

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Soutenue publiquement le 24 Mai 2019

Par M. DAURE Antoine

CRISPR-Cas 9

**De la biotechnologie d'aujourd'hui aux applications cliniques de
demain**

Membres du jury :

Président :	Monsieur le Professeur Jean-Louis CAZIN
Assesseurs :	Madame le Professeur Sophie LESTAVEL
	Monsieur le Docteur Cyril COUTURIER
Membre extérieur :	Monsieur le Docteur Hai Pascal DAO PHAN

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Jean-Louis CAZIN

Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)
Docteur ès Sciences Pharmaceutiques
Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie Clinique en Cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre Régional de Lutte Contre le Cancer en Hauts de France)
Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens : Conseiller Ordinal élu (section H).

Assesseurs : Madame le Professeur Sophie LESTAVEL

Professeur de Biologie Cellulaire et Moléculaire à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)

Monsieur le Docteur Cyril COUTURIER

Docteur en Sciences (Paris VI)
Maitre de Conférences à l'Université de Lille
Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Membre extérieur : Monsieur le Docteur Pascal DAO PHAN

Docteur en Pharmacie
Responsable Opérations Cliniques chez Bayer Pharmaceuticals



Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie

Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT- AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules

Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie

Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS

A mon président et directeur de thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Louis CAZIN,

Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)
Docteur ès Sciences Pharmaceutiques

Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie Clinique en Cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre Régional de Lutte Contre le Cancer en Hauts de France)

Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens : Conseiller Ordinal élu (section H).

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger et présider le jury de cette thèse. Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail bien qu'atypique pour ma formation, pour votre disponibilité, vos conseils avisés, vos encouragements et votre esprit critique qui ont permis son aboutissement.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect. Je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Aux membres du jury, assesseurs et membre extérieur :

Madame le Professeur Sophie LESTAVEL,

Professeur de Biologie Cellulaire et Moléculaire à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)

Vous avez accepté, avec un grand intérêt, de juger ce travail. Merci pour votre disponibilité, votre vision de chercheur dans ce domaine, et les compétences particulières que vous avez mis à disposition en constituant ce jury. Veillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Monsieur le Docteur Cyril COUTURIER

Docteur en Sciences (Paris VI)

Maitre de Conférences à l'Université de Lille

Habilité à Diriger des Recherches (HDR)

Vous avez accepté, avec un grand intérêt, de juger ce travail. Merci pour de m'avoir fait découvrir CRISPR-Cas9 au cours de vos enseignements du Master Biologie Santé, pour votre disponibilité, et les compétences particulières que vous avez mis à disposition en constituant

ce

jury.

Veillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Monsieur le Docteur Hai Pascal DAO PHAN,

Docteur en Pharmacie

Responsable Opérations Cliniques chez Bayer Pharmaceuticals

Vous avez accepté, avec un grand intérêt, de juger ce travail. Merci pour votre disponibilité, votre vision éclairée du futur des essais cliniques dans ce domaine, et les compétences particulières que vous avez mis à disposition en constituant ce jury. Veillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Je remercie également,

Madame Françoise BATAILLE, et toute l'équipe de la Pharmacie de La République,

Un grand merci pour m'avoir accueilli parmi vous, pour avoir participé à ma formation et transmis votre expérience.

Merci pour votre patience, vos conseils, et votre bienveillance.

Mes parents,

Merci pour votre exigence qui m'a donné envie de faire toujours mieux, votre soutien, votre présence durant toutes ces années qui ont été intenses, autant pendant mes révisions, que dans mes choix d'orientation.

Pour avoir toujours cru en moi.

Pour m'avoir encouragé sans cesse sur cette voie qui aboutit aujourd'hui.

Maman, Papa, un immense merci.

Mes frères, Charles et Mathieu,

Merci d'avoir toujours été là, et de m'avoir toujours soutenu. Best bro 4ever !

Eugénie,

Merci pour tous tes petits potins et ton aide précieuse dans les moments difficiles.

Ma famille,

Merci pour ces réunions de famille qui m'ont fait découvrir le monde.

Mes amis de Pharma,

Merci à Valentin, pour tes conseils, ton soutien, et nos discussions passées à refaire le monde.

Merci à Charles-Éric, pour toutes nos théories, nos soirées, et ton humour incompris.

Merci à Konny, pour tes blagues hors pair, tes talents de Top chef, et nos petits footing DJ in shape.

Merci à Kéké, le Duc De Saint O, sans qui nos soirées n'auraient jamais été aussi mémorables.

Merci à Anne-Sophie et Manon, pour nos petits commérages qui nous font tant rire et nos sorties.

Merci à Bishop l'Ovni, et ton humour BPNN.

Merci à tous les FDLV : BJ, Titia, Schpère, Valou, Paulo, Charly, Cricri, Matthieu, Cloé et Perrine avec qui j'ai passé les meilleures soirées.

Merci à la team du QG : Charles, Nicolas, Noémie, Pauline pour nos soirées gastronomiques, les cigares et nos cocktails.

Merci à Séréna et Thomas, pour nos séances passées plus à parler qu'à faire du sport.

*Merci à la team des Beaufs du Ski (votre anonymat est sauf) : la Princesse des *** qui a toujours été là pour me pousser à voyager (et pas que...), le Berger disparu pour nos sorties, Cap*** man et le Mouton noir pour vos goûts musicaux et vos blagues.*

Merci à mes espions, Victor, Vincent et Lucas.

Merci à mes co-externes de Wasquehal : Adèle et Alix, pour ce stage si enrichissant qui nous aura fait rire comme des dauphins.

Merci à Romane, Sushi, et toutes les personnes qui m'ont accompagné pendant toutes ces années d'études...

Mes amis de toujours,

Antoine, Thomas, Nadir, Nicolas, Jérémie, Éric, Joël et tous les autres... Le temps passe et vous êtes toujours là, merci.

Graal, et Raoul.

Et enfin, j'ai une pensée toute particulière pour les personnes qui sont, ou qui ont été confrontées au cancer et pour qui je fonde le grand espoir que CRISPR-Cas9 devienne une thérapie curative.

SOMMAIRE

Introduction	31
I. Hier	33
I.1 ADN	33
I.1.1 De la découverte de l'ADN à son édition	33
I.1.1.1 Frederick Griffith découvre le phénomène de transformation bactérienne.....	33
I.1.1.2 L'ADN identifié comme le « Principe transformant ».....	34
I.1.1.3 Hershey et Chase, la protéine n'est pas le support de l'hérédité	35
I.1.1.4 L'ADN comme support de l'hérédité	37
I.1.1.5 L'élaboration du modèle de la structure de l'ADN	38
I.1.1.6 L'élucidation du Code Génétique	40
I.1.2 L'édition du génome.....	40
I.1.2.1 Une construction empirique	40
I.1.2.2 Les précédentes technologies d'édition du génome.....	42
I.1.3 La protéine Cas9.....	45
I.1.3.1 Fonction pour la bactérie.....	45
I.1.3.2 Mécanisme d'action.....	45
I.2 Virus	47
I.2.1 Biologie virale générale.....	47
I.2.1.1 Définition d'un virus.....	47
I.2.1.2 Structure d'un virus.....	47
I.2.1.3 La réplication virale.....	50
I.2.2 Vecteurs viraux	52
I.2.2.1 Principe	52
I.2.2.2 Production d'un vecteur viral	53
I.2.2.3 Types de vecteurs viraux	54
I.2.3 Type de vecteurs non-viraux	56
I.2.3.1 Vectorisation de CRISPR-Cas9 par méthodes physiques	56
I.2.3.2 Vectorisation de CRISPR-Cas9 par méthodes chimiques	58
I.3 Conception du matériel génétique nécessaire au fonctionnement de CRISPR-Cas9.....	63
I.3.1 Rappel sur le Code Génétique universel et dégénéré.....	63
I.3.2 Synthèse d'oligonucléotide.....	64
I.3.2.1 Synthèse chimique d'oligonucléotide	64
I.3.2.2 Synthèse enzymatique de l'ADN.....	65
I.3.3 Design de l'ARN guide (sgRNA) nécessaire au ciblage de CRISPR-Cas9	66
I.4 Genèse d'une révolution, le concept.....	67
I.4.1 Quelles manipulations génétiques sont-elles recherchées ?.....	67
I.4.1.1 Mise au silence d'un gène : knockout.....	67
I.4.1.2 Edition d'un gène	68
I.4.1.3 Répression ou interférence : CRISPRi.....	69
I.4.1.4 Activation d'un gène : CRISPRa.....	69
I.4.2 Comment cibler une cellule spécifiquement ?.....	70
I.4.2.1 Plasmide exprimant Cas9 et l'ARNg	70
I.4.2.2 Protéine complexant Cas9 et l'ARNg	74
I.4.3 Quel système d'expression choisir ?.....	76
I.4.4 Comment sélectionner la séquence cible et concevoir l'ARNg ?.....	78
I.4.4.1 Connaitre la lignée cellulaire / organisme et la séquence génomique.....	78
I.4.4.2 Sélectionner le gène et l'élément génétique à manipuler	78

I.4.4.3	Sélectionner les ARNg sur la base des activités prévues et non ciblées	79
I.4.4.4	Synthétiser et cloner les ARNg souhaités.....	79
I.4.4.5	Livrer Cas9 et ARNg.....	79
I.4.4.6	Valider la modification génétique.....	79
II.	Aujourd'hui	83
II.1	État des lieux	83
II.2	Axes d'améliorations	84
II.2.1	Détection biaisée des actions « hors cible » dans le génome	84
II.2.2	Détection non biaisée des actions « hors cible » dans le génome	85
II.2.3	Sélection des ARN guides et modèles prédictifs.....	86
II.2.4	Orthologues Cas9 et nouvelles protéines CRISPR	87
II.2.5	Ingénierie des protéines et PAM sur-mesure	89
II.2.6	Spécificité de dCas9.....	92
II.2.7	Guides modifiés	92
II.2.8	Cinétique et régulation	94
II.2.9	Implications plus larges de la spécificité	95
III.	Demain	99
III.1	Point sur les essais cliniques	99
III.2	Le cancer	99
III.2.1	Physiopathologie et contexte clinique.....	99
III.2.2	Essais cliniques en cours	101
III.3	Les troubles sanguins.....	103
III.3.1	Contexte clinique.....	103
III.3.2	Les essais cliniques en cours.....	105
III.4	La cécité.....	105
III.5	L'infectiologie.....	106
III.5.1	Contexte clinique du SIDA.....	106
III.5.2	Les essais cliniques en cours.....	106
III.6	La fibrose kystique	107
III.7	La dystrophie musculaire	108
III.8	La maladie de Huntington.....	108
	Conclusion.....	111
	Références	113

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Protocole de l'expérience de Griffith (1928) ⁵	33
<u>Figure 2</u> : Quelle est la nature du facteur transformant des cellules ? ADN, ARN, protéines ⁵	34
<u>Figure 3</u> : Structure d'un phage ⁵	35
<u>Figure 4</u> : Un phage infectant <i>Escherichia coli</i> ⁵	36
<u>Figure 5</u> : Bases azotées de l'ADN ¹⁰	37
<u>Figure 6</u> : Cliché en croix obtenu à partir d'un bombardement de rayon X sur un amas d'ADN ¹	38
<u>Figure 7</u> : Structure en double hélice de l'ADN ¹⁵	38
<u>Figure 8</u> : Schéma de la synthèse d'une protéine à partir d'un brin d'ADN ¹⁷	39
<u>Figure 9</u> : Schéma du processus de réplication de l'ADN ¹⁹	39
<u>Figure 10</u> : Utilisation d'analogues de l'ATP pour la mise en évidence d'activités d'editing-like ²⁵	41
<u>Figure 11</u> : Mécanisme de fonctionnement des méganucléases de homing ²⁹	43
<u>Figure 12</u> : Schéma représentant le mécanisme de reconnaissance employé par les TALEN ³²	44
<u>Figure 13</u> : Schéma des possibilités d'édition du génome médié par une ZFN ³⁴	45
<u>Figure 14</u> : Mécanisme d'action de Cas9 ³⁷	46
<u>Figure 15</u> : Classification des virus infectants les animaux ³⁹	47
<u>Figure 16</u> : Particule virale dans le cytoplasme d'une cellule (Grossissement x166 000) ⁴⁰	47
<u>Figure 17</u> : Représentation schématique de la structure d'un virus enveloppé ⁴¹	48
<u>Figure 18</u> : Représentation schématique des différentes capsides ⁴²	48
<u>Figure 19</u> : Photographie d'une capsidie icosaédrique vue au microscope électronique ⁴³	49
<u>Figure 20</u> : Photographie d'une capsidie hélicoïdale vue au microscope électronique ⁴³	49
<u>Figure 21</u> : Photographie d'un virus complexe vu au microscope électronique à balayage ⁴⁶	49
<u>Figure 22</u> : Photographie d'un virus enveloppé : un Herpesviridae vu au microscope électronique ⁴⁸	50
<u>Figure 23</u> : Représentation schématique de la réplication virale ⁵⁰	50
<u>Figure 24</u> : Schématisation de l'adsorption du VIH sur un lymphocyte T4 ⁵¹	51
<u>Figure 25</u> : Schématisation de la production d'un vecteur viral par une cellule transcomplémentante ⁵⁸	53
<u>Figure 26</u> : Représentation schématique des différentes méthodes de vectorisation non virales ⁶³	56
<u>Figure 27</u> : Différents challenges à surmonter pour le transfert des éléments de Cas9/gRNA par des vecteurs non-viraux ⁶³	58
<u>Figure 28</u> : Réaction de désacétylation du chitosan ⁷⁷	59
<u>Figure 29</u> : Représentation illustrée d'un PLL-PEG ⁷⁹	59

<u>Figure 30</u> : Différents types de vecteurs de protéine non-viraux ⁶³	63
<u>Figure 31</u> : Cycle de synthèse par la méthode des phosphoramidites ¹¹⁵	65
<u>Figure 32</u> : Mécanisme de la mise au silence d'un gène par CRISPR-Cas9 ¹²²	67
<u>Figure 33</u> : Mécanisme d'édition d'un gène par CRISPR-Cas9 via HDR ¹²²	68
<u>Figure 34</u> : Fonctionnement du système SAM dans CRISPRa ¹²²	69
<u>Figure 35</u> : Acheminement de Cas9 et de son ARNg dans la cellule ¹²²	70
<u>Figure 36</u> : Architecture plasmidique ¹²⁷	71
<u>Figure 37</u> : Structure d'un plasmide ciblant un seul gène ¹²⁸	73
<u>Figure 38</u> : Structure d'un plasmide ciblant plusieurs gènes ¹²⁹	74
<u>Figure 39</u> : Mode de délivrance Cas9-gRNA sous forme de RNP ¹³³	75
<u>Figure 40</u> : Fonctionnement de la recombinaise Cre ¹³⁷	76
<u>Figure 41</u> : Arbre phylogénétique des orthologues de Cas9 reconstitué à partir de la sélection des séquences multiples d'orthologues alignés ¹⁷⁵	88
<u>Figure 42</u> : Schéma représentatif de la structure du pre-crRNA.	88
<u>Figure 43</u> : Modèle de ciblage de l'ADN par Cas9 et clivage ¹⁷⁷	89
<u>Figure 44</u> : Illustration d'une paire de cassure simple brin décalée ¹⁸¹	90
<u>Figure 45</u> : Illustration d'une paire de cassure simple brin décalée avec fusion FokI ¹⁸³	90
<u>Figure 46</u> : Illustration de la cascade métabolique ²²³	100
<u>Figure 47</u> : Schéma du protocole du traitement de la drépanocytose par CRISPR-Cas9 ²²⁹	104
<u>Figure 48</u> : Schématisation de la mutation du canal CFTR ²³¹	107

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Exemples du rapport des bases azotées par espèces ¹²	37
<u>Tableau 2</u> : Code génétique ²²	40
<u>Tableau 3</u> : Principaux groupes de vecteurs viraux et leurs caractéristiques (Tableau personnel)	55
<u>Tableau 4</u> : Composants plasmidiques minimum ¹²⁷	72
<u>Tableau 5</u> : Principaux systèmes d'expression dans l'utilisation de CRISPR ¹⁴⁰	78

Lexique

AA : Acide Aminé	NHEJ : Non-Homologue End-Joining
AAV : Adeno-Associated Viral vector	NLS : Signal de Localisation Nucléaire
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique	NmCas9 : <i>Neisseria meningitides</i> Cas9
ARN : Acide Ribo Nucléique	Nt : Nucléotide
ARNm : ARN messenger	OGM : Organisme Génétiquement Modifié
ARNt : ARN de transfert	PAM : Protospacer Adjacent Motif
Cas9 : CRISPR associated protein 9	PCR : Polymerase Chain Reaction
CFD : Détermination de la fréquence de coupure	pDNA : ADN sous forme plasmidique
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène	PEG : Polyéthylène glycol
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	PEI : Polyéthylénimine
CRISPRa : CRISPR activateur	PID : Domaine d'interaction avec PAM
CRISPRi : CRISPR interférence	RNase : Protéase de l'ARN
crRNA : Courte séquence Répétée d'ARN	RNP : Ribo-nucléo-protéine
DNase : Protéase de l'ADN	SaCas9: <i>Staphylococcus aureus</i> Cas9
dsDNA : ADN double brin	SAM : Système d'Activation de la Transcription
dsDNA : Double-Stranded DNA	sgRNA : Synthetic Guide ARN
<i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i>	SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
EMA : European Medicines Agency	Souche R : souche Rough
FDA : Food and Drug Administration	Souche S : souche Smooth
GFAP : Glial fibrillary acidic protein	SpCas9: Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>
GM : Génétiquement Modifié	SpCas9-HF : SpCas9 Haute Fidélité
gp120, gp41 : Glycoprotéine 120, glycoprotéine 41	ssDNA : ADN simple brin
gRNA : ARN guide	ssDNA : Single-Stranded DNA
HbF : Hémoglobine fœtale	StCas9 : <i>Streptococcus thermophilus</i> Cas9
HDR : Homology Directed Repair	TALE : Transcription Activator Like Effector
HSV : Herpes Simplex Virus	TALEN : Transcription Activator Like Effector Nuclease
iPS : induced Pluripotent Stemcell	TdT: Désoxynucléotidyl transférase terminale
M : 2'-O-methyl	tracrRNA : Trans activating RNA
MEND : Multifunctional Enveloppe-type Nanodevice	VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
MS : 2'-O-methyl 3' phosphorothioate	WT : Wildtype
MSP : 2'-O-methyl 3' thioPACE	wtCas9 : Cas9 de type sauvage
	ZFN : Zinc Finger Nuclease

INTRODUCTION

Le XXI^{ème} siècle sera le siècle d'une des révolutions qui bouleversera le plus durablement l'humanité.

James Watson et Francis Crick découvraient en 1953 la structure de l'ADN¹, 34 ans plus tard, au décours de travaux de recherches fondamentales sur la bactérie *Escherichia coli*, un groupe de chercheurs japonais faisait la découverte de ces « courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées » qu'ils ne tardèrent pas à nommer « CRISPR »². Les prémices d'une des découvertes majeures de notre époque étaient nées. Vingt ans passèrent, quand en 2012, Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, en s'inspirant de la réaction immunitaire bactérienne déployée contre les infections virales, mirent au point cette biotechnologie qui fut baptisée : CRISPR-Cas³.

Ce « ciseau moléculaire », comme certains auteurs aiment à l'appeler, s'avance comme une solution de choix pour lutter contre le mal du siècle, le cancer. L'oncologie et la biologie qui la définit, ces mutations qui conduisent à la dérégulation de la prolifération d'une cellule sont, par essence, candidates à être les cibles de ce ciseau.

Ce travail abordera didactiquement d'abord les fondements sur lesquels se base ce concept : l'ADN, le virus, la conception du brin de matériel génétique à intégrer, puis, le fonctionnement même de la méthode. Un état des lieux sera alors dressé, CRISPR-Cas9 en 2019, d'abord les points d'optimisation de la méthode, ces cibles potentielles, et les essais cliniques en cours. Enfin, les perspectives en oncologie où seront redéfinies, les cibles du ciseau moléculaire potentielles, les applications qui en découlent, et pour terminer, les essais cliniques associés.

I. HIER

Chaque organisme vivant sur Terre doit à sa descendance l'hérédité du patrimoine génétique qui lui transmet. Ce patrimoine génétique est principalement représenté par l'A.D.N., l'acide désoxyribonucléique.

I.1 ADN

I.1.1 De la découverte de l'ADN à son édition

I.1.1.1 Frederick Griffith découvre le phénomène de transformation bactérienne

Suite à l'épidémie de grippe mortelle qui survint en 1918, les gouvernements de nombreux pays entreprennent des recherches afin de développer des vaccins contre ce fléau. En 1928, Frederick Griffith rapporte, à la suite d'une expérience qu'il entreprend sur deux souches de pneumocoques *Diplococcus pneumoniae*, l'identification du support de l'hérédité par le phénomène de la transformation bactérienne ⁴.

En effet, ce chercheur anglais décrit deux souches de pneumocoques, une première souche R – pour « Rough » : rugueux, du fait de son aspect lors de sa mise en culture sur boîte de Petri – et une souche S – pour « Smooth » : d'aspect lisse. Cette dernière doit son aspect à la synthèse d'une capsule polysaccharidique qui la protège, et qui conduit à la mort des souris lorsqu'elles en sont infectées. Alors que la souche R qui ne la synthétise pas ne présente pas de pathogénicité lorsqu'elle est injectée aux souris. La différenciation qui se fait entre ces deux souches vient d'une mutation du gène codant pour l'enzyme à l'origine de la synthèse de la capsule.

Griffith, dans son expérience injecte dans un premier temps des bactéries de souches S après les avoir tuées par la chaleur ; ces dernières ne sont alors plus létales pour la souris. Lorsqu'il injecte à la fois les bactéries S tuées avec les bactéries R vivantes, la souris meurt (Figure 1). Il en conclut donc que les bactéries S ont transmis un caractère pathogène aux bactéries R qu'elles ne développaient pas avant. Ce phénomène fut nommé « Principe de Transformation bactérienne ».

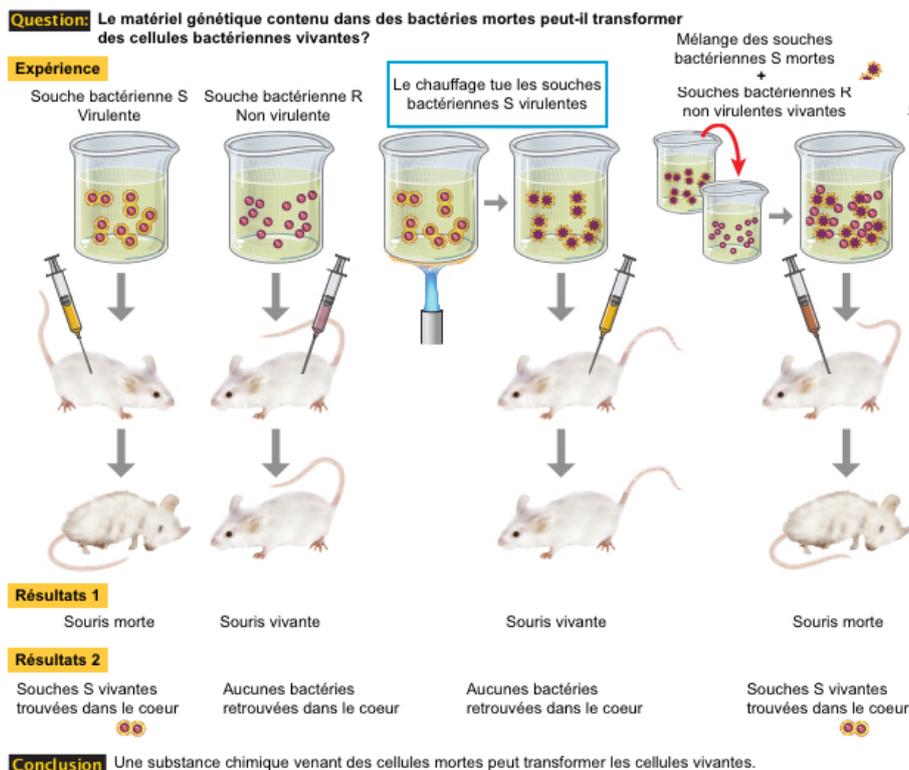


Figure 1 : Protocole de l'expérience de Griffith (1928)⁵

De plus, il existe différentes souches de pneumocoques, type I, II, et III différenciables au point de vue phénotypique. En se basant sur ces différences fonctionnelles et morphologiques, l'expérience se poursuit par l'injection d'une souche R de type III avec une souche S de type II inactivée qui conduit à la mort de la souris. Lorsque l'on isole la souche virulente, on découvre que la souche responsable est toujours la souche de type II. On en conclue donc que ce changement est stable et définitif.

L'apport de cette expérience illustrant une action biologique, permet d'avancer l'idée qu'il existe dans les cellules un facteur transformant qui serait libéré à la suite d'un stress thermique, susceptible d'être intégré par d'autres cellules, leurs permettant d'acquérir de nouvelles propriétés génétiques de manière héréditaire.

