi d'activer se « vacciner » contre le bactériophage en intégrant de nouveaux espaceurs dans son locus CRISPR préexistant (Tsarmopoulos, 2017).

4/Le principe de CRISPR-Cas9.

L'avènement des nucléases programmables, telles que CRISPR-Cas9, représente une avancée technologique dans le domaine du génie génétique. L'idée derrière ces méthodes est simple : elles génèrent des cassures au niveau des séquences cibles de l'ADN dans les cellules d'intérêt (Ducos & al., 2020). La création de cassures double brin (DSB) spécifique au site par le complexe CRISPR/Cas9 déclenche l'édition du génome via deux mécanismes différents. Premièrement, en l'absence d'une matrice d'ADN homologue, le DSB peut être réparé par une jonction d'extrémité non homologue (NHEJ), qui est sujette à des erreurs et entraîne des insertions ou des délétions mineures. Deuxièmement, en présence d'une matrice

de réparation synthétique, le DSB peut être réparé via une réparation dirigée par homologie (HDR), ce qui permet l'introduction de tout changement de paire de bases souhaité (Savić & Schwank. 2021).

5/Mécanismes de l'édition du gène CRISPR/Cas9.

Le mécanisme d'édition du gène CRISPR/Cas-9 peut être décomposé en trois étapes : reconnaissance, clivage et réparation. En raison de sa paire complémentaire de nucléotides 5'crRNA (anti-CRSPR), le sgRNA (ARNg) conçu dirige Cas-9 et reconnaît la séquence cible dans le gène cible. En l'absence de sgRNA, la protéine Cas-9 reste inactive. La nucléase Cas-9 génère des cassures double brin(DSB) sur un site à trois paires de bases en présence de (PAM). La séquence PAM est une courte séquence d'ADN conservée (entre 2 et 5 paires de bases) au voisinage du site de coupe, et sa taille varie selon les espèces bactériennes. La protéine Cas-9 reconnaît la séquence PAM dans 5-NGG-3 (ne peut être n'importe quelle base nucléotidique). Lorsque Cas-9 trouve un site cible avec le bon PAM, il déclenche la fusion locale d'ADN et le développement d'un hybride ARN-ADN, mais le mécanisme par lequel Cas-9 ancre la séquence d'ADN cible est encore inconnu. Ensuite la protéine Cas-9 est alors activée, permettant le clivage de l'ADN. Le domaine HNH clive le brin complémentaire, tandis que le domaine RuvC clive le brin non complémentaire de la cible ADN pour la production de DSB principalement à l'extrémité franche. Enfin, le DSB est réparé par la machine cellulaire hôte (Asmamaw *et al.*, 2021).

5-1/Mécanismes de réparation de la rupture à double brin.

D'autres nucléases de conception, comme CRISPR/Cas9, fonctionnent de manière similaire. Chacun a la capacité de provoquer une double cassure de brin d'ADN(DSB) à un emplacement spécifique défini génétiquement, qui peut être réparé par l'un des deux mécanismes. S'il n'y a pas de matrice homologue pour guider la réparation, une jointure d'extrémité non homologue (NHEJ) est utilisée, ce qui entraîne peu d'insertions ou de délétions (indels), et s'il y a une matrice homologue, une réparation dirigée par homologie (HDR) est utilisée. Cette technologie est utilisée pour générer des lignées cellulaires modifiées sur le génome à des fins de recherche, de dépistage de médicaments et à des fins thérapeutiques potentielles, ainsi que des plantes et des animaux génétiquement modifiés pour améliorer la production alimentaire. Il est également utilisé chez les animaux dont les génomes ont été falsifiés pour la recherche fondamentale, la modélisation des maladies, les

tests précliniques de médicaments et l'amélioration des ressources de transplantation (figure 03) (Doetschman & Georgieva, 2017).

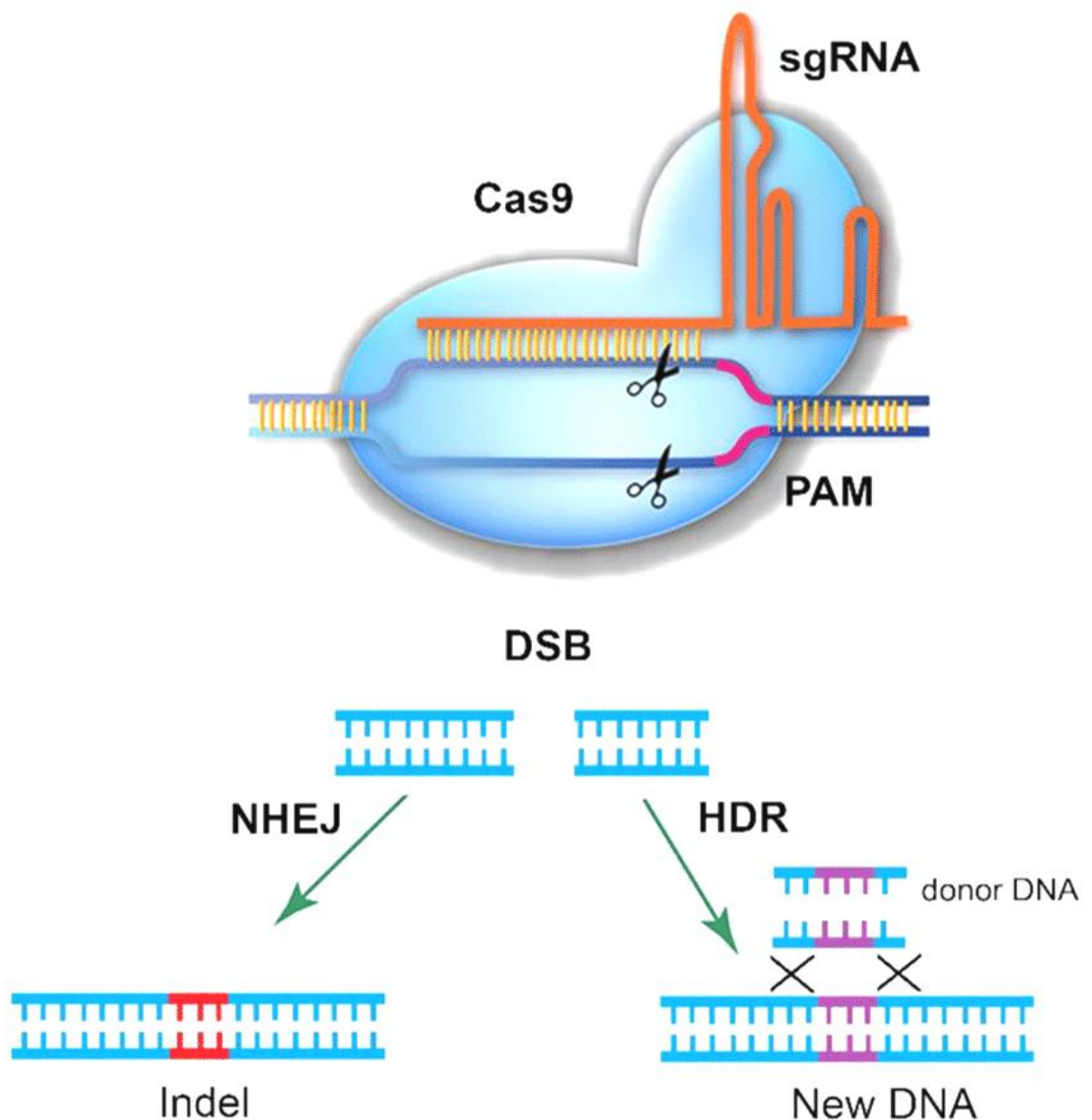


Figure 3 : L'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9 (Zaynitdinova *et al.*, 2021).

Le recrutement de Cas9 dans l'ADN cible est médié par un ARN chimérique à guide unique (sgRNA). Il obtient un protospacer reconnaissant la séquence cible suivi d'un motif adjacent au protospacer (PAM). Les DSB induits par Cas9 sont réparés soit par NHEJ donnant lieu à des mutations indel, soit par HDR en utilisant une matrice d'ADN donneur synthétique, ce qui permet l'introduction des changements de séquence souhaités. CRISPR, courte répétition palindromique regroupée régulièrement espacée ; ARNc, ARN CRISPR ; DSB, cassures double brin ; indel, insertions ou suppressions.

6/Stratégie de formulation et mécanisme de distribution (livraison) de CRISPR-Cas9

6-1/Stratégie de formulation

Pour l'édition du génome, l'outil CRISPR-Cas9 a un certain nombre de méthodes de formulation différentes. Le moyen principal et le plus simple consistent à utiliser un système CRISPR-Cas9 basé sur des plasmides qui codent à la fois pour Cas9 et ARNsg dans le même vecteur, ce qui est nécessaire pour éviter de nombreuses transfections de différents composants de la technologie. La protéine Cas9 et le sgRNA seront exprimés dans le vecteur, ce qui entrainera la formation du complexe sgRNA-Cas9 dans les cellules qui modifiera les séquences génomiques. La combinaison de l'ARNm de Cas9 avec l'ARNsg est la deuxième approche. Lorsque l'ARNm Cas9 est converti en protéine Cas9 dans les cellules, le complexe sgRNA-Cas9 se forme. La troisième stratégie consiste à délivrer directement la combinaison sgRNA-Cas9 assemblée *in vitro* à la cellule (Tiruneh *et al.*, 2021).

Nombreuses formes possibles du système CRISPR/Cas9 sont disponibles (Figure 4). Le bénéfice le plus frappant pour chacun d'eux est la facilité avec laquelle un gène peut être ciblé. Deux éléments principaux sont indispensables : premièrement, une version améliorée en codons de l'endonuclease Cas9 et deuxièmement, les éléments d'ARN crRNA et tracrRNA. La séquence d'ADN qui code pour le crRNA constitue d'environ 20 nucléotides et est aussi connue sous le nom de protospacer. À l'extrémité 3, la séquence d'ARNcr doit conclure par une forme protospacer adjacent (PAM) de 2 pb (paire de bases) de la séquence GG ou AG. La séquence d'ARNc peut être conçue comme continueur du brin + ou - de la région d'ADN cible. Il est probable de convenir la séquence de crRNA avec la séquence de tracrRNA dans l'asgRNA. De plus, des vecteurs CRISPR pour l'expression de sgRNA et Cas9 à partir d'un seul plasmide peuvent être acquis à partir de différentes sources via Addgene1. La descendance d'une bibliothèque génomique pour l'édition du génome (en applique la nickase Cas9 ou Cas9 de type sauvage) ou le silençage génique (en appliqué la Cas9 catalytiquement inactionne) peut être concrétisée par un simple clonage d'oligonucléotides d'ADN courts dans les vecteurs CRISPR successifs. Les protocoles pour la structuration de plasmides et le sous-clonage sont abondants gratuitement. Des protocoles d'automatisation d'un tel clonage à grande échelle ont déjà été progressé et appliqué à la descendance de bibliothèques de shARN à l'échelle du génome. En bref, des paires d'oligonucléotides créés codant pour l'ARNc souhaités peuvent être circulé séparément et attachées dans le vecteur

CRISPR. Les jointures peuvent être changées en bactéries compétentes dans un format de lame à 96 puits. Les transformations récoltantes d'une plaque peuvent être regroupées et déployées sur une lame de gélose pour le prélèvement robotique de colonies et le séquençage des plasmides. Cette procédure a prouvé une efficacité remarquable lorsqu'il est utilisé à la génération de bibliothèques de shARN à l'échelle du génome (Heintze *et al.*, 2013).

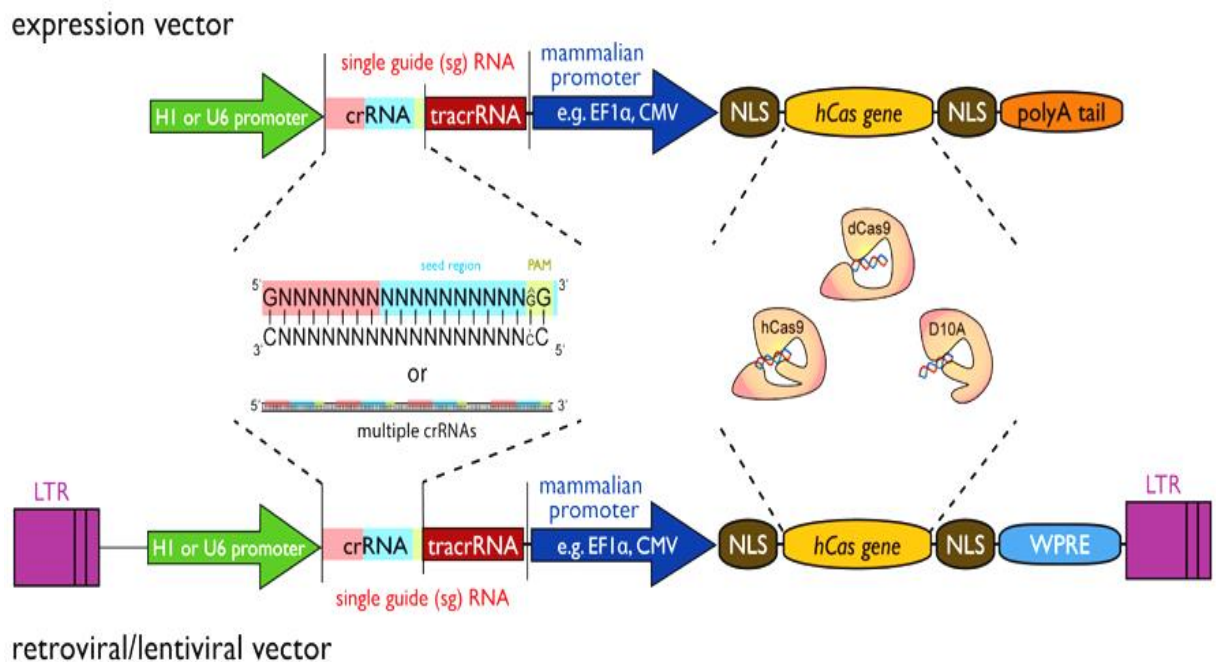


Figure 4: Principe de conception d'un vecteur d'expression CRISPR/Cas9 pour la construction de bibliothèques à grande échelle (Heintze *et al.*, 2013).

Le vecteur nécessite deux composants minimaux, à savoir la séquence d'ARN à guide unique (sgRNA) et le gène Cas9 qui peut tous deux être exprimé à partir d'un système à vecteur unique. Le sgRNA est composé d'un crRNA variable et d'un tracrRNA constant. La séquence de gène peut être insérée par une simple étape de clonage d'adaptateur dans la région d'ARNc de 20 pb. De plus, plusieurs séquences cibles du même gène peuvent être insérées pour augmenter l'efficacité et réduire les effets hors cible. À l'extrémité 3' de la séquence d'ARNc, un motif adjacent au protospacer de 2 pb (paire de bases) (PAM - boîte verte) de la séquence GG est essentiel, mais AG peut également être utilisé dans une moindre mesure. Une région de graine de 12 pb (boîte bleue) à l'extrémité 3' est nécessaire pour le ciblage de la séquence avec 8 pb supplémentaires à l'extrémité 5' contribuant à la spécificité (boîte rouge). L'expression de l'ARNsg peut être pilotée par un promoteur U6 ou alternativement par un promoteur HI. Le composant Cas9 est actuellement disponible sous trois formes différentes : en version de type sauvage (hCas9) ou mutante (D10A) à des fins d'édition de gènes et en version

catalytiquement morte (dCas9) pour les approches de silençage génique. L'expression de Cas9 peut être pilotée par n'importe quel promoteur d'expression de mammifère (par exemple, EF1A, CMV, etc.) ou promoteur rétroviral (LTR). Pour le ciblage nucléaire, le gène Cas9 nécessite plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS) et l'expression générale de Cas9 peut être améliorée par l'inclusion d'un élément régulateur post-transcriptionnel de la marmotte (WPRE) à l'extrémité 3'. Une queue polyA est requise pour les vecteurs d'expression, alors qu'elle doit être supprimée des vecteurs d'expression lenti-/rétroviraux qui ont une séquence de reconnaissance polyA dans leur 3'-LTR. Des variations de cette conception sont possibles en ce qui concerne le gène Cas utilisé ou d'autres modifications telles que le marquage du gène Cas avec GFP ou NLS afin d'optimiser le ciblage nucléaire Cas9.

6-1-1/Installation d'un système CRISPR/Cas9 basé sur des vecteurs épisodiques

La technologie actuelle d'édition du génome est basée sur l'expression transitoire Cas9 et un ARNg spécifique. Pour améliorer l'efficacité de l'altération, epiCRISPR a été créée en utilisant un multivecteur basé sur OriP/EBNA1 qui exprime un ARNg, Cas9, un gène de résistance à la puromycine (pour l'enrichissement des cellules transfectées par sélection de médicaments) et GFP (pour le contrôle de l'efficacité de la transfection) séparés par le peptide T2A autoclivant (Figure 05) (Xie *et al.*, 2017).

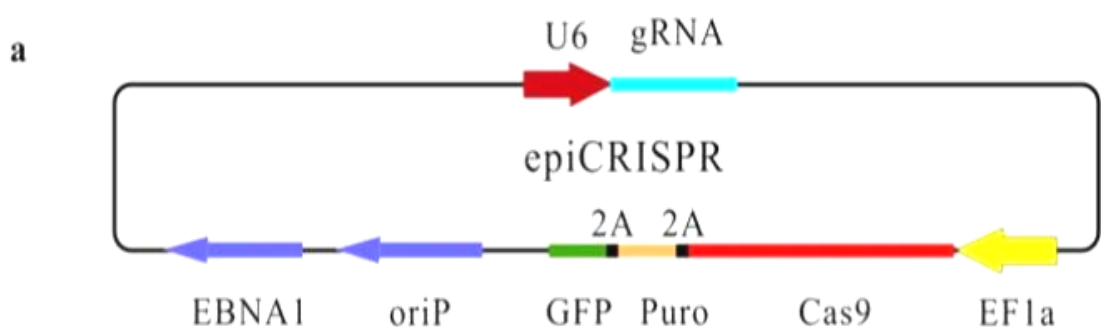


Figure 5 : Schéma de la conception du système epiCRISPR (Xie *et al.*, 2017).