1.1.1.2 L'ADN identifié comme le « Principe transformant »

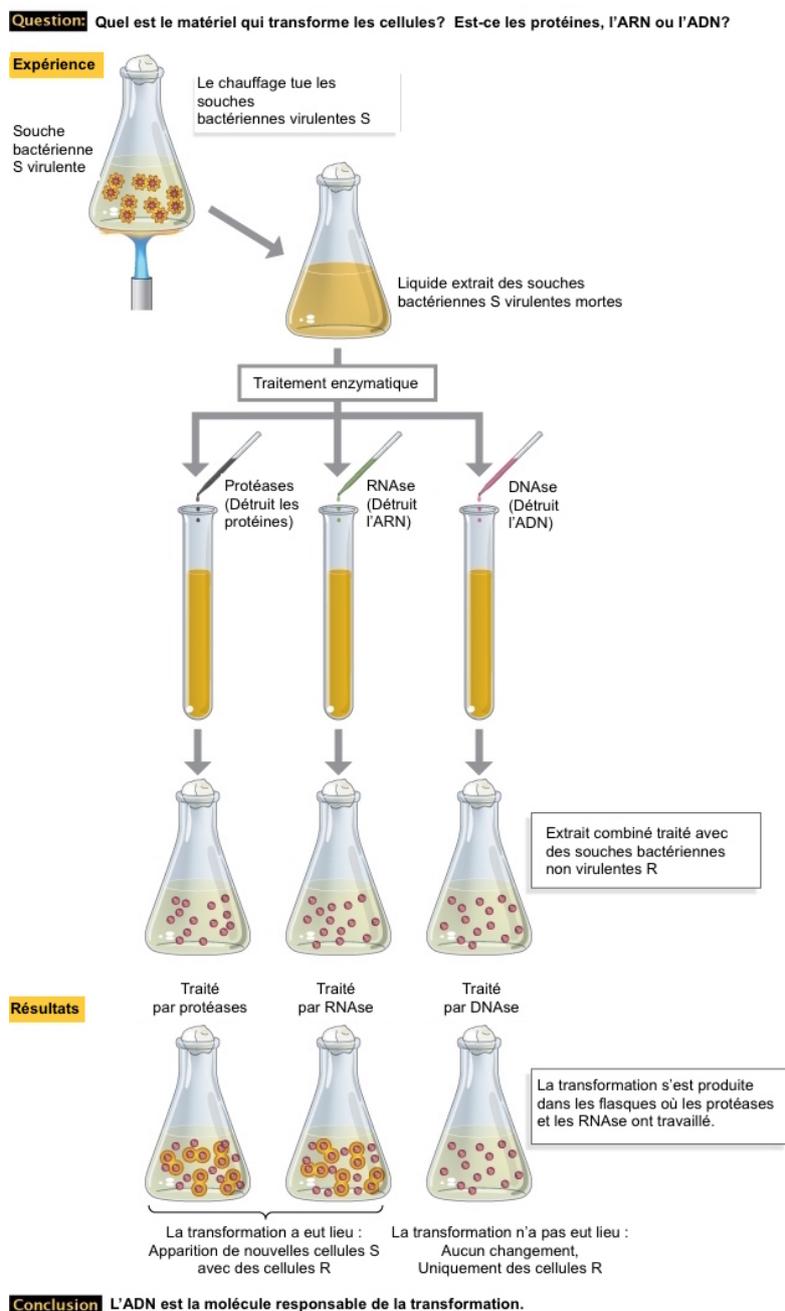


Figure 2: Quelle est la nature du facteur transformant des cellules ? ADN, ARN, protéines ⁵

En 1944, Oswald Avery réussit à caractériser le phénomène biologique responsable de ce facteur transformant que Griffith avait mis en évidence ; il caractérise pour la première fois de l'histoire l'ADN, l'acide désoxyribonucléique⁶. En effet, il observe que le simple fait d'extraire l'ADN d'une souche S et de la transférer à une souche R permet de la rendre virulente. Le processus qui opère alors à l'intérieur de la cellule, est l'intégration de fragment d'ADN (fragmenté notamment par la cytolysse provoquée par le stress thermique) de la souche S préalablement tuée qui concourt à la transformation des bactéries R. En effet, les fragments d'ADN ont cette capacité de s'intégrer spécifiquement par homologie de séquence dans les chromosomes au niveau des mêmes régions. Avery et son équipe étayent par la suite leur théorie en écartant l'éventualité que le facteur transformant puisse être une protéine ou de l'ARN ; réalisant séquentiellement l'expérience avec une DNase, une RNase, et une protéase, seule la DNase conduit à une non-virulence de la souche, ce qui a donc confirmé que le facteur transformant n'était pas de nature protéique ou à base d'ARN, mais d'ADN (Figure 2).

1.1.1.3 Hershey et Chase, la protéine n'est pas le support de l'hérédité

Le Groupe du Phage, groupe informel de recherche en biologie moléculaire regroupé autour de Max Delbrück et de nombreux scientifiques dont Alfred Hershey, travailla au milieu du XX^{ème} siècle sur la compréhension de la génétique bactérienne. Ils montrent, en 1944, l'apparition de mutations chez plusieurs souches bactériennes notamment par la lyse de région d'ADN suite à l'infection par des phages⁷. L'intérêt de l'étude basée sur les effets de l'infection par un phage s'appuie sur la rapidité de répliation de ce virus qui provoque, en seulement un cycle répliatif, l'éclatement de sa cellule hôte. Au microscope électronique, la structure des phages se révèle par une tête icosaédrique, un corps cylindrique et des prolongements simples qui permettent l'attachement sur la bactérie (Figure 3).

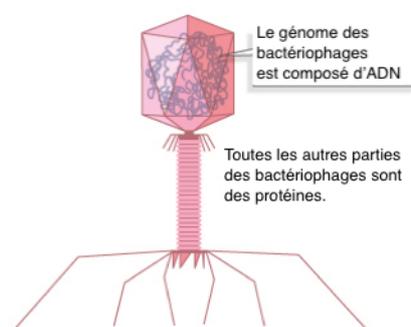


Figure 3: Structure d'un phage⁵

C'est Hershey qui parvient alors à reconnaître les phénomènes de recombinaison qui surviennent chez les phages en expérimentant l'infection d'une même bactérie par deux phages différents portant chacun une mutation distincte. Les résultats qui en découlent le conduisent à deux éventualités, avec l'apparition de phages recombinants qui portent, soit les deux mutations, soit aucune d'entre elles⁷ (Figure 4).

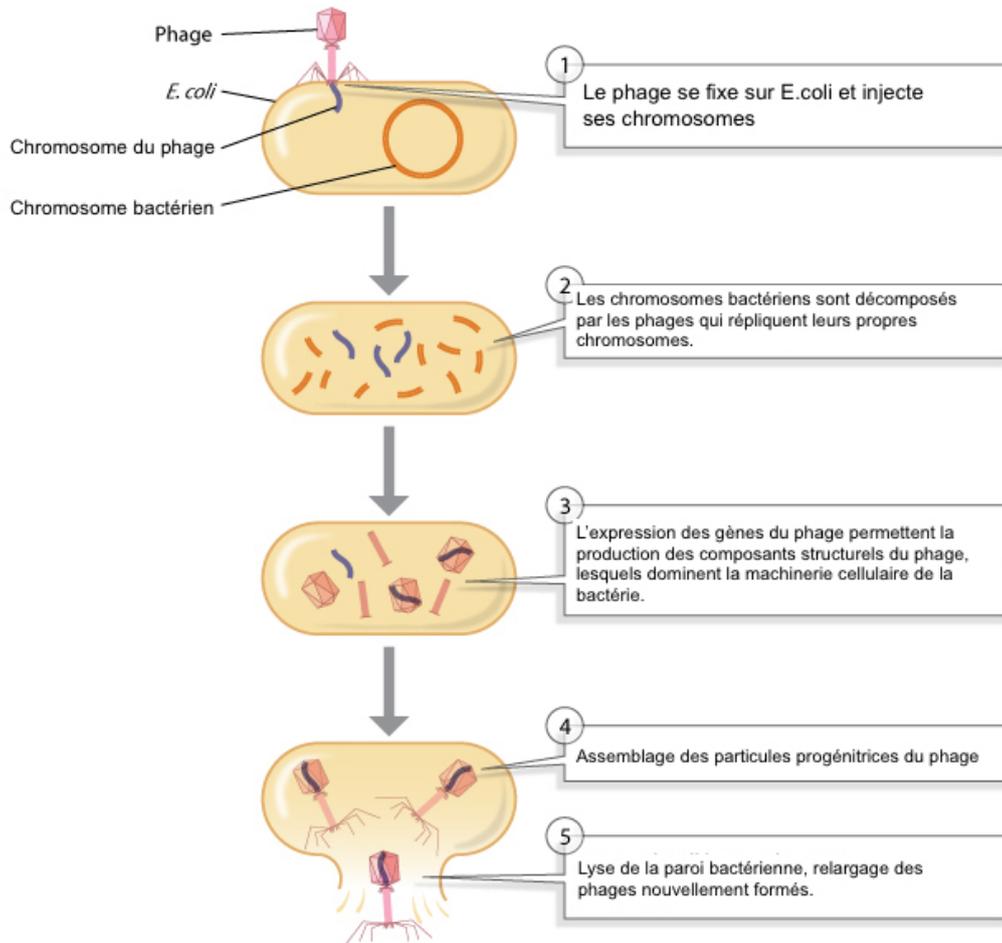


Figure 4 : Un phage infectant *Escherichia coli*⁵

Afin d'étayer cette découverte, les études du scientifique le poussent à étudier, avec Martha Chase, le rôle des constituants d'un phage, en particulier le bactériophage T2 – qui est un virus infectant spécifiquement la bactérie *E. coli* – dans la transmission de l'information génétique. Pour cela, l'emploi d'isotopes radioactifs que sont le phosphore radioactif ³²P (qui entre dans la composition de l'ADN), et le soufre radioactif ³⁵S (qui compose les protéines de la capsid bactérienne) permettent un marquage spécifique de ces composants et mesurable lors des réactions conduisant à l'infection d'une bactérie par ce virus.

A la suite de l'infection, il est possible de séparer par une méthode de centrifugation sur gradient différentiel, d'une part les bactéries infectées par les phages, de ces derniers. Mais également les particules phagiques des bactéries à l'aide d'une simple centrifugation. Après sédimentation, les cellules infectées se retrouvent dans le fond du tube où l'on mesure la plus grande intensité des radio-isotopes du phosphore, et qui, lorsqu'on remet en culture, ces cellules sont retrouvées dans les virions de phages et donc ont permis la réplication virale.

A contrario, le surnageant qui contient les débris de phages infectants est lui, plus marqué par les radio-isotopes du soufre ; ces débris protéiques donc, quant à eux ne pouvant pas conduire à la transmission et à la réplication des phages. Pour autant, ils n'en déduisirent pas que l'ADN était le matériel biologique support de l'hérédité mais qu'il avait une fonction dans la réplication ; tandis que les protéines qui forment la capsid protégeant le phage n'avaient qu'une fonction protectrice et un rôle dans le pouvoir infectant du virus notamment par la médiation de l'attachement aux bactéries⁸.

1.1.1.4 L'ADN comme support de l'hérédité

L'ADN tarde à être reconnu comme le support de l'hérédité, au départ le concept le plus largement répandu désigne la structure de l'ADN comme une molécule simple, régulière et monotone. C'est notamment Phoebus Levene qui décrit l'enchaînement répétitif de quatre bases azotées et la présence de désoxyribose dans sa structure (Figure 5) ⁹.

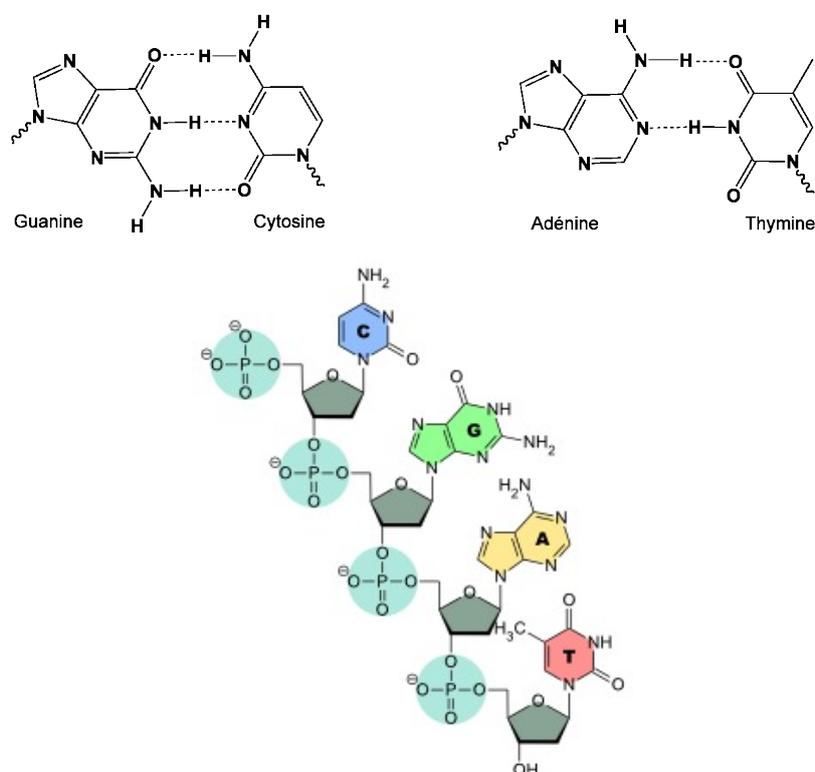


Figure 5 : Bases azotées de l'ADN¹⁰

Par la suite, dans les années 50, Erwin Chargaff, grâce aux avancées de la chromatographie sur papier, entame des travaux sur les bases azotées de l'ADN¹¹. Il découvre alors un rapport d'appariement entre deux paires de base qu'il ne tarde à associer : l'adénine / la thymine, et la cytosine / la guanine que l'on écrit A/T et C/G. Il montre ainsi que le rapport :

- Purine / Pyrimidine = $(A+G)/(C+T) = 1$ et $A/T=1$, $G/C=1$ quelle que soit l'espèce
- $(A+T)/(C+G)$ est variable selon les espèces, mais constant pour tous les membres d'une espèce donnée, il caractérise ainsi l'espèce (Tableau 1).

Par exemple :

Origine de l'ADN	A	G	C	T	A/T	G/C	(A+T)/(C+G)
Thymus de bovin	28,2	21,5	21,2	27,8	1,01	0,96	1,3
Rate bovine	27,9	22,7	20,8	27,3	1,02	1,02	1,25
Sperme bovin	28,7	22,2	20,7	27,2	1,05	1,01	1,26

Tableau 1 : Exemples du rapport des bases azotées par espèces¹²

Il en déduit que l'ADN est une molécule polymérique, qui n'est plus monotone comme l'avancé Levene, mais qui occupe une place centrale dans les mécanismes héréditaires et est capable de contenir de l'information¹³. Il publie par la suite que le rapport entre ces bases azotées est identique quelles que soient les espèces qu'il étudie, cette nouvelle observation sera le fondement sur lequel se basera Watson et Crick dans l'élaboration du modèle de la structure de l'ADN¹⁴.

1.1.1.5 L'élaboration du modèle de la structure de l'ADN

En 1951, Rosalind Franklin après, avoir réalisé un bombardement de rayons X sur un échantillon concentré d'ADN extrait du thymus de veau observe une structure organisée de l'ADN. A la suite de cette expérience, de nouveaux clichés sont pris afin d'étudier la diffraction des rayons, qui plus tard, conduira Watson et Crick à proposer le modèle de double hélice d'ADN (Figure 6).

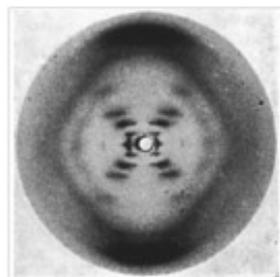


Figure 6 : Cliché en croix obtenu à partir d'un bombardement de rayon X sur un amas d'ADN ¹

C'est en 1953 que Watson et Crick découvrent la structure en double hélice de l'ADN¹. Leurs connaissances sur cette molécule commencent à s'étayer :

- l'ADN est composé de désoxyribose, de base azotées et de groupements phosphate
- les bases azotées ont des rapports identiques : A/T C/G suite aux travaux de Chargaff
- avec les progrès de la microscopie électronique, le diamètre de la molécule d'ADN est de 20Å, ce qui laissait suggérer que la molécule comportait deux chaînes de désoxyribose-phosphate.

C'est en se basant sur ces acquis, couplés aux données biochimiques et cristallographiques, qu'ils concluent à une hélice double brins dont les groupements phosphates et désoxyribose sont opposés. Sur les sucres, sont fixées les bases azotées s'opposant symétriquement grâce aux liaisons hydrogène qui les maintiennent en vis-à-vis et bloquent la structure en double hélice dextre anti-parallèle. A chaque thymine s'oppose une adénine, et à chaque cytosine une guanine ; elles se lient entre elles réciproquement par 2 et 3 liaisons hydrogène (Figure 7). Les deux brins sont alors qualifiés de complémentaires. En 1962, Crick, Watson et Wilkins reçurent le prix Nobel pour cette avancée majeure du XX^{ème} siècle.

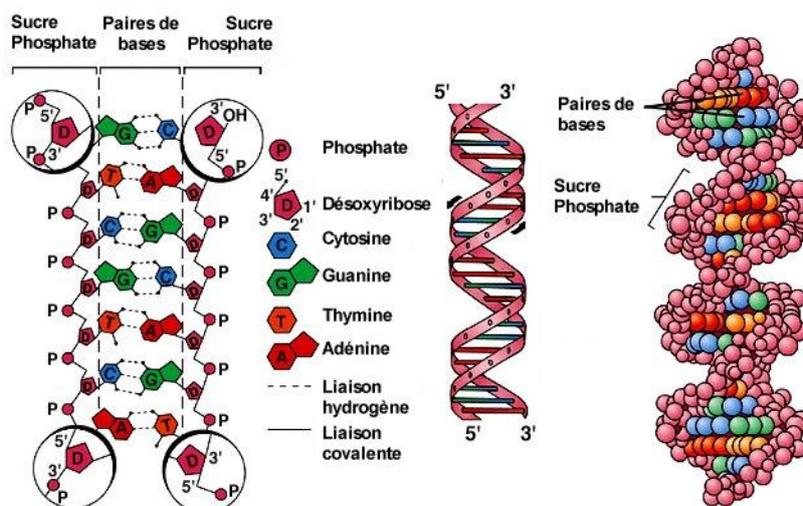


Figure 7 : Structure en double hélice de l'ADN¹⁵

Lorsque l'on s'intéresse à la sémantique du code génétique, la structure du support de l'hérédité offre une multitude de séquences possibles, 4^n possibilités pour n bases. En se basant sur cette possibilité, et en recoupant ceci avec la connaissance du code génétique, l'enchaînement des nucléotides détermine celui des acides aminés lui-même déterminant la structure de la protéine codée ; tout cela à la suite de deux phénomènes cellulaires majeurs, la transcription, puis la traduction. A partir de la structure à une dimension qu'est l'ADN, ce processus conduit à la synthèse de structure à 3 dimensions – régies par les lois de la thermodynamique – les protéines, dont la forme détermine la fonction¹⁶ (Figure 8).

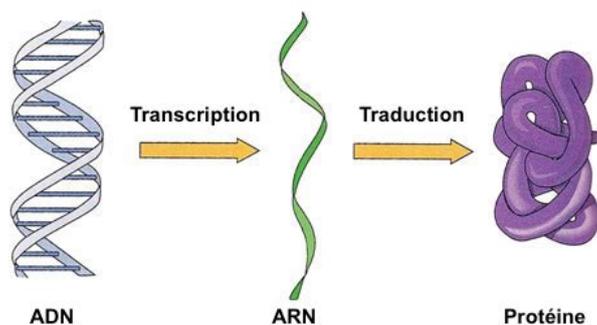


Figure 8 : Schéma de la synthèse d'une protéine à partir d'un brin d'ADN¹⁷

En 1940, l'équipe du Phage, derrière Delbrück et Pauling, avait avancé l'idée d'une propriété d'auto-réplication de l'ADN, effectuée par une structure intermédiaire, qui réaliserait un négatif dont le moule produirait une structure identique à son image¹⁸. Cette théorie est révisée par Watson et Crick qui mentionnent dans leur publication¹⁶ la possibilité d'un mécanisme de réplication du matériel génétique basé sur la conservation de l'enchaînement des bases azotées. Cet appariement complémentaire des bases azotées de l'ADN soutient l'idée que l'ADN pourrait être à la fois matrice et participant pour la constitution de deux nouvelles molécules d'ADN suite à la séparation du double brin formant l'hélice. Chaque brin devenant alors matrice pour la synthèse du brin complémentaire. Ainsi, ce processus de réplication aboutit à la formation de deux nouvelles molécules d'ADN identiques entre elles, et identiques à la molécule initiale selon un modèle semi conservatif (Figure 9).

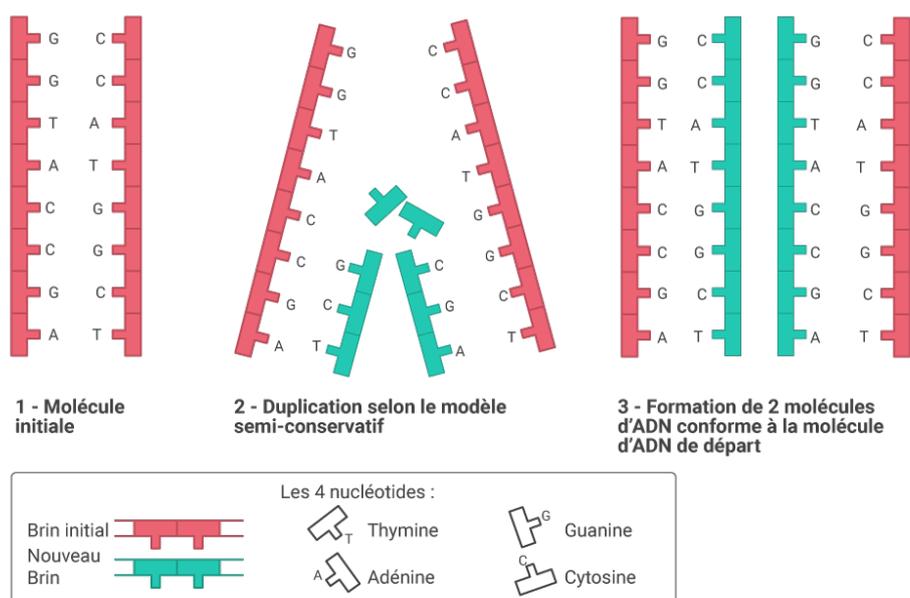


Figure 9 : Schéma du processus de réplication de l'ADN¹⁹

I.1.1.6 L'élucidation du Code Génétique

En 1960, Marshall Nirenberg et Heinrich Mathaei découvrent, à la suite d'une étude sur *Escherichia coli* dans laquelle ils incorporent de la Valine marquée au carbone 14 (^{14}C) dans une protéine à production rapide, que la synthèse de la protéine était alors énergie dépendant stimulée par l'ajout d'un mélange d'acide aminé (énantiomère L), mais fortement inhibée par la présence de RNase, de puromycine (antibiotique nucléosidique) et de chloramphénicol²⁰. Ce modèle permit de montrer que ce système de synthèse d'une protéine était requérant d'un brin d'ARN comme modèle, d'acide aminé à incorporer, et de ribosomes. Aussi, ils découvrirent que ce système pouvait être déclenché aussi bien par un brin d'ARN synthétisé *de novo* que par un brin naturel. C'est ainsi qu'à partir de polynucléotides synthétiques (ARN) qui contenaient donc le code génétique nécessaire à la synthèse d'une protéine, ils purent déterminer à quelle séquence était associé un acide aminé. A la suite de cette découverte, l'enchaînement de 3 bases d'ARN, c'est-à-dire de trois nucléosides (base azotée – sucre, et non nucléotides qui correspond à l'enchaînement base azotée – sucre – groupement phosphate) appelé codon, correspondait un acide aminé. Dans les cellules eucaryotes, la machinerie cellulaire responsable de la synthèse des protéines utilise 21 acides aminés dont 8 essentiels (non synthétisables par l'Homme) ; chacun d'entre eux est codé par un codon, mais plusieurs codons différents sont associés à un même acide aminé, c'est pourquoi le code génétique est dit dégénéré (Tableau 2). De plus, il existe 3 codons stop qui, lorsqu'ils sont reconnus par le ribosome, entraînent l'arrêt de la lecture du brin d'ARN, et donc l'arrêt de la synthèse de la protéine²¹.

le code génétique										
		Deuxième lettre						ik		
		U		C		A		G		
Première lettre (côté 5')	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Stop	UGA	Stop	A
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Stop	UGG	Trp	G
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G
		codon d'initiation			codon de terminaison					

Tableau 2 : Code génétique²²

I.1.2 L'édition du génome

Avec l'expansion de la connaissance sur le génome et les lois empiriques qui le déterminent, de nouvelles perspectives se profilent. Sans connaître l'intégrité du sens du génome, un certain nombre de chercheurs empruntèrent ce chemin de traverse qu'est l'édition du génome.

I.1.2.1 Une construction empirique

I.1.2.1.1 Historique

I.1.2.1.1.1 Transgénèse

A la suite des travaux de Marshall Nirenberg qui démontrait l'universalité de la molécule d'ADN, ce dernier se basant sur ce principe établi qu'un gène d'une espèce codant pour un phénotype pouvait être intégré dans le génome d'une autre espèce et exprimer ce même phénotype. A l'époque cette projection semblait irréaliste, mais laissait entrevoir d'immenses possibilités telle une boîte de Pandore dans le monde de la génétique. En 1965, la découverte des enzymes de

restriction, qui clivent sélectivement des brins d'ADN aux niveaux de sites spécifiques permettent aux chercheurs de cartographier le génome, mais également leurs donne la possibilité de développer le génie génétique à la base de la transgénèse en créant des ADN recombinants.

La transgénèse naît donc dans les années 1970, et marque la création des premiers organismes génétiquement modifiés : les OGM. En 1973, la première transgénèse est réalisée par l'équipe de Stanley Norman Cohen et de Paul Berg, elle consiste alors à un transfert d'un gène d'amphibien africain dans l'ADN d'une bactérie *Escherichia coli*²³ afin de montrer l'acquisition d'une résistance à deux antibiotiques que sont la tétracycline et la kanamycine.

Par la suite, les travaux se multipliant, en 1978 le gène codant pour l'insuline humaine est introduit dans le génome de cette bactérie qu'est *Escherichia coli* GM (Génétiquement Modifiée) qui se met alors à produire de l'insuline humaine. Aujourd'hui encore, cette insuline est utilisée dans le traitement du diabète ²⁴.

I.1.2.1.1.2 Edition de l'ARN

A la suite de la transgénèse, les chercheurs ont découvert en 1986 au niveau de l'expression du génome mitochondrial de *Trypanosoma brucei* que les cellules elles-mêmes étaient capables de modifier l'ARN (RNA editing) par un processus de correction afin de lutter contre des altérations de types insertions / délétions (InDel) post-traductionnelles de bases ou des modifications de bases par désamination de telle sorte que la séquence d'ARNm ne corresponde plus à la séquence génomique d'ADN codant ²⁵. La séquence des bases azotées conduisant à un changement de codon, donc soit à un codon d'initiation ou de terminaison de la traduction (changeant alors le cadre de lecture), soit à un changement d'acide aminé (Figure 10). Ainsi, comme cela a été établi, la transmission linéaire de l'information conduit directement à la synthèse des protéines. Cette édition de l'ARN a finalement été mise en évidence dans de nombreux organismes eucaryotes dont l'homme mais également chez certains virus comme celui de la rougeole, de l'hépatite δ et du virus Ebola.

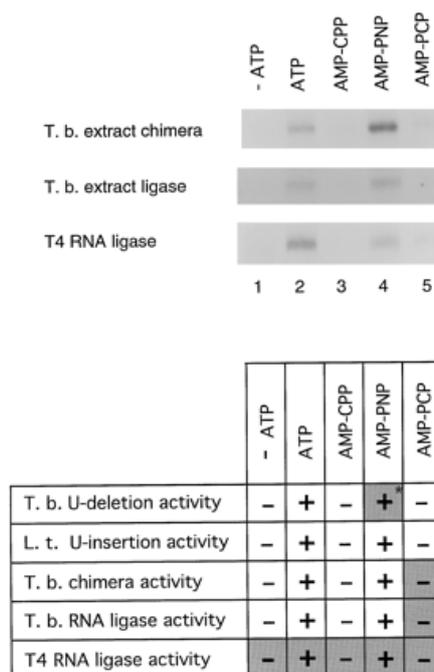


Figure 10 : Utilisation d'analogues de l'ATP pour la mise en évidence d'activités d'editing-like²⁵

I.1.2.1.1.3 Edition de l'ADN

Ces mêmes mécanismes ont également été découverts dans l'ADN notamment chez l'homme où une famille d'enzymes qu'est l'APOBEC3 peut éditer le génome par désamination aussi bien sur l'ADN que sur l'ARN²⁶. Ces enzymes ont donc des propriétés mutagènes mais elles sont finement régulées par l'organisme afin de produire un mécanisme de défense cellulaire contre l'insertion irrégulière de gènes exogènes dans le génome. Ces enzymes sont également appuyées dans leur fonctionnement par des protéines qui permettent de cibler spécifiquement la position où la protéine devra agir sur l'ADN, ceci formant alors l'éditosome²⁷.

I.1.2.1.2 Principe et enjeux

L'édition du génome consiste en l'insertion, la délétion ou le remplacement d'un ou plusieurs brins d'ADN à l'aide de techniques de génie génétique. Pour cela, sont utilisées des protéines particulières capables de cliver le génome que sont les nucléases également appelées enzymes de restriction ou ciseaux moléculaires. L'enjeu de ces outils est de cliver spécifiquement un endroit du double brin d'ADN afin de permettre un mécanisme de réparation de la cellule mais également la recombinaison avec d'autres brins. Des mécanismes au sein même de la cellule permettent donc l'autoréparation de la molécule d'ADN, mais également la possibilité d'une réorganisation des gènes du brin.

Les deux mécanismes alors engagés sont donc : la recombinaison homologue, où les séquences d'ADN sont échangées entre molécule d'ADN identiques, et un mécanisme non-conservatif qu'est la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) qui conduit à la création de nouvelles séquences différentes de la séquence initiale, ce mécanisme par son mode de fonctionnement est donc sujet à créer des mutations ²⁸.

I.1.2.2 Les précédentes technologies d'édition du génome

Basés sur cette théorie, quatre groupes de nucléases ont été développés afin de modifier le génome : les méganucléases, les nucléases de type activateur de transcription (TALEN), les nucléases à doigts de zinc, et les CRISPR-Cas 9.

I.1.2.2.1 Méganucléases

Certains archaea, bactéries, phages, champignons unicellulaires, levures et algues produisent des enzymes cytotoxiques également appelés endodésoxyribonucléases qui vont avoir la capacité de reconnaître des séquences d'ADN double-brin de grande taille (12 à 40 paires de bases) qui sont donc très souvent uniques dans le génome, ce qui rend donc l'action de ces enzymes spécifiques.

Il existe principalement deux familles d'endonucléases de homing²⁹, les endonucléases introniques et les intéines. Ces endonucléases ont donc cette fonction de ciseaux moléculaires de l'ADN, ils sont capables de remplacer, supprimer ou modifier une séquence de façon spécifique, mais afin de modifier la séquence ciblée par cette enzyme il est possible de modifier le site de reconnaissance par génie génétique.

Ces ciseaux moléculaires sont codés par des introns ou des intéines (portion non codante d'un gène) qui sont mobiles dans le génome mais sont intégratifs à des endroits précis du génome qui permet de casser l'allèle complémentaire (qui ne contient pas cette partie mobile) à l'aide de la méganucléase exprimée (Figure 11). Pour certains introns et les intéines, la cassure induite permet la duplication de la partie mobile grâce à un mécanisme de recombinaison homologue de l'ADN double brin. Ceci permet donc l'intégration éventuelle d'une séquence déterminée.

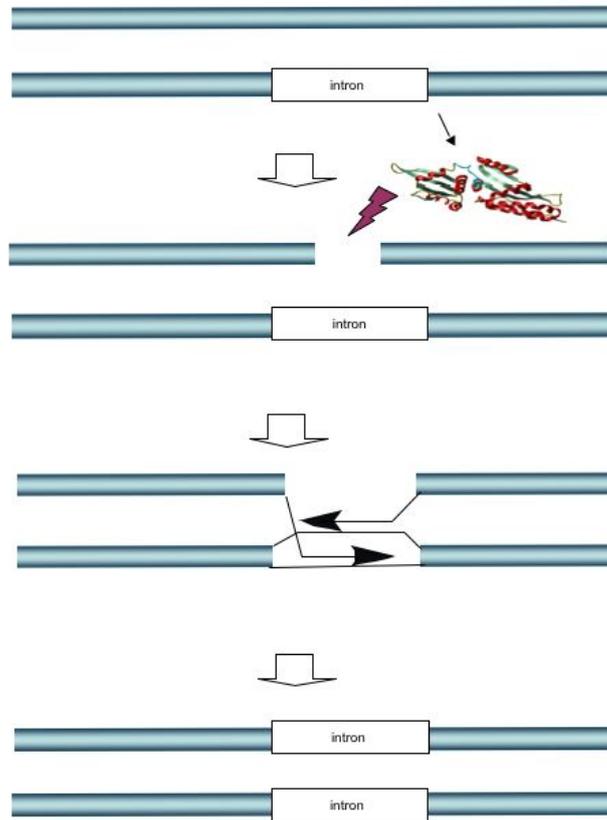


Figure 11 : Mécanisme de fonctionnement des méganucléases de homing²⁹

1.1.2.2.2 Protéine TALEN

Les Transcription Activator Like Effector Nucleases, c'est à dire des nucléases effectrices de type activateur de transcription ont été décrit à partir de 2009 comme des enzymes de restrictions artificielles produites par la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN aussi appelé TALE (Transcription Activator Like Effector) avec un domaine capable de cliver la molécule d'ADN³⁰. Ces nucléases reprogrammées se basent sur l'endonuclease Fok1 afin de produire des enzymes hybrides capables d'augmenter l'efficacité et la spécificité du clivage du double brin d'ADN. Le TALE qui représente donc le domaine de liaison à l'ADN est constitué de 33 ou 34 acides aminés (AA) identiques exception faite du 12^{ème} et du 13^{ème} qui sont variables et spécifiques dans le mécanisme de reconnaissance d'un nucléotide³¹. Ils sont donc par leurs enchainements à l'origine de la création des domaines spécifiques de liaison à l'ADN. La synthèse de cette protéine particulière résulte de l'assemblage des oligonucléotides réalisé après deux étapes de PCR suivies d'une amplification de tout le gène. Une fois l'assemblage des gènes codant pour le TALEN effectué, ils sont insérés dans une structure mobile capable de transférer du matériel génétique à une cellule qu'est un plasmide. Une fois dans cette dernière, l'ADN sera traduit et les TALEN seront donc capables de réaliser une cassure double brin de l'ADN. Suivant cette action, la cellule va entreprendre des mécanismes de réparation notamment par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ), c'est à dire par reconnexion des deux extrémités provoquée par la cassure lorsqu'aucune séquence complémentaire n'est disponible pour la synthèse de la réparation. Ce type de mécanisme est donc le siège de potentielles mutations liées à une insertion ou une délétion, ce qui implique donc la nécessité d'une réflexion lors de la création du TALEN et la vérification par PCR, suite à la formation d'un hétéroduplex, des potentielles différences entre deux allèles.

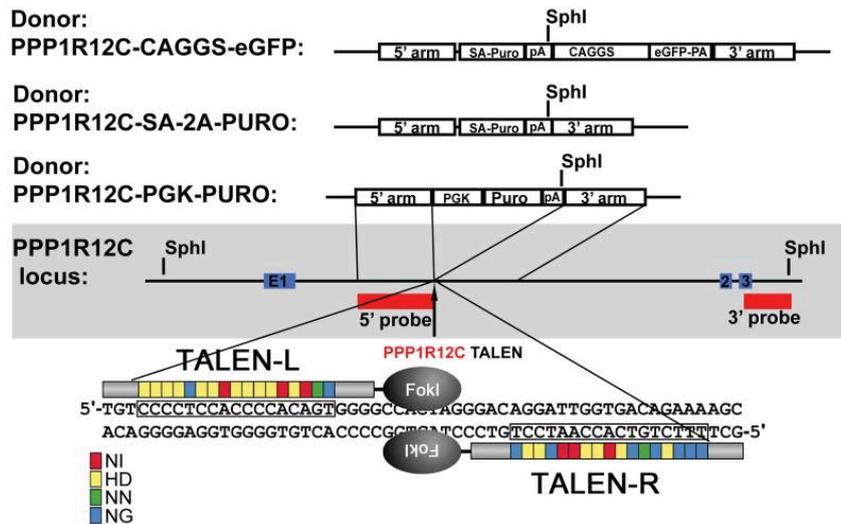


Figure 12 : Schéma représentant le mécanisme de reconnaissance employé par les TALEN³²

Basé sur ce principe, les TALEN peuvent permettre de réaliser l'insertion d'un génome étranger dans une cellule hôte à partir de l'introduction d'ADN étranger au niveau du site de la cassure qui sera utilisé comme modèle par les mécanismes de réparations intrinsèques. Aujourd'hui cette technique a permis de générer des iPS (induced Pluripotent Stemcell) et de modifier des cellules souches embryonnaires humaines (Figure 12) ³².

Néanmoins, cette technique a quelques limites notamment liées au fait d'un manque de spécificité au niveau des sites de reconnaissance ce qui entraîne des clivages non voulus pouvant également conduire à la mort de la cellule si ces derniers entraînent des réarrangements chromosomiques majeurs.

1.1.2.2.3 Zinc Finger nuclease

Les Zinc Finger Nuclease ou ZFN sont des protéines constituées d'un domaine de liaison en doigt de zinc et d'un domaine de clivage de l'ADN notamment via l'endoprotéase Fok I comme chez les TALEN. Il est possible de concevoir le domaine de reconnaissance du doigt de zinc afin qu'elle ne reconnaisse qu'une seule séquence dans le génome. Chaque doigt de zinc a la capacité de reconnaître trois paires de bases, on utilise donc généralement trois ZFN afin d'augmenter la spécificité du domaine de reconnaissance. De plus, afin que la coupure de l'ADN soit double brin, il est nécessaire qu'une paire de ZFN se dimérise au niveau du domaine de clivage par leurs extrémités C-terminales. Les séquences de liaisons entre le domaine en doigt de zinc et le domaine de clivage nécessite un espacement des extrémités 5' de chaque domaine de liaison de 5 à 7 paires de bases ³³.

Par la suite, cette technique exploite le mécanisme de réparation endogène de l'ADN ce qui peut donc conduire à différentes possibilités tel que la délétion d'un gène, l'intégration d'un gène mais également des réparations par jonctions d'extrémités homologues ou non homologues (NHEJ). Mais à la suite de ce clivage double brin, il est possible d'insérer à l'intérieur de la cellule un brin d'ADN exogène qui servira de modèle pour l'intégration et la synthèse d'un bras complémentaire à la place du brin clivé (Figure 13).

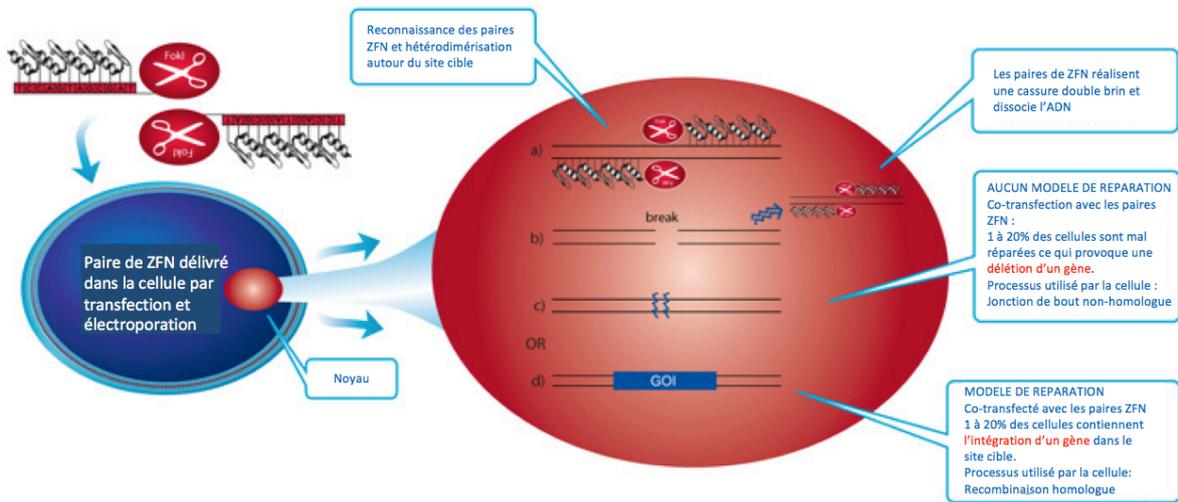


Figure 13 : Schéma des possibilités d'édition du génome médié par une ZFN³⁴

Les ZFN bien qu'étant très utiles pour réaliser de la thérapie génique, conservent de multiples défaut et notamment une grande sensibilité à l'environnement génomique dans lequel elles interagissent (sensibilité allostérique de Fok I notamment), mais également une difficulté au niveau de la spécificité et de la tolérance cellulaire.

1.1.3 La protéine Cas9

Cas 9 pour CRISPR associated protein 9, est une endonucléase d'ADN par un ARN guide (ou gRNA ou sgRNA) qui est capable de cliver chaque brin de la double hélice d'ADN grâce à deux sites de clivage. Cette protéine a été découverte dans l'immunité adaptative de type II de *Streptococcus pyogenes*³⁵.

1.1.3.1 Fonction pour la bactérie

Ce streptocoque utilise la protéine Cas9 afin de lutter contre les infections virales et notamment en détectant et en supprimant l'ADN étranger qui se serait intégré dans le génome bactérien notamment dans le cas des bactériophages. Pour ce faire, les bactéries possèdent dans leur génome de courtes séquences d'ADN répétés régulièrement (CRISPR) ; elles ont pour fonction de conserver en mémoire une infection par un virus afin de prévenir une infection ultérieure. Dans ce cadre, à la suite d'une infection par un virus, des séquences d'ADN de ce dernier sont insérées dans les CRISPR³⁶.

1.1.3.2 Mécanisme d'action

Lorsqu'une nouvelle infection du virus survient, l'ADN au sein des CRISPR est transcrit en ARN et associé à la protéine Cas9. Cet ARN ou gRNA (ARN Guide) contient une « séquence échafaudage » (scaffold sequence) nécessaire à l'endonucléase pour se fixer alors sur l'ADN du virus par complémentarité de séquence (spacer d'environ 20 nucléotides), la protéase inactive alors le virus en le clivant. La fixation de Cas9 est déterminée par deux éléments, d'abord la complémentarité entre le gRNA et l'ADN, mais également par la présence d'un Protospacer Adjacent Motif (PAM) immédiatement adjacent à ce dernier (Figure 14).

A la suite de cet événement, plusieurs possibilités se révèlent, soit aucune séquence de jonction modèle n'est présente, le processus de réparation cellulaire insère ou enlève quelques nucléotides au niveau de chaque extrémité de l'ADN afin de permettre la jonction des brins, mais ceci est alors le siège de mutation qui entraîne, soit l'inactivation du gène, soit sa réparation mais permet la suppression du génome viral ; soit une séquence d'ADN permet *via* le processus de réparation

d'être intégré et corrigé alors la séquence qui a été clivée. Ce dernier mode sera détaillé par la suite et est à la base même de cet outil de génie génétique qu'est CRISPR-Cas9.

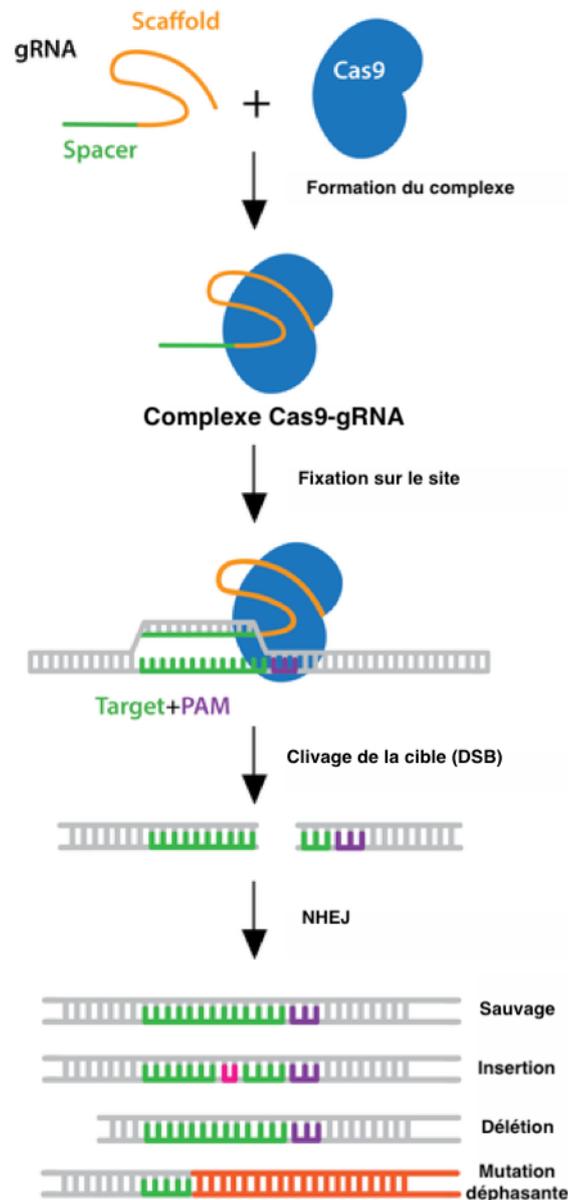


Figure 14 : Mécanisme d'action de Cas9³⁷

Lexique :

gRNA : ARN guide

Scaffold : Echafaudage

Spacer : Espaceur

Complex formation : Formation du complexe

Target : Cible

PAM : Protospacer Adjacent Motif : Motif adjacent Protospacer

Target cleavage (DSB) : Cible du clivage (double brin)

NHEJ : Non Homologue End Junction : Jonction non homologue des bouts

I.2 Virus

I.2.1 Biologie virale générale

I.2.1.1 Définition d'un virus

Un virus se définit comme étant un agent infectieux nécessitant un hôte dont il utilise les ressources et le métabolisme pour se répliquer. L'hôte le plus commun est la cellule. La nature vivante ou non des virus n'a pas encore été clairement définie, seulement, par son mode de développement, on note son incapacité à se suffire à lui-même dans sa biologie. Les virus sont généralement assimilés aux acaryotes ³⁸.

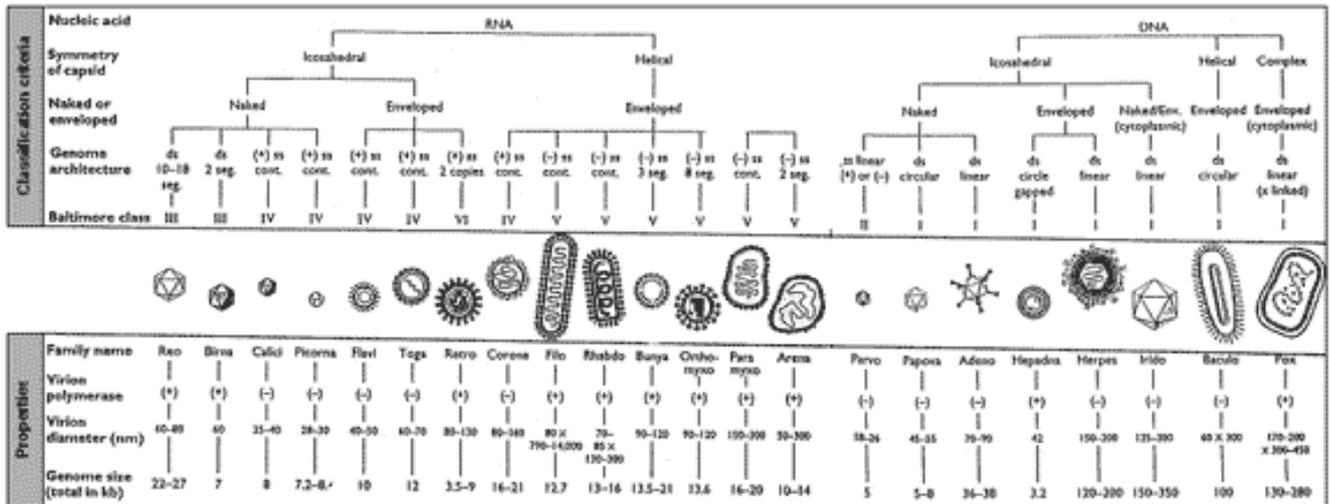


Figure 15 : Classification des virus infectants les animaux ³⁹

Lorsque ce dernier n'est pas dans un corps qu'il infecte comme une cellule, il peut se présenter sous deux formes extra-cellulaires : soit comme un virion, lorsqu'il possède une capsid, soit un viroïde, forme plus rare lorsqu'il n'en possède pas (Figure 15).

Lorsque le virus est sous une forme intracellulaire, son métabolisme peut être : soit quiescent, soit actif. Dans ce dernier cas, à l'aide de son matériel génétique il est capable de se répliquer en détournant une partie ou l'intégrité de la machinerie cellulaire. Pour cela, son ADN ou ARN selon la nature du virus, s'intégrera ou non au matériel génétique de son hôte ³⁹.

I.2.1.2 Structure d'un virus

Cette particule virale se compose restrictivement au minimum d'un acide nucléique qui peut être : soit de l'ADN, soit de l'ARN, encapsulé dans une capsid de protéines, elle-même à l'intérieur ou non d'une enveloppe virale selon le type viral, comme cela le fut montré par M.D. Morgan en 1954 (Figure 16)⁴⁰.

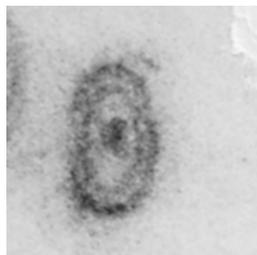


Figure 16 : Particule virale dans le cytoplasme d'une cellule (Grossissement x166 000)⁴⁰

La structure d'un virus enveloppé va être développée ci-dessous de manière centrifuge (Figure 17).