Le vecteur contient un échafaudage d'ARNg piloté par le promoteur U6, un Cas9 piloté par le promoteur EF1a fusionné au gène de résistance à la puromycine et à la GFP avec des peptides P2A, et des éléments OriP/EBNA1 pour la répllication plasmidique dans les eucaryotes. Puro, gène de résistance à la puromycine.

6-2/Mécanisme de livraison

Il est difficile de délivrer des acides nucléiques en général et CRISPR-Cas9 en particulier, au tissu ou à la cellule cible. Les approches physiques et les approches vectorielles (virales ou non virales) sont deux des stratégies de distribution les plus utilisées. L'électroporation et les micro-injections sont utilisées dans les méthodes physiques, tandis que la livraison hydrodynamique. Les stratégies d'administration virale, telles que le virus adénoassocié (AAV) sont largement utilisées dans les méthodes vectorielles, car elles sont non pathogènes et peuvent infecter à la fois des virus et des non-virus. Des cellules de la division et des lentivirus avec des enzymes intégrases inactives sont à l'étude (Tiruneh *et al.*, 2021).

Une autre méthode, la lipofection (transfection de nanoparticules à médiation lipidique) est une autre technologie qui est probablement la méthode la plus efficace d'administration de CRISPR-Cas9 *in vivo*, cette approche est actuellement testée dans des essais cliniques (Tiruneh *et al.*, 2021).

Les vecteurs non viraux, d'autre part, offrent un certain nombre d'avantages par rapport aux vecteurs viraux et constituent un domaine de recherche en croissance rapide. Les systèmes de vecteurs non viraux comprennent les nanoparticules lipidiques, les peptides perméables aux cellules (CPP), les nanoclews d'ADN et les nanoparticules d'or (Lino *et al.*, 2018). Nous mentionnons ici les méthodes les plus importantes utilisées dans les laboratoires.

6-2-1 Méthodes de livraison physique

-Microinjections

La micro-injection est considérée comme le « gold standard » pour introduire des composants CRISPR dans les cellules, avec des efficacités quasi parfaites. Dans cette méthode, un plasmide ADN qui code à la fois pour Cas9 et sgRNA, un ARNm qui code pour Cas9 et sgRNA, ou Cas9 avec sgRNA peut être directement injecté dans des cellules individuelles. Une membrane cellulaire est percée à l'aide d'un microscope et d'une aiguille de 0,5 à 5,0 mm de diamètre, et la cargaison est livrée directement à un point cible à l'intérieur de la cellule (Lino *et al.*, 2018). Nous mentionnons ici les méthodes les plus importantes utilisées dans les laboratoires.

-L'électroporation

L'électroporation est une méthode physique établie depuis de longue date pour fournir des outils d'édition de gènes à une population de cellules. Cette approche utilise des courants électriques pulsés à haute tension pour ouvrir des espaces nanométriques dans la membrane cellulaire des cellules suspendues dans un tampon de manière transitoire, permettant aux composants avec des diamètres hydrodynamiques de dizaines de nanomètres de s'écouler à travers la cellule (Lino *et al.*, 2018).

-Livraison hydrodynamique.

La livraison hydrodynamique est une approche d'administration *in vivo* qui consiste à injecter rapidement une solution à grand volume (huit à dix pourcent du poids corporel) contenant une solution d'édition de gènes dans la circulation sanguine d'un animal, généralement par la veine caudale (Lino *et al.*, 2018).

6-2-2/Méthode de livraison des vecteurs viraux

-Virus adénoassocié

L'VAA, du genre *Dependovirus* et de la famille des Parvoviridae est un petit virus à ADN, qui peut infecter l'être humain. Toutefois, il ne provoque pas de maladie et n'entraîne qu'une réponse immunitaire de défense modérée (Lino *et al.*, 2018).

7/Édition du génome pour la modélisation de maladies et la thérapie génique.

L'utilisation de nucléases modifiées guidées par l'ARN comme CRISPR/Cas9, des nucléases programmables de liaison à l'ADN comme les nucléases à doigt de zinc(ZNF) et les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) étaient utilisées pour modifier l'ADN. Cependant, le développement de ces protéines de liaison à l'ADN spécifiques à la séquence prenait du temps et était difficile, ce qui constituait un obstacle important à leur utilisation généralisée. En raison de la facilité et de la rapidité avec lesquelles les nucléases guidées par CRISPR peuvent être créées, le système CRISPR/Cas9 a rapidement évolué pour devenir l'outil d'édition d'ADN le plus largement utilisé, facilitant un grand nombre d'études d'édition de gènes dans une variété d'organismes, y compris les mammifères ex : espèce de singe.

Ces découvertes ont suscité de grands espoirs pour la thérapie génique médiée par CRISPR/Cas9, qui vise à réparer les allèles pathogènes en modifiant la séquence d'ADN à l'emplacement exact sur le chromosome. Les deux sections suivantes se concentrent sur les approches *in vivo* qui ciblent les cellules directement dans le zygote ou les animaux adultes (Figure 06). De plus, des approches *ex vivo* pour modifier des ²cellules somatiques ou progénitriques en culture avec une transplantation ultérieure chez le patient (Figure 06) ont été discutées (Savić & Schwank, 2021).

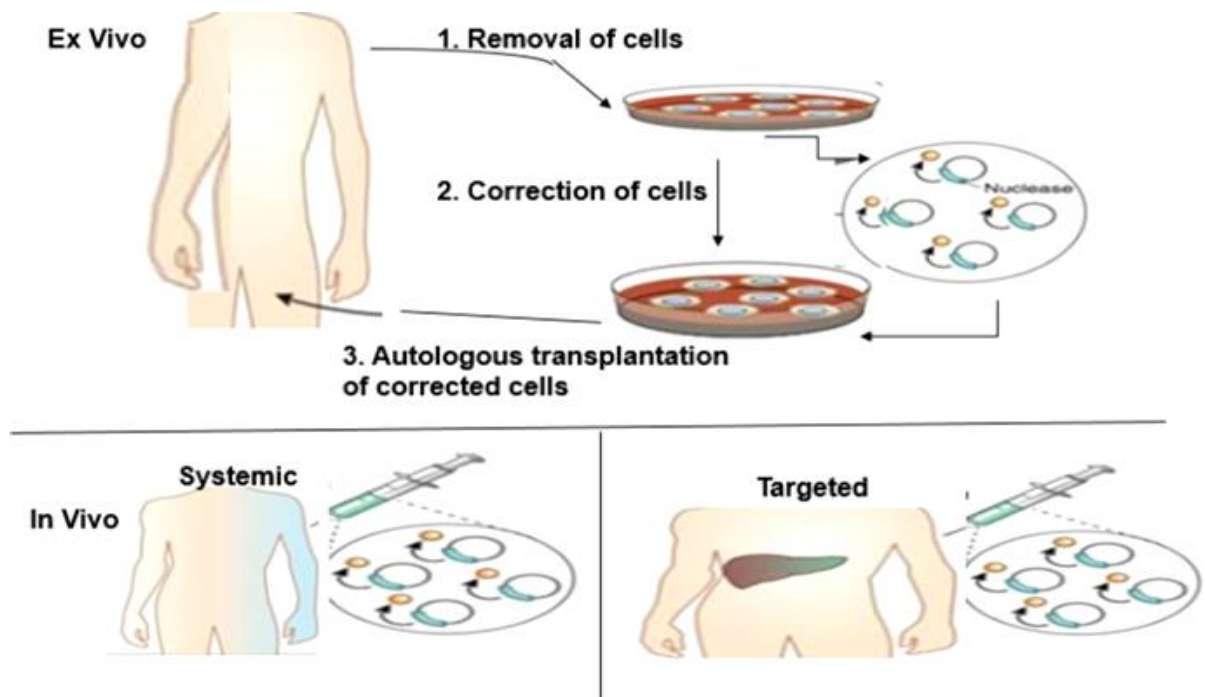


Figure 6 : Aperçu des procédures d'édition du génome *ex vivo* et *in vivo* pour la thérapie clinique (Khalil, 2020).

En haut : dans la thérapie d'édition ex vivo, les cellules sont supprimées provenant d'un patient à traiter, corrigé par édition de gènes, puis greffé au patient. Pour obtenir un succès thérapeutique, les cellules cibles doivent être capables de survivre à la transplantation in vitro et autologue des cellules corrigées. Ci-dessous : Dans la thérapie d'édition in vivo, conçue, les nucléases sont administrées à l'aide de techniques virales ou non virales et directement injectées localement dans le tissu affecté, telles que l'œil, le cerveau ou le muscle.

²**Cellule somatique ou progénitriques** : ensemble des cellules d'un organisme dépourvu de fonction reproductrice.

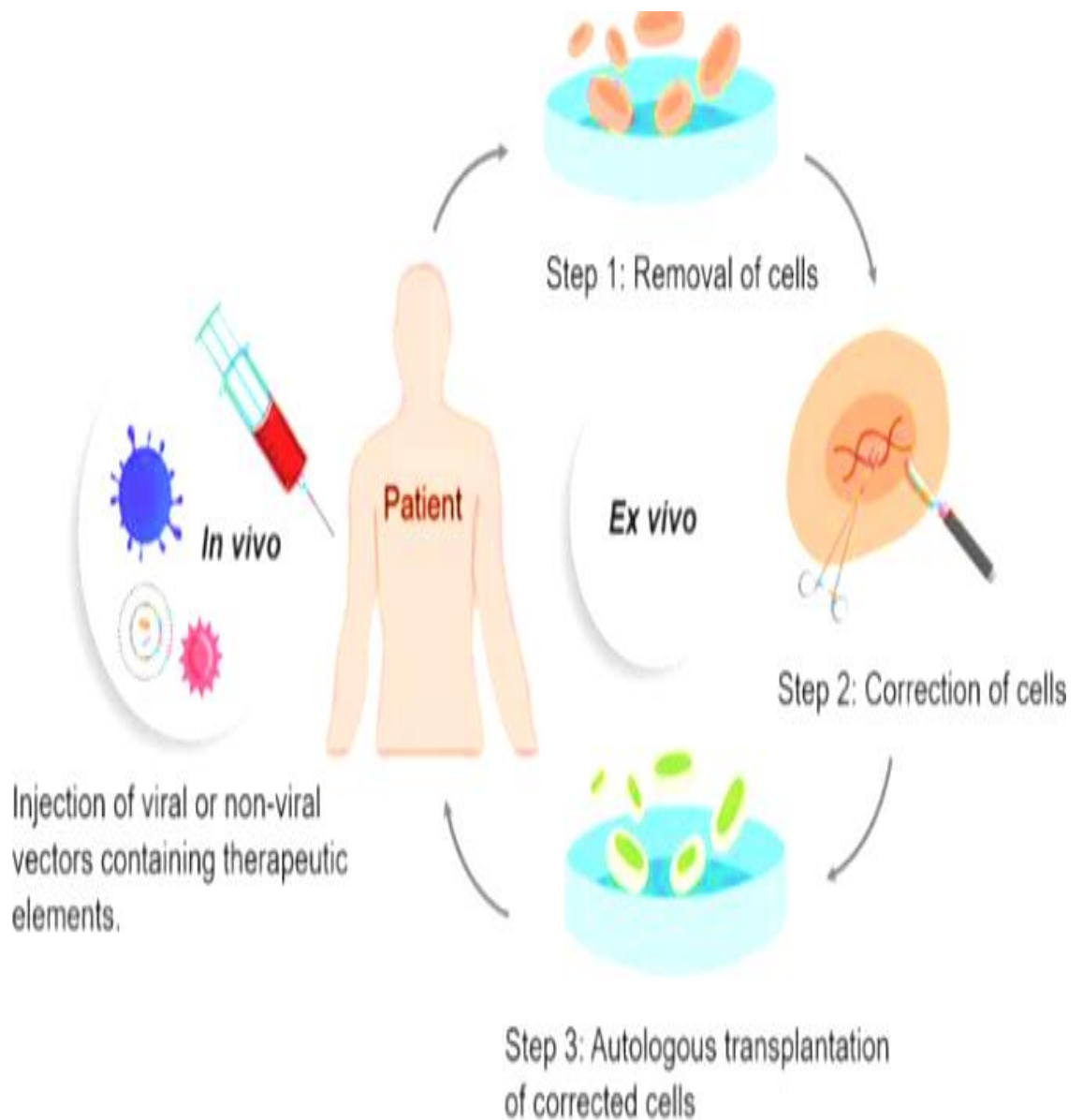


Figure 7 : Édition du génome *ex vivo* et *in vivo* pour la thérapie clinique (Li *et al.*, 2020).

Droite : Pour la thérapie d'édition ex vivo, les cellules sont isolées d'un patient à traiter, éditées puis greffées sur le patient. Pour obtenir un succès thérapeutique, les cellules cibles doivent être capables de survivre in vitro et de retourner dans le tissu cible après la transplantation. À gauche : pour la thérapie. D'édition in vivo, les nucléases modifiées sont administrées par des approches virales ou non virales et directement injectées au patient pour un effet systémique ou ciblé sur les tissus (tels que les yeux, le cerveau ou les muscles).

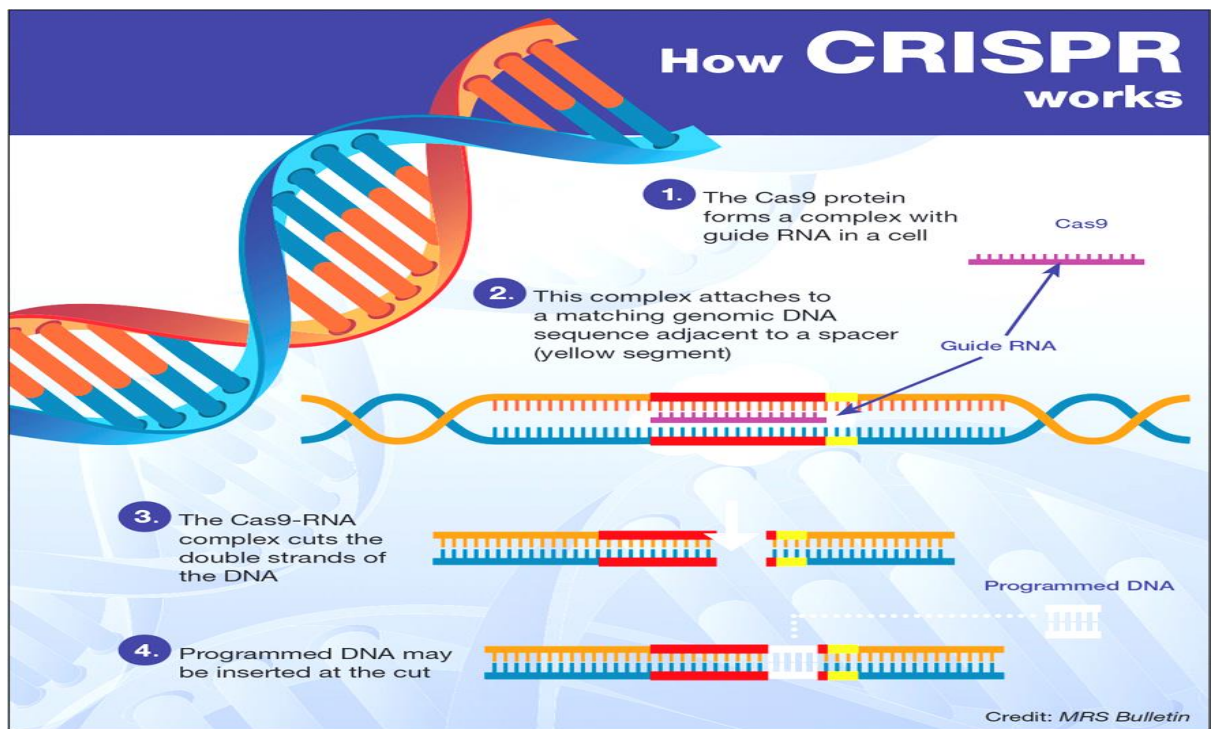


Figure 8 : Un résumé de la méthode d'édition du génome CRISPR-Cas9 (Ball, 2016).

8/Les avantages de CRISPR-Cas9

Les avantages du système CRISPR par rapport aux nucléases à doigts de zinc (ZFN) et (TALEN) sont les :

- Contrairement aux méthodes impliquant les nucléases ZFN et TALEN, une seule protéine (Cas9) est requise, et parce qu'elle est universelle, aucune ingénierie protéique n'est requise.
- Le ciblage est dépendant de l'apparition des bases, la création de guides ARN ne nécessite donc que la connaissance des règles de Watson et Crick.
- Les nouveaux guides ARN sont très faciles à produire.
- En utilisant une combinaison de plusieurs guides ARN, il est possible de cibler plusieurs séquences en même temps.
- Contrairement aux nucléases (ZFN) et (TALEN), le système CRISPR peut cliver un ADN méthylé (Tremblay, 2015).

9/ Extraction et purification de CRISPR-Cas9

Il est essentiel d'avoir une procédure simple et rapide pour obtenir une protéine nucléase pure. Cas9 est fréquemment purifié par enrichissement en métal d'affinité en une seule étape pour les approches d'édition du génome et les tests de nucléase *in vitro*. Cependant, pour une pureté plus élevée de la purification de Cas9, d'autres étapes de chromatographie comme la chromatographie d'échange de cations et la chromatographie d'exclusion de taille ont été ajoutées à l'enrichissement d'affinité initial.

La technique de purification Cas9 décrite ici comporte quatre parties, dont deux sont des étapes de purification de protéines. Pour réaliser cette purification, il y a besoin d'un système de chromatographie comme le KTA FPLC (Fast protein liquid chromatography) et d'une colonne échangeuse de cations haute résolution comme la Resource S (capacité de la colonne : 6 ml).