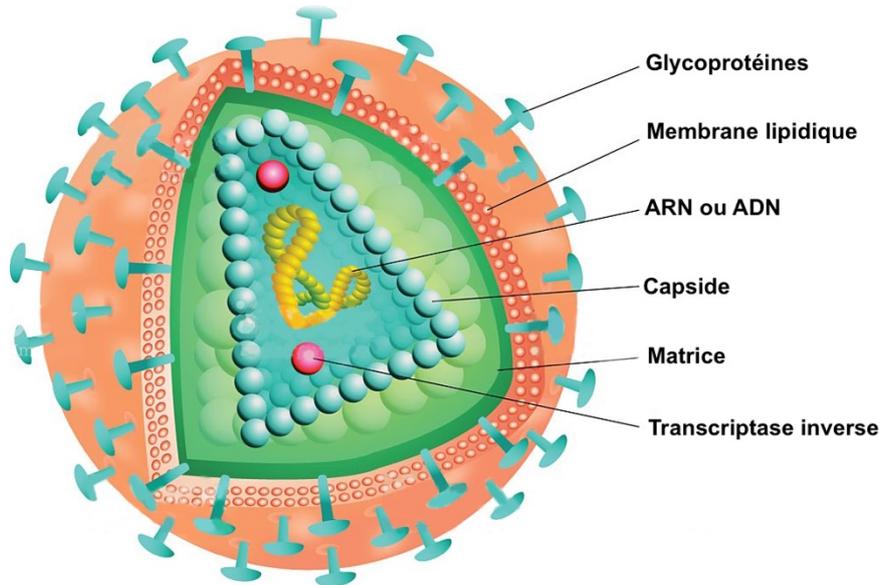


Figure 17 : Représentation schématique de la structure d'un virus enveloppé ⁴¹

1.2.1.2.1 Capside

Comme cela a pu être abordé précédemment, le génome viral quel que soit le type de virus est inséré dans une capsidite, l'ensemble est appelé nucléocapsidite. La capsidite est formée par l'assemblage de protéines, les capsomères ; elle peut se présenter sous différentes formes permettant ainsi l'élaboration d'une classification.

On distingue trois grands groupes de virus différenciés par la forme de la capsidite qui est, soit icosaédrique, soit hélicoïdale, soit complexe (Figure 18).

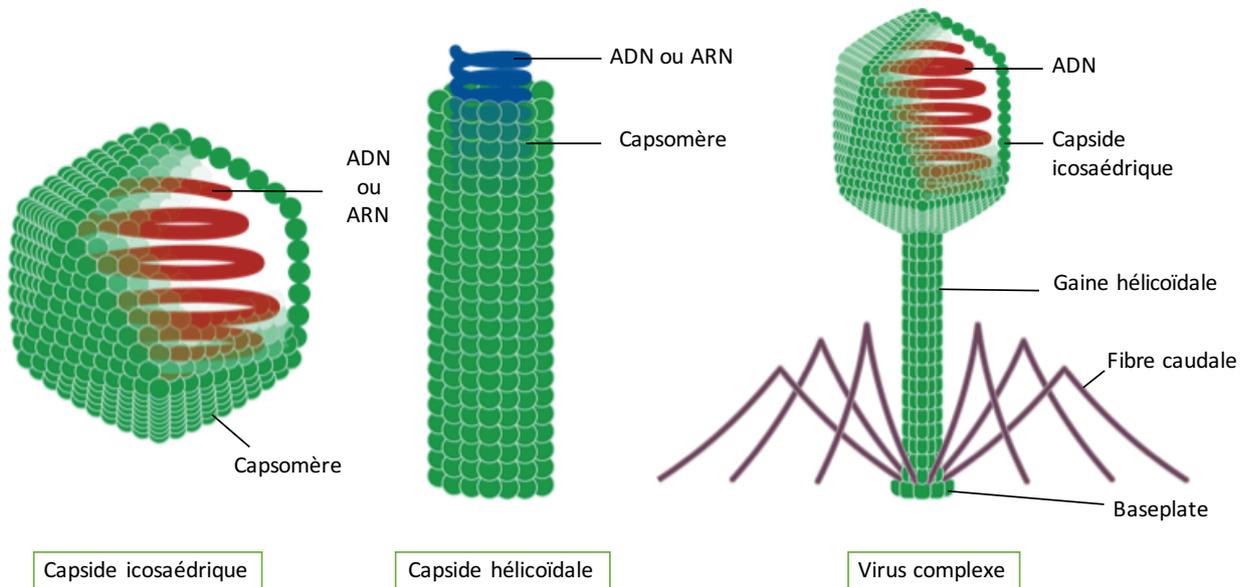


Figure 18 : Représentation schématique des différentes capsidites ⁴²

I.2.1.2.1.1 Virus à capside icosaédrique

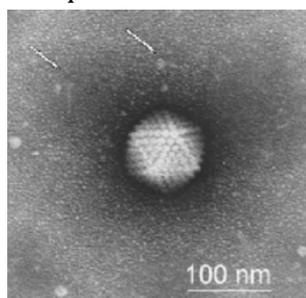


Figure 19 : Photographie d'une capside icosaédrique vue au microscope électronique⁴³

La forme icosaédrique de la capside est liée aux protéines formant les capsomères, il en existe deux types : les pentons et les hexons (Figure 19). Le nombre de capsomère est spécifique de chaque espèce virale, par exemple, les adénovirus sont formés de 252 capsomères. Dans le cadre de l'utilisation de CRIPSR-Cas 9 en thérapeutique, le ciblage spécifique est produit par génie génétique en modifiant les pentons de certains adénovirus afin de modifier leurs tropismes⁴⁴.

I.2.1.2.1.2 Virus à capside hélicoïdale



Figure 20 : Photographie d'une capside hélicoïdale vu au microscope électronique⁴³

La forme hélicoïdale se rapproche de celle de nanotube de fullerène d'une longueur comprise entre 300 et 400nm, ils sont composés de protomères enroulés en spirale formant des anneaux (Figure 20). Chaque anneau forme un capsomère, le génome viral se loge à l'intérieur même du tube⁴⁵.

I.2.1.2.1.3 Virus complexes

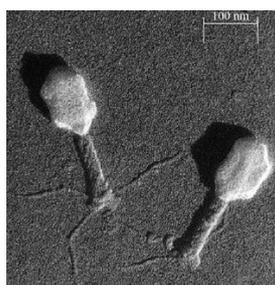


Figure 21 : Photographie d'un virus complexe vu au microscope électronique à balayage⁴⁶

Les virus complexes ont une capside qui est dite mixte et symétrique, leurs formes sont complexes. La « tête » des bactériophages, par exemple, ressemble à une capside icosaédrique mais est montée sur un collier suivi par une gaine dont la base est plate et où se fixent des fibres caudales⁴⁷.

1.2.1.2.2 Enveloppe

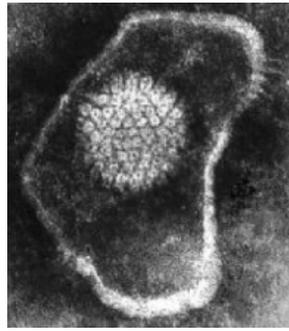


Figure 22 : Photographie d'un virus enveloppé : un *Herpesviridae* vu au microscope électronique ⁴⁸

L'enveloppe ou péplos, qui signifie manteau en grec, est présente chez certains virus. Elle est issue de la membrane cellulaire, cytoplasmique ou nucléaire de sa cellule hôte sur laquelle est adjoit des glycoprotéines virales. La présence ou non d'enveloppe joue un rôle déterminant dans le mode de transmission viral. Les virus dont la capsid est icosaédrique sont rarement enveloppés, mais ils peuvent l'être comme pour les *Herpesviridae*, ou encore les *Togaviridae*. Les virus ayant une capsid hélicoïdale ont tous un péplos⁴⁹.

1.2.1.3 La réplication virale

La réplication virale est commune à tous les virus. Elle débute par la multiplication virale en elle-même suivie par un mécanisme prolifératif, on distingue principalement deux types de cycle propre à la phase active ou non de la prolifération.

La multiplication virale peut se décomposer en sept étapes détaillées ci-dessous (Figure 23).

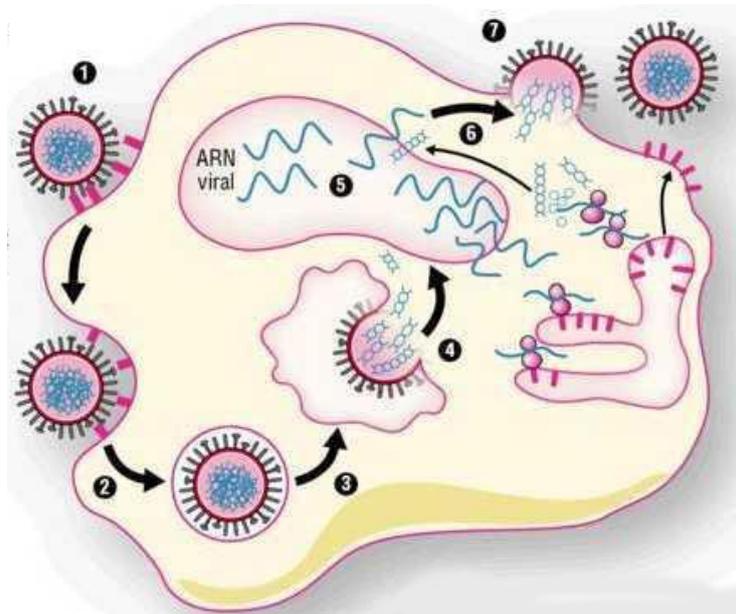


Figure 23 : Représentation schématique de la réplication virale ⁵⁰

1.2.1.3.1 Adsorption du virus

Comme cela a été abordé précédemment, certains virus sont enveloppés. La membrane qui les recouvre a pour origine la cellule hôte qui a hébergé ce dernier précédemment, mais certaines protéines virales sont également présentes à sa surface. Afin de réaliser l'attachement, les cellules peuvent présenter des récepteurs aux virus dont la nature chimique est, soit une glycoprotéine, soit un glycosphingolipide.

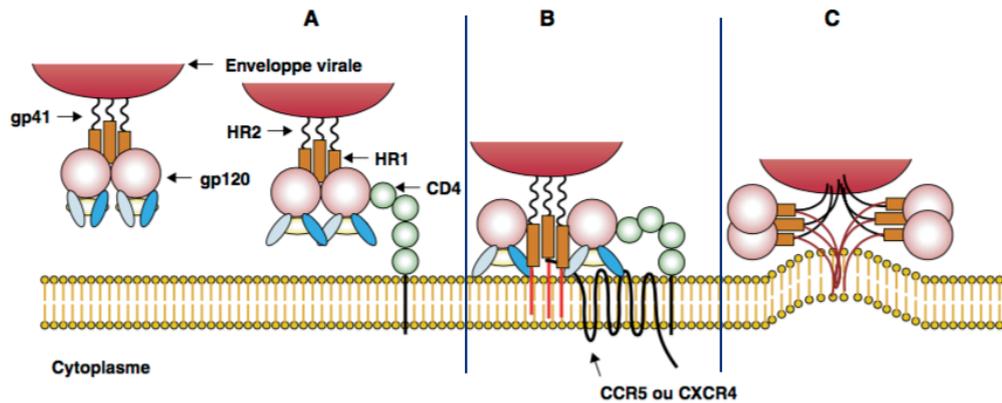


Figure 24 : Schématisation de l'adsorption du VIH sur un lymphocyte T4⁵¹

Pour illustrer ce mécanisme, l'attachement du VIH sur sa cellule cible, un lymphocyte T CD4, permet d'expliquer le principe (Figure 23-1 & Figure 24)⁵¹.

- dans un premier temps, la glycoprotéine gp120 présente sur l'enveloppe virale du VIH, va se lier au récepteur CD4 du lymphocyte et induire un changement conformationnel qui va permettre de découvrir les sites d'interaction aux corécepteurs (Figure 24 - A).
- à la suite de la liaison de la gp120 avec les corécepteurs CCR5 et CXCR4 présents sur le lymphocyte, un mécanisme va permettre l'exposition du site cryptique qui masquait jusque là le peptide de fusion de la gp41 (Figure 24 - B).
- ceci entraîne les changements conformationnels des régions HR1 et HR2 de la gp41 conduisant à la formation du faisceau à six hélices permettant la fusion complète des membranes virales et cellulaires (Figure 24 - C).

1.2.1.3.2 Pénétration du virus dans sa future cellule hôte

A la suite de l'attachement du virus sur la membrane de la cellule cible, différents mécanismes vont pouvoir se mettre en place. En fonction de la nature du virus, si ce dernier possède une enveloppe ou non, le mode de pénétration pourra être différent. Chez les virus nus, la capside avec sa membrane virale va pouvoir entrer par pinocytose. Chez les virus enveloppés, la pénétration se fera par fusion de membrane ou par endocytose dans une vésicule endoplasmique (Figure 23-2 & 23-3)⁵¹.

1.2.1.3.3 Décapsidation

A la suite de la fusion, une fois dans la cellule hôte un mécanisme de décapsidation va se dérouler permettant ainsi la libération du génome viral (Figure 23-4). Le génome viral restera soit dans le cytoplasme, soit migrera dans le noyau de la cellule⁵².

1.2.1.3.4 Réplication virale

Le génome viral, une fois libéré de sa capside, va pouvoir s'intégrer ou non dans le génome de la cellule, il pourra alors s'exprimer soit immédiatement en détournant la machinerie cellulaire (ribosome, ARNt, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi...), soit rentrer en quiescence (Figure 23-5). La transcription en ARNm qui suit la réplication du génome va permettre grâce au détournement de la machinerie cellulaire, la traduction de ceux-ci en protéines virales. Il existe une cinétique particulière dans la production de ces protéines, certaines sont plus précoces que d'autres, et interviennent de manière différente dans ce mécanisme⁵². Par exemple, dans les rétrovirus dont le génome est formé d'ARN, une transcriptase inverse est employée pour produire un transcrit d'ADN, et pouvoir s'intégrer au génome de la cellule hôte, cela fut découvert en 1970 par Howard Temin et Satoshi Mizutani⁵³.

1.2.1.3.5 Encapsidation

Une fois que la machinerie cellulaire a fini de produire et de mûrir les protéines virales, le génome viral va être encapsidé (Figure 23-6). Plusieurs copies du génome vont ainsi former de nouvelles particules virales formant de nouveaux virions, qui s'ils sont enveloppés, formeront de nouveaux virus ⁵².

1.2.1.3.6 Libération virale

Selon l'espèce virale, la libération des particules virales diffère. Il existe deux modes prolifératifs (Figure 23-7) : un cycle lytique, et un cycle lysogénique⁵⁴.

1.2.1.3.6.1 Cycle lytique

A la suite de l'encapsidation, les virions nouvellement encapsidés vont s'accumuler au niveau de la membrane, et ainsi conduire :

- soit à une lyse complète de la membrane, le virus sera donc enveloppé par la membrane nucléaire ou la membrane cellulaire. La lyse de la cellule sera alors produite par la déstabilisation de la membrane avec par exemple l'externalisation de la phosphatidyl-sérine sur le feuillet externe de la bicouche phospholipidique, ou encore la création de pore, ou la déstabilisation de canaux ioniques
- soit à une exocytose, à la suite du bourgeonnement de la membrane cytoplasmique provoquée par la réorganisation des constituants de la bicouche phospholipidique (glycoprotéines, phospholipides...).

1.2.1.3.6.2 Cycle lysogénique

Ce type de cycle est propre aux virus de type phage dont le génome viral s'est intégré dans celui de la cellule hôte. Le virus sera donc en phase de quiescence lorsque la cellule ne sera pas en réplication, et en phase active lorsque celle-ci sera en division. L'expression du virus est donc directement liée à l'activité cellulaire de la cellule hôte. Dans ce type de virus, l'ADN viral est transmis aux cellules filles, on parle alors de transmission héréditaire (cette transmission du matériel génétique à la descendance de la cellule hôte, suite à l'infection de la cellule, est une propriété particulière exploitée dans la thérapie génique sur laquelle se base CRISPR-Cas9). Lors de l'activation de la réplication, l'expression du génome viral peut conduire à la lyse de la cellule tel que cela a pu être décrit précédemment ⁵⁵.

1.2.2 Vecteurs viraux

1.2.2.1 Principe

La vectorisation, dans le milieu pharmaceutique, se définit comme l'opération visant à moduler et à maîtriser, autant que possible, la distribution d'un principe actif, de son administration à son site d'action dans l'organisme. On utilise pour cela un système approprié appelé vecteur.

Le choix du vecteur résulte de la prise en compte de plusieurs paramètres propres au principe actif qui doit être vectorisé, et qui permettent d'établir des critères de sélection au quel doit répondre le vecteur. Dans le cadre des vecteurs viraux, le principe actif est représenté par un génome artificiellement modifié en regard de la souche virale dont le vecteur est dérivé, et le vecteur qui est un virus aura pu être modifié au préalable, si nécessaire, afin d'acquérir un tropisme particulier (glycoprotéines à la surface du virus permettant de reconnaître certaines cellules par exemple), diminuer l'immunogénécité, ou encore annuler le potentiel toxique ⁵⁶.

1.2.2.2 Production d'un vecteur viral

La production d'un vecteur déficient pour la réplication s'effectue par le biais de cellules dites transcomplémentantes possédant les gènes supprimés du virus sauvage. Ces gènes peuvent être présents sous différentes formes au sein de la cellule, soit directement intégrés au génome de celle-ci, soit sous forme plasmidique épisomale (Figure 25). La transcription puis la traduction de ces gènes permet la production des protéines qui interféreront donc dans la réplication virale en intégrant le virion sans lui permettre d'avoir la capacité à se répliquer ⁵⁷.

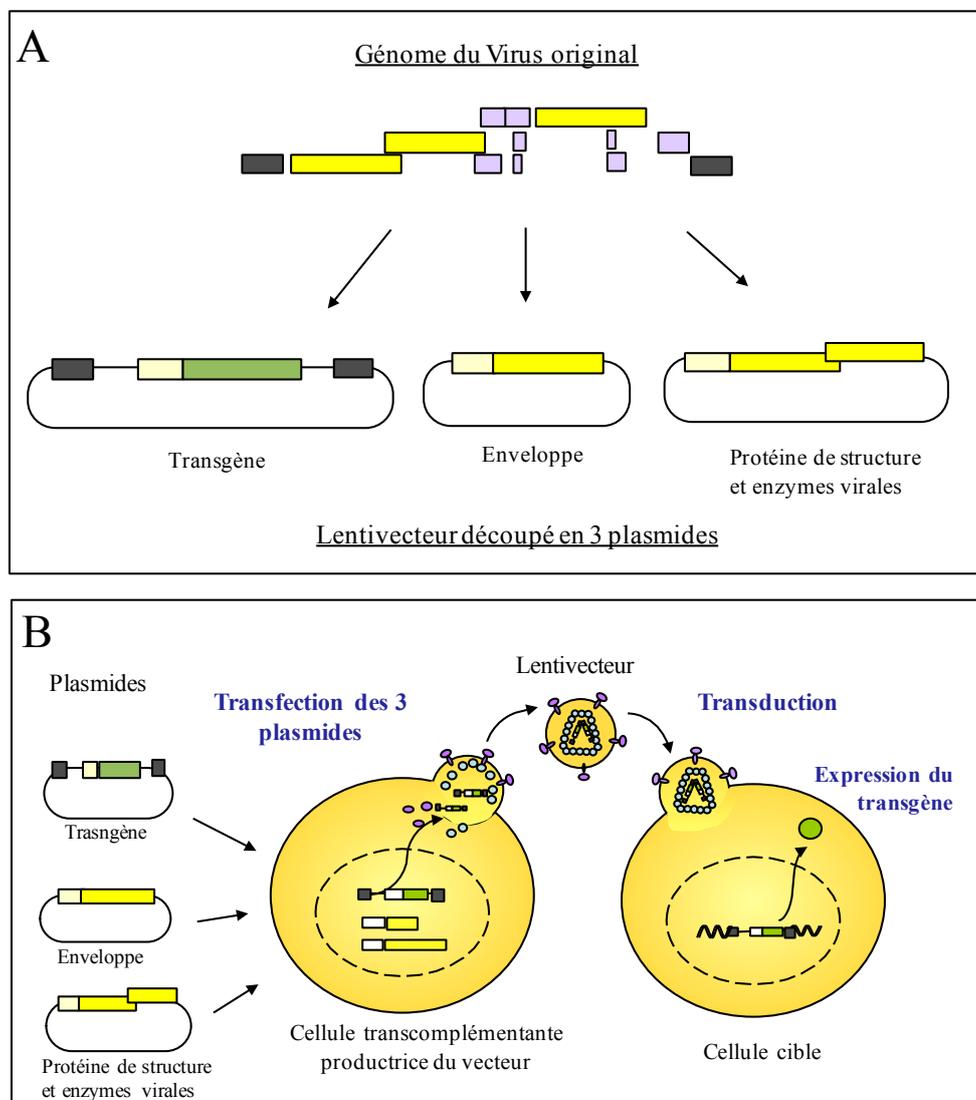


Figure 25 : Schématisation de la production d'un vecteur viral par une cellule transcomplémentante ⁵⁸

A : La séquence du génome viral est répartie sur 3 plasmides différents : l'un joue le rôle de génome contenant le transgène. Un deuxième plasmide contient un gène d'enveloppe permettant de déterminer son tropisme. Enfin un troisième plasmide code des protéines de structure et des enzymes virales.

B : La transfection de ces 3 plasmides dans une lignée cellulaire productrice de vecteurs permet la formation de particules contenant toutes les protéines virales présentes chez le virus sauvage (pour le plasmide enveloppe et protéine de structure et enzymes virales), alors que le génome encapsidé ne code que le transgène. Les cellules cibles transduites par les vecteurs produits expriment donc uniquement le transgène.

1.2.2.3 Types de vecteurs viraux

1.2.2.3.1 Critères de sélection

Il existe différents types de vecteurs viraux qui se différencient par leurs caractéristiques : ils peuvent être intégratifs ou non, propagatifs ou non-propagatifs. Cette catégorisation résulte de la capacité ou non du virus à s'intégrer au génome de la cellule hôte et à conserver ou non son potentiel prolifératif illimité dans le vecteur viral qu'il forme. Ces deux propriétés sont des éléments clés dans le choix d'un vecteur viral.

1.2.2.3.1.1 Vecteurs intégratifs

Les vecteurs intégratifs vont avoir la capacité d'insérer leur matériel génétique dans le génome de la cellule hôte. Cette caractéristique conditionne la transmission héréditaire de ces nouveaux gènes contenus dans le génome viral aux cellules filles lors des divisions cellulaires suivant l'infection. Cette capacité de transmission à la descendance permet de nombreuses applications thérapeutiques, néanmoins l'intégration du génome viral peut entraîner des remaniements du génome de la cellule hôte pouvant conduire à des modifications de l'expression des gènes (mutation, délétion, insertion...) liée à la mutagenèse insertionnelle ⁵⁹. Ces vecteurs sont principalement représentés par les lentivirus et les rétrovirus. Cette caractéristique a d'ailleurs conduit à leur utilisation dans la technique CRISPR-Cas9.

1.2.2.3.1.2 Vecteurs non-intégratifs

Les vecteurs non-intégratifs quant à eux vont se présenter sous une forme épisomale dans la cellule hôte et non directement insérés dans le génome de celle-ci. Lors de la division de ces cellules, la forme épisomale de ce matériel génétique ne sera donc transmis qu'à une seule des cellules filles, ce qui entraîne une disparition progressive du matériel génétique. L'utilisation de ce type de vecteur peut être utile dans le cadre de cellule somatique, ils sont d'ailleurs plus sûrs que les vecteurs intégratifs puisqu'ils n'interagissent pas avec le génome de la cellule et ne sont donc pas sujets à d'éventuelles mutagenèses insertionnelles. Ces vecteurs sont généralement dérivés des adénovirus ou de virus associés aux adénovirus (AAV) ⁶⁰.

1.2.2.3.1.3 Vecteurs propagatifs

Un vecteur propagatif a donc la capacité de se répliquer, leur conception peut être le produit de deux mécanismes. Il peut provenir de la préparation de virions, notamment à partir des poxvirus, génétiquement modifiés mais compétents pour la réplication. Mais également provenir de virions génétiquement modifiés défectifs pour les gènes responsables de la réplication mais associés à des particules auxiliaires compétentes pour celle-ci qui complémente en *trans* cette défaillance. Ceci est classiquement représenté par le virus sauvage parental. Par exemple c'est le cas de certains vecteurs dérivés des virus de l'Herpès (amplicons)⁶¹.

1.2.2.3.1.4 Vecteurs non-propagatifs

Les vecteurs non-propagatifs quant à eux se présentent sous la forme d'une préparation pure de virions défectifs pour la réplication, dans le cas présent il n'y a donc pas de particules auxiliaires. Les virus tel que les rétrovirus Murine Leukemia Virus (MLV), certains lentivirus, l'Adeno-Associated Virus (AAV) utilisé dans la technique CRISPR-Cas9 et des adénovirus permettent la formation de ce type de vecteur viral.

Cette caractéristique de défection de la capacité propagative de ces vecteurs peut varier en importance selon le nombre de gènes qui ont été mis au silence ou supprimés par génie génétique. Ainsi plus le nombre de gène modifié sera important, plus le risque de réversion vers un phénotype répliatif compétent sera faible. Ainsi les vecteurs dont la phase de lecture codant pour les protéines virales, et donc la propriété proliférative du virus, est non ou peu présente, auront

une sureté plus grande pour leur utilisation. Cette propriété est donc un paramètre discriminant dans le choix d'un vecteur qui serait muni d'outils capables de modifier durablement le génome d'une cellule ⁶¹.