Pour la lyse des cellules bactériennes, les chercheurs ont utilisé une cellule French pressée. C'est une méthode de lyse douce et efficace qu'ils ont trouvée assez efficace pour les cellules bactériennes. D'autres ont utilisé avec succès la sonication pour lyser les cellules afin de purifier le Cas9. Cependant, il faut être prudent lors de l'utilisation de la sonication, et il est important d'éviter de surchauffer les échantillons, car cela peut entraîner une dénaturation des protéines.

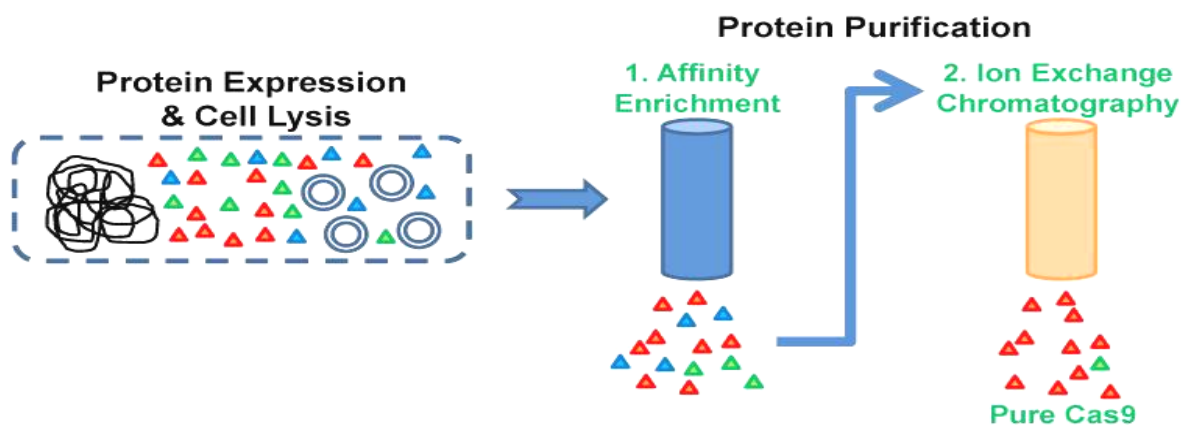
Différents groupes ont utilisé divers composants et compositions de tampons pour répondre à diverses exigences de purification et de fonctionnement en aval. Lors de l'étape de lyse cellulaire, un agent réducteur est fréquemment ajouté et maintenu dans les étapes de purification et de stockage. Alors que certains protocoles utilisaient le β mercaptoéthanol (β -ME) comme réducteur. Malgré le fait qu'il soit stable, il doit être manipulé avec précaution, car il est toxique et a une odeur forte et désagréable. De plus, le β -ME peut créer des additifs avec des cystéines libres dans la protéine, qui doivent être prise en compte dans toute analyse ultérieure des protéines, comme la spectrométrie de masse ou les protocoles de modification chimique.

Le dithiothréitol (DTT) est un autre agent réducteur utilisé dans la purification de Cas9. Cependant, par rapport à β -ME, le DTT est instable et doit être évité dans les procédures sensibles telles que la calorimétrie par titrage isotherme (ITC).

D'autres chercheurs utilisés l'agent réductase stable et inodore Tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP). De plus, le TCEP pourrait être utile pour toute altération chimique impliquant des résidus de cystéine sans thiol, en particulier ceux impliquant des composés apparentés au maléimide. Pour les protéines instables, les protocoles de purification nécessitent un cocktail d'inhibiteurs de protéase.

Cependant, avec l'ajout de ces inhibiteurs, les chercheurs n'ont remarqué aucun changement significatif dans le profil d'éluion ou le rendement final de Cas9. De ce fait, ils ont obtenu un résultat que les bandes supplémentaires observées sous la bande de protéine Cas9 lors de la purification par affinité n'étaient pas des produits Cas9 protéolytiques. Après le premier enrichissement par affinité, des étapes supplémentaires sont nécessaires pour obtenir une cas9 hautement purifiée.

D'autres chercheurs ont utilisé une colonne GE Health care (HiTrap SP) pour la purification de Cas9 par chromatographie d'échange de cations. Les colonnes HiTrap Sp, avec leurs plus grandes tailles de billes fournissent une purification à basse résolution, ils sont donc utilisés une colonne Resource S à haute résolution pour l'étape de purification finale. Cela permet d'obtenir une plus grande pureté de Cas9 en seulement deux étapes de purification. La figure montre un schéma général d'une stratégie de purification (Figure 09) (Rajagopalan *et al.*,



2018).

Figure 9 : protocole de purification de Cas9 (Rajagopalan *et al.*, 2018).

La protéine Cas9 a été exprimée dans des cellules hôtes E. coli, et les cellules ont été récoltées et lysées à l'aide d'une presse française. Une chromatographie d'affinité métallique a été utilisée pour enrichir Cas9 avec un His-Tag C-terminal à partir de lysat cellulaire soluble. Pour obtenir du Cas9 pur, la fraction d'enrichissement en Cas9 a été directement appliquée à une colonne de chromatographie échangeuse de cations à haute résolution.

Chapitre II

Les applications de CRISPR-Cas9

Quelques années seulement après sa découverte, l'outil d'édition de gènes CRISPR/Cas9 a déjà été étudié pour un large éventail d'applications et a eu un impact significatif sur le monde dans une variété de domaines, y compris la médecine, l'agriculture et la biotechnologie. Les chercheurs prévoient que cette technologie continuera de progresser à l'avenir afin de traiter et de guérir les maladies, de développer des cultures plus nutritives et d'éradiquer les maladies infectieuses. Les sections suivantes traitent des principales caractéristiques de certains domaines récents de CRISPR/Cas9 ainsi que des essais cliniques en cours (Asmamaw & Zawdie, 2021).

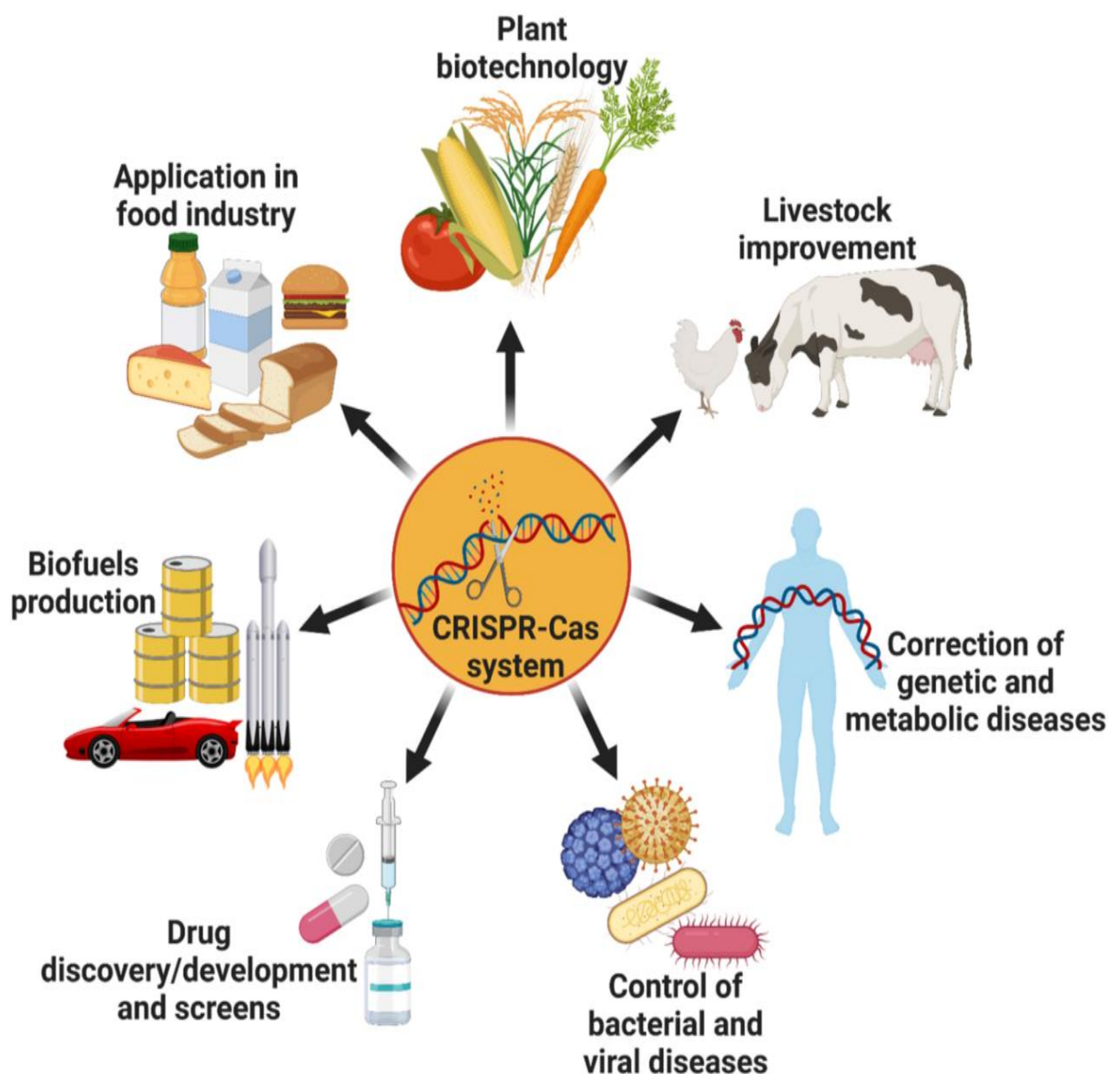


Figure 10 :L'application de la technologie CRISPR-Cas dans une variété de domaines (Nidhi *et al.*, 2021).

1/L'utilisation de CRISPR-Cas9 dans le domaine médicale

1-1/Soigner le cancer

Le cancer est l'une des maladies mortelles les plus courantes qui peuvent être causées par l'accumulation de modifications épigénétiques dans le génome. L'inconvénient de la chimiothérapie conventionnelle est le manque de ciblage spécifique et la résistance aux médicaments chimio thérapeutiques. En conséquence, de nouvelles cibles moléculaires pouvant aider au traitement du cancer doivent être découvertes. Il a été suggéré que les oncogènes mutés et les gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses pourraient agir comme des cibles thérapeutiques intelligentes, ce qui implique que la modulation des gènes suppresseurs de tumeurs peut induire l'apoptose dans les cellules tumorales (Sharma *et al.*, 2021).

CRISPR-Cas9 s'est révélé très prometteur pour le traitement du cancer dans l'immunothérapie du cancer, la manipulation du génome et de l'épigénome du cancer et l'élimination ou l'inactivation des infections virales cancérogènes (Cheng *et al.*, 2020). Les scientifiques ont pu l'utiliser dans plusieurs types de cancers telles que : Cancer du poumon, Cancer du sein, Cancer colorectal, cancer de la prostate, cancer des os, cancer des ovaires, cancer hépatocellulaire.

1-1-1/Soigner le cancer du poumon

Le cancer du poumon est la principale cause de décès liés au cancer et le deuxième cancer le plus souvent diagnostiqué aux *États-Unis* (Hoyet *al.*, 2019). Plusieurs études ont utilisé CRISPR/Cas9 pour cibler efficacement divers gènes impliqués dans l'apparition et la progression du cancer du poumon (Cheng *et al.*, 2020). Par exemple : Koo *et al* (2017). On utilise CRISPR pour cibler des variantes mutantes du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) dans la souris, qui joue un rôle essentiel dans la progression tumorale, ce qui a entraîné une réduction de la prolifération cellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'EGFR a également été éliminé dans une lignée cellulaire NSCLC (cancer du poumon non à petites cellules), ce qui a entraîné la mort des cellules cancéreuses et une diminution de la taille de la tumeur *in vivo* (Siva *et al.*, 2021).

1-1-2/Soigner le cancer de l'ostéosarcome.

Le type le plus courant de cancer des os malins chez les enfants et les adultes est l'ostéosarcome. Il a été démontré que le gène CDK11 (cyclin dependent kinase 11) est nécessaire à la croissance de plusieurs cellules d'ostéosarcome. Ces dernières années, le système CRISPR/Cas9 des mécanismes de défense de l'hôte bactérien s'est avéré être un outil d'édition du génome supérieur dans le diagnostic du cancer, Feng *et al.* (2015). Ont démontré avec succès l'utilisation du système CRISPR/Cas9 comme outil d'édition du génome robuste pour déterminer l'effet direct du gène CDK11 dans une lignée d'ostéosarcome cellulaire. L'inhibition de CDK11 réduit la prolifération et la viabilité des cellules dans les lignées d'ostéosarcome. En conséquence, l'inactivation de CDK11 pourrait être utilisée comme marqueur pronostique puissant pour le diagnostic d'ostéosarcome (Siva *et al.*, 2021).

1-1-3/Soigner les tumeurs malignes myéloïdes.

Il a été rapporté que dans les myéloïdes malins, les régulateurs épigénétiques sont fréquemment mutés. La technologie CRISPR-Cas9 a été utilisée pour diminuer la croissance des cellules leucémiques dans les xénogreffes de souris en corrigeant le gène supplémentaire sexcombs-like 1 (ASXL1) et restauré l'expression de la protéine ASXL1, ce qui a considérablement réduit la croissance des cellules leucémiques dans les xénogreffes de souris. Le système CRISPR-Cas9 a également été utilisé pour désactiver le gène de la leucémie myéloïde -1 (MCL-1), un membre de la famille des gènes BCL2, dans les cellules humaines du lymphome de Burkitt (BL) pour induire l'apoptose, suggérant que MCL- 1 pourrait être une nouvelle cible pour le traitement du cancer, car il joue un rôle dans la division cellulaire, la prolifération et la différenciation tumorale (Sharma *et al.*, 2021).

1-1-4/Soigner le cancer du sein.

SHC SH2-binding protéine 1 (SHCBP1) fait partie de la famille des homologues du collagène qui régule la division cellulaire. Parce que la surexpression du gène SHCBP1 a été liée à une variété de maladies, y compris le cancer, il pourrait être une cible thérapeutique potentielle ainsi qu'un biomarqueur pour le diagnostic du cancer. Il a été démontré que le ³silencage médié par CRISPR-Cas9 du gène SHCBP1 peut inhiber la prolifération des cellules

³**Silencage** : Le silencage génétique est une stratégie pour réduire ou éliminer la production d'une protéine basée sur son gène correspondant.

cancéreuses tout en induisant également ⁴l'apoptose des cellules cancéreuses du sein (Sharma *et al.*, 2021).

1-1-5/inhiber le carcinome du nasopharynx

Les protéines Kelch sont impliquées dans la pathogenèse de diverses maladies humaines, dont le cancer. Le carcinome naso-pharyngé (NPC) est un cancer rare dans la plupart des pays, mais courant dans le sud de la Chine et dans certaines parties de l'Asie du Sud-est. Dans cette étude, les chercheurs ont identifié Kelch Domain Containing 4 (KLHDC4), un membre orphelin de la superfamille des répétitions kelch, comme marqueur pronostique de NPC. Ils ont examiné l'expression de KLHDC4 dans 168 cas NPC en utilisant la coloration immunohistochimie. Ils ont découvert un niveau beaucoup plus élevé de KLHDC4 dans les biopsies NPC par rapport à la muqueuse nasopharyngienne normale environnante. La désactivation (KO) de KLHDC4 dans la lignée cellulaire NPC à l'aide de l'édition de gènes CRISPR/Cas9 a considérablement réduit la prolifération cellulaire, la formation de colonies dans l'agar et la croissance tumorale chez la souris nude. La perte de KLHDC4 a provoqué une augmentation significative de l'apoptose spontanée dans les cellules NPC (Lian *et al.*, 2016).

1-2/Soigner la maladie causée par le virus du papillome humain (VPH).

Le VPH virus ADN double brin (ADNdb), infecte les cellules des muqueuses ou de la peau. Il provoque des maladies sexuellement transmissibles et représente environ 11 % de tous les cas de cancer chez les femmes dans le monde. Il a été rapporté que le traitement du cancer du col de l'utérus par CRISPR-Cas9 peut être obtenu en inhibant HPV E6 (la protéine E6 est une protéine transformatrice majeure de nombreux types de papillomavirus). La technologie CRISPR-Cas9 peut également cibler les régions conservées des gènes HPV6/11 E7, indiquant le potentiel thérapeutique de l'édition de gènes contre les erreurs génétiques (Sharma *et al.*, 2021).

⁴**L'apoptose** : Mécanisme de mort cellulaire programmée, intervenant pendant le développement de l'embryon et permettant la différenciation des organes définitifs à partir des structures embryonnaires.

1-3/Soigner l'allergie et les troubles immunologiques

JAK3 (Janus Kinase 3) est une tyrosine kinase qui régule une variété de processus pathogènes dans l'asthme allergique. Le déficit en JAK3 est lié à une diminution du nombre de cellules Natural Killer (NK) et tu circulantes, ainsi qu'à un nombre normal de cellules B qui fonctionnent de manière insuffisante. La réparation CRISPR-Cas9 du gène humain JAK3 a restauré la capacité à différencier les progéniteurs des cellules T capables de produire des cellules T/NK. Cela suggère que la technologie CRISPR- Cas9 peut reprogrammer les cellules pour prévenir diverses maladies allergiques (Sharma *et al.*, 2021).

1-4/Soigner la maladie causée par le virus de l'hépatite B (VHB)

Le VHB infecte à long terme plus de 240 millions de personnes dans le monde. Les deux seules classes de médicaments pour le traitement du VHB sont les analogues nucléosidiques et l'interféron. Cependant, aucun de ces antiviraux ne cible l'ADN circulaire fermé par covalence nucléaire (cccDNA), qui sert de modèle aux synthèses d'ARNm viral et d'ARN pré-génomique et assure la persistance du virus. En conséquence, le fait que seul un faible pourcentage de patients traités ait une réponse virale soutenue (RSV) ou soient guéri souligne le besoin de nouvelles thérapies VHB. Les régions conservées du génome VHB peuvent être ciblées spécifiquement par le système d'édition des gènes CRISPR/Cas9. Cela se traduit par une forte suppression virale et fournit un outil prometteur pour l'éradication du virus (Lin *et al.*, 2015).

Dans les lignées cellulaires ou les modèles animaux, il est conçu pour cibler des séquences d'ADN spécifiques du VHB afin d'inhiber la réplication du VHB et d'induire une mutation du génome viral (Peng *et al.*, 2015).

Lin *et al.* (2014) ont également montré que l'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9 pourrait être utilisée pour traiter l'infection par le VHB. De nombreux patients développent des infections chroniques à VHB, qui peuvent entraîner une cirrhose du foie ou un carcinome hépatocellulaire. Malgré le fait que des thérapies antivirales aient été développées pour les personnes atteintes de VHB chronique, elles réussissent rarement à éradiquer complètement le virus de l'infection. Cette viabilité à long terme est due à la grande stabilité des matrices cccDNA utilisées pour la réplication virale. Les chercheurs de cette étude ont utilisé des injections hydrodynamiques dans la veine caudale de vecteurs exprimant le VHB pour modéliser l'infection chronique à VHB chez la souris (Savić & Schwank, 2016).

L'approche hydrodynamique de la veine caudale est un moyen sûr et efficace de délivrer des acides nucléiques au foie par une injection intravasculaire rapide d'un grand volume de liquide. Il peut être utilisé pour délivrer certains gènes dans le foie, pour fournir de l'ARNi, pour provoquer des tumeurs et pour étudier l'expression génétique de l'hôte après avoir reçu un ADN étranger qui génère des effets thérapeutiques (Kim & Ahituv, 2013).

Il convient de noter que la co-injection du système CRISPR/Cas9 avec la séquence VHB a conduit au clivage du vecteur et finalement, à une réduction de l'antigène de surface de l'hépatite B (Savić & Schwank, 2016).

1-5/Le Système CRISPR/Cas9 pour le traitement de la cardiomyopathie dilatée

La cardiomyopathie dilatée (DCM) est une maladie avec un taux de mortalité et une incidence élevée. Ses traitements ont pour objectif principal de réduire les symptômes, et il n'y a qu'une seule option de traitement efficace : ⁵la transplantation cardiaque. Parce que le DCM est si étroitement lié à des raisons génétiques, l'utilisation de thérapies géniques, telles que le système CRISPR/Cas9, est une option de traitement prometteuse. Pour ce faire, les chercheurs doivent examiner les gènes cibles potentiels de cette approche et les conséquences de leur utilisation. Les chercheurs ont émis l'hypothèse qu'une kinase cardiaque interagissant avec la troponine I de type 3 (TNI3K), impliquée entre autres dans la synthèse de superoxyde chez les patients atteints de DCM, pourrait être une bonne cible pour l'utilisation des cellules souches (Olivaes *et al.*, 2019).

1-6/Le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

La DMD est une maladie caractérisée par une faiblesse musculaire proximale causée par de petites mutations du gène DMD qui entraînent l'absence de protéine dystrophine (Sharma *et al.*, 2021).

CRISPR/Cas9 a été utilisé dans deux études indépendantes pour corriger les allèles responsables du DMD dans les CSPi (cellules souches pluripotentes induites) dérivés de patients et les lignées cellulaires immortalisées dans notre recherche. La DMD est causée par des mutations du gène de la dystrophine, qui code pour une protéine structurale nécessaire à

⁵**La transplantation cardiaque** : Implantation du cœur d'un donneur sur un malade receveur.

l'intégrité des fibres musculaires. La perte de la fonction des gènes provoque des changements dans la structure des fibres musculaires, ce qui entraîne un affaiblissement des muscles squelettiques, respiratoires et cardiaques. Li *et al.* (2014) ont utilisé CRISPR/Cas9 en conjonction avec un modèle donneur pour restaurer la pleine longueur du gène de la dystrophine par recombinaison homologue dans une lignée de cellules souches pluripotentes induites issue de patients DMD (CSPi) qui avaient perdu l'exon. Les CSPi récupérés ont été sélectionnés et différenciés en cellules musculo-squelettiques, dans lesquelles la dystrophine de type sauvage s'est exprimée (Savić *et al.*, 2019).

Dans la deuxième étude, Ousterout *et al.* (2015) ont créé des suppressions d'exons simples et nombreuses dans les myoblastes dérivés de patients DMD pour restaurer le cadre de lecture du gène de la dystrophine. De plus, l'édition de gène multiplex a permis la création d'une large délétion qui élimine les exons 45 à 55, une mutation « point chaud » qui représente plus de 60 % des mutations DMD. *In vitro* et *in vivo* après transplantation dans des souris mutantes, cette délétion a restauré l'expression et la fonction de la dystrophine (Savić *et al.*, 2019).

1-7/Soigner les troubles cardiovasculaires (MCV).

Le gène de la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Une mutation gain de fonction dans le gène PCSK9 peut entraîner une hypercholestérolémie avec athérosclérose associée. Jiang *et al.* (2017) ont rapporté un clonage thérapeutique du gène PCSK9 chez la souris en utilisant CRISPR-Cas9. De plus, l'outil d'édition du génome CRISPR-Cas9 a été identifié comme perturbant le gène du récepteur des lipoprotéines de basse densité (Ldlr) et surexprimant le gène PCSK9 chez la souris adulte dans la recherche de l'athérosclérose, Tessadori *et al.* (2018) ont utilisé un outil d'édition du génome basé sur CRISPR-Cas9 dans un modèle de poisson-zèbre pour corriger les problèmes cardiaques génétiques humains. Ces résultats indiquent que CRISPR-Cas9 est un outil potentiel d'édition de gènes pour les problèmes cardiovasculaires, en particulier ceux liés aux troubles lipidiques héréditaires (Sharma *et al.*, 2021).

1-8/Soigner ⁶la tyrosinémie de type I.

Yin *et al.* (2014) ont mené l'une des premières études pour corriger avec succès une maladie génétique chez des animaux postnatals en utilisant l'édition de gènes CRISPR/Cas9 *in vivo* dans un modèle de souris pour la tyrosinémie de type I. La tyrosinémie de type I est causée par un déficit en l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase (FAH), qui entraîne l'accumulation de métabolites toxiques et la mort des hépatocytes. Les chercheurs ont utilisé une injection hydrodynamique dans la veine caudale pour délivrer des vecteurs spécifiques Cas9 et sgRNA, ainsi qu'un oligo-ADN pour HDR, directement dans le foie de la souris. Il en est résulté la réparation d'un allèle mutant de la fumarylacétoacétate hydrolase et la stabilisation de la protéine, entraînant une diminution de la toxicité hépatocellulaire et une diminution de la perte de poids chez la souris. Il est à noter que la tyrosinémie peut être particulièrement bien adaptée à la thérapie génique CRISPR/Cas9, car la faible fréquence initiale de réparation (0,4 %) est compensée par la sélection positive des hépatocytes corrigés (Savić *et al.*, 2019).

1-9/Soigner les troubles neurologiques.

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurologique autosomique récessive causée par des expansions répétées CAG dans l'exon 1 du gène Huntingdon (HTT). Un outil d'édition de nucléotides CRISPR-Cas9 a été utilisé avec succès pour éliminer le gène *HTT* dans un modèle murin. D'autres études ont également soutenu l'utilisation du système d'édition du génome CRISPR-Cas9 contre les maladies MH.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui provoque une perte de mémoire progressive. Des mutations des gènes de la préséniline 1 (PSEN1) et PSEN2 ont été associées à la maladie d'Alzheimer familiale. PSEN1 est une sous-unité catalytique de la sécrétase, une enzyme protéase qui convertit le précurseur de protéine en amyloïde (APP), plusieurs études ont rapporté la correction des mutations A79V et L150P dans PSEN1 dans une lignée de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) issue de patients MA. Le système d'édition de nucléotides CRISPR-Cas9 a été utilisé pour éditer la mutation spontanée « T » avec le nucléotide de type sauvage « C ». En conclusion, la technologie d'édition de

⁶**La tyrosinémie de type I :** Maladie génétique qui cause une déficience dans la production par le foie de l'enzyme fumarylacétoacétate hydrolase. Exemple : La tyrosinémie type 1 entraîne une accumulation de déchets toxiques dans l'organisme.

gènes CRISPR-Cas9 peut être utilisée comme stratégie efficace pour les troubles neurologiques causés par des mutations génétiques (Sharma *et al.*, 2021).

1-10/Dégradation de cholestérole.

Une autre étude *in vivo* a porté sur la disruption du gène du protéine convertase subtilisine/kexine type 9 (PCSK9) dans le foie de souris. Le PCSK9 est sécrété dans le plasma par les hépatocytes et inhibe l'absorption et la dégradation du cholestérol des lipoprotéines de basse densité (LDL) en agissant comme un antagoniste des récepteurs LDL. Les mutations naturelles de PCSK9 qui entraînent une perte de fonction abaissent le taux de cholestérol sanguin. Pour imiter cette situation, les chercheurs ont utilisé des vecteurs adénoviraux CRISPR/Cas9 pour perturber PCSK9 dans le foie. Cela a entraîné une diminution des taux de PCSK9, une augmentation des taux de récepteurs LDL dans le foie et par conséquent, une diminution des taux plasmatiques de cholestérol. Il a été possible d'atteindre des efficacités d'édition allant jusqu'à 50 %, ce qui peut être suffisant pour une utilisation clinique (Savić *et al.*, 2019).

1-11/Soigner les troubles métaboliques.

La maladie métabolique du foie (MLD) est causée par un manque de protéine de transport, ce qui entraîne un métabolisme anormal des sucres, des protéines et des céréales. Villiger *et al.* (2018) ont récemment publié 52 mutations du gène *enu2* de la phénylalanine hydroxylase (Pah) pour traiter la phénylcétonurie (PCU), une maladie hépatique autosomique récessive avec l'utilisation des systèmes d'édition CRISPR-Cas9 chez la souris (Sharma *et al.*, 2021).

La méthode *ex vivo* nécessite l'utilisation de protocoles de culture cellulaire dérivés du patient, qui peuvent ensuite être transplantés dans l'hôte après l'édition du génome. Takahashi et ses collègues ont développé une méthode de production de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) à partir de fibroblastes humains en 2007. Il est essentiel de garder à l'esprit que l'iPSC peut se propager et se différencier indéfiniment dans n'importe quel type de cellule corporelle et représente donc une ressource précieuse pour les thérapies génétiques *ex vivo*.

L'une des premières études de preuve de concept pour la thérapie génique *ex vivo* basée sur CRISPR/Cas9 a été menée au CSPI et s'est concentrée sur une maladie génétique du sang appelée thalassémie. Des mutations du gène bêta de l'hémoglobine provoquent la thalassémie, qui diminue la production d'hémoglobine et provoque ainsi une anémie.

Xie *et al.* (2014) ont créé des iPSC à partir de fibroblastes d'un patient homozygote pour β -thalassémie, puis les a transfecté avec des vecteurs basés sur CRISPR/Cas9 ciblés sur l'allèle pathogène avec une matrice ADN pour HDR. En sélectionnant une cassette de résistance aux antibiotiques cointégrée, des événements de recombinaison homologue ont été identifiés. Grâce à un nouveau protocole monocouche (Savić *et al.*, 2019).

1-12/Soigner la maladie causée par le virus de l'hépatite C (VHC)

L'hépatite C est une maladie inflammatoire du foie causée par le VHC, un virus à ARN simple (ssRNA). Il a été découvert que l'endonucléase Cas9 de la bactérie Gram-négative *Francisellanoviciida*, également connue sous le nom de FnCas9, peut cibler l'ARN endogène. Le système CRISPR-FnCas9 a été utilisé pour empêcher la formation de VHC dans les cellules eucaryotes (Sharma *et al.*, 2021).

1-13/Soigner la maladie du fibrose kystique.

Dans une étude dirigée par Clevers *et al.* (2013) utilisé des organoïdes intestinaux comme modèle, qui permettent une croissance infinie de cellules souches intestinales multipotentes pour corriger un allèle préexistant qui cause la fibrose kystique. La fibrose kystique est une maladie monogénique causée par des mutations du régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), un canal ionique qui régule le transport des fluides épithéliaux. La perte de fonction peut provoquer une accumulation de mucus dans les voies gastro-intestinales et respiratoires, entraînant une variété de symptômes tels que des difficultés respiratoires et des infections récurrentes. Dans cette étude, ils ont isolés des cellules intestinales de patients atteints de mucoviscidose, les avons cultivées *in vitro* sous forme de cultures organoïdes tridimensionnelles, puis les avons transfectées avec des vecteurs CRISPR/Cas9 ciblant le gène CFTR avec un modèle HDR. Une cassette de résistance à la puromycine dans l'un des introns a permis la sélection de clones avec des événements d'intégration. Une réparation génétique réussie a été démontrée à l'aide du séquençage et d'un test gonflement d'organodes dépendant du CFTR. Fait important, ils sont trouvés très peu d'effets hors cible (Figure 11) (Savić *et al.*, 2019).

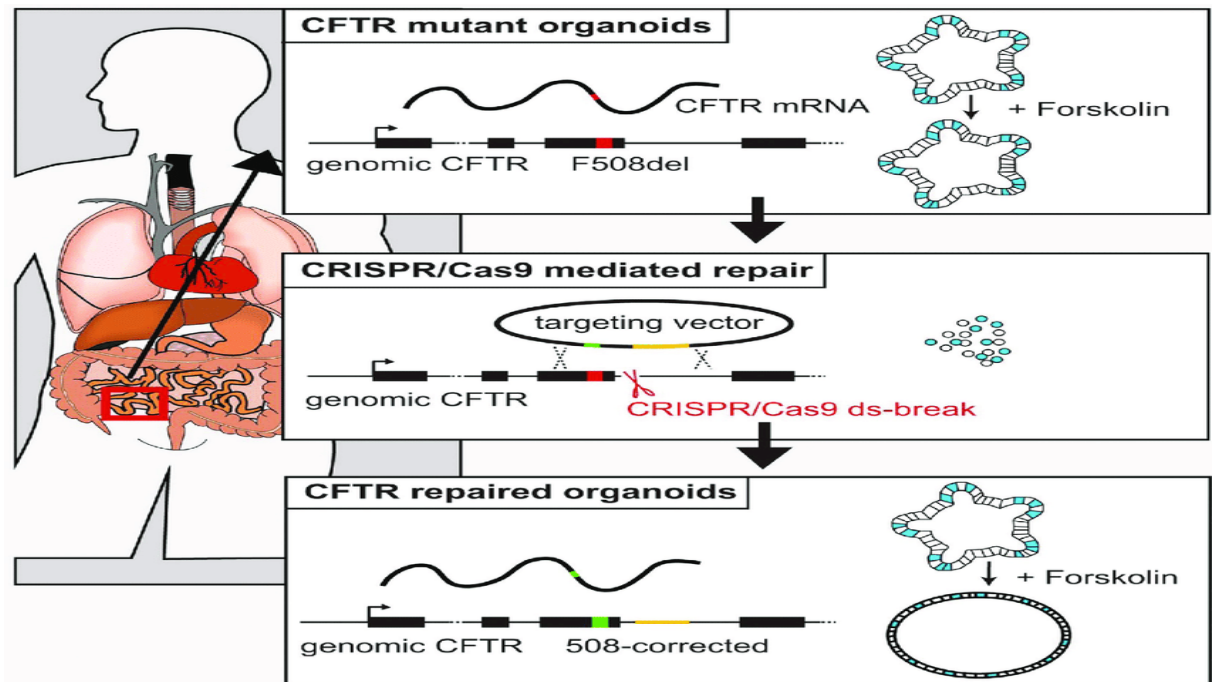


Figure 11 : Illustration schématique montrant la réparation fonctionnelle du CFTR par CRISPR-Cas9 dans les organoïdes de cellules souches intestinales acquis auprès de patients atteints de fibrose kystique (Saha *et al.*, 2019)

1-14/Soigner les troubles liés au sang

L'anémie de Fanconi (FA) est une maladie autosomique récessive, est causée par des anomalies dans les gènes qui contrôlent l'excision, qui dépend de la réplication de l'interbrine ADN. L'application de l'édition du génome pour corriger les défauts de la voie de réparation de l'ADN est impliquée dans la recombinaison dirigée par homologie (HDR) médiée par CRISPR-Cas9 dans le gène FA. Dans les fibroblastes primaires, des corrections médiées par CRISPR-Cas9 d'une mutation disruptive dans le gène du groupe F de complémentation FA (Fancf) et la correction du gène de l'anémie de Fanconi I (FANCI) ont été rapportées. L'approche thérapeutique CRISPR-Cas9 contre l'insuffisance médullaire est utilisée pour traiter les mutations de l'AF.

L'anémie falciforme (SC) est une maladie du sang, est causée par une mutation du gène β -globine, qui entraîne la création d'une protéine hémoglobine S anormale (HbS). CRISPR-Cas9 s'est avéré être une thérapie génique sûre et prometteuse pour l'anémie SC. La restauration de la fonction normale de l'hémoglobine chez les individus atteints de SC a été confirmée par une réparation du gène CRISPR-Cas9 dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) (Sharma *et al.*, 2021).

1-15/Soigner l'immunodéficience humaine (VIH)

Une autre étude d'édition de gènes *ex vivo* CRISPR/Cas9 s'est concentrée sur la lutte contre l'infection par le VIH. Tout au long de son cycle de vie, le VIH-1 s'intègre dans le génome hôte des cellules immunitaires, où il sert de modèle d'expression virale. À ce stade, une infection par le VIH peut être atténuée au niveau transcriptionnel, entraînant une infection dormante. Parce que le virus latent vit dans des cellules à longue durée de vie comme les cellules T, l'infection dure indéfiniment, même en présence de puissants médicaments antirétroviraux. Les chercheurs utilisent la technologie d'édition du génome pour tester leurs théories.