1.2.2.3.2 Vecteurs viraux potentiels

L'ensemble des caractéristiques des principaux groupes de vecteurs viraux a été regroupé dans le tableau 3 ci-dessous, où sont précisés leurs principaux avantages et inconvénients⁶².

Vecteur	Matériel Génétique	Capacité de stockage	Tropisme	Potentiel inflammatoire	Forme du vecteur génomique	Principales limitations	Principaux avantages
Enveloppé							
Rétrovirus	ARN	8kb	Cellule en division seulement	Faible	Intégré	Uniquement transduit dans les cellules en divisions L'intégration peut provoquer de l'oncogenèse dans certaines applications	Les gènes transférés vont persister dans les cellules en divisions
Lentivirus	ARN	8kb	Large	Faible	Intégré	L'intégration peut provoquer de l'oncogenèse dans certaines applications	Les gènes transférés persistent dans la plupart des tissus.
HSV-1	dsDNA	40kb* 150kb‡	Fort pour les neurones	Elevé	Episomal	Inflammation Expression transitoire du transgène autre que dans les neurones	Grande capacité de stockage Fort tropisme pour les neurones
Non-enveloppé							
AAV	ssDNA	<5kb	Large, avec une potentielle exception pour les cellules hématopoïétiques	Faible	Episomale (>90%) Intégré (<10%)	Faible capacité de stockage	Non inflammatoire Non pathogène
Adénovirus	dsDNA	8kb* 30kb§	Large	Elevé	Episomale	La capsid induit une réaction inflammatoire puissante	Transduction extrêmement efficace dans la plupart des tissus

*Réplication defective. ‡ Amplicon. § Dépendant d'helper. dsDNA : ADN double brin. ssDNA : ADN simple brin

Tableau 3 : Principaux groupes de vecteurs viraux et leurs caractéristiques (Tableau personnel)

Les vecteurs viraux malgré leurs avantages présentent des limitations importantes notamment au niveau de l'utilisation clinique. En effet, les virus contrairement aux vecteurs non-viraux vont avoir un potentiel infectieux qui représente un risque, d'autant qu'ils interviennent au niveau génomique et peuvent subir des recombinaisons avec certains virus sauvages ou être à l'origine de réaction immunitaire. De plus, comme cela est précisé dans le tableau ci-dessus, la capacité de stockage pouvant être véhiculée est généralement limitée.

Les vecteurs les plus largement utilisés dans la technologie CRISPR-Cas9 sont principalement les lentivirus, les AAV et les adénovirus.

1.2.3 Type de vecteurs non-viraux

Par opposition, les vecteurs non-viraux ne disposent pas de cette nature infectieuse. Ils vont nécessiter le recours à des techniques leur permettant à la fois un tropisme particulier dans l'organisme mais également le passage transmembranaire dans les cellules cibles.

Ces techniques non virales peuvent être classées dans deux catégories : les méthodes physiques, et les méthodes chimiques.

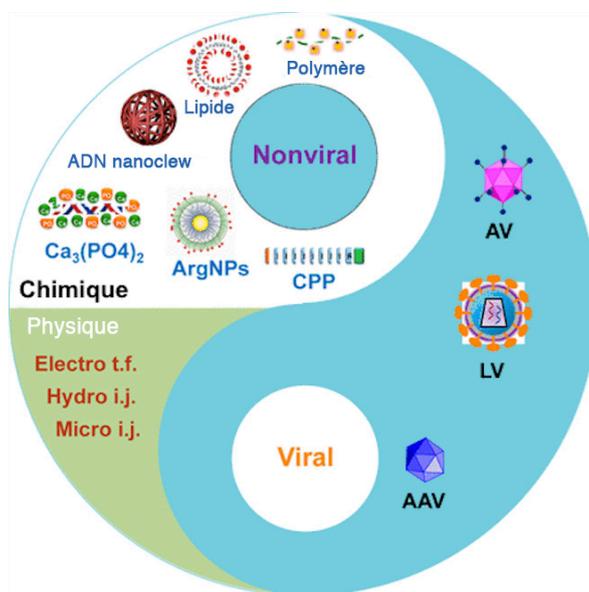


Figure 26 : Représentation schématisée des différentes méthodes de vectorisation non virales ⁶³

1.2.3.1 Vectorisation de CRISPR-Cas9 par méthodes physiques

1.2.3.1.1 Microinjection

La méthode la plus directe pour introduire de l'ADN, un mRNA ou une protéine dans une cellule est la microinjection. Cette dernière va permettre de traverser à la fois la barrière extracellulaire mais également cytoplasmique afin de faire gagner de manière contrôlée dans le noyau ou le cytoplasme le matériel génétique ou protéique. Par ce type de vectorisation, le pourcentage d'efficacité peut atteindre jusqu'à 100% de réussite de transfert ⁶⁴.

De plus, la quantité totale injectée d'éléments Cas9 / sgRNA étant connue, il est plus facile de contrôler et de réduire les effets off-target (trad. : hors-cible). A cela s'ajoute le fait qu'il n'y a pas de limite quant au poids moléculaire ou la taille qui peut parfois être imposante pour l'expression du plasmide de Cas9, les mRNA et la totalité de la protéine Cas9 avec son poids de 130kDa.

Cependant, la microinjection reste une technique fastidieuse qui ne peut être réalisée que pour une centaine de cellules par expérimentation puisqu'elle est réalisée à la main. Elle est donc possible uniquement pour l'édition du génome de cellule seule mais en aucun cas pour des applications ciblant des millions de cellules ⁶³.

1.2.3.1.2 Electroporation

L'électroporation est une méthode qui va également permettre le transfert de matériel génétique à l'intérieur d'une cellule. Ce passage intracellulaire va être réalisé par la déstabilisation transitoire de la membrane lipidique constituant la membrane plasmique.

Ce type de méthode est uniquement possible pour certaines nanoparticules puisque la taille des ouvertures créées par l'électroporation va être de l'ordre d'une dizaine de nanomètre ce qui coïncide avec le transfert du matériel de Cas9.

Aujourd'hui il a été démontré que cette méthode pouvait être aussi bien utilisée *in vitro* qu'*in vivo*. Cette méthode semble se présenter comme l'une des méthodes les plus efficaces et sûres dans le transfert de CRISPR-Cas9 ⁶⁵.

Cependant, la mort ou l'endommagement d'une partie des cellules peut être parfois problématique, mais il est possible d'optimiser les paramètres de l'électroporation (composition du milieu, intensité, durée...), afin de minimiser ces effets indésirables.

1.2.3.1.3 Injection hydro-dynamique

L'injection hydro-dynamique est une méthode non virale très puissante notamment utilisée chez le rongeur pour le transfert de gène *in vivo*. La méthode consiste à transférer un plasmide d'ADN dans la cellule à l'aide d'une forte pression sur une très court laps de temps afin de former transitoirement des pores dans la membrane de la cellule.

Cette technique a récemment été utilisée dans le cadre de la correction d'un gène muté pour le cancer du foie chez une souris ⁶⁶, la correction d'une mutation héréditaire de la tyrosinémie et de son phénotype ⁶⁷, ou encore, interrompre la prolifération de l'HBV *in vivo* ⁶⁸.

Cependant, l'injection hydro-dynamique requiert l'injection d'un grand volume et peut causer de sérieux dommages au foie. De plus, un seul essai clinique sur l'humain a été réalisé à partir de cette technique. Malgré le potentiel de cette technique, il faudra encore attendre des améliorations majeures avant de pouvoir utiliser cette technique pour le transfert de matériel génétique.

D'autres méthodes de transfert par méthode physique existent également telle que la sonoporation, l'irradiation laser ou encore la déformation membranaire afin de délivrer le système CRISPR-Cas9 aux cellules. Ils fonctionnent tous selon un mécanisme relativement similaire en créant des pores dans la membrane mais produisent le même genre de dommages cellulaires.

Il faut également noter que ces méthodes physiques vont généralement utiliser de l'ADN nu, des mRNA, ou des protéines sans protection particulière de ces différents éléments, ce qui lorsqu'ils sont administrés dans un tissu ou dans la circulation systémique, les exposent à la dégradation enzymatique ou encore à des mécanismes de clairance. C'est pourquoi la vectorisation par méthode chimique risque de jouer un rôle prédominant dans un futur proche.

1.2.3.2 Vectorisation de CRISPR-Cas9 par méthodes chimiques

CRISPR-Cas9 est une biotechnologie qui nécessite à la fois le plasmide d'expression de Cas9, les mRNA et les sgRNAs, mais également la protéine Cas9 en elle-même (Figure 27).

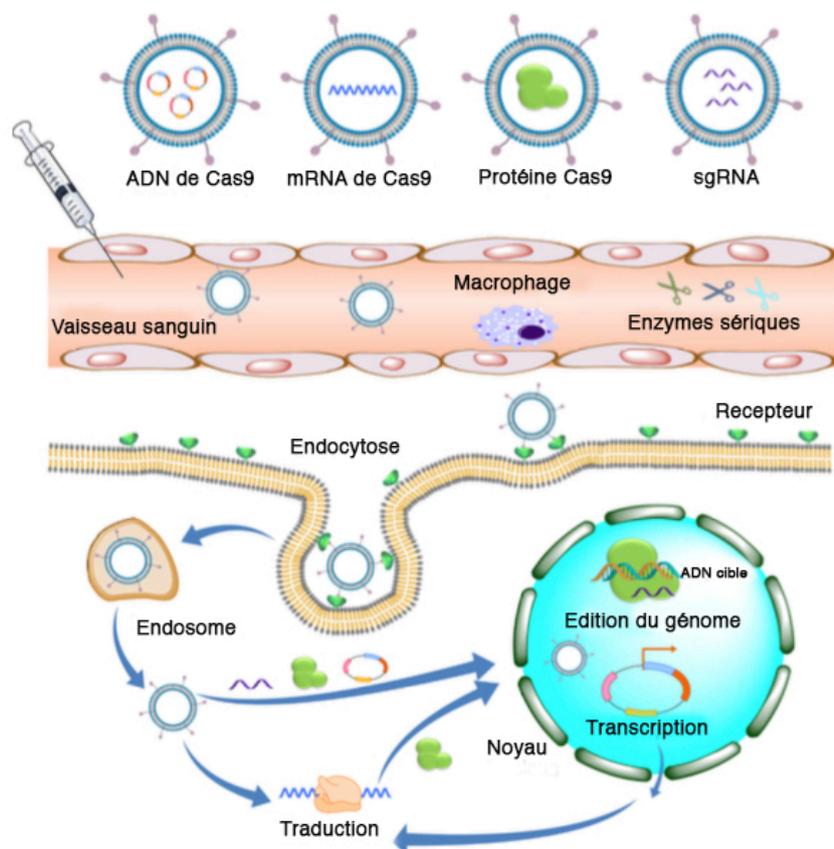


Figure 27: Différents challenges à surmonter pour le transfert des éléments de Cas9/gRNA par des vecteurs non-viraux ⁶³

1.2.3.2.1 Potentiels vecteurs pour le transfert du plasmide d'expression de Cas9

Les nanocomplexes qui vont transporter les plasmides d'expressions vont être formulés par des interactions électrostatiques qui sont optimisées pour les petites tailles, qui ont une absorption cellulaire maximale, une protection contre la dégradation, et qui vont permettre le dépackaging intracellulaire au moment opportun.

Cependant, le plasmide d'expression de Cas9 est un plasmide considéré comme large. Il va donc falloir prendre en compte quelques paramètres comme le ratio de charges positives / négatives, le potentiel particulaire zêta, la taille des particules, le taux de libération de l'ADN, ou encore la capture par l'endosome qui pourront être optimisés différemment. Pour répondre à toutes ces conditions il existe différentes méthodes mais le domaine des transporteurs qui seront polymériques ou à base de lipides dominant actuellement le marché.

A ce titre, les transporteurs polymériques vont jouer sur la diversité et l'adaptabilité que permet la chimie. Ils peuvent être représentés par les PEI, les chitosan, et les poly (L-Lysine) (PLL).

1.2.3.2.1.1 Polyéthylénimine (PEI)

Les polyéthylénimines peuvent être liés à des amines primaires, secondaires ou tertiaires, et donc par conséquent avoir une charge de haute densité, et plus important encore avoir la capacité de pH tampon. Ce qui est formé, va faciliter la condensation des pDNA en une petite taille, et plus tard promouvoir l'échappement des nanoparticules de polymères d'ADN (poly-complexes) du compartiment endolysosomal par l'effet éponge à protons.

Le problème majeur avec les PEI branchés (i.e. amines I^{aire}, II^{aire}, III^{aire}) dont le poids moléculaire s'approche des 25kDa est que leur transfection est particulièrement cytotoxique. Il est néanmoins possible de réduire cette cytotoxicité en utilisant des PEI linéaires et avec un poids moléculaire plus faible ⁶⁹ ou à l'aide de modifications chimiques fractionnées comme avec les PEG (polyéthylène glycol). Actuellement plusieurs essais cliniques sur l'homme sont en cours et utilisent les vecteurs basés sur les PEI ^{70 71}. Ces études vont permettre d'établir l'utilité de ces vecteurs dans le transfert de gène pour Cas9 ⁷².

I.2.3.2.1.2 Chitosan

Les chitosans sont des biopolymères composés de polysaccharides qui présentent donc une faible toxicité ⁷³. Le facteur le plus critique dans l'efficacité du transfert de gène par les chitosans est le poids moléculaire. Dans une étude, il a été montré que les chitosans de haut poids moléculaire formaient des polyplexes plus stables du fait de l'enchevêtrement des chaînes ⁷⁴. D'autres publications ont aussi rapporté que l'augmentation du poids moléculaire des chitosans pouvait accroître l'efficacité de transfection des gènes qu'ils transportent ^{75 76}.

Cependant, il est nécessaire de respecter un certain poids maximal (200kDa) au-delà duquel le chitosan va condenser trop fortement le plasmide de Cas9 et gêner sa libération dans la cellule. En plus du poids moléculaire, le degré de désacétylation va jouer un rôle significatif dans l'efficacité de transfection *in vitro* ⁷⁴. A cela s'ajoute que les chitosans dont le degré de désacétylation est modéré (entre 62 et 70%) sont beaucoup plus efficaces pour la transfection *in vivo* de gène que les chitosans de haut degré de désacétylation (90%) (Figure 28)⁷⁴.

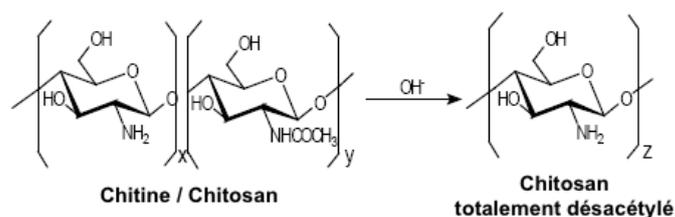


Figure 28: Réaction de désacétylation du chitosan ⁷⁷

I.2.3.2.1.3 Poly (L-lysine) (PLL)

Le PLL est un homopolypeptide d'acide aminé basique qui est la lysine. Le transfert de gène à l'aide de PLL pégylé (PLL-*b*-PEG (Figure 29)) a montré la capacité identique à transférer des plasmides de taille comprise entre 5,3 et 20,2kb⁷⁸ ce qui montre que les vecteurs non-viraux basés sur les PLL pourraient être un bon choix pour le transfert de Cas9.

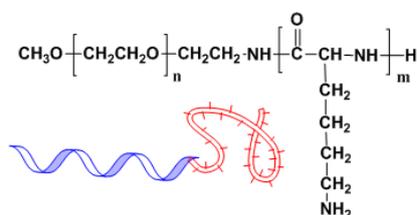


Figure 29: Représentation illustrée d'un PLL-PEG ⁷⁹

I.2.3.2.1.4 Lipoplexe

Les vecteurs formés de lipides sont généralement composés de lipides cationiques comme le N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (DOTMA), le 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA), le

1,2-dioleoyl-3-triméthylammoniumpropane (DOTAP), le 1,2-di-myristyloxypropyl-3-diméthylhydroxyéthylammonium bromide (DMRIE), et le 3 β -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol. Ils sont largement utilisés comme vecteur non viral de gène grâce à leurs hauts taux de transfection.

Les complexes lipides-ADN sont généralement relativement petits et de taille uniforme. Ils sont capables de fixer ou d'encapsuler efficacement l'ADN pour le transférer à l'intérieur d'une cellule. Mais la faible stabilité colloïdale, la rapidité de clairance, et la cytotoxicité induit par les lipides cationiques peuvent être résolus par l'incorporation de lipide neutre. Les lipoplexes ont montré de bonnes performances quant au transfert du plasmide d'expression de Cas9, du mRNA, des protéines et des sgRNA, mais la grande partie d'entre eux peut uniquement être utilisés *in vitro*, *ex vivo*, ou via une administration locale *in vivo*^{80 81 82}. Ce mode de vectorisation occupe déjà une place importante pour la vectorisation systémique de Cas 9 mais va probablement s'accroître dans les années à venir⁸³.

I.2.3.2.1.5 Vecteurs inorganiques

Il n'y a actuellement aucune publication concernant l'emploi de vecteur inorganique pour le transfert du plasmide d'expression de Cas9 pour plusieurs raisons. Cependant, certaines nanoparticules inorganiques comme les nanoparticules de silice⁸⁴, les nanoparticules d'or⁸⁵, ou les nanotubes de carbone⁸⁶ ont montré de bonnes performances dans le transfert de nombreux gènes, ce qui pourrait laisser présager leur usage pour le plasmide de Cas9.

En comparaison aux lipoplexes par exemple, les vecteurs inorganiques ont une meilleure stabilité colloïdale et sont plus faciles à contrôler avec le respect de la composition, et de la taille. De plus, certaines propriétés physico-chimiques de ces nanoparticules ont montré une bonne tolérance à la lyophilisation en présence de cryoprotecteurs ce qui offre de belles perspectives en terme de conservation.

Comme toutes les autres méthodes de transfert, aucune n'est véritablement capable de franchir toutes les barrières physiologiques et libérer Cas9 de manière efficace. Certaines améliorations sont en cours de réflexion afin de développer des vecteurs multifonctionnels qui pourront s'affranchir des microenvironnements extra- et intra-cellulaires⁸⁷. Par exemple le MEND : Multifunctional Enveloppe-type Nanodevice contient un cœur formé par un complexe polycation-pDNA, et un manteau lipidique pour son enveloppe, laquelle peut être équipée avec plusieurs modules multifonctionnels comme une couche de PEG pour permettre d'accroître le temps dans la circulation sanguine, un ligand pour activer la cible, un peptide particulier permettant l'entrée dans la cellule et augmenter la libération intracellulaire, un lipide pour lancer le mécanisme d'échappement de l'endosome, et enfin un signal de localisation nucléaire (NLS) pour qu'il soit dirigé vers le noyau^{88 89}. Ce genre de nanotransporteur intelligent peut ainsi franchir de nombreuses barrières pour délivrer la thérapeutique de manière contrôlée dans l'espace et dans le temps.

I.2.3.2.2 Potentiels vecteurs pour le transfert du mRNA de Cas9

La principale contrainte associée aux mRNA est qu'ils sont facilement contaminables et très labiles. De plus, leur expression est moins importante que celle de l'ADN qui peut d'ailleurs parfois être indésirable dans certaines thérapies géniques. Mais ceci est compensé par le fait que les mRNA ne nécessitent pas d'être adressés au noyau qui représente la principale barrière pour l'adressage des pDNA.

Découlant de cela, il est plus facile de contrôler les effets off-target et de minimiser l'induction d'une toxicité liée aux nucléases. Le rôle des transporteurs de mRNA va donc principalement être de les protéger contre les RNAses qui vont chercher à les dégrader dans l'espace extracellulaire (Figure 27).

Une fois endocyté, il va falloir une dégradation contrôlée dans le compartiment endolysosomal avant la libération dans le cytoplasme.

Actuellement, de nombreux polyplexes et lipoplexes sont disponibles sur le marché comme le Lipofectamine qui est utilisé dans la transfection de mRNA ^{90 91} mais leur utilisation reste restreinte du fait de leur faible potentiel de transfection et de leur toxicité *in vivo*. On peut également citer les lipides cationiques propriétaires que sont le MegaFectin et le TransIT qui permettent le transport efficace *in vivo* de mRNA ^{92 93}. Il existe également d'autres lipides ou matériels à base de lipides qui ont montré une efficacité comme la formulation à base de DOTAP cationique et de phospholipides zwitterioniques DOPE⁹⁴⁹⁵, la formulation DlinDMA/DSPC/Cholesterol/PEG ⁹⁶, et la formulation C12-200 ⁹⁷.

On peut également retrouver des transporteurs polymériques comme le chitosan (vu précédemment)⁹⁸, la protamine ⁹⁹, les PEI⁹⁵, le poly(2-diméthylaminoéthyl méthacrylate) (PDMAEMA)¹⁰⁰, et le poly(β-amino esters) (PBAEs) ⁹² qui ont été adaptés à partir du transport des siRNA et de l'ADN pour celui des mRNA. On peut d'ailleurs faire référence à une étude de Mahiny et al. qui a conçu un transporteur à base de poly (acide lactique – l – glycolique) enveloppé par du chitosan qui a permis le transfert d'un ZFN et de mRNA pour réaliser une édition du génome site spécifique dans le foie ⁹⁸, qui pourrait très probablement être adaptée pour le transport de Cas9 et de mRNA.

Un essai clinique est actuellement en cours. Il utilise un complexe mRNA/protamine administré par injection intradermale dans le cadre d'un traitement métastatique du mélanome ¹⁰¹. Des perspectives pour Cas9 sont donc très largement envisageables mais il reste encore de grandes améliorations à apporter afin d'améliorer son transport.

1.2.3.2.3 Potentiels vecteurs pour le transfert de la protéine Cas9

Cas9 est une protéine. À ce titre, il est possible de la transporter sous différents formats. En effet, elle peut être transportée comme telle, mais également traduite à partir d'un mRNA ou encore transcrite puis traduite à partir d'un pDNA ^{80 102 103}.

Le transport dans la cellule des RNP Cas9 qui permettent l'expression de la protéine et des sgRNA (Figure 27) permet d'éviter l'intégration non désirée de l'ADN dans le génome, et donc de diminuer le risque de clivage off-target ^{72 80 102}. Bien que le transport direct de la protéine Cas9 dans la cellule pourrait faciliter l'édition du génome, l'efficacité du transfert intracellulaire des protéines reste un véritable challenge puisque ces dernières sont instables à la fois *in vitro* mais également *in vivo*, immunogènes et leurs demi-vies restent relativement limitées ^{104 105}. Il faut aussi considérer que la taille importante, et la faible efficacité d'échappement de l'endosome par la protéine représentent des freins à un transport efficace ¹⁰⁶.

Finalement, pour permettre une édition du génome réussie il faut que le sgRNA et la protéine Cas9 puissent être tous les deux adressés à la cellule, et transloqués à l'intérieur de cette dernière ¹⁰². Mais aujourd'hui la plupart des systèmes d'édition du génome qui utilisent la protéine Cas9 la vectorisent non pas sous forme de protéine, mais sous la forme de RNP Cas9 qui peut être rapidement préparé par incubation de la protéine Cas9 avec le sgRNA ou le double ARN constitué

par des crRNA et des tracrRNA^{80 107 108}. En effet, seul un faible nombre d'études dans la littérature ont tenté de transporter séparément la protéine Cas9 et les sgRNA⁷². Il a été rapporté que le transport préassemblé des RNP de Cas9 permettait d'améliorer l'efficacité de l'édition génomique, et de réduire la fréquence des effets off-target en permettant le clivage immédiat des sites cibles sur les chromosomes après la transfection, et subir juste après, une dégradation rapide par les protéase endogènes¹⁰⁹

Le transport des protéines se fait principalement de trois manières : par conjugaison directe avec un transporteur, par adsorption physique, ou par encapsulation via une émulsion¹⁰⁶. La PEGylation des protéines comme cela a pu être abordé précédemment permet l'échappement au système réticulo-endothélial, une augmentation du temps de circulation au niveau systémique, et de prévenir de la dégradation par les enzymes protéolytiques¹¹⁰.

D'autres méthodes existent également. Elles peuvent consister en la fusion d'un domaine de transduction sur la protéine et de sa conjugaison avec un peptide de pénétration cellulaire qui est très largement utilisé et permet une grande efficacité pour la vectorisation⁷². Néanmoins il est important de rappeler que ce genre de conjugaisons se faisant par des liaisons covalentes ne sont pas spécifiques et peuvent entraîner des modifications structurales de la protéine pouvant influencer sur son activité.

Une alternative aux liaisons covalentes peut être l'emploi des interactions de type Van des Waals entre la protéine et son transporteur¹⁰⁶.

L'usage de double émulsion de la forme : eau dans huile dans eau est possible aussi, elle a déjà été étudié pour le transport de protéine tel que pour certaines insulines¹¹¹.

D'autres solutions sont également parfois utilisées à la manière de bouclier pour protéger les protéines contre les différentes agressions contre lesquelles elles peuvent être exposées et qui pourraient entraîner des dégradations prématurées, tel qu'une dénaturation induite par les attaques de l'environnement dans lequel elles vont évoluer. Des nano-transporteurs sont donc fréquemment utilisés permettant la transduction de la protéine au niveau intracellulaire à l'aide par exemple de nanoparticules contenant des colloïdes lipidiques (e.g. liposome ou des nanoparticules lipide / solide), des nanomatériaux polymériques (e.g. polymersome, nanogel, et micelle), des nanovéhicules inorganiques (e.g. nanotube de carbone, quantum dot, silice mésoporeuse, nanoparticule magnétique, ou des nanotubes d'or) et enfin des nano-transporteurs médiés par des protéines (Figure 30)¹⁰⁶.