Il existe maintenant deux stratégies pour lutter contre l'infection latente par le VIH. Dans la première approche, la séquence du génome viral est ciblée avec des nucléases pour éradiquer l'ADN du VIH intégré dans le génome des lymphocytes T infectés. Une expression constante des vecteurs CRISPR/Cas9 ciblant la région LTR a entraîné leur perturbation, entraînant une réduction de la production de virus et l'élimination du réservoir latent. De plus, les auteurs ont pu montrer que les types de cellules réservoirs du VIH, créés à partir de cellules souches pluripotentes humaines préalablement transduites à l'aide de vecteurs CRISPR/Cas9 ciblant LTR, étaient résistantes à une nouvelle infection par le virus.

La deuxième méthode consiste à moduler le récepteur de la chimiokine 5 (CCR5), nécessaire à l'infection du VIH-1 par les lymphocytes T. Mandal et ses collègues en 2014 ont utilisé l'édition CRISPR/Cas9 pour perturber ce récepteur dans les cellules souches et progénitrices CD34+ (HSPC). Les chercheurs ont utilisé des vecteurs CRISPR/Cas9 pour éliminer CCR5 dans HSPC avec une efficacité de 30 %. De plus, ils ont découvert que ces clones HSPC avec ablation de CCR5 conservaient un potentiel multilignage complet après xénotransplantation chez la souris avec seulement quelques mutations au-delà de la plage cible. Il convient de noter que la stratégie de mutation CCR5 a déjà été développée et testée avec succès dans des essais cliniques utilisant des nucléases à doigts de zinc (Savić *et al.*, 2019).

1-16/Soigner les troubles liés aux yeux.

La rétinite pigmentaire (RP) est une dystrophie pigmentaire héréditaire, peut entraîner une perte de vision. Plusieurs mutations ont été liées à cette maladie, notamment celles des gènes régulateurs RP1, rhodopsine (RHO) et RP GTPase(RPGR). L'approche d'édition de

gènes CRISPR-Cas9 peut corriger le gène Rho en injectant le guide ARN (ARNg)-plasmide Cas9 dans la rétine, ce qui améliore la fonction visuelle et l'arrêt de la dégénérescence rétinienne chez le rat (figure 12) (Sharma *et al.*, 2021).

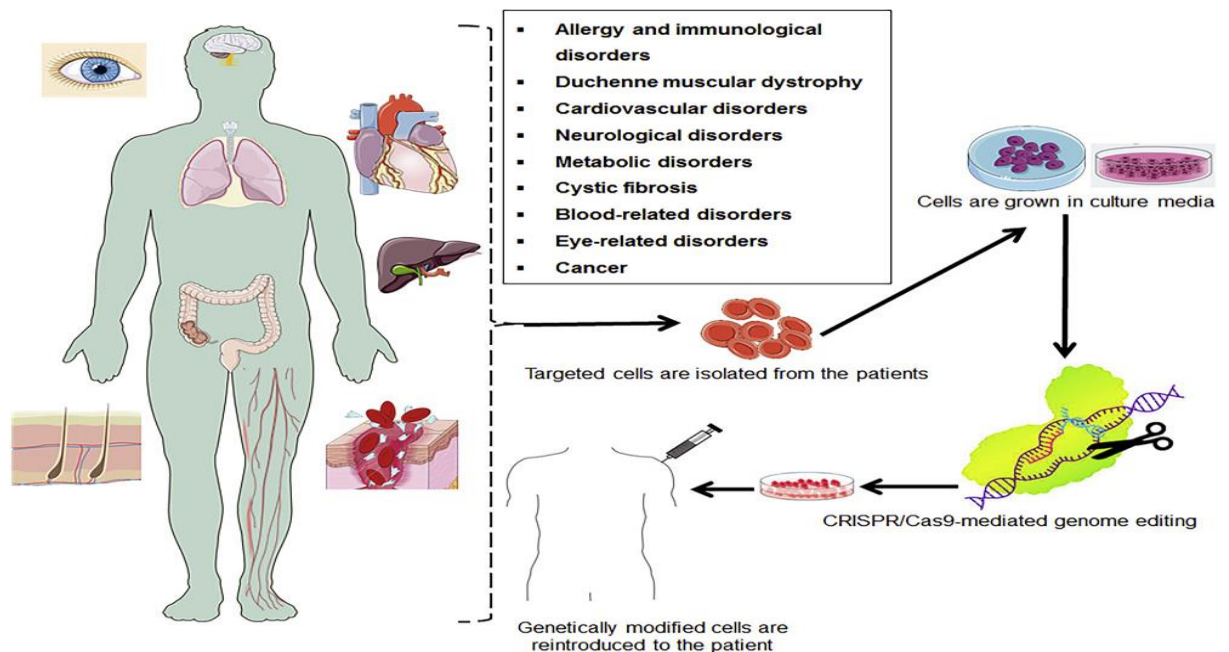


Figure 12 : L'abstract d'une méthode d'utilisation CRISPR-Cas9 pour plusieurs maladies (Sharma *et al.*, 2021).

2/L'utilisation de la technologie d'édition CRISPR/Cas9 des gènes dans l'agriculture et les cultures fruitières

Les cultures fruitières telles que la pomme, l'orange, le raisin sec, la banane, les fruits frais, la pastèque, le kiwi et la tomate, fournissent non seulement des nutriments essentiels à la vie humaine, mais contribuent également de manière significative à la production agricole et à la croissance économique dans de nombreux pays et région autour du monde. Les progrès récents dans l'édition du génome offrent une opportunité unique d'améliorer la génétique de ces cultures importantes sur le plan agronomique. Ici, nous résumons les rapports récents sur l'utilisation de CRISPR/Cas9 dans les cultures fruitières, y compris les efforts visant à réduire la sensibilité aux maladies, à modifier l'architecture des plantes ou la morphologie des fleurs, à améliorer la qualité des fruits et à augmenter le rendement (Zhou *et al.*, 2020). Le premier rapport sur l'édition de gènes CRISPR/Cas9 chez les plantes est apparu dans trois articles de Nature Biotechnology en succession rapide (Fig. 13) (Zhou *et al.*, 2020).

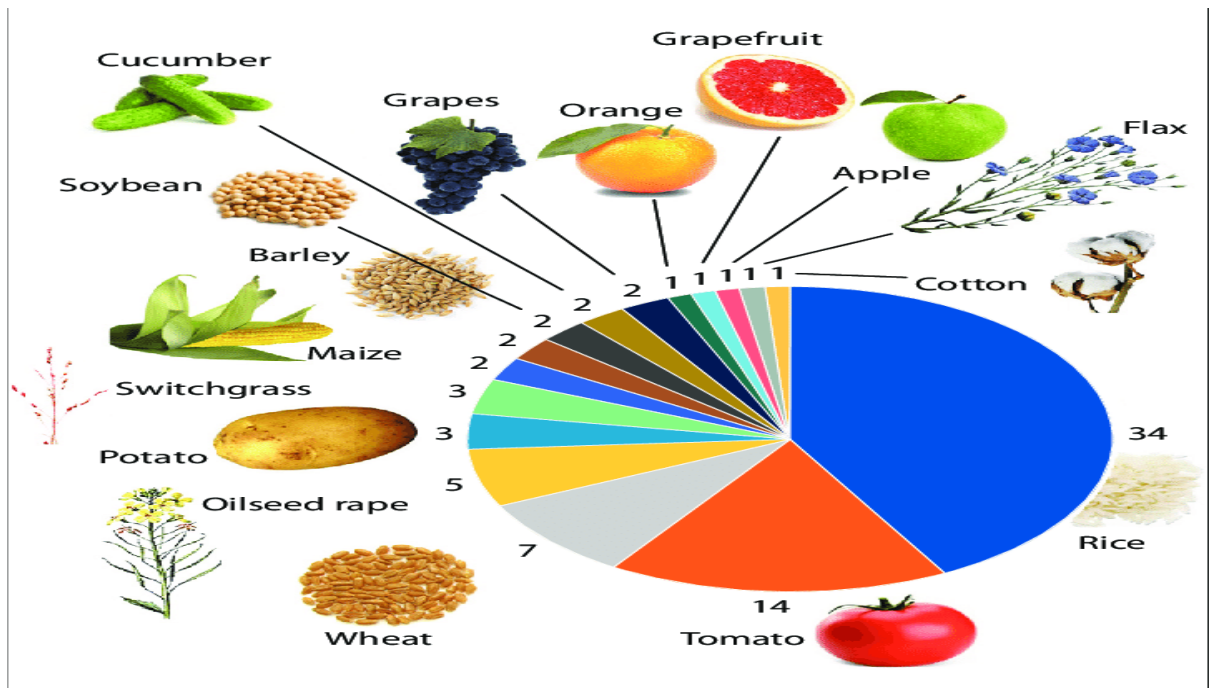


Figure 13 : Le Nombre des gènes modifiés à l'aide du système CRISPR-Cas9 dans le but d'améliorer les cultures (Koroktova *et al.*, 2017).

2-1/L'édition du génome chez le bananier

La banane est l'une des fruits les plus importants économiquement dans les zones tropicales. C'est aussi la quatrième culture la plus peuplée au monde. Du fait de son génome triploïde et de sa stérilité, l'élevage traditionnel est difficile. La génie génétique est peut être la seule moyen d'améliorer cet aliment de base et ces fruits cruciaux. Dans les cultures en suspension de cellules embryonnaires de bananier, un seul guide ARN a été conçu pour cibler le domaine conservé de deux gènes RAS-PDS (RAS-PDS1 et RAS-PDS2). Avec un taux de mutation de 59 %, un phénotype complet albinos et panache a été découvert parmi les plantules régénérées. La recherche montre que l'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9 est efficace chez le bananier. La prochaine étape dans l'amélioration de la génétique du bananier sera l'identification des gènes endogènes et l'examen de la transmission germinale de la mutation nouvellement découverte allant de 0 à 86 % (Zhou *et al.*, 2020).

2-2/L'utilisation du système PTG/Cas9 pour réaliser un montage kiwi à haute efficacité.

Le kiwi est un fruit populaire à haute teneur en vitamine C et en fibres alimentaires. Le système de base CRISPR/Cas9 et le système plus puissant de cassette polycistronique ARNt-

ARNg (PTG)/Cas9 ont tous deux été utilisés pour éditer le génome de Kiwi. Le gène PDS Kiwi fruit a été modifié dans des plantules à l'aide du système PTG/Cas9, ce qui implique que le système PTG/Cas9 est un outil puissant (Zhou *et al.*, 2020).

2-3/Modification du génome du Riz

À l'aide de CRISPR/Cas9, le gène LAZY1 a été retiré du riz, ce qui a donné un phénotype qui pourrait conduire à une augmentation du rendement des cultures. De même, les gènes GN1a, DEP1 et GS3 du cultivar de riz ZH11 (Zhonghua11) ont été modifiés à l'aide de CRISPR/Cas9, ce qui a donné des phénotypes avec un nombre de grains accumulés, des particules dressées denses et une taille de grain plus gros (Siva *et al.*, 2021).

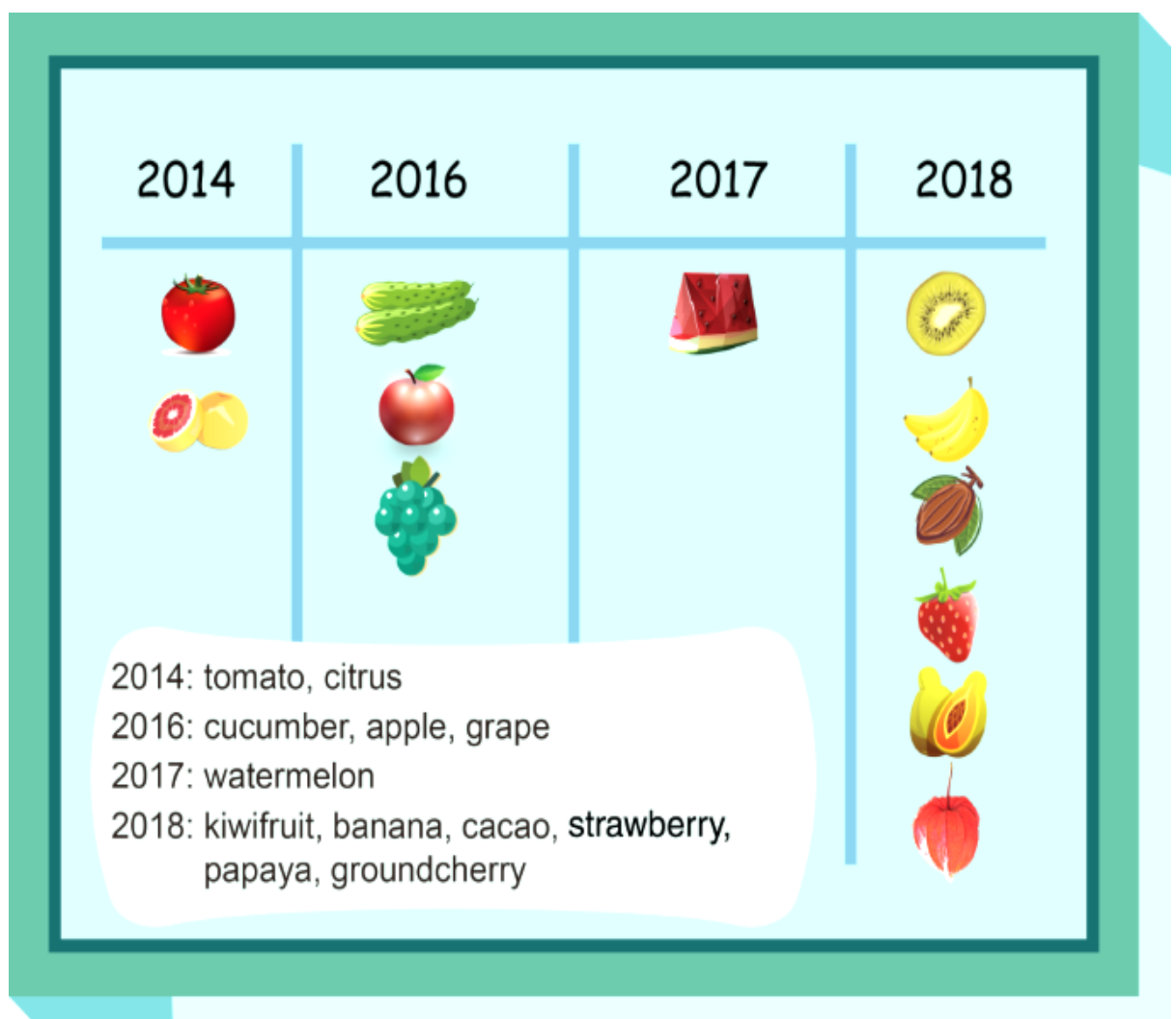


Figure 14 : La lignée de la première application du système CRISPR-Cas9 dans les cultures fruitières (Wang *et al.*, 2021).

2-4/Autres applications en agriculture

CRISPR/Cas9 peut également être utilisé pour améliorer les profils nutritionnels dans les cultures, améliorer la résistance au stress biotique, prolonger la durée de stockage et créer des cultures résistantes aux herbicides.

D'autres équipes ont étudié l'efficacité de CRISPR/Cas9 dans l'évaluation des gènes exo et l'endogène dans les racines du soja. Haun *et al* ont utilisé la technologie TALEN pour améliorer l'acidité du soja en ciblant le gène FAD2 en 2014.

Du *et al.* (2016) ont confirmé en comparant l'efficacité de TALEN et de CRISPR/Cas9 pour cibler les gènes de la phytoène désaturase et en concluant que CRISPR est bien plus efficace que TALEN pour cibler ces allèles.

Une modification ciblée de trois homologues d'EDR1 pour produire des plants de blé résistants à l'odium. SIMLO1 a également été modifié pour produire des tomates anti-odium. Lorsque le gène eIF4E du concombre a été perturbé, un grand nombre de plantes résistantes aux virus ont été produites, notamment celles résistantes au les pomovirus, au virus du concombre jaune et au virus de la papaye-W.

Il y a une plus grande portée et promesse dans l'utilisation de ces variantes pour les grands cultivars (Figure 14) (Siva *et al.*, 2021).

3/CRISPR-Cas la technique d'édition du génome humain

D'après l'équipe de France CNET France. Le système d'édition de gènes CRISPR, qui permet aux médecins de manipuler les branches de l'ADN, a été utilisé pour la première fois dans une intervention chirurgicale.

Les ciseaux moléculaires CRISPR-Cas9, qui permettent la manipulation des branches de l'ADN, ont été utilisés dans une intervention chirurgicale pour la première fois au monde. Un nouveau traitement pour une forme héréditaire de cécité a été administré par des scientifiques du Casey Eye Institute dans l'Oregon. Cette étude vise à évaluer un traitement expérimental de l'amaurose congénitale de Leber, une maladie génétiquement héréditaire.

La maladie est causée par un gène défectueux qui provoque la cécité dès la naissance ou au cours des premiers mois de la vie et touche environ une naissance sur 40 000. Il n'y a pas de traitement approuvé pour le moment.

Le premier patient de l'étude a reçu un médicament expérimental appelé AGN-151587, qui a été injecté dans son œil. L'idée est d'utiliser CRISPR pour délivrer un traitement directement aux cellules du système immunitaire qui sont affectées par une maladie génétique. CRISPR a la capacité de se frayer un chemin à travers ces cellules et de corriger le gène. Une sorte d'opération de copier-coller pour changer une petite partie de l'ADN et donc éliminer la mutation problématique.

Il est important de noter que le changement CRISPR est permanent, ce qui signifie que les patients n'auront plus besoin de subir de traitement. L'étude comprendra 18 participants et utilisera plusieurs doses du médicament expérimental pour déterminer la quantité nécessaire pour atteindre l'objectif sans aucun effet secondaire. Les chercheurs ont gardé le silence sur la date officielle de l'opération et son efficacité, ainsi les informations sur le premier patient sont rares (Cnet France, 2020).

4/L'élevage.

La production d'aliments d'origine animale, en particulier de lait et de viande, a augmenté dans le monde en raison d'une demande croissante alimentée par la croissance démographique. La disponibilité de ces produits est essentielle pour la santé et l'apparence physique des personnes.

La capacité d'apporter des modifications précises au génome d'un animal pour améliorer la productivité et la résistance aux maladies a été rendue possible par la technologie d'édition du génome. Le gène de la myostatine a été l'un des premiers à être génétiquement modifié chez les animaux de ferme. Les modifications apportées à ce gène ont le potentiel d'améliorer considérablement l'efficacité économique de la production de viande. Les porcs, les bovins, les moutons, les chèvres et les barbues de rivière sont des exemples d'animaux de ferme qui ont été génétiquement modifiés. Néanmoins, en raison de sa valeur économique mondiale, de sa nature multipare et de sa courte durée de génération, le porc est aujourd'hui l'animal le plus génétiquement modifié. CRISPR-Cas9, étant la technologie d'édition de gènes la plus importante aujourd'hui, joue un rôle essentiel dans l'amélioration de la qualité de vie. Cette méthode permet d'obtenir les résultats souhaités en augmentant la fréquence des allèles favorables ou en supprimant les allèles délétères. CRISPR-Cas9 a non seulement contribué à augmenter les produits d'origine animale, mais il a également fait de nombreuses avancées dans le domaine de la biomédecine en produisant des animaux transgéniques et clonés. En raison de leur faible risque pour la santé humaine, comme la prévention de la transition virale,

les outils d'édition du génome tels que CRISPR-Cas9 et le transposon PiggyBac pourraient être utiles en immunologie et dans le développement de vaccins.

Les porcs sont aujourd'hui les meilleurs candidats aux dons d'organes parmi les espèces étudiées, en raison de leur éloignement évolutif important de l'homme (figure 15) (Tavakoli *et al.*, 2021).

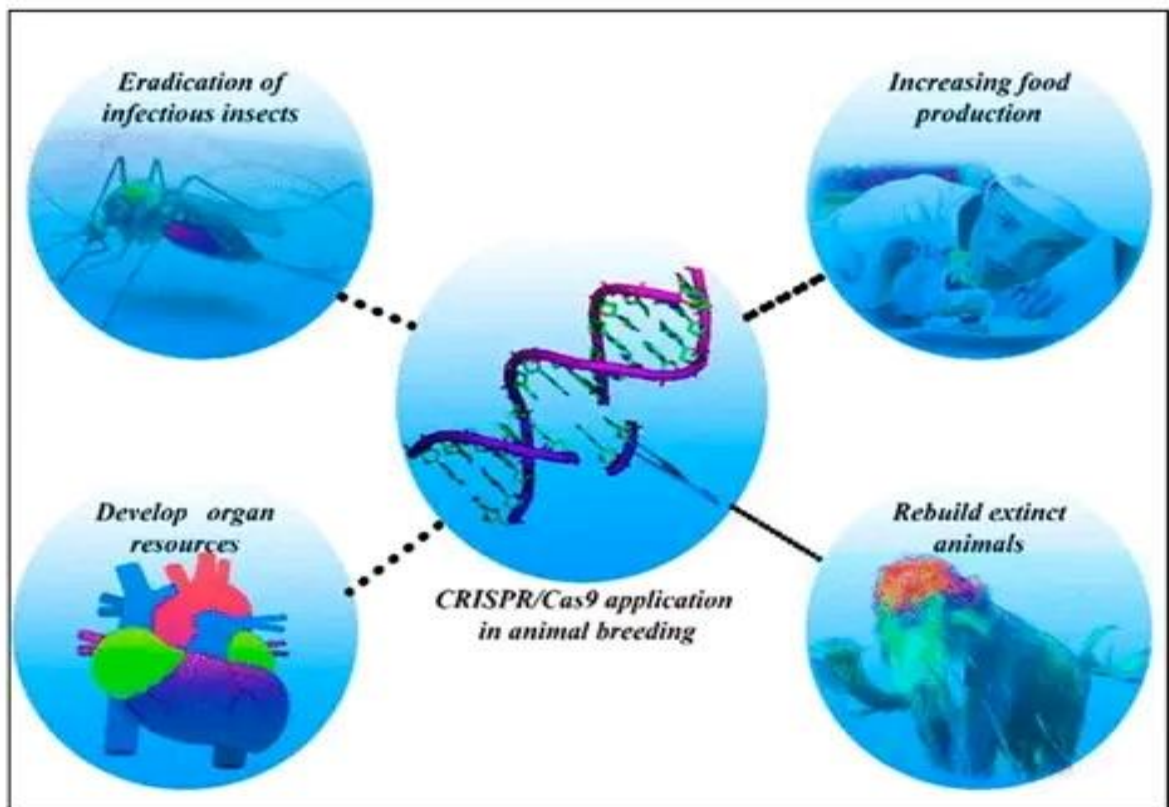


Figure 15 : Exploitation de CRISPR-Cas en l'élevage et les modèles d'animaux (Tavakoli *et al.*, 2021).

5/Premiers bébés génétiquement modifiés

He Jiankui a déclaré le 25 novembre 2018 que son laboratoire avait réussi à éditer les gènes de deux embryons pour les protéger de l'héritage du VIH de leur père. Il s'est réjoui de la naissance de Lulu et Nana (Peterson, 2019).

Le scandale génétique le plus récent a été révélé par un chercheur chinois qui avait génétiquement modifié un gène dans des embryons humains, entraînant la naissance de deux bébés nommés Lulu et Nana. Les jumeaux semblent avoir un gène CCR5 désactivé, ce qui pourrait leur fournir une protection contre l'infection par le VIH. Ils sont maintenant testés.

Apparemment, ces bébés ont été créés dans le secret, sous couvert d'un projet de développement de vaccins anti-sida. Contrairement à l'édition de gènes en tant que thérapie pour corriger les mutations génétiques dans les cellules somatiques, le processus d'édition de gènes utilisé pour générer des jumeaux entraînerait un changement permanent (Singh, 2022).

He Jankui explique dans sa vidéo comment lui et son équipe ont utilisé l'approche d'édition de gènes CRISPR-Cas9. Cette technologie, développée par Emmanuelle Charpentier de France et Jennifer Doudna des États-Unis, permet aux chercheurs de couper l'ADN à un endroit précis du génome et de le corriger.

Les naissances de Lulu et Nana ont repoussé les limites de la révolution génétique, permettant la génération d'enfants génétiquement modifiés. Cet acte a été largement condamné comme inopportun, dangereux, alarmant et contraire à l'éthique. À la lumière de ces progrès, nous pouvons nous attendre à un nombre croissant de signalements de bébés génétiquement modifiés à l'avenir. Les naissances de Lulu et Nana ne sont pas un phénomène scientifique. Néanmoins, c'est une première et une ligne qui n'a jamais été franchie auparavant en raison de divers facteurs. Il y a un besoin de dialogue social afin de choisir un endroit confortable pour tracer une ligne et développer des mécanismes pour la suivre. La décision ne devrait pas être laissée aux chercheurs et aux scientifiques sur le banc. Il a le potentiel d'affecter l'humanité et doit trouver un épanouissement social. Sinon, nous revenons à la même vieille question : les craintes eugéniques doivent-elles étouffer le progrès scientifique, qui pourrait inclure la prévention des maladies génétiques graves affectant la famille ? (Singh *et al.*, 2019).

Chapitre III

Les éthiques, les risques et les enjeux juridiques du système CRISPR-Cas9

1/L'éthique derrière la modification génomique humaine

En février 2016, le grand patron de l'éducation des États-Unis a été le premier à tirer la sonnette d'alarme. James Clapper a classé CRISPR Cas9 comme une « arme de destruction massive » potentielle dans un rapport déclassifié de la CIA (Central Intelligence Agency). Pour lui, cette technologie, qui est utilisée dans des milliers de laboratoires, est à comparer au programme nucléaire nord-coréen, et aux missiles de croisière russe ! (Tronchet & Bertheau, 2017).

Après, la nouvelle tombe le 28 novembre 2018 : des jumelles génétiquement modifiées sont nées en Chine. Cette révolution scientifique apparaît comme inattendue et surprenante. Elle ne laisse personne indifférent. Plusieurs questions se posent à ce stade : est-ce que les normes éthiques ont été enfreintes ? Il est dirigé par nous. Vers une meilleure condition humaine ? Enfin, il y a la technique CRISPR-Cas9 est-elle sans danger pour ces enfants ? (Crobeddu *et al.*, 2019). Parce que CRISPR n'est pas le premier essai d'édition de gènes, à première vue, il semble que bon nombre de questions éthiques élevées par CRISPR sont proportionnelles à celles qui ont été soulevées il y a des décennies. Compte tenu des essais précédents d'acquiescer des conséquences thérapeutiques au moyen du génie génétique, il dégote un large corpus de littérature traitant d'importantes questions juridiques et éthiques. Problèmes qui se placent dans le contexte du changement génétique. Ainsi, un cadre de principes gérant les règles de l'édition de gènes humains existe déjà. Ce cadre est mérité d'être évalué comme base de tout dialogue sur les implications éthiques des nouvelles technologies d'édition génétique. Les premières recherches cliniques sur la thérapie génique ont entraîné de graves événements indésirables. Mais ce n'est que la mort de Jesse Gelsinger, un jeune patient inscrit à une tentative clinique de thérapie génique, qu'un plusieurs nombres de ces accidents indésirables sont devenus publics. Important, mais pas unique au gène, l'édition est le fait que les données précliniques ne peuvent pas révéler toutes les influences indésirables possibles. Et donc, comme pour tout traitement hautement expérimental impliquant des patients gravement malades, les essais sur l'homme donnent des résultats inattendus et imprévus. L'exigence d'une compréhension intimement de la science et les effets des applications de l'édition de gènes chez l'homme ont été critiqués comme une limitation des premières technologies. Cela reste une préoccupation de la communauté scientifique face à l'utilisation clinique de CRISPR (Foulkes *et al.*, 2019).

Elfi Oral, avocate spécialisée en déontologie, déclare : « Il n'est pas acceptable de mettre en danger la santé ou l'intégrité physique d'une personne, pour le bien-être de la population ». Alors dans la génomique il faut que le risque d'effets indésirables pour le patient soit inférieur aux bénéfices escomptés (Crobbedu *et al.*, 2019).

2/Les risques de l'édition du génome par le système CRISPR-Cas9.

Le CRISPR-Cas9, une technique qui traite des êtres vivants, a une stratégie importante et présente à la fois des opportunités et des risques. La facilité croissante avec laquelle il peut être utilisé à des coûts de plus en plus bas démocratise l'étude des gènes. Son développement apparaît au centre d'une multitude d'enjeux internationaux : scientifiques, technologiques, juridiques, éthiques et géopolitiques Nachmanson *et al.* (2018) on dit génotoxiques, les agents provoquant directement des dommages à l'ADN et causant des mutations. La notion de génotoxicité est donc profondément corrélée au système CRISPR-Cas9 et sa maîtrise formée un enjeu majeur en vue d'exploiter l'édition génique dans stratégie thérapeutique sûre. Pour y comprendre, les risques génotoxiques et leurs résultats doivent premièrement être caractérisés puis maîtrisés. L'une des premières incidences nuisibles détectées du système CRISPR-Cas9 a été sa vitalité hors cible (off-Target) qui fait référence à tous les effets non désirables que peut engendrer l'outil CRISPR-Cas9, du fait que l'enzyme Cas9 n'est pas à 100 % précise, et elle peut couper le génome à des endroits non souhaités. Par conséquent, des mutations peuvent être induites dans une partie différente de l'ADN que celle initialement ciblée (Cullot, 2019).

Le premier effet indésirable est l'effet hors cible. Cela fait référence à une circonstance dans laquelle des mutations sont induites dans une partie différente de l'ADN que celle initialement ciblée. L'inactivation de gènes essentiels, l'activation de gènes cancérogènes et l'émergence de maladies inhabituelles et inconnues sont autant de conséquences possibles d'effets hors cible. Lorsque des cellules modifiées sont transmises par voie germinale, de telles conséquences posent des risques inconnus non seulement pour les patients, mais aussi pour les générations futures (Carbon & Hausman, 2019).

Un autre effet défavorable est l'apparition d'un effet qui est à l'opposé de ce qui est souhaité sur un site ADN spécifique. Cet effet se produit lorsqu'un gène muté est remplacé par un gène corrigé, ou lorsqu'un fragment d'ADN coupé est réintroduit dans le mauvais sens. La réparation de l'ADN qui n'a pas été effectuée correctement par l'un des systèmes naturels de

réparation de l'ADN peut avoir cet impact. Elle peut entraîner la formation de cellules anormales ou cancéreuses.

En plus de ces effets indésirables, il est possible que CRISPR-Cas9 ne modifie que l'ADN d'un sous-ensemble de cellules plutôt que l'ADN de toutes les cellules ciblées. En conséquence, des ⁷cellules mosaïques, ou cellules sans le même patrimoine génétique sont produites. Le mosaïsme peut provoquer des maladies inhabituelles ainsi que « des problèmes pratiques liés à l'identification d'ADN pour le diagnostic, les tests de paternité ou l'identification médico-légale » (Carbon & Hausman, 2019).

3/ Les avis des chercheurs partisans et opposants sur la technologie CRISPR-Cas9.

Pour le Pr Moineau, « cette méthode n'était ni efficace ni adaptée à ce type d'application l'avenir de cet outil de manipulation génétique est radieux, à condition de procéder avec prudence ». L'une des préoccupations est que nous n'avons aucune idée de la façon dont notre propre système immunitaire réagira à ces menaces molécules étrangères précédemment isolées de bactéries. Le Comité International de Bioéthique (CIB) a appelé à un moratoire sur l'utilisation de cet outil pour modifier génétiquement des embryons humains. Alors avant même d'envisager de travailler avec des embryons humains, la communauté scientifique a convenu que des études sur des modèles animaux étaient nécessaires pour aborder le sujet des réponses immunitaires à la protéine Cas9. Malgré les préoccupations scientifiques et éthiques généralisées soulevées par l'appel du CIB à un moratoire, le Dr He Jiankui et son équipe sont allés de l'avant avec la naissance des premiers bébés modifiés par CRISPR-Cas9. Selon le Pr Sylvain Moineau, « la violation du moratoire du CIB pourrait entraîner la fin de sa carrière scientifique » (Crobeddu *et al.*, 2019).

Selon l'avis des deux scientifiques : Paul Berg et George Church qu'ils soutiennent la recherche ouverte dans le but « d'évaluer l'efficacité de la technologie CRISPR dans des modèles expérimentaux utiles à l'évaluation d'une application thérapeutique germinale ». CES recherches permettront de déterminer quelles approches thérapeutiques sont susceptibles d'être acceptées à l'avenir sur l'homme (Carbon & Hausman, 2019).

⁷Cellules mosaïques : des cellules de structures chromosomiques différentes.

Le Comité International de Bioéthique de l'UNESCO exhorte les États à s'accorder sur « un moratoire relatif au génie génétique des lignées germinales humaines tant que la sécurité et l'efficacité des procédures ne seront pas établies comme option de traitement ». Cependant, certains scientifiques ne sont pas d'accord. C'était la situation de Jiankui He. Pour rappel, c'est lui qui a publié le génome embryonnaire à des fins de reproduction. Un patient qui a participé à des essais cliniques a reçu des jumelles avec un génotype génétiquement modifié. En raison de l'état actuel des connaissances scientifiques et éthiques, la modification de la lignée germinale à des fins de reproduction a été jugée totalement irresponsable. Néanmoins, même si Jiankui He a été largement condamné par la communauté scientifique, il n'est pas impossible que d'autres scientifiques suivent ses traces. Pour éviter tout débordement supplémentaire, il est donc essentiel de prendre des mesures à contre-courant, notamment au niveau législatif (Carbon & Hausman, 2019).

Au niveau européen, le 4 avril 1997, le Conseil de l'Europe a adopté une convention sur les droits de l'homme et la biomédecine à Oviedo. Les articles 13 et 18 de la convention traitent de la modification des cellules germinales humaines. Conformément aux dispositions de l'article 13 de la convention, « Une intervention ayant pour but de modifier le génome humain ne peut être réalisée à des fins préventives, diagnostiques ou thérapeutiques, et seulement si elle n'a pas pour but d'induire une modification du génome du descendant ». L'article 18 stipule que « lorsque la recherche embryonnaire *in vitro* est autorisée par la loi, la loi garantit que l'embryon est protégé de manière adéquate » il précise en outre que « la création d'embryons humains à des fins de recherche est interdite. L'objectif de cette convention était de parvenir à un consensus international, mais il n'a pas été atteint, car certains pays ont trouvé le texte trop restrictif, tandis que d'autres l'ont trouvé trop permissif. Certains pays membres (Royaume-Uni, Allemagne, Autriche, Belgique, Irlande et Russie) n'ont pas ratifié la convention, de même qu'aucun des pays associés du Conseil de l'Europe (Australie, Canada, États - Unis, Japon, Mexique et Suisse) (Borges & Lassalas, 2018).

Malgré le fait que les essais cliniques sur la lignée germinale soient actuellement interdits dans la majorité des pays et fortement déconseillés ailleurs, les gouvernements sont conscients que de tels essais deviendront une réalité dans le futur. Après cela, ils estiment préférable de les appréhender, par exemple, à travers la révision des dispositions légales qui les interdisent ou la mise en place d'un cadre juridique approprié. En France, par exemple, le Comité d'éthique de l'Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (INSERM) propose de modifier l'interdiction imposée par l'article 13 de la Convention d'Oviedo.

L'objectif d'une telle modification serait de permettre des modifications génétiques sur la lignée germinale au cas par cas, mais seulement pour un nombre limité de maladies génétiques. Ce point de vue est similaire à celui défendu par le Commetteon Human Gene Editing aux États-Unis (Comité sur l'édition du gène humain). Il pense que la génothérapie germinale utilisant la technologie d'édition du génome pourrait également être légalisée si un système de surveillance strict est en place. En conséquence, un certain nombre de pays, dont les États-Unis, ont appelé à « la coopération internationale, la coopération et l'harmonisation des réglementations régissant l'édition du génome humain » (Carbon & Hausman, 2019).