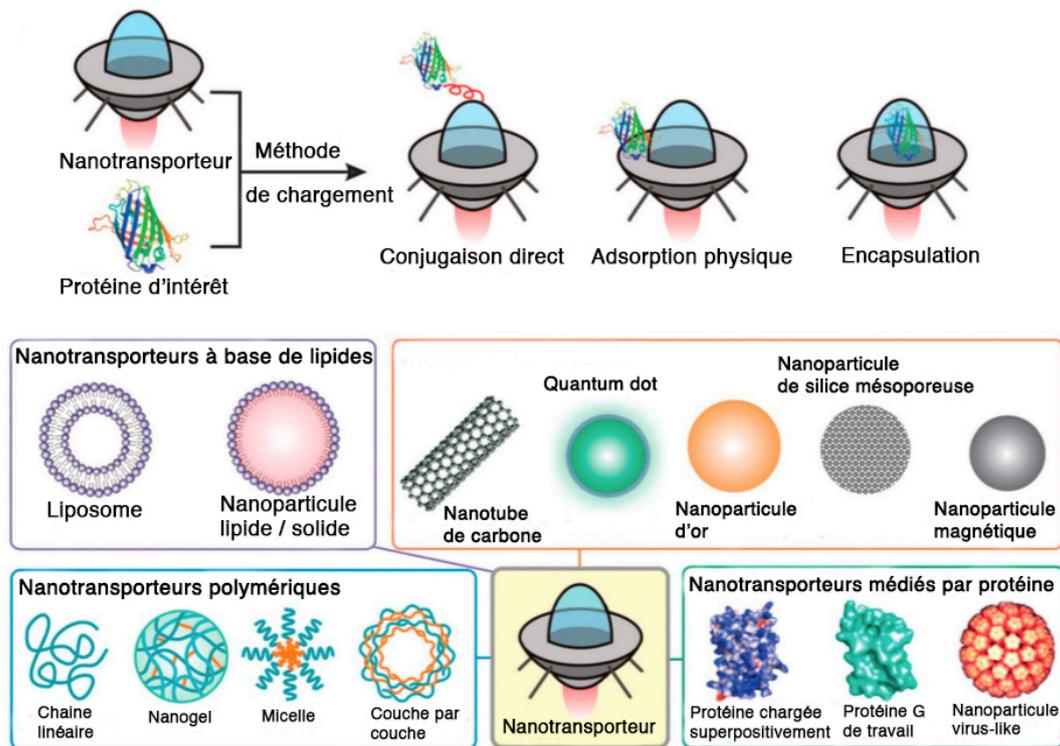


Figure 30: Différents types de vecteurs de protéine non-viraux ⁶³

A partir des caractéristiques de ces méthodes, il serait envisageable de les extrapoler pour le transport de la protéine Cas9 et des RNP de Cas9. Cependant, l'opposition des charges entre la surface de la protéine Cas9 (chargée positivement), et les RNP de Cas9 (chargées négativement) devraient être pris en considération dans le design de ces systèmes ¹⁰⁷.

Du fait de l'importance qui est accordée au transport de Cas9 afin qu'elle pénètre la membrane cellulaire puis soit directement adressée au noyau, des alternatives ont été développées comme l'attachement d'une NLS directement à la protéine Cas9 ou aux RNP de Cas9. *In vivo*, il est important de prendre en considération la stabilité de Cas9 dans la circulation sanguine, c'est pourquoi l'emploi des vecteurs non viraux pour Cas9 risquent de s'accroître encore davantage à l'avenir puisque ces méthodes sont plus sûres que les vecteurs viraux, et permettent de plus en plus de précision ce qui est primordial pour de futurs essais cliniques.

I.3 Conception du matériel génétique nécessaire au fonctionnement de CRISPR-Cas9

La conception d'un brin d'ADN ou d'ARN à intégrer s'avère être une étape clé pour la thérapie génique. Depuis la finalisation du Projet Génome Humain en février 2001¹¹², l'ensemble de la séquence du génotype humain a été séquencé, mais les recherches se poursuivent quant à la compréhension et à l'identification de chacun des gènes le constituant.

I.3.1 Rappel sur le Code Génétique universel et dégénéré

Comme nous l'avons vu dans la première partie sur l'ADN, l'expression des gènes se réalise par la transcription d'un brin d'ADN en ARNm dans le sens 5' → 3', qui sera ensuite traduit à l'aide de ribosome en protéine dans le sens 5' → 3' à la suite de la reconnaissance d'un codon d'initiation AUG. Chaque codon signifie un seul acide aminé. Il existe 64 codons, seuls 3 sont non significatifs et correspondent à des codons stop arrêtant la traduction : UAA, UAG et UGA.

I.3.2 Synthèse d'oligonucléotide

La synthèse d'oligonucléotide, aussi bien l'ADN que l'ARN utilise des mécanismes communs qui peuvent être de différentes natures, que ce soit chimique ou enzymatique. Le mode de production est un critère majeur à prendre en compte puisqu'il détermine la fiabilité (taux d'erreur ou d'écart par rapport au code désiré). Ces oligonucléotides seront utilisés par la biotechnologie CRISPR-Cas9 de différentes manières, soit pour permettre de cibler une zone de clivage par la protéase, soit pour insérer une séquence nucléotidique choisie. Ces différentes méthodes vont être détaillées ci-dessous.

I.3.2.1 Synthèse chimique d'oligonucléotide

Bien que la synthèse chimique d'ARN ait été miniaturisée et automatisée, la technique qui en est sous-jacente, connue sous le nom de chimie des phosphoramidites, n'a pratiquement pas changé depuis son développement fin des années 1970 par H. Gobind Khorana¹¹³. Pour l'ADN, la 1^{ère} synthèse a été réalisée en 2002 par le groupe Gen9¹¹⁴.

Le principe consiste à ajouter des bases de nucléotide une à la fois, chacune coiffée d'un groupe protecteur qui l'empêche de réagir afin d'allonger le brin jusqu'à ce que l'on retire le capuchon et ajoute la base suivante. Plus précisément la technique utilise des nucléosides de type désoxyadénosine (dA), la thymidine (T), la désoxycytidine (dC) et la désoxyguanosine (dG) pour l'ADN et de type adénosine (A), la thymidine (T), la cytidine (C) et la guanosine (G) pour l'ARN sous forme de phosphoramidite. La technique a pour point de départ un support solide sur lequel est greffé le premier nucléotide, à sa suite par de nombreux cycles successifs, les oligonucléotides sont incorporés un à un. La synthèse chimique ainsi réalisée se déroule dans le sens inverse de la biologie, de 3' → 5' (Figure 31). Une fois la synthèse terminée, l'oligonucléotide va être séparé du support par un clivage chimique, et purifié par chromatographie liquide haute performance.

Néanmoins, cette approche n'est pas parfaite. A chaque nucléotide ajouté, il y a 0,5% de chance d'erreur. Plus la chaîne est longue, plus il y a de chance qu'elle contienne une erreur, ce qui limite les brins d'ADN à environ 300 bases de long. Par conséquent, les chercheurs qui espèrent écrire des gènes contenant des milliers de lettres doivent assembler un ensemble de fragments. La synthèse enzymatique promet de faire mieux en cooptant des polymérase, enzymes que les êtres vivants utilisent pour fixer ensemble les nucléotides en longues séquences pratiquement exemptes d'erreur.

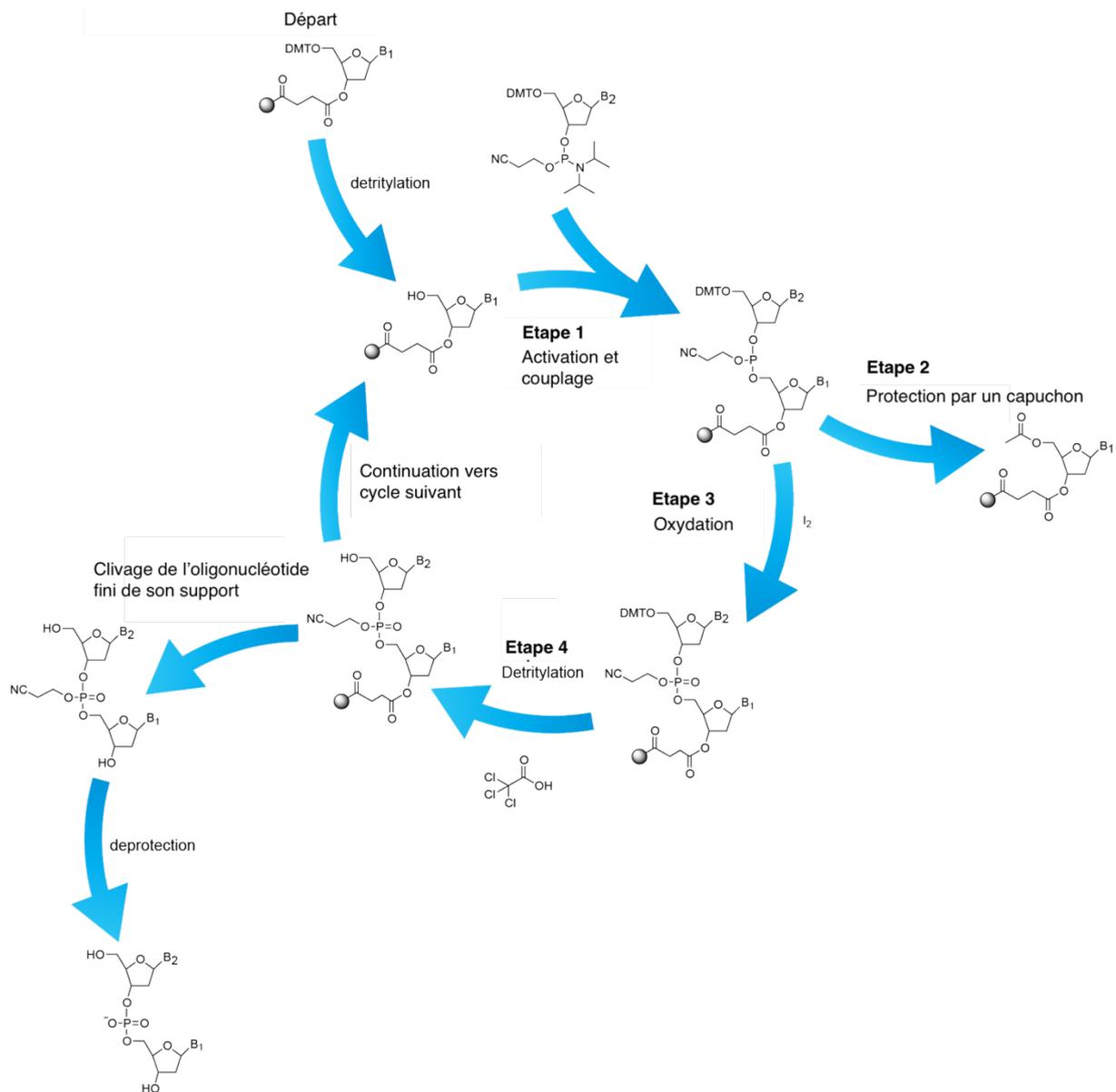


Figure 31 : Cycle de synthèse par la méthode des phosphoramidites¹¹⁵

1.3.2.2 Synthèse enzymatique de l'ADN

Dans les cellules vivantes, la plupart des polymérases commencent par un brin matrice et en créent un complémentaire, en appariant A avec T et G avec C. Une polymérase particulière présente dans les cellules immunitaires, appelée désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT), fonctionne sans matrice, ce qui en fait un critère de choix en matière de polymérase pour la synthèse enzymatique. Cependant, comme TdT ajoute de nouvelles lettres ADN au hasard, les chercheurs ont dû trouver le moyen de le forcer à ajouter la lettre souhaitée, une par une. L'équipe de Gariel y parvient en dotant chaque base d'ADN d'un groupe protecteur exclusif qui, comme dans la synthèse chimique, empêche le TdT d'ajouter plus d'une lettre à la fois au brin en croissance. Une fois la lettre correcte ajoutée et le groupe protecteur supprimé, le cycle se répète. Selon Gariel, l'ajout de chaque lettre ne prend que 5 minutes et s'effectue avec une précision de 99,5%¹¹⁶¹¹⁷.

I.3.3 Design de l'ARN guide (sgRNA) nécessaire au ciblage de CRISPR-Cas9

A présent que les modes de conception des oligonucléotides ont été abordés, il semble intéressant de comprendre comment doit-être designé l'ARN guide qui permettra de cibler spécifiquement la zone à cliver par la protéase. Pour cela, l'équipe de John G. Doench a mis au point un programme permettant d'améliorer l'activité des sgRNA, ce dernier est libre d'accès via le lien suivant :

<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design>

Pour concevoir cet outil, l'équipe a créé un pool d'ARNg, couvrant l'ensemble des sites cibles possibles d'un panel de six gènes de souris endogènes et de trois gènes humains endogènes. Ils ont ensuite évalué quantitativement leur capacité à produire des allèles nuls de leur gène cible grâce à une coloration via des anticorps et la cytométrie en flux. Ils ont alors découvert des caractéristiques de séquence améliorant l'activité, notamment une optimisation supplémentaire du motif proto-espaceur adjacent (PAM) de *Streptococcus pyogenes Cas9*. Les résultats des 1 841 sgRNA ainsi produits, ont été utilisés pour construire un modèle prédictif de l'activité des sgRNA afin d'améliorer la conception des sgRNA pour l'édition de gène et le criblage génétique¹¹⁸.

I.4 Genèse d'une révolution, le concept

Le système CRISPR-Cas9 est un outil puissant et hautement spécifique d'édition du génome. Cette biotechnologie est composée de deux éléments, un ARN guide (ARNg), qui conduit la nucléase Cas9 vers la séquence cible présente dans le génome de la cellule afin d'induire des modifications de différentes natures : perte complète et permanente d'un gène (Knockout), mutation spécifique et ponctuelle d'un allèle d'un gène, augmentation ou diminution de l'expression d'un gène cible.

Une fois l'objectif fixé, différents paramètres vont être ajustés afin d'obtenir le résultat escompté.

I.4.1 Quelles manipulations génétiques sont-elles recherchées ?

Différentes manipulations génétiques sont possibles avec CRISPR, mais elles font appel à différentes composantes. La sélection d'une manipulation génétique spécifique est un impératif pour déterminer les réactifs appropriés.

I.4.1.1 Mise au silence d'un gène : knockout

La mise au silence d'un gène, également appelé knockout, qui a pour but de perturber de façon permanente la fonction du gène dans un type de cellule particulier peut être réalisée à l'aide de Cas9 ou de la nickase Cas9 (Figure 32). Il suffit pour cela d'un seul ARNg (ou de deux si emploi de nickase Cas9), ciblant des exons en 5' ou des domaines protéiques essentiels. Il faut savoir que les enzymes Cas9 ont une haute-fidélité ce qui augmente la spécificité de la méthode^{119 120}. L'approche par deux nickases augmente encore davantage la spécificité mais elles sont moins efficaces¹²¹.

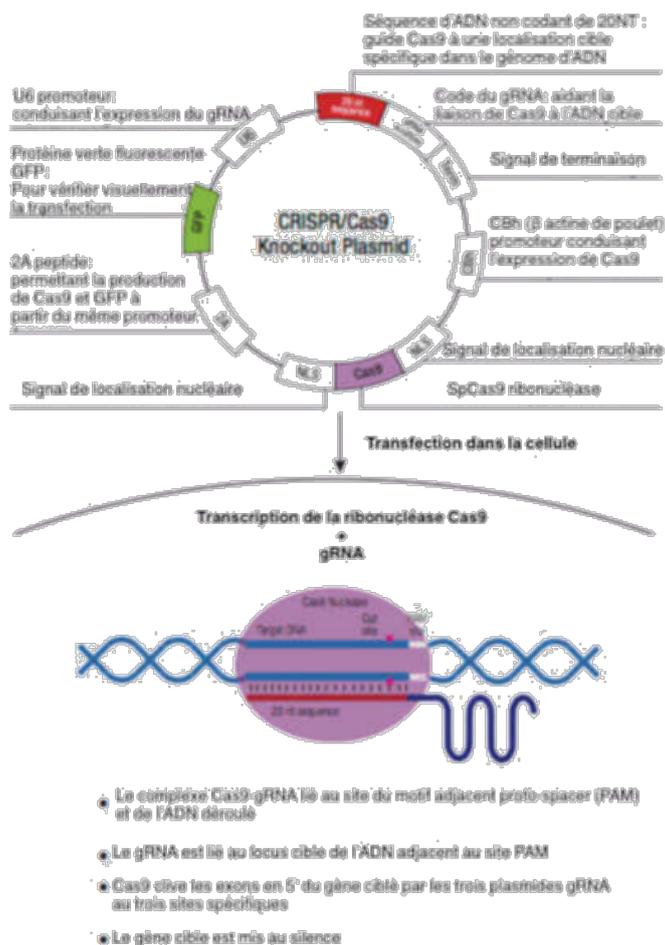


Figure 32 : Mécanisme de la mise au silence d'un gène par CRISPR-Cas9¹²²

1.4.1.2 Edition d'un gène

L'édition d'un gène qui consiste en la génération d'un changement de séquence spécifique défini par l'utilisateur dans un gène particulier, telle que la génération d'une mutation ponctuelle ou l'insertion d'un marqueur ou séquence de choix. Ceci est rendu possible par l'utilisation de Cas9 ou Cas9 nickase et un éditeur de base. Pour cela, il suffit d'un seul (ou de deux ARNg comme pour le Knockout), qui ciblera la région où la modification devra être faite. Dans le cadre de cette technique, le mécanisme de réparation mis en jeu est le HDR : Homology Directed Repair, c'est-à-dire la réparation directe homologue.

Les Plasmides HDR fournissent une matrice de réparation de l'ADN spécifique pour une coupure du double brin (DSB). Lorsque co-transfecté avec le Plasmide KO CRISPR/Cas9, le plasmide HDR incorpore un gène de résistance à la Puromycine permettant la sélection des cellules au niveau du site de rupture de l'ADN induit par la Cas9. Chaque matrice HDR correspond à deux bras homologues de 800 pb élaborés pour se lier spécifiquement à l'ADN génomique entourant le site de coupure de l'ADN double brin induit par Cas9. Chaque gène de résistance à la puromycine est encadré par deux sites LoxP qui permettront d'être traités ultérieurement par le vecteur Cre (Figure 33).

Ce mode de réparation affiche une efficacité réduite par rapport au knockout qui se base le NHEJ Non-Homologous End Joining, c'est-à-dire la jonction de bouts non homologues. Les éditeurs de base peuvent créer un nombre limité de mutations¹²³.

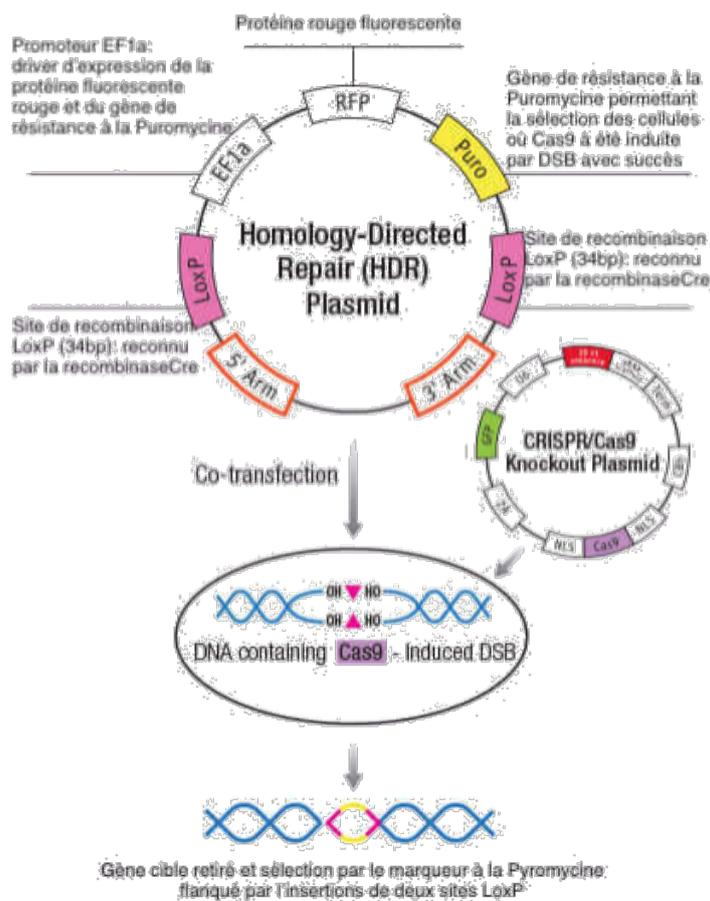


Figure 33 : Mécanisme d'édition d'un gène par CRISPR-Cas9 via HDR¹²²

I.4.1.3 Répression ou interférence : CRISPRi

La répression ou l'interférence sur un gène par CRISPR est parfois reprise sous l'acronyme de CRISPRi, elle consiste en la réduction de l'expression d'un ou de plusieurs gènes sans modifier le génome de façon permanente. Pour cela on va devoir utiliser une Cas9 particulière : dCas9-repressor comme dCas9-KRAB, ou une dCas9. Le ou les ARNg seront alors dirigés contre les éléments promoteurs du gène cible. Il faut néanmoins savoir que le dCas9-KRAB est plus efficace que le dCas9 seul lorsque l'on travaille sur des lignées cellulaires de mammifères¹²⁴.

I.4.1.4 Activation d'un gène : CRISPRa

L'activation d'un gène peut être commandé par la biotechnologie CRISPR, on lui donne l'acronyme CRISPRa. Son mécanisme s'exprime par l'augmentation de l'expression d'un ou de plusieurs gènes endogènes sans modifier le génome de façon permanente. C'est un dCas9-activator, par exemple dCas9-VP64, qui sera employé ici. Pour cela, il sera nécessaire d'utiliser un ou des ARNg ciblant les éléments promoteurs du gène cible. Il existe de nombreux activateurs différents, y compris le système SAM (Système d'Activation de la Transcription) multi-plasmidique¹²⁵.

Les plasmides d'activation CRISPR/dCas9 correspondent à un système d'activation de la transcription par un médiateur d'activation synergique du système (SAM) spécifiquement conçu pour réguler positivement l'expression des gènes. Les plasmides d'activation CRISPR/dCas9 se composent de trois plasmides suivants au ratio 1:1:1: un plasmide codant pour la nucléase Cas9 désactivée (dCas9) (D10A et N863A) fusionnée avec le domaine de transactivation VP64; un plasmide codant pour la protéine de fusion MS2-p65-HSF1; et un plasmide codant pour un ARN guide cible spécifique de 20NT. Les séquences des ARNg sont issues de la bibliothèque des séquences de Médiateur d'Activation Synergique (SAM) CRISPR/Cas9 humains collectés et dirige le complexe SAM pour se fixer à une région du site spécifique d'environ 200-250NT en amont du site de départ de la transcription du gène cible. Le système SAM fournit un recrutement accru des facteurs de transcription pour une activation hautement efficace du gène cible (Figure 34).

CRISPRa peut être réalisé par méthode plasmidique comme précédemment développé, mais également par le biais d'un lentivirus qui aura été structuré selon un procédé similaire¹²⁶.

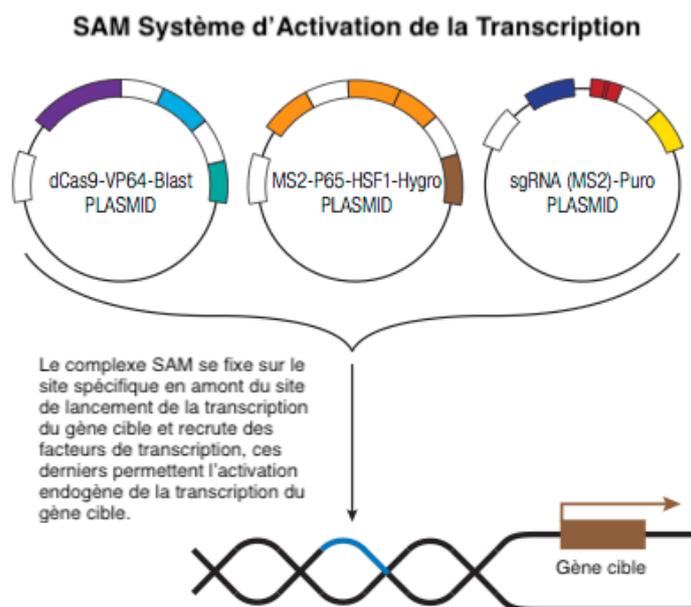


Figure 34 : Fonctionnement du système SAM dans CRISPRa¹²²

L'obtention d'une bonne efficacité de l'édition génomique est donc dépendante de l'efficacité de transfection du complexe nucléase Cas9 - ARN guide, ainsi que son acheminement dans le noyau dans lequel est localisé la séquence cible à modifier (Figure 35).