Le Comité des Sciences, de l'Ingénierie et de la Médecine des Académies Nationales des Sciences (National Academies of Sciences, Engineering, and Médecine Committee), dans son rapport de 2017 sur l'édition du génome humain, a souligné l'importance de répondre à certains critères afin de mener de telles expériences. Il est également prévu de l'utiliser que si aucune autre option n'est disponible et aussi longtemps que nécessaire pour soigner une maladie grave. Parmi ces critères, il s'assure que l'autonomie du patient est protégée, puisqu'il envisage de mettre en place un système de suivi multi générationnel qui respecte l'autonomie et l'espace personnel du patient (Figure 16) (Carbon & Hausman, 2019).



Figure 16 : CRISPR-Cas9 à travers la presse (Kaplan, 2017).

4/Cadre juridique

Sur le plan juridique, il convient de noter qu'il n'existe aucune réglementation spécifique régissant les technologies d'édition du génome telles que CRISPR-Cas9. Ce vide juridique se manifeste tant au niveau national qu'international. Il s'explique par le fait que la science progresse à un rythme important et rapide, obligeant le droit à intervenir plus tard, une fois les progrès scientifiques réalisés. Aucune convention ou traité international n'interdit l'utilisation de cellules somatiques dans la recherche ou les essais cliniques. Ceci est également vrai au niveau national, où les lois de nombreux pays les autorisent de manière générale. CRISPR-Cas9 peut donc être utilisé à diverses fins. Mais la majorité des pays interdisent les opérations sur la lignée germinale humaine dans le but de modifier la descendance. En outre, certains pays ont adopté une législation stricte dans le domaine de la recherche embryonnaire à la suite de cela (Carbon & Hausman, 2019). Nous mentionnons plusieurs systèmes juridiques en vigueur dans plusieurs pays.

4-1/Régime juridique en vigueur en Belgique

L'article trois 1er de la loi du 7 mai 2004 précise qu'elle s'applique à l'expérimentation humaine, y compris les essais cliniques. Cependant, l'article 5 précise qu'une telle expérience ne peut être menée que dans des circonstances déterminées. Par exemple, il ne peut être utilisé qu'à des fins scientifiques. De plus, pour mener un essai clinique, les bénéfices thérapeutiques doivent l'emporter sur les risques et l'autorisation de la personne doit être libre et éclairée. Selon cette loi, CRISPR-Cas9 peut être utilisé dans des essais cliniques somatiques tant que des garanties spécifiques sont respectées. Afin d'éviter tout gaspillage, il est nécessaire de s'assurer que les essais cliniques sont scientifiquement et thérapeutiquement fondés. Et ce, malgré le fait que les risques associés aux mutations des cellules somatiques ne sont pas les mêmes que ceux associés aux mutations des cellules germinales et embryonnaires.

La loi du 19 décembre 2008 autorise l'utilisation de tissus corporels humains, tels que les cellules, pour autant qu'elle soit effectuée « dans un but préventif, diagnostique ou thérapeutique précis et scientifiquement étayé, ou dans un but de recherche scientifiquement pertinent ». Cette loi permet d'utiliser la technologie CRISPR-Cas9 dans les cellules somatiques humaines dès que possible, tant que c'est à des fins scientifiques.

La loi du 11 mai 2003 régit la recherche en fécondation *in vitro*. Elle est autorisée à le faire tant qu'elle respecte les règles énoncées dans la présente loi. L'approche belge est

indulgente dès le départ, mais la présence de ces conditions signale la prudence (Carbon & Hausman, 2019).

4-2/Régime juridique en vigueur en France.

En termes d'essais cliniques, la France a décrété une interdiction similaire à celle de la Belgique, bien qu'aucune exception n'ait été accordée.

La législation française sur la recherche embryonnaire a évolué au fil du temps. Auparavant, elle interdisait par principe la recherche sur l'embryon et les cellules embryonnaires *in vitro*. Cette enquête fait actuellement l'objet d'un permis. Certes, la France a adopté une position moins restrictive qu'auparavant, mais elle n'adopte pas encore une approche permissive. Contrairement à la Belgique qui autorise en principe la recherche sur les cellules souches embryonnaires, la France l'interdit si elle n'a pas été approuvée (Carbon & Hausman, 2019).

4-3/Régime juridique canadien en vigueur.

La loi canadienne fédérale sur la procréation assistée et la recherche associée interdit, entre autres, toute manipulation génétique de la lignée germinale. Les violations de cette loi canadienne peuvent entraîner des sanctions allant d'une amende pouvant aller jusqu'à 500 000,00 \$ à une peine pouvant aller jusqu'à dix ans de prison (Crobeddu *et al.*, 2019).

Enfin, deux questions importantes doivent être posées : quel est l'avenir de cette technologie derrière tous ces avis et la polémique internationale en cours ? Faut-il changer les dispositions législatives relatives à la modification des cellules germinales ? La réponse à ces deux questions nécessite une évaluation objective de l'intérêt de la modification des cellules germinales ou des embryons, ainsi que des alternatives qui peuvent exister. En raison de la nature technique des procédures utilisées et des conséquences imprévues qu'elles peuvent produire, il est extrêmement difficile pour un juge de procéder à une telle appréciation. La technologie évoluant à un rythme effréné, il devient de plus en plus difficile d'anticiper tout en maintenant la sécurité juridique à laquelle ont droit les nombreux intervenants. Il est encore plus difficile d'être légitime dans ce domaine lorsqu'on est engagé dans un changement de paradigme dans l'évaluation du ratio profit/risque. Si les avantages attendus l'emportent sur les risques anticipés, l'investigation peut être justifiée. CRISPR-Cas9 change cette approche en facilitant l'intervention sur le génome. Alternativement, le génome est le gardien du patrimoine hérité d'un individu, et toute modification de ce patrimoine aura inévitablement des ramifications pour les générations futures. Pour justifier ces pratiques, il

serait prudent d'évaluer les bénéfices/risques de la recherche sur les cellules germinales non seulement au niveau d'un individu, mais au niveau d'une population, voire d'une espèce entière. L'absence d'harmonisation internationale des législations rend la tâche du législateur encore plus difficile. En effet, il faut adapter sa législation à l'environnement social national tout en faisant face à des enjeux majeurs comme le poids économique de la recherche, fuite des chercheurs à l'étranger, le tourisme médical, etc (figure 17) (Borges & Lassalas, 2018).

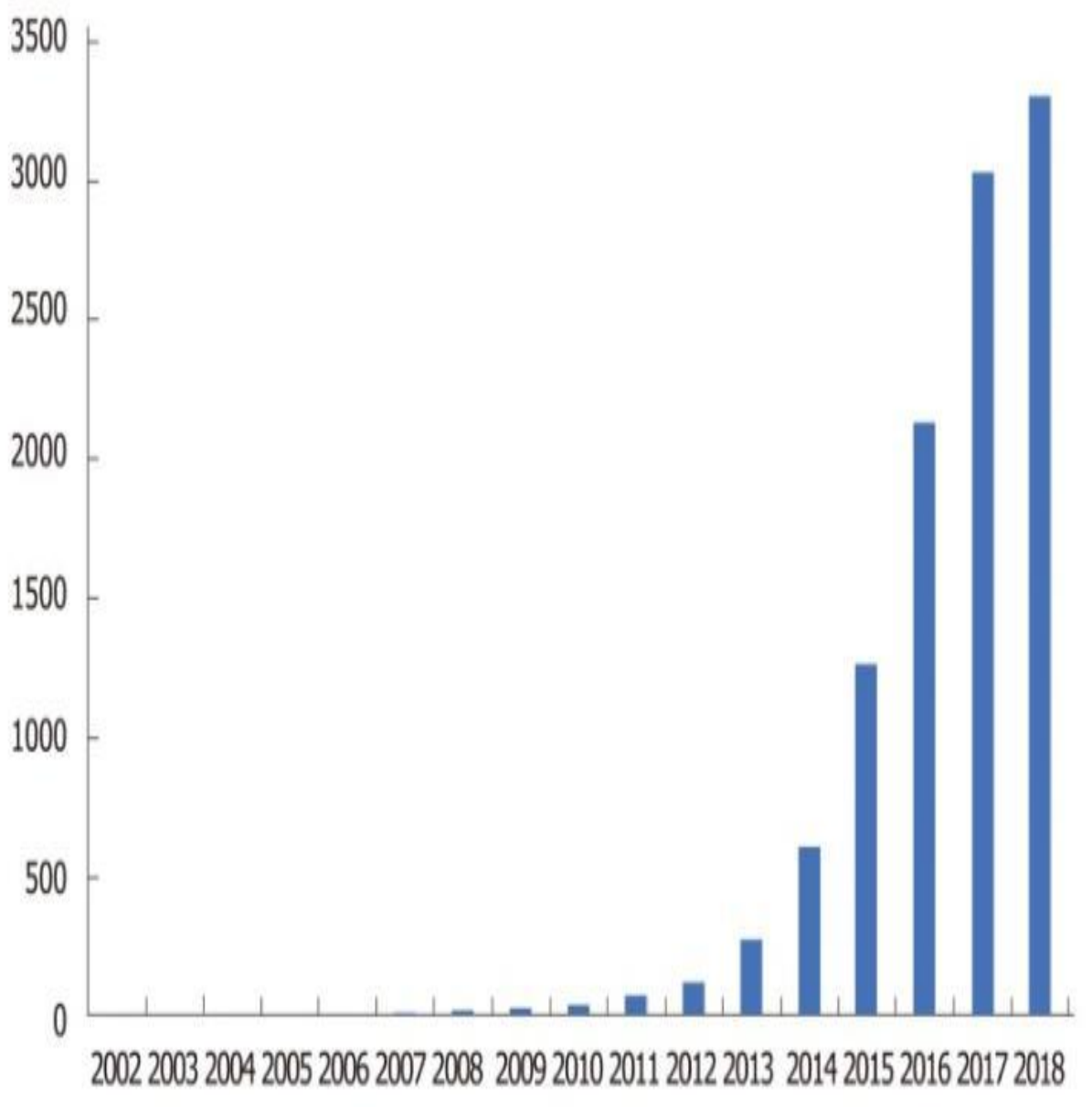


Figure 17 : Nombre de publications CRISPR par an (Limanskiy *et al.*, 2019).

5/Les Solutions suggérées pour éviter les dangers de la technologie CRISPR-Cas9

Dans les cellules humaines, CRISPR/Cas9 présente un risque important d'altérations hors cible. Plusieurs séquences d'ADN se retrouvent souvent dans de grands génomes identiques ou très similaires aux séquences d'ADN ciblées. En plus des séquences cibles, CRISPR/Cas9 provoque également des changements sur des sites défavorables, connus sous le nom de mutations hors cible, en découpant des séquences d'ADN identiques ou presque identiques. Les mutations qui ne sont pas ciblées peuvent entraîner la mort ou un changement cellulaire. Pour réduire la toxicité cellulaire CRISPR/Cas9, davantage d'efforts sont déployés pour éliminer les mutations qui ne sont pas des cibles. Il est préférable de choisir les sites cibles avec le moins de sites hors cible et de décalages entre l'ARNg et sa séquence de suivi. Xiao *et al.* (2014) ont récemment développé CasOT, un outil de recherche polyvalent qui peut identifier des emplacements potentiels hors cible sur des génomes entiers (Zhang *et al.*, 2014).

5-1/fonctionnement de CasOT

Est un script Perl qui peut s'exécuter localement sur les systèmes d'exploitation Windows, trois options de recherche sont disponibles : ARNg unique, ARNg apparié et cible et ARNg hors cible.

5-1-1/mode single-gRNA

les utilisateurs doivent fournir(i) : un fichier FASTA contenant des sites cibles individuels allant de 21 à 33 nucléotides (protospacer de 18 à 30 nucléotides plus le PAM -NGG à l'extrémité 3') (ii) : des fichiers de séquences de gènes pour trouver les sites en dehors de la cible ou toute séquence spécifiée par l'utilisateur, et (iii) : (facultatif) un fichier d'annotation de gène (format Ensemble GTF) : pour voir s'il existe des sites potentiels en dehors de la plage cible dans les exons. Sur le site Web de CasOT, il existe des liens vers des séquences publiques et des fichiers d'annotation pour un certain nombre de génomes couramment utilisés. Les utilisateurs peuvent être utilisés (quatre niveaux sont disponibles).

Le programme enregistre les séquences cibles d'entrée de gamme et les divise en régions PAM, sans germes et non sans germes. Un pool est créé pour contenir toutes les séquences imaginables de 12 nt similaires aux régions de départ, ainsi que leurs séquences inverses, sans écart par rapport à l'option spécifiée par l'utilisateur. Si elles sont trouvées, les séquences génomiques adjacentes du fragment sont extraites et des étapes de test supplémentaires sont

accélérées pour vérifier si le type de PAM et le numéro de non-concordance dans la région non-graine correspondant aux options suggérées par l'utilisateur.

Les séquences du génome, ainsi que toute autre séquence fournie par l'utilisateur, sont scannées nucléotide par nucléotide pour voir si un fragment de 12 nt apparaît dans le pool de semences préconstruites. S'ils sont trouvés, les séquences génomiques voisines du fragment sont extraites et des étapes de test supplémentaires sont effectuées pour s'assurer que le type de PAM et le nombre de non-concordances dans la région sans grainage correspondent aux préférences de l'utilisateur.

Si tous les critères sont remplis, la position et la longueur du fragment dans le génome ou la séquence sont enregistrées. Ensuite, des informations détaillées sur les sites potentiels hors cible, tels que les emplacements, les séquences, le type de PAM, les nombres et les descriptions détaillées des discordances, sont produites sous la forme de fichiers séparés pour chaque site cible. Si un fichier d'annotation est fourni, l'identifiant et le symbole du gène sont ajoutés aux informations non ciblées si le site est situé dans un exon. Un fichier de statistiques est également créé afin de comptabiliser les catégories de sites potentiels hors cible (Xiao *et al.*, 2014).

5-1-2/Le Mode de recherche d'ARNg apparié.

Le Cas9 est muté de sa forme nucléase d'origine à une forme nickase dans ce système. Sous le contrôle d'un seul ARNg, la Cas9-nickase clive un seul ADN double brin et ne laisse qu'une seule entaille, qui est précisément réparée par le mécanisme de réparation cellulaire et ne provoque pas de mutations en général. La majorité des fichiers d'entrée et de support, ainsi que les paramètres, sont similaires à ceux du mode unique CasOT ARNg, à l'exception que les deux séquences cibles de chaque paire dans le fichier FASTA doivent partager le même nom avec des suffixes différents «_#F'et »_#R ». En plus de ça, les utilisateurs peuvent également spécifier la distance maximale autorisée entre les deux séquences potentielles hors cible (par défaut, 0 nt). Les résultats de la recherche pour chaque ARNg individuel sont produits de la même manière qu'ils sont en mode unique ARNg et les paires de sites potentiels hors cible situés aux extrémités opposées du même chromosome dans le décalage autorisé sont sorties dans un dossier séparé (Xiao *et al.*, 2014).

5-1-3/Mode de recherche cible et hors cible

Il est nécessaire de concevoir des sites cibles Cas9/gRNA, puis de rechercher séquentiellement des cibles potentielles en dehors de ces sites. Les utilisateurs peuvent spécifier deux paramètres pour cette étape : la plage de longueur du protospacer (18–30 nt ; 19–20 nt par défaut) et le type de sites autorisés [seul -NGG PAM est requis, ou un G en première position (extrémité 5') pour le promoteur T7 est également nécessaire]. Ensuite, les cibles potentielles identifiées sont utilisées pour rechercher des sites potentiels hors cible dans le génome ou la séquence donnée, de la même manière que la recherche d'un seul ARNg. En plus de ça le mode cible et hors cible de CasOT accepte une séquence <1 kb et recherche d'abord les sites cibles candidats (Xiao *et al.*, 2014).

Un autre facteur affectant les mutations non ciblées est la posologie de CRISPR/Cas9, qui doit être étroitement surveillée. La spécificité de CRISPR/Cas9 ne semble pas affectée par la méthylation des séquences d'ADN cibles. De plus, la conversion de Cas9 en nickase peut aider à réduire les altérations non ciblées, tout en améliorant l'efficacité de l'édition de gènes basée sur CRISPR/Cas9 (Zhang *et al.*, 2014).

CRISPR/Cas9 peut théoriquement être utilisé pour modifier n'importe quelle séquence d'ADN à l'aide d'ARNg programmable conçu. Outre la complémentarité ARNg/séquence cible, la spécificité CRISPR/Cas9 nécessite une séquence PAM de 2 à 5 nt située immédiatement en aval de la séquence cible. NGG PAM de *Streptococcus pyogenes*, NGGNG et NNAGAAW PAM de *Streptococcus thermophilus* et NNNNGATT PAM de *Neisseria meningitidis* font partie des séquences PAM trouvées. La dépendance à PAM, en revanche, augmente la spécificité de CRISPR/Cas9. Le nombre de mutations en dehors de la cible de CRISPR/Cas9 qui nécessitent un PAM long doit être inférieur au nombre de mutations qui nécessitent un PAM court (Zhang *et al.*, 2014).

Conclusion

La connaissance de système CRISPR-Cas9 a connu une croissance exponentielle ces dernières années, et des avancées spectaculaires dans son utilisation comme outil génétique ont révolutionné les sciences biologiques. Qu'il s'agisse de caractériser des processus biologiques, de traiter des maladies génétiques ou d'étudier des écosystèmes microbiologiques, le système CRISPR-Cas9 a déjà changé notre façon de faire de la recherche. La polyvalence du système CRISPR-Cas ouvre une foule de nouvelles avenues pour la recherche fondamentale et appliquée, y compris dans le domaine biomédical. La capacité du système CRISPR-Cas à cibler pratiquement n'importe quelle séquence de gènes pourrait révolutionner les stratégies de traitement des maladies génétiques, passant de la gestion des symptômes à la véritable guérison. Lorsqu'il est associé à des méthodes de contrôle de l'activité des endonucléases et à de nouveaux vecteurs de transport, le système CRISPR-Cas offre un large éventail de possibilités qui ne cessent de se développer. Si le passé prédit l'avenir, les années à venir devraient apporter de nouvelles applications performantes et stimulantes.