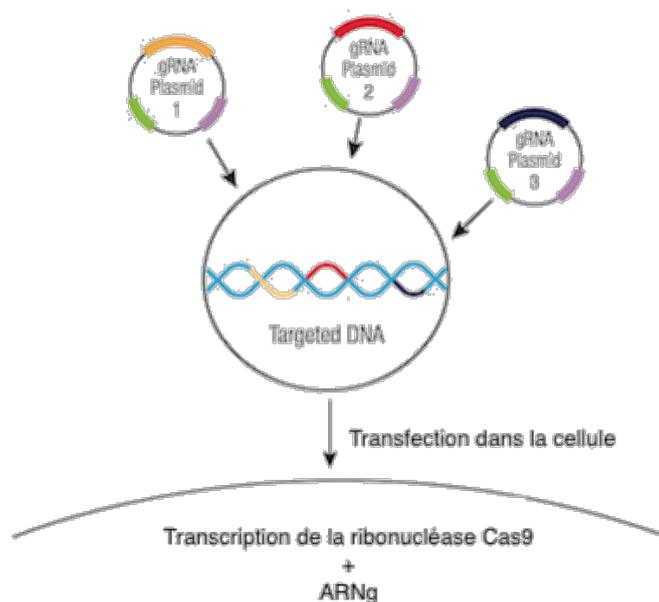


Figure 35 : Acheminement de Cas9 et de son ARNg dans la cellule¹²²

1.4.2 Comment cibler une cellule spécifiquement ?

Comme nous l'avons abordé dans les parties précédentes, il existe différents moyens de vectoriser le système CRISPR-Cas9 : soit via des vecteurs viraux dont on aura préalablement déterminé le tropisme, soit par des vecteurs non viraux (physique ou chimique). Mais ce système constitué de deux éléments peut être acheminé jusque dans la cellule cible sous deux formes : soit via des plasmides utilisés pour exprimer la protéine Cas9 et son ARNg, soit des systèmes dans lesquels la protéine Cas9 est directement complexée à l'ARNg.

1.4.2.1 Plasmide exprimant Cas9 et l'ARNg

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe différents types de plasmides disponibles pour le transfert de Cas9 et de l'ARNg. Néanmoins certaines règles communes sont à respecter afin de contrôler au mieux les paramètres de la manipulation.

1.4.2.1.1 Structure fonctionnelle

Un plasmide est produit par une bactérie, il se présente sous la forme d'un matériel génétique cylindrique composé au minimum des éléments suivants (Figure 36 – Tableau 4) :

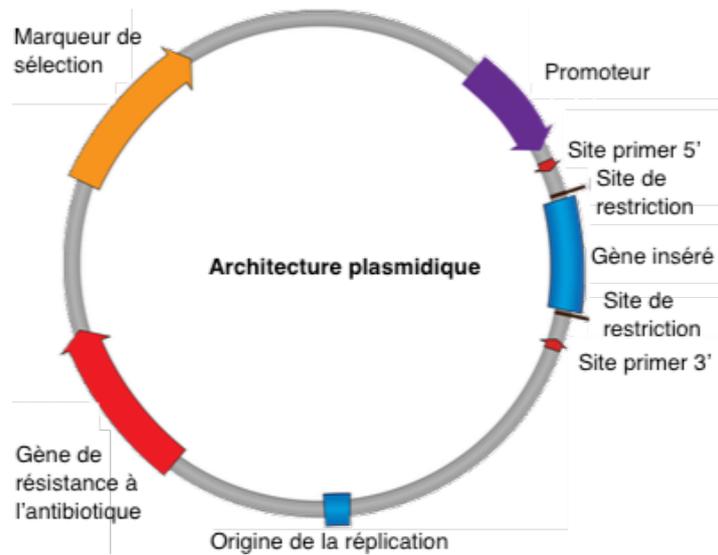


Figure 36 : Architecture plasmidique¹²⁷

<p>Origine de réplication (ORI)</p>	<p>Séquence d'ADN qui dirige l'initiation de la réplication plasmidique en recrutant des éléments de la machinerie cellulaire nécessaire à son déroulement. L'ORI est essentiel pour donner la capacité au plasmide à être amplifié (ce qui est une caractéristique importante pour laquelle les plasmides sont pratiques et faciles à utiliser).</p>
<p>Gène de résistance aux antibiotiques</p>	<p>Permet la sélection de bactéries contenant des plasmides en offrant un avantage de survie à l'hôte bactérien. Chaque bactérie peut contenir plusieurs copies d'un plasmide individuel et, idéalement, répliquerait ces plasmides lors de la division cellulaire en plus de leur propre ADN génomique. Pour assurer la rétention de l'ADN plasmidique dans les populations bactériennes, un gène de résistance aux antibiotiques (c'est-à-dire un gène dont le produit confère la résistance à l'ampicilline) est inclus dans le plasmide. Ces bactéries sont ensuite cultivées en présence d'ampicilline. Dans ces conditions, il existe une pression sélective pour conserver l'ADN plasmidique, malgré la charge de réplication supplémentaire, car les bactéries sans l'ADN plasmidique ne survivraient pas au traitement antibiotique. Il est important de distinguer que le gène de résistance aux antibiotiques est sous le contrôle d'un promoteur bactérien et qu'il est donc exprimé dans la bactérie par un mécanisme de transcription bactérien.</p>
<p>Site de clonage multiple (MCS)</p>	<p>Court segment d'ADN contenant plusieurs sites d'enzymes de restriction, permettant une insertion facile de l'ADN par digestion et ligature d'enzymes de restriction. Dans les plasmides d'expression, le MCS est souvent situé en aval d'un promoteur, de sorte que lorsqu'un gène est inséré dans le MCS, son expression sera dirigée par le promoteur. En règle générale, les sites de restriction dans le MCS sont uniques et ne sont pas situés ailleurs dans le squelette du plasmide.</p>

Insérer	L'insert est le gène, le promoteur ou un autre fragment d'ADN cloné dans le MCS. L'insert est typiquement l'élément génétique que l'on souhaite étudier à l'aide d'un plasmide particulier.
Région promotrice	Le promoteur est conçu pour recruter des mécanismes de transcription à partir d'un organisme ou d'un groupe d'organismes particulier. Cela signifie que si un plasmide est destiné à être utilisé dans des cellules humaines, le promoteur sera une séquence promotrice humaine ou mammifère. Le promoteur peut également diriger l'expression spécifique dans une cellule, ce qui peut être obtenu par un promoteur spécifique à un tissu (par exemple, un promoteur spécifique du foie). La force du promoteur est également importante pour contrôler le niveau d'expression de l'insert (c'est-à-dire qu'un promoteur fort dirige une expression élevée, alors que des promoteurs plus faibles peuvent diriger des niveaux d'expression bas / endogènes).
Marqueur sélectionnable	Le marqueur de sélection est utilisé pour sélectionner les cellules qui ont absorbé avec succès le plasmide dans le but d'exprimer l'insert. Le marqueur de sélection permet de sélectionner une population de cellules ayant absorbé le plasmide et pouvant être utilisées pour étudier l'insert. Le marqueur de sélection se présente généralement sous la forme d'un autre gène de résistance aux antibiotiques (cette fois sous le contrôle d'un promoteur non bactérien) ou d'une protéine fluorescente (pouvant être utilisée pour sélectionner ou trier les cellules par visualisation ou par FACS).
Site de reliure d'apprêt	Une courte séquence d'ADN simple brin utilisée comme point d'initiation pour l'amplification par PCR ou le séquençage de l'ADN du plasmide. Les amorces peuvent être utilisées pour vérifier la séquence de l'insert ou d'autres régions du plasmide.

Tableau 4 : Composants plasmidiques minimum¹²⁷

1.4.2.1.2 Mode de fonctionnement

Il faut noter que l'ADN transfecté doit entrer dans le noyau pour la production d'ARN messager et d'ARNg. L'ARNm conduira par le biais d'un détournement de la machinerie cellulaire de la cellule hôte à la production de la protéase Cas9, et l'ARNg sera utilisé dans un second temps afin de guider cette protéine. Il faut néanmoins prendre en considération le risque d'intégration de ce matériel génétique dans le génome de la cellule hôte.

Il est aujourd'hui possible d'avoir un ciblage d'un seul gène (Figure 37)¹²⁸ ou de plusieurs gènes (Figure 38)¹²⁹ à la fois par le biais de cette technique.

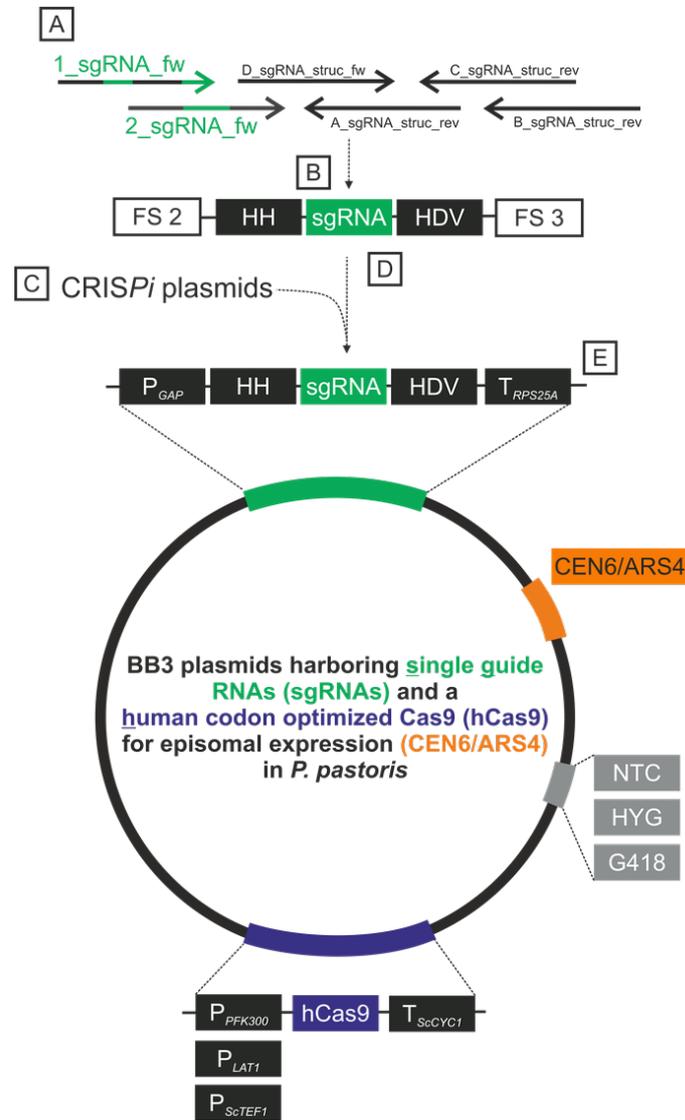


Figure 37 : Structure d'un plasmide ciblant un seul gène ¹²⁸

(A) La construction des sgRNA est réalisée à la suite d'une PCR de 6 amorces chevauchantes. La séquence variable est couverte par deux amorces (1_sgRNA_fw et 2_sgRNA_fw) et la partie structurale contenant le sgRNA et les ribozymes adjacentes est composée de quatre amorces (D_sgRNA_struct_fw et A, B et C_sgRNA_struct.).

(B) La construction finale HH-sgRNA-HDV est flanquée de sites de restriction BspI (enzyme de restriction)¹³⁰ avec un site de fusion ouvert Fs2 (5') et Fs3 (3').

(C) Les plasmides CRISPRi contiennent tous les éléments nécessaires à l'expression de hCas9 et sgRNA dans *P. pastoris*, HH - sgRNA - HDV et une cassette d'expression vide HH - sgRNA - HDV avec des sites internes BspI entre le promoteur et le terminateur sgRNA (Fs 2,3 linker).), permettent l'assemblage direct des plasmides finaux (D).

(E) Les plasmides finaux présentent une séquence CEN6 / ARS4 pour l'expression épisomique, un marqueur de résistance pour la sélection positive chez *E. coli* et *P. pastoris*, une unité d'expression pour hCas9 (3 promoteurs différents, PPFK300, PLAT1 et PScTEF1 disponibles) et l'expression unité pour l'unité HH - sgRNA - HDV sous le contrôle du promoteur PGAP et du terminateur TRPS25A.

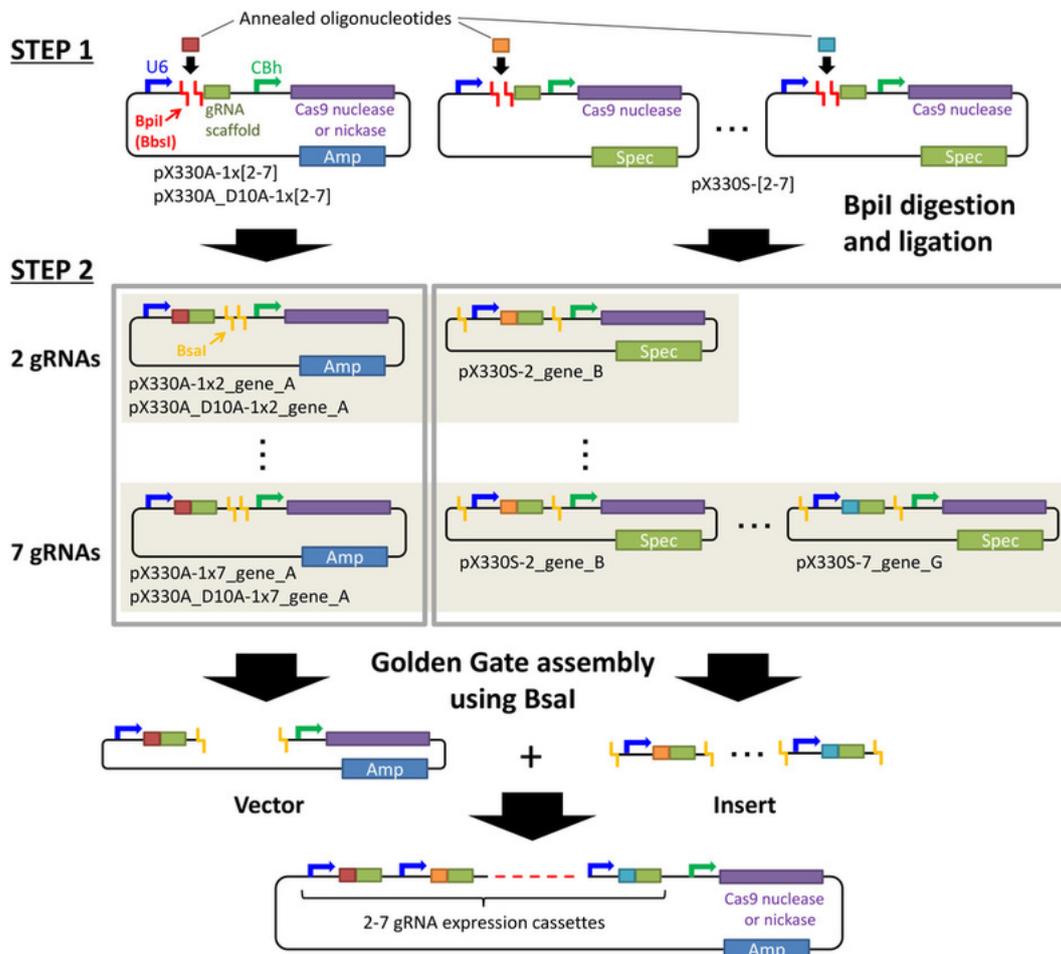


Figure 38 : Structure d'un plasmide ciblant plusieurs gènes ¹²⁹

La figure 34 illustre le kit du système d'assemblage Multiplex CRISPR-Cas9 (commercialisé par l'entreprise Addgene) permettant la construction de vecteurs CRISPR-Cas9 tout-en-un qui exprime plusieurs ARNg (2-7) et une nucléase Cas9. Plusieurs cassettes d'ARNg sont assemblées à l'aide de la méthode de clonage Golden Gate ¹³¹ médiée par BsaI. Le kit contient 18 plasmides : pX330A-1x [2-7], pX330A_D10A-1x [2-7] et pX330S- [2-7].

1.4.2.2 Protéine complexant Cas9 et l'ARNg

L'autre manière permettant l'acheminement de la nucléase Cas9 se réalise sous forme d'une protéine complexée à l'ARNg (formant un complexe Ribo Nucléo Protéique (RNP)), ce système s'affranchit alors de l'ADN utilisé dans la précédente méthode décrite (Figure 39). Ces systèmes représentent donc une alternative intéressante, car le complexe RNP est directement opérationnel dès son entrée dans le cytoplasme sans risque d'intégration de l'ADN. De plus, la délivrance de la nucléase Cas9 conduit à un meilleur contrôle de son expression, atténuant ainsi son activité « Off Target », c'est-à-dire « hors cible ». Ainsi, les RNP clivent l'ADN chromosomique presque immédiatement après leur délivrance dans la cellule et se dégradent rapidement dans ces dernières, réduisant ainsi les effets hors cible ¹³².

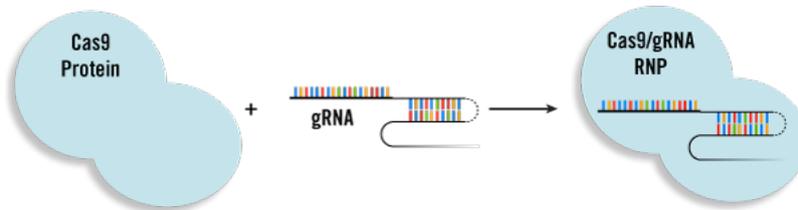


Figure 39 : Mode de délivrance Cas9-gRNA sous forme de RNP ¹³³

En outre, l'administration de RNP est moins stressante pour les cellules souches embryonnaires humaines, produisant au moins deux fois plus de colonies que la transfection plasmidique¹³⁴.

Mais pour cela une libération intracellulaire efficace des protéines est nécessaire. Les méthodes actuelles d'administration des protéines que nous avons vues précédemment souffrent généralement d'une faible tolérance au sérum, d'une faible fuite endosomale et d'une efficacité *in vivo* limitée¹³⁵. D'après les publications de John A. Zuris et son équipe, les réactifs de transfection d'acide nucléique cationiques communs peuvent libérer des protéines qui sont fusionnées à des protéines super-chargées négativement, qui contiennent des domaines anioniques naturels ou qui se lient de manière native à des acides nucléiques anioniques¹³⁶.

Cette approche implique la délivrance efficace de concentration en nanomolaire de recombinase Cre, d'activateurs de transcription basés sur Cas9, et de complexes nucléase Cas9 : sgRNA dans des cellules humaines en culture dans un milieu contenant 10% de sérum. La délivrance de complexes Cas9: sgRNA non modifiés avait alors entraîné jusqu'à 80% de modification du génome avec une spécificité sensiblement plus élevée par rapport à la transfection d'ADN. Cette approche a également permis une délivrance efficace des complexes Cre recombinase et Cas9: sgRNA dans l'oreille interne de souris *in vivo*, permettant une recombinaison à 90% et une modification du génome à 20% par Cas9 dans les cellules.

→ Précision sur la recombinase Cre :

La Cre recombinase est une enzyme tyrosine recombinase dérivée du bactériophage P1. L'enzyme utilise un mécanisme similaire à la topoisomérase I pour réaliser des recombinaisons spécifiques à un site. Cette intégrase fait partie de la famille des recombinases spécifiques de site et elle est connue pour catalyser la recombinaison spécifique de site entre deux sites de reconnaissance d'ADN (sites LoxP). Les produits de recombinaison induite par Cre sur les sites LoxP dépendent de l'emplacement et de l'orientation relative des sites LoxP. Deux espèces d'ADN distinctes contenant des sites LoxP peuvent subir une fusion suite à la recombinaison induite par Cre¹³⁷.

Cette recombinase est généralement utilisée dans le cadre de l'usage de CRISPR-Cas9 avec un plasmide HDR ou Knockout. Après la sélection par la Puromycine, les cellules peuvent être transfectées avec le Vecteur Cre pour exciser le matériel génétique inséré durant la phase de réparation de l'ADN homologue, tel que le gène de résistance à cet antibiotique. Le vecteur Cre peut contenir un promoteur CMV pour diriger l'expression de la recombinase Cre (Figure 40).

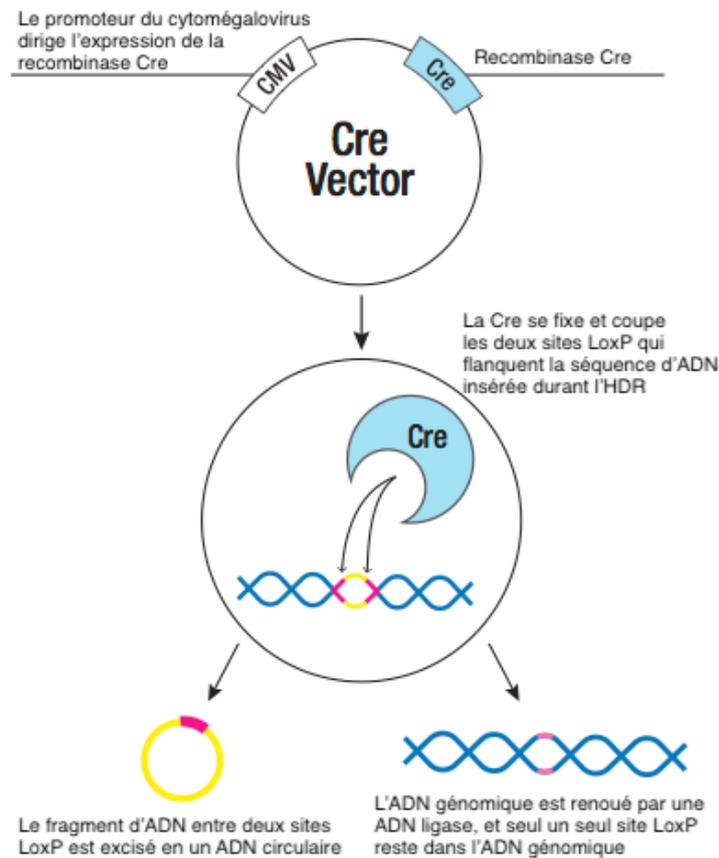


Figure 40 : Fonctionnement de la recombinaise Cre¹³⁷

1.4.3 Quel système d'expression choisir ?

Après avoir défini l'objectif de la manipulation génétique à réaliser, et comment cibler la cellule devant subir cette modification, il faut choisir le système d'expression permettant cette action.

CRISPR nécessite à la fois la protéase Cas9 et un ARNg exprimé dans la cellule cible. Pour les types de cellules faciles à transfecter (par exemple, les cellules HEK293), une transfection avec des réactifs de transfection standard peut être suffisante pour exprimer la machinerie CRISPR¹³⁸. Pour les cellules plus difficiles (par exemple les cellules primaires), le transfert par un vecteur viral des réactifs CRISPR peut être plus approprié¹³⁹. Dans les cas où l'édition hors cible est une préoccupation majeure, les complexes de ribonucléoprotéine (RNP) Cas9-gARN sont avantageux en raison de l'expression transitoire de Cas9.

Le tableau 5 résume les principaux systèmes d'expression et les principales variables pour l'utilisation de CRISPR dans des cellules de mammifère. Certaines des variables incluent :

- L'espèce de l'enzyme Cas et d'ARNg
- L'espèce de promoteur et modèle d'expression du promoteur pour l'enzyme Cas et l'ARNg
- La présence d'un marqueur sélectionnable (médicament ou fluorophore)
- La méthode de livraison

Système d'expression	Composants du système	Application
Vecteur d'expression mammifère	<ul style="list-style-type: none"> Le promoteur de l'enzyme Cas peut être constitutif (CMV, EF1alpha, CBh) ou inductible (Tet-ON). Le promoteur U6 est généralement utilisé pour l'ARNg. Peut contenir un gène rapporteur (par exemple, GFP) pour identifier et enrichir les cellules positives, ou un marqueur de sélection pour générer des lignées cellulaires stables 	Expression transitoire ou stable de Cas9 et / ou d'ARNg dans une lignée cellulaire de mammifère pouvant être transfectée avec un rendement élevé
Transduction lentivirale	<ul style="list-style-type: none"> Cas9 et ARNg peuvent être présents dans un seul vecteur de transfert lentiviral ou dans des vecteurs de transfert séparés Peut contenir un gène rapporteur (Ex. : GFP) ou un marqueur de sélection pour identifier et enrichir les cellules positives Les plasmides d'emballage et d'enveloppe fournissent les composants nécessaires à la fabrication de particules lentivirales) 	<ul style="list-style-type: none"> Expression stable et ajustable de Cas9 et / ou d'ARNg dans une grande variété de lignées cellulaires de mammifères Utile pour les types de cellules difficiles à transfecter. Peut aussi être utilisé <i>in vivo</i> Un choix commun pour la réalisation d'écrans du génome entier avec CRISPR
Transduction AAV	<ul style="list-style-type: none"> Limite de conditionnement ~ 4,5 kb (compatible uniquement avec les enzymes Cas plus petites) Les éléments CRISPR sont insérés dans un vecteur de transfert AAV et utilisés pour générer des particules AAV 	<ul style="list-style-type: none"> Expression transitoire ou stable de SaCas9 et / ou d'ARNg Infections des cellules en division et non en division AAV est la méthode la moins toxique pour la délivrance virale <i>in vivo</i>
Livraison d'ARN de Cas9 et d'ARNg	Les réactions de transcription <i>in vitro</i> génèrent l'ARNm et l'ARNg de Cas9 matures, qui sont ensuite délivrés aux cellules cibles par microinjection ou électroporation.	<ul style="list-style-type: none"> Expression transitoire de composants CRISPR L'expression diminue à mesure que l'ARN se dégrade dans la cellule Une courte fenêtre d'expression de composant CRISPR peut réduire les effets non ciblés

Système d'expression	Composants du système	Application
		<ul style="list-style-type: none"> Peut être utilisé pour générer des embryons transgéniques
Complexes de ribonucléoprotéines (RNP) Cas9-gARN	La protéine Cas9 purifiée et l'ARNg transcrit <i>in vitro</i> sont combinés pour former un complexe Cas9-gARN, qui est délivré aux cellules à l'aide de lipides cationiques	<ul style="list-style-type: none"> Expression transitoire de composants CRISPR Une courte période d'activité de CRISPR peut réduire les effets non ciblés

Tableau 5 : Principaux systèmes d'expression dans l'utilisation de CRISPR¹⁴⁰

I.4.4 Comment sélectionner la séquence cible et concevoir l'ARNg ?