Néanmoins, malgré le développement rapide de la technologie CRISPR, de nombreuses questions mécanistes restent sans réponse et d'autres défis doivent encore être surmontés. Pour commencer, les méthodes de livraison existantes doivent être optimisées et de nouvelles approches doivent être développées pour la livraison des éléments CRISPR à la cellule cible afin d'atteindre des niveaux d'efficacité adéquats. Deuxièmement, l'efficacité doit être liée à la spécificité, et de nouvelles méthodes pour contrôler la distribution ciblée tout en évitant les conséquences imprévues doivent être étudiées. Pour résumer, des recherches approfondies sont nécessaires avant que CRISPR puisse être largement utilisé dans la recherche et la thérapie fondamentales et biomédicales. Néanmoins, nous pensons que les méthodes d'ingénierie du génome basées sur CRISPR-Cas9 nous aideront à mieux comprendre les processus pathologiques et leur traitement.

Finalement, l'une des difficultés les plus importantes que nous avons rencontrées lors de la préparation de notre mémoire de fin d'études était que nous n'étions pas en mesure de travailler directement sur cette technologie, en raison de son manque de diffusion dans les pays du monde arabe et africain en général, en particulier dans notre pays. L'Algérie, outre le manque de centres de recherche et de matériels de base et le manque d'outils biologiques pour son application.

Références

Bibliographiques

- Asmamaw, M., & Zawdie, B. (2021). Mechanism and Applications of CRISPR-/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics: targets & therapy*, 15, 353–361. <https://doi.org/10.2147/BTT.S326422>
- Ball, P. (2016, 11 17). MRS Bulletin. Consulté le 06 21, 2022, sur <https://www.cambridge.org/core/journals/mrs-bulletin/news/crispr-implications-for-materials-science>
- Borges, R. M. & Lassalas, C. (2018). Le Dossier : Quelles limites pour les technosciences en santé ?, Actes du colloque de Clermont-Ferrand du 13 mars 2018, textes réunis par RM. Borgès et C. Lassalas, La Revue du Centre Michel de l'Hospital [édition électronique], E. Raschel (dir.), 2018, n° 15, pp. 7-60. In colloque quelles limites pour les technosciences en santé ?
- Carbon, M. & Hausman, J. M. « CRISPR-Cas9: entre génétique et éthique, où est la place du droit ? Faculté de droit et de criminologie, Université catholique de Louvain, 2019. *Prome: Hausman, Jean-Marc*. <http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:20308>
- Cheng, X., Fan, S., Wen, C. & Du, X. (2020). CRISPR/Cas9 for cancer treatment: technology, clinical applications and challenges. *Briefings in functional genomics*, 19(3), 209–214. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elaa001>
- Cnet France. (2020, 03 05). Consulté le 06 16, 2022, sur <https://www.cnetfrance.fr/news/crispr-la-technique-d-edition-du-genome-utilisee-chez-l-homme-pour-la-premiere-fois-39900153.htm>
- Crobeddu, B., Côté, M. C., Oral, E., Boutet, E., & Moineau, S. (2019). L'éthique derrière la modification génomique humaine. La synthèse : *le journal des étudiants de l'INRS-Hors-série* (1).
- Cullot, G. (2019). Génotoxicité des systèmes CRISPR-Cas9 (Doctoral dissertation, Bordeaux).
- Doetschman, T., & Georgieva, T. (2017). Gene Editing With CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circulation Research*, 120(5), 876–894.
- Du, H., Zeng, X., Zhao, M., Cui, X., Wang, Q., Yang, H., Cheng, H., & Yu, D. (2016). Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *Journal of biotechnology*, 217, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.11.005>

- Ducos, A., Bed'Hom, B., Acloque, H. & Pain, B. (2020). Modifications ciblées des génomes : Apports et potentiels des nouvelles technologies pour les espèces aviaires. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 173(1), 140-150.
- Feng, Y., Sassi, S., Shen, J. K., Yang, X., Gao, Y., Osaka, E., Zhang, J., Yang, S., Yang, C., Mankin, H. J., Hornicek, F. J., & Duan, Z. (2015). Targeting CDK11 in osteosarcomacellsusing the CRISPR-Cas9 system. *Journal of orthopedic research: official publication of the Orthopedic Research Society*, 33(2), 199–207. <https://doi.org/10.1002/jor.22745>
- Foulkes, A. L., Soda, T., Farrell, M., Giusti-Rodríguez, P. & Lázaro-Muñoz, G. (2019). Legal and ethical implications of CRISPR applications in psychiatry. *North Carolina law review*, 97(5), 1359.
- Haun, W., Coffman, A., Clasen, B. M., Demorest, Z. L., Lowy, A., Ray, E., Retterath, A., Stoddard, T., Juillerat, A., Cedrone, F., Mathis, L., Vytas, D. F. & Zhang, F. (2014). Improvedsoybeanoilquality by targeted mutagenesis of the fattyacid desaturase 2 gene family. *Plant biotechnology Journal*, 12(7), 934–940. <https://doi.org/10.1111/pbi.12201>
- Heintze, J., Luft, C., & Ketteler, R. (2013). A CRISPR CASE for high-throughput silencing. *Frontiers in genetics*, 4, 193.
- Hoy, H., Lynch, T. & Beck, M. (2019). SurgicalTreatment of Lung Cancer. *Critical care nursing clinics of NorthAmerica*, 31(3), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2019.05.002>
- Hartenian, E., & Doench, JG (2015). Screenings génétiques et génomique fonctionnelle utilisant la technologie CRISPR/Cas9. *La revue FEBS*, 282 (8), 1383-1393.
- Jiang, C., Mei, M., Li, B., Zhu, X., Zu, W., Tian, Y., Wang, Q., Guo, Y., Dong, Y., & Tan, X. (2017). A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeuticallytargeting HBV DNA and pcsk9 *in vivo*. *Cell research*, 27(3), 440–443. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.16>
- Jordan, B. (2021). CRISPR: le Nobel, enfin....
- Kaplan, J. C. (2017). CRISPR-Cas9: un scalpel génomique à double tranchant. *Science et Pseudosciences* avril, 320, 26-37.

- Kaur, K., Tandon, H., Gupta, AK et Kumar, M. (2015). CrisprGE : un hub central de l'édition du génome basée sur CRISPR/Cas. Base de données,2015.
- Khalil, AM (2020). La révolution de l'édition du génome. *Journal du génie génétique et de la biotechnologie*, 18 (1), 1-16.
- Kim, MJ et Ahituv, N. (2013). Le test hydrodynamique de la veine caudale comme outil pour l'étude des promoteurs et des amplificateurs du foie. Dans *Pharmacogenomics* (pp. 279-289). HumanaPress, Totowa, NJ.
- Koo, T., Yoon, A. R., Cho, H. Y., Bae, S., Yun, C. O. & Kim, J. S. (2017). Selective disruption of an oncogenic mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumorregression. *Nucleic acids research*, 45(13), 7897–7908. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx490>
- Korotkova, AM, Gerasimova, SV & Khlestkina, EK (2019). Réalisations actuelles dans la modification des gènes des cultures à l'aide du système CRISPR/Cas. *Vavilov J Race Genet*, 23 (1).
- Lannoy, N., & Hermans, C. Le potentiel thérapeutique des « Ciseaux moléculaires » : perspectives du Prix Nobel de chimie 2020.
- Lassalas, C.& Borges, R. M. (2018). «La technologie CRISPR-Cas9 : enjeux juridiques », Le Dossier : Quelles limites pour les technosciences en santé ? Actes du colloque de Clermont-Ferrand du 13 mars 2018, textes réunis par RM. Borgès et C. Lassalas, *La Revue du Centre Michel de l'Hospital* [édition électronique], 2018, n° 15, pp. 39-47. *La Revue du Centre Michel de l'Hospital-édition électronique*, (15), pp-39.
- Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., Yamamoto, T., Yamanaka, S.& Hotta, A. (2015). Precise correction of the dystrophingene in duchennemusculardystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem cell reports*, 4(1), 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.013>
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M. & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>

- Lian, Y. F., Yuan, J., Cui, Q., Feng, Q. S., Xu, M., Bei, J. X. & Feng, L. (2016). Upregulation of KLHDC4 predicts a poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 11(3), e0152820.
- Limanskiy, V., Vyas, A., Chaturvedi, LS & Vyas, D. (2019). Exploiter le potentiel de la technologie d'édition de gènes à l'aide de CRISPR dans les maladies inflammatoires de l'intestin. *Journal mondial de gastroentérologie*, 25 (18), 2177.
- Lin, G., Zhang, K. & Li, J. (2015). Application de la technologie CRISPR/Cas9 au VHB. *Journal international des sciences moléculaires*, 16 (11), 26077-26086.
- Mandal, P. K., Ferreira, L. M., Collins, R., Meissner, T. B., Boutwell, C. L., Friesen, M., Vrbanac, V., Garrison, B. S., Stortchevoi, A., Bryder, D., Musunuru, K., Brand, H., Tager, A. M., Allen, T. M., Talkowski, M. E., Rossi, D. J. & Cowan, C. A. (2014). Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell stem cell*, 15(5), 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.004>
- Mangin, L. (2020). Les “ciseaux génétiques” CRISPR-Cas9. *Pour la Science*, 518(12), 15b-15b.
- Nachmanson, D., Lian, S., Schmidt, E. K., Hipp, M. J., Baker, K. T., Zhang, Y. & Risques, R. A. (2018). Targeted genome fragmentation With CRISPR/Cas9 enables fast and efficient enrichment of small genomic regions and ultra-accurate sequencing with low DNA input (CRISPR-DS). *Genome research*, 28(10), 1589–1599.
- Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G. & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR–Cas systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3327.
- Olivaes, J., Bonamino, M. H. & Markoski, M. M. (2019). CRISPR/Cas 9 system for the treatment of dilated cardiomyopathy: A hypothesis related to function of a MAP kinase. *Medical hypotheses*, 128, 91–93. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.05.013>
- Ousterout, DG, Kabadi, AM, Thakore, PI, Majoros, WH, Reddy, TE & Gersbach, CA (2015). Édition multiplex du génome basée sur CRISPR/Cas9 pour la correction des mutations de la dystrophine qui causent la dystrophie musculaire de Duchenne. *Communications naturelles*, 6, 6244. <https://doi.org/10.1038/ncomms7244>

- Peng, C., lu, M. & Yang, D. (2015). Outils basés sur CRISPR/Cas9 pour l'édition ciblée du génome et le contrôle de la réplication du VHB. *VirologicaSinica*, 30 (5), 317-325.
- Peterson, JC (2019). Gene Editing Lulu, Nana et leurs enfants. Perspectives sur la science et la foi chrétienne, 71 (1), 1-3.
- Rajagopalan, N., Kagale, S., Bhowmik, P.& Song, H. (2018). A Two-Step Method for Obtaining Highly Pure Cas9 Nuclease for Genome Editing, Biophysical, and Structural Studies. *Methods and protocols*, 1(2), 17. <https://doi.org/10.3390/mps1020017>
- Redman, M., King, A., Watson, C. & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas 9 ? *Archives of disease in childhood. Education and Practice Edition*, 101(4), 213–215. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>
- Saha, S. K., Saikot, F. K., Rahman, M. S., Jamal, M. A. H. M., Rahman, S. K., Islam, S. R. & Kim, K. H. (2019). Programmable molecular scissors: applications of a new tool for genome editing in biotech. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 14, 212–238.
- Savić, N. & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational research: the Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 168, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.008>
- Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C. K., Nieuwenhuis, E. E., Beekman, J. M. & Clevers, H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell stem cell*, 13(6), 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.002>
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., Lee, S. S. & Chakraborty, C. (2021). CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of 3-3-Human Diseases. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 29(2), 571–586. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.028>
- Singh S. M. (2019). Lulu and Nana open Pandora's box far beyond Louise Brown. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association médicale canadienne*, 191(23), E642–E643. <https://doi.org/10.1503/cmaj.71979>
- Singh, SM (2022). RE : Lulu et Nana (2018) ouvrent la boîte de Pandore bien au-delà de Louise Brown (1978) : doit-elle rester fermée pour toujours.

- Siva, N., Gupta, S., Gupta, A., Shukla, J. N., Malik, B. & Shukla, N. (2021). Genome-editing approaches and applications: a brief review on CRISPR technology and its role in cancer. *3 Biotech*, 11(3), 146. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02680-4>
- Tavakoli, K., Pour-Aboughadareh, A., Kianersi, F., Poczai, P., Etminan, A. & Shooshtari, L. (2021). Applications de CRISPR-Cas9 en tant que système avancé d'édition du génome dans les sciences de la vie. *Biotechnology*, 10 (3), 14.
- Tessadori, F., Roessler, H. I., Savelberg, S., Chocron, S., Kamel, S. M., Duran, K. J., van Haelst, M. M., van Haften, G. & Bakkers, J. (2018). Effective CRISPR/Cas9-based nucleotide editing in zebrafish to model human genetic cardiovascular disorders. *Disease models & mechanisms*, 11(10), dmm035469. <https://doi.org/10.1242/dmm.035469>
- Tiruneh G/Medhin, M., Chekol Abebe, E., Sisay, T., Berhane, N., Bekele, T. & Asmamaw Dejenie, T. (2021). Current Applications and Future Perspectives of CRISPR-Cas9 for the Treatment of Lung Cancer. *Biologics: targets & therapy*, 15, 199–204. <https://doi.org/10.2147/BTT.S310312>
- Tremblay, J. P. (2015). CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Médecine/Sciences*, 31(11), 1014-1022.
- Tronchet, S. & Bertheau, Y. (2017). CRISPR Cas9 : la grande menace de la génétique.
- Tsarmopoulos, I. (2017). Ingénierie du génome de bactéries minimales à l'aide des outils CRISPR/Cas9 (Thèse de doctorat, Université de Bordeaux). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309727>
- Villiger, L., Grisch-Chan, H. M., Lindsay, H., Ringnalda, F., Pogliano, C. B., Allegri, G., Fingerhut, R., Häberle, J., Matos, J., Robinson, M. D., Thöny, B. & Schwank, G. (2018). Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nature medicine*, 24(10), 1519–1525. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0209-1>
- Wang, T., Zhang, H. & Zhu, H. (2019). La technologie CRISPR révolutionne l'amélioration des cultures de tomates et d'autres fruits. *Recherche horticole*, 6.

- Wang, J., Zhang, C. & Feng, B. (2020). The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: A customizable toolbox for molecular manipulations. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(6), 3256–3270.
- Xiao, A., Cheng, Z., Kong, L., Zhu, Z., Lin, S., Gao, G. & Zhang, B. (2014). CasOT : un outil de recherche hors cible Cas9/gRNA à l'échelle du génome. *Bioinformatique*, 30 (8), 1180-1182.
- Xie, F., Ye, L., Chang, J. C., Beyer, A. I., Wang, J., Muench, M. O. & Kan, Y. W. (2014). Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome research*, 24(9), 1526–1533. <https://doi.org/10.1101/gr.173427.114>
- Xie, Y., Wang, D., Lan, F., Wei, G., Ni, T., Chai, R. & Wang, Y. (2017). Un système CRISPR/Cas9 basé sur un vecteur épisomique pour une inactivation de gène hautement efficace dans les cellules souches pluripotentes humaines. *Rapports scientifiques*, 7(1), 1-11.
- Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P. A., Jacks, T. & Anderson, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature biotechnology*, 32(6), 551–553. <https://doi.org/10.1038/nbt.2884>
- Zaynitdinova, M. I., Lavrov, A. V. & Smirnikhina, S. A. (2021). Animal models for researching approaches to therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Transgenic research*, 30(6), 709–725. <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00278-3>
- Zhang, F., Wen, Y. & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23 (R1), R40–R46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>
- Zhou, J., Li, D., Wang, G., Wang, F., Kunjal, M., Joldersma, D. & Liu, Z. (2020). Application and future perspective of CRISPR/Cas9 genome editing in fruit crops. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(3), 269–286. <https://doi.org/10.1111/jipb.12793>

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : Benathmane Bouchra
Meziani Salima

Le Système d'Édition du Génome CRISPR-Cas9

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire des
Microorganismes

Résumé

CRISPR/Cas9 est un nouveau système d'édition du génome dérivée du système immunitaire bactérien, qui défend les bactéries hôtes contre l'agression des bactériophages. Simple, rapide et efficace pour couper l'ADN à un endroit précis du génome, dans n'importe quelle cellule. Ce mécanisme est constitué d'un ARN guide, qui cible une séquence d'ADN particulière, associé à l'enzyme Cas9, qui, comme des ciseaux moléculaires, coupe l'ADN. Il permet d'inactiver un gène, en contrôlant l'expression ou en le modifiant, de guérir des maladies génétiques, doper le rendement des cultures, ressusciter des espèces disparues ou donner vie à des bébés parfaits. Cependant, l'application de ces méthodes soulève un certain nombre de problèmes (techniques, réglementaires, économiques, éthiques, et surtout légal).

Une fois ces problèmes résolus, CRISPR/Cas9 a le potentiel d'être un outil fiable et simple pour l'édition du matériel génétique. Pour mieux comprendre les capacités de CRISPR/Cas9 et explorer ses caractéristiques, des recherches supplémentaires sont nécessaires qui devraient porter sur la spécificité de l'outil, les effets hors cible et les modalités d'administration. Par exemple, les récents résultats du séquençage profond à l'échelle du génome seront utiles pour choisir les bons sites cibles et développer des ARNg hautement spécifiques.

Les mots clés : système immunitaire bactérien CRISPR-Cas9, édition du génome, cas9, ARNg, maladies génétiques

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Frères Mentouri, Constantine 1.

Encadrante : Dr BOUBEKRI Karima (MCA, Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinateur 1 : Dr BOUCHEHAM Anouar (MCA, Saleh Boubnider, Université 3).

Examinatrice 2 : Dr BOULTIFAT Linda (MCB, Université Frères Mentouri, Constantine 1).