Une fois que les composants de CRISPR et la méthode de livraison ont été choisis, il faut sélectionner une séquence cible et concevoir l'ARNg.

I.4.4.1 Connaître la lignée cellulaire / organisme et la séquence génomique

Lorsque cela est possible, il faut séquencer la région que l'on prévoit de modifier avant de concevoir votre ARNg, car la variation de séquence entre votre séquence de ciblage d'ARNg et l'ADN cible peut entraîner une réduction du clivage. Le nombre d'allèles pour chaque gène peut varier en fonction de la lignée cellulaire ou de l'organisme, ce qui peut affecter l'efficacité observée de knock-out ou CRKPR de CRISPR.

I.4.4.2 Sélectionner le gène et l'élément génétique à manipuler

Afin de manipuler un gène donné à l'aide de CRISPR, il est nécessaire d'identifier la séquence génomique du gène qui doit être ciblée. Cependant, la région exacte du gène qui sera ciblée dépendra de l'activité que l'on voudra exercer. Par exemple :

- Pour activer ou réprimer un gène cible à l'aide d'activateurs dCas9 ou de répresseurs dCas9, les ARNg doivent être ciblés sur le promoteur responsable de l'expression du gène d'intérêt.
- Pour les knock-outs, les ARNg ciblent généralement des exons exprimés de manière constitutive en 5', ce qui réduit les chances que la région ciblée soit retirée de l'ARNm en raison d'un épissage alternatif. Les exons proches de l'extrémité N-terminale sont visés, car les mutations des allèles décalant la trame du génome augmentent la probabilité de production d'un produit protéique non fonctionnel.
- Il est également possible que les ARNg soient conçus pour cibler des exons qui codent pour des domaines protéiques essentiels. L'avantage de cette approche est que même les allèles non dépendant du cadre peuvent modifier la fonction des protéines lorsqu'ils se produisent dans des domaines protéiques importants.
- Pour les expériences d'édition de gènes utilisant le HDR, il est essentiel que la séquence cible soit très proche de l'emplacement du montage souhaité, idéalement à moins de 10 pb. Dans ce cas, il est nécessaire d'identifier l'emplacement exact où la modification doit avoir lieu et de sélectionner une séquence cible à proximité.

1.4.4.3 Sélectionner les ARNg sur la base des activités prévues et non ciblées

Une séquence PAM est absolument nécessaire pour que Cas9 se lie à l'ADN cible. En tant que tel, on peut commencer par identifier toutes les séquences de PAM dans la région génétique à cibler. S'il n'y a pas de séquences PAM pour l'enzyme choisie dans la séquence souhaitée, il est possible d'envisager d'autres enzymes de Cas. Une fois que les séquences PAM possibles et les sites cibles putatifs ont été identifiés, il faut choisir le site susceptible de générer le clivage le plus efficace sur la cible.

La séquence cible d'ARNg doit correspondre au locus cible, mais il est également essentiel de s'assurer que la séquence cible d'ARNg ne corresponde pas à des sites (autres) supplémentaires dans le génome. Dans l'idéal, la séquence cible d'ARNg aurait une homologie parfaite avec la cible sans homologie ailleurs dans le génome. Mais en réalité, une séquence cible d'ARNg aura une homologie partielle avec des sites supplémentaires dans le génome. Ces sites sont appelés « off-target » (trad. : hors cible) et doivent être examinés lors de la conception de l'ARNg. En général, les sites non ciblés ne sont pas clivés aussi efficacement lorsque des disparités apparaissent près de la séquence PAM. Par conséquent, les ARNg sans homologie ou présentant des disparités proches de la séquence PAM auront la spécificité la plus élevée. Pour augmenter la spécificité, il est également envisageable d'utiliser une enzyme Cas haute fidélité.

En plus de l'activité off-target, il est également important de prendre en compte les facteurs qui maximisent le clivage de la séquence cible souhaitée ou de l'activité sur cible. Deux séquences de ciblage d'ARNg présentant une homologie de 100% avec leurs cibles d'ADN peuvent ne pas aboutir à une efficacité de clivage équivalente. En effet, l'efficacité du clivage peut augmenter ou diminuer en fonction des nucléotides spécifiques dans la séquence cible sélectionnée. Par exemple, des séquences de ciblage d'ARNg contenant un nucléotide G en position 20 (1 pb en amont de la PAM) peuvent être plus efficaces que des ARNg contenant un nucléotide C à la même position, bien qu'ils correspondent parfaitement à la séquence cible.

De nombreux programmes de conception d'ARNg peuvent localiser des séquences PAM et cibles potentielles et classer les ARNg associés en fonction de leur activité prédite sur cible et hors cible. De plus, de nombreux plasmides contenant des ARNg validés sont maintenant disponibles chez différentes biotech les commercialisant. Ces plasmides contiennent des ARNg qui ont été utilisés avec succès dans des expériences d'ingénierie génomique.

1.4.4.4 Synthétiser et cloner les ARNg souhaités

Une fois que les séquences cibles ont été sélectionnées, il faut concevoir les oligos d'ARNg et les cloner dans le vecteur souhaité. Dans de nombreux cas, les oligos de ciblage sont synthétisés, et insérés dans des plasmides contenant l'échafaudage d'ARNg en utilisant un clonage standard par ligature de restriction. Cependant, la stratégie de clonage exacte dépendra du vecteur d'ARNg choisi.

1.4.4.5 Livrer Cas9 et ARNg

Il est primordial de choisir une méthode de livraison compatible avec le système expérimental. L'efficacité de CRISPR dépend de la méthode d'administration et du type de cellule. Avant de procéder à la manipulation, il peut être nécessaire d'optimiser les conditions de livraison comme cela a pu être développé dans les précédentes parties.

1.4.4.6 Valider la modification génétique

Une fois que la protéine Cas et les gRNA ont été délivrés avec succès dans les cellules cibles, il est important de valider la modification du génome. L'édition CRISPR produit plusieurs génotypes possibles au sein de la population cellulaire résultante. Certaines cellules peuvent être de type

sauvage (donc non modifiées) en raison d'un manque d'expression de l'ARNg et / ou de Cas9, ou d'un manque de clivage cible efficace dans les cellules exprimant à la fois Cas9 et l'ARNg.

Les cellules éditées peuvent être homozygotes ou hétérozygotes au niveau du locus cible. De plus, dans les cellules contenant deux allèles mutés, chaque allèle muté peut être différent en raison de la nature sujette aux erreurs de NHEJ. Dans les expériences d'édition de gènes HDR, la plupart des allèles mutés ne contiennent pas l'édition souhaitée, car un pourcentage important de DSB est toujours réparés par NHEJ.

La méthode exacte nécessaire pour valider une modification génétique dépend de l'objectif voulu. Il existe cependant plusieurs moyens de vérifier que les cellules contiennent l'édition souhaitée, notamment via :

- Un test de clivage par mésappariement (pour les DSB réparés par NHEJ): cela fournit une lecture semi-quantitative du pourcentage d'allèles mutés au sein d'une population de cellules mélangées. La région d'intérêt est amplifiée par PCR, les produits de PCR sont dénaturés-renaturés, traités avec une nucléase qui clive les hétéroduplexes de l'ADN et passés sur un gel d'agarose pour identifier les fragments d'ADN.
- Une PCR et digestion de restriction (pour les DSB réparés par HDR) : pour les modifications de petits nucléotides introduisant un nouveau site de restriction. La région d'intérêt est amplifiée par PCR, digérée avec l'enzyme de restriction appropriée et passée sur un gel d'agarose pour identifier les fragments d'ADN.
- Une amplification PCR et électrophorèse sur gel (pour HDR ou NHEJ) : pour les grandes délétions ou les insertions, la région d'intérêt peut être amplifiée par PCR en utilisant des amorces qui, soit encadrent la région d'intérêt (délétions ou petites insertions), soit couvrent le génome qui insère la limite (insertions seulement). Le produit de PCR est ensuite passé sur un gel d'agarose pour déterminer si la vérification a réussi.
- Une amplification PCR, sous-clonage et séquençage de Sanger (pour HDR ou NHEJ) qui fournit une évaluation semi-quantitative de la fréquence de ciblage et de la séquence exacte des allèles ciblés. Cela implique l'amplification par PCR de la région ciblée à partir de l'ADN, le sous-clonage dans un plasmide et le criblage de clones individuels.
- Une amplification PCR et séquençage de nouvelle génération (pour HDR ou NHEJ) qui fournit une évaluation quantitative des modifications du génome dans la séquence cible et peut également être utilisée pour examiner les effets non ciblés.

Conclusion intermédiaire

Après avoir revu les postulats sur lesquels se fondent la biotechnologie CRISPR-Cas9, de la découverte de l'ADN, en passant par les fondements de la virologie et la synthèse d'oligonucléotide, la technique a été expliquée étape par étape à la manière de la conception d'une expérience.

Transition

A présent, il semble pertinent de faire un état des lieux des réalisations possibles aujourd'hui en 2019 : les freins rencontrés et les leviers d'amélioration de cette biotechnologie. Enfin, seront abordées les pathologies faisant l'objet d'essais cliniques, et celles dont l'ambition laisse à penser qu'elles pourront être candidates à ce mode d'édition du génome.

II. AUJOURD'HUI

Cette technologie, qui devrait atteindre 3,61 milliards de dollars de revenus d'ici 2021¹⁴¹, semble pouvoir encore s'améliorer. Au lendemain des « bébés CRISPR »¹⁴², il est intéressant de revenir sur les paramètres permettant d'optimiser la méthode et d'éviter certains risques liés à la fois aux modifications du génome, mais plus globalement à l'emploi de cette technique.

II.1 État des lieux

CRISPR-Cas9 s'est établi comme un puissant outil moléculaire dans de nombreux domaines d'études biologiques où il est utile de cibler ou de modifier les séquences d'ADN spécifiques dérivées à l'origine du système immunitaire adaptatif bactérien¹⁴³. Cette nucléase Cas9 peut localiser et cliver un ADN cible via un ARN guide, et éditer l'ADN cible aux locus souhaités dans les cellules eucaryotes¹⁴⁴. Cependant, dans le contexte de grands génomes eucaryotes, la protéase est connue pour se lier et cliver des sites non ciblés¹⁴⁵ ce qui n'était pas le cas des outils tels que les doigts de zinc ou les TALEN. Des travaux permettant d'améliorer et comprendre la spécificité de Cas9 sont donc d'une importance cruciale.

Récemment, plusieurs améliorations ont été mises au point pour l'enzyme sauvage de Cas9 dérivée *Streptococcus pyogenes* (nucléase la plus utilisée pour l'édition du génome). Initialement, les scientifiques ont fait appel à des solutions bioinformatiques pour la sélection de la séquence de l'ARN guide permettant la reconnaissance des cibles génomiques apparentées ayant une homologie de séquence minimale à travers l'ensemble du génome que l'on cherchait à modifier. Bien que cette méthode se soit révélée raisonnablement efficace, certains profils subséquents ont conservé une activité hors cible *in vitro*¹⁴⁶ et *in vivo*¹⁴⁷ qui ont conduit à la première série de recommandations basées sur les données pour la sélection du site cible. Ces outils informatiques vont donc permettre en fonction du locus ciblé et l'espèce dans laquelle on souhaite réaliser une modification, que les modèles informatiques classent les ARNg par spécificité probable et informent sur les sites susceptibles d'être « hors cible ».

Cependant, le nombre de sites « hors cible » potentiels reste incertain puisque la précision de la prédiction *in silico* peut varier. Ainsi, un axe d'amélioration se fonde sur les méthodes de détection et de quantification « hors cible ». Dans cette démarche, plusieurs protocoles pour la détection non biaisée de l'activité « hors cible » de Cas9 à l'échelle du génome dans les cellules ont récemment été décrits¹⁴⁸, et sont des compléments importants à la détection biaisée « hors cible » des méthodes basées sur la prédiction *in silico* et le séquençage ciblé¹⁴⁹. En plus de ces protocoles, des outils de calcul ont été développés pour aider à la conception d'ARN guide et prédire les sites « hors cible » en prenant en compte la compréhension approfondie des spécificités cellulaires incluant les caractéristiques détaillées de la séquence « hors cible » et les orthologues de Cas9.

Enfin, de nombreuses méthodes ont été développées pour améliorer la spécificité en utilisant des orthologues naturels ou artificiels de Cas9, l'ingénierie de la protéine Cas9 ou de l'ARN guide, ou par modulation de la cinétique et de la régulation des composants CRISPR dans la cellule. Entre temps, l'utilisation de Cas9 inactivées : « dCas9 » pour cibler les sites de fixation comme les sites de régulation transcriptionnelle qui représentent une distinction particulière entre la recherche de la cible de Cas9 et le mécanisme nucléolytique. La spécificité de CRISPR doit également être considérée dans un sens plus large pour inclure le type, et la spécificité temporelle et spatiale. Enfin, la standardisation des méthodes d'analyse « hors cible » et la communication des données dans les publications de recherche seraient utiles pour permettre des comparaisons entre les études et de meilleurs algorithmes pour la conception d'ARN de guidage.

II.2 Axes d'améliorations

II.2.1 Détection biaisée des actions « hors cible » dans le génome

À ce jour, l'approche prédominante pour identifier l'activité hors cible de la nucléase Cas9 a été utilisée pour prédire par calcul les sites probablement « hors cible » en fonction des homologies de séquence, puis pour évaluer toute activité d'édition potentielle à l'aide de techniques enzymatiques sensibles aux séquences en désaccord avec les endonucléases, séquençage de Sanger ou analyse en profondeur des séquences cibles¹⁵⁰¹⁵¹. Ces prédictions sont à priori critiques car 98% des Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) ont des ARN guides qui ont dans les promoteurs et les exons humains au moins un site « hors cible » avec trois incompatibilités ou moins, et les études fondamentales de spécificité Cas9 ont démontré que les sites avec trois inadéquations ou moins sont nettement plus susceptibles d'être clivés que d'autres sites¹⁴⁹¹⁵². La sélection du site cible la plus unique possible est donc une stratégie importante pour améliorer la spécificité étant donné que de nombreuses applications d'édition de gènes ont plusieurs ARN guides possibles pour atteindre le même résultat expérimental (c'est-à-dire en détruisant un gène en introduisant un ou des indels dans un exon d'intérêt).

L'unicité de la séquence est donc un filtre initial important pour la sélection des ARN guides avec des sites potentiels « hors cible » avec une homologie de séquence élevée. Cependant, comme le nombre d'inadéquations par rapport au site cible augmente, le nombre total potentiel de sites « hors cible » augmente également de façon spectaculaire. Par exemple, un ARN guide de référence conçu pour cibler le locus EMX1 sans décalage sauf pour site « hors cible » d'une inadéquation dans le génome de référence hg38, a 10 sites « hors cibles » avec deux inadéquations, 69 sites pour trois inadéquations et jusqu'à 27 480 sites pour six inadéquations¹⁵³.

Par conséquent, même un séquençage ciblé est biaisé par un petit nombre de sites qui peuvent échapper à l'analyse du génome modifié par Cas9. En effet, il a été rapporté que des sites « hors cibles » ont été clivés par Cas9 et ont conduit jusqu'à 6 inadéquations par rapport à la séquence de guidage, ce qui démontre le risque de manquer des événements détectables en fixant des seuils trop bas en terme de nombre d'inadéquations pour des raisons pratiques. En outre, la plupart des outils de prévision informatisés pour détecter les sites « hors cible » ne permettent pas d'envisager des séquences de sites non ciblés présentant des lacunes, des renflements ou un motif alternatif protospacer adjacent (PAM) (motifs de séquence reconnus par Cas9 directement en 3' de la séquence guide correspondante dans l'ADN cible : typiquement 5'-NGG pour SpCas9, mais aussi 5'-NAG avec une efficacité moindre)¹⁵⁴.

À l'avenir, les essais reposant sur le séquençage ciblé de sites « hors cible » pourraient devenir une norme en raison de leur sensibilité et de leur précision. Les méthodologies actuelles ayant une limite de détection inférieure d'environ 0,1%, soit 1/1000 inadéquation¹⁵⁵. Il est suggéré que l'essai Surveyor (plus simple et rapide) ne soit utilisé que lorsque le premier passage de clivage par la protéase est rapide et que les mesures d'efficacité du clivage sont nécessaires¹⁴⁵. Le test Surveyor est généralement quantifié en analysant l'intensité de la bande d'images électrophorétiques sur gel, et on pense que la limite de détection d'environ 5% de l'indel, ce qui le rend impropre à la plupart des détections d'événements « hors cibles ». Enfin, le séquençage ciblé est peut-être mieux à même de vérifier l'activité sur des sites « hors cible » découverte par des méthodes non biaisées, couvrant l'ensemble du génome¹⁵⁶

II.2.2 Détection non biaisée des actions « hors cible » dans le génome

Aborder les limitations actuelles associées aux prévisions *in silico* de potentiels sites « hors cible » par plusieurs méthodes non biaisées ont récemment été rapportées pour mesurer l'activité « hors cible » de Cas9 sur le génome¹⁵⁷. Les protocoles basés sur le séquençage profond tel que BLESS¹⁵³, HTGTS¹⁵⁸, GUIDE-seq¹⁵⁹, capture IDLV¹⁶⁰ et Digenome-seq¹⁶¹ qui sont des méthodes non biaisées démontrent que la séquence d'homologie seule n'est pas totalement prédictive des sites « hors cible ». En outre, bien que le PAM ait tendance à être le prédicat le plus strict de la fidélité de reconnaissance de la cible par rapport à la séquence guide, une mutagenèse non ciblée a également été observée au niveau des PAM non canoniques, confirmant que les méthodes peuvent manquer des sites « hors cible » importants de Cas9.

Cependant, selon l'approche utilisée pour analyser le clivage de l'ADN induit par Cas9, les méthodes non biaisées ont tendance à être moins sensibles et avoir un débit inférieur à celui du séquençage ciblé (vu précédemment). De plus, il est généralement nécessaire de séquencer une plus grande partie du génome, et les protocoles à mettre en place sont beaucoup plus complexes. Par conséquent, il est actuellement difficile de générer des données « hors cible » à une échelle nécessaire pour déterminer adéquatement un modèle prédictif de spécificité. Néanmoins, ces approches restent utiles pour les chercheurs cherchant à valider des séquences d'ARN guide individuellement dans leur système expérimental.

GUIDE-seq et Digenome-seq ont une sensibilité pour détecter des événements non ciblés à environ 0,1%, soit 1 événement sur 1000, alors que la capture IDLV a une sensibilité de 1%, là où les méthodes BLESS et HTGTS n'ont pas explicitement rapporté leur sensibilité. Il convient donc de noter que tous ces taux de sensibilité varient selon différents paramètres qui sont à la fois liés au nombre de cellules testées dans l'expérimentation, la profondeur de séquençage et les méthodes bioinformatiques utilisées pour différencier les événements de clivage induit par Cas9 et ceux dus au bruit de fond. Ainsi, les différences de sensibilité de détection rapportées entre les différents protocoles ne reflètent pas nécessairement la meilleure méthode de détection « hors cible », mais montrent la nécessité de techniques d'optimisation.

Conclusion intermédiaire

Les futures générations de ces méthodes devraient permettre d'améliorer la précision et le débit, ainsi que de réduire le nombre de cellules requises pour ces tests. En résumé, ces méthodes biaisées et non biaisées peuvent et devraient être utilisées de manière complémentaire. Par exemple, des sites « hors cible » peuvent être découverts *in vitro* (par exemple par Digenomeseq), dans des types de cellules faciles à cultiver (par exemple par HTGTS, ou par GUIDE-seq), ou même *in vivo* (par exemple par BLESS) dans des lignées cellulaires d'intérêt par séquençage ciblé. Bien que des combinaisons de méthodes biaisées et non biaisées aient été utilisées pour un petit ensemble d'ARN guide, des ensembles de données plus importants seront nécessaires pour déterminer le degré de précision pour la détection *in vitro* de modification « hors cible ». Ces types de collection de données conduiront à une amélioration continue d'outils de bioinformatique pour la sélection de sites cibles, ces améliorations seront à considérer dans la perspective du développement du machine learning (trad. : apprentissage automatique informatisé) et de l'intelligence artificielle.

II.2.3 Sélection des ARN guides et modèles prédictifs

De nombreux outils et applications en ligne ont été développés pour la conception *in silico* des ARN guides et la prédiction de leurs sites « hors cible ». Certains, comme BLAST¹⁶² (pour les guides pré-designer) ou Cas-OFFinder¹⁶³, permettent d'identifier les sites « hors cible » via la similarité de séquence et les classent en fonction de leur orthogonalité, tandis que d'autres méthodes utilisent un calcul de score de spécificité (développé dans la précédente partie). Cette formule note les guides sur la base d'une somme pondérée des disparités. Il a été établi que les disparités entre les 5' du spaceur sont plus fréquemment tolérées que les disparités proximales de PAM. Cet effet de "séquence d'ensemencement" a été corroboré par des expériences biochimiques démontrant que Cas9 se déroule et se lie à l'ADN de manière directionnelle en s'éloignant, ou de 3' vers 5' par rapport à la PAM¹⁶⁴, et que l'appariement correct de l'extrémité 5' de la séquence guide est important pour le positionnement correct du domaine de la nucléase et la réussite Clivage Cas9¹⁶⁵. Au-delà de la pondération pour les mésappariements proximaux de PAM, le score de spécificité reflète également la constatation que des inadéquations consécutives atténuent plus l'activité de Cas9 qu'un nombre équivalent de mésappariements espacés. De plus il est important de recontextualiser ces résultats, en effet les directives qui ont été établies sont basées sur des études de SpCas9, leur applicabilité à des orthologues couramment utilisés chez Cas9 restent donc des extrapolations.

Globalement, ces outils bioinformatiques semblent généralement bien classer les ARN guides de telle sorte que, pour un locus donné, les utilisateurs peuvent facilement sélectionner des séquences de guidage optimisées très spécifiques. Cependant, comme la compréhension des mécanismes de Cas9 reste empirique, plusieurs mises en garde, ainsi que des pistes pour l'amélioration de la prédiction, ont émergé.

Par exemple, il existe des rationnels suggérant que des sites « hors cible » avec de petites insertions ou suppressions (InDels) dans la séquence ciblée ou dans des PAM alternatifs peuvent être clivés par Cas9, bien que ceci ne représente qu'une faible fréquence¹⁵³. De manière similaire, on sait que la spécificité de Cas9 varie en fonction d'autres variables telles que le type cellulaire, l'espèce, le mode de livraison, et le dosage. Il est donc difficile d'intégrer toutes ces observations de manière systématique, afin que ces paramètres soient pris en compte par les outils de prédiction des « hors cible ».

Pour exploiter le potentiel de prédiction de cette approche *in silico*, il semble nécessaire de mettre en place des outils capables de traiter ces ensembles de données afin d'améliorer les modèles de calcul et de les rendre de plus en plus précis pour accroître l'efficacité de désactivation des nouveaux ARN guides¹⁶⁶. Plus récemment, une analyse groupée a été mise en œuvre sur 9 914 variants d'ARN guide (couvrant la totalité des disparités uniques), et des ARN uniques (permettant de provoquer un phénomène InDels), ciblant 65 cibles dans le génome, ont été utilisés pour déterminer un score de détermination de fréquence de coupure (CFD) capable de prédire la probabilité d'activité « hors cible »¹⁶⁷.

Globalement, ces données soulignent la complexité de prédiction de la spécificité de Cas9 et de l'importance de prendre en compte à la fois la position et le type de mésappariement par une mesure comme le score CFD. En outre, dans une étude de validation, une corrélation a été établie entre le CFD et l'activité « hors cible » observée sur 60 sites avec un ou deux mésappariements. En règle générale, les ARN de guidage bien conçus évitent les sites de mésappariement de un ou deux nucléotides, les modèles doivent être améliorés pour prévoir l'activité dans les sites de non-concordance de trois ou quatre nucléotides. Les améliorations et idées futures seront probablement tirées de l'analyse d'importants ensembles de données qui considère les sites non

ciblés avec au moins un mésappariement ou un InDel. Enfin, les outils en ligne seront d'une utilité pratique pour la plupart des chercheurs, mais les bioinformaticiens peuvent tirer parti des performances et de la souplesse des outils hors ligne, tels que CRISPRseek¹⁶⁸. Une comparaison complète de ces outils informatiques peut être trouvée avec l'outil CRISPR Software Matchmaker¹⁶⁹.

II.2.4 Orthologues Cas9 et nouvelles protéines CRISPR

Récemment, un plus large éventail de protéines Cas9 orthologue a été mis au point pour l'édition du génome tels que le *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9). Sa taille est inférieure de 1kb à celle du plus communément utilisé SpCas9 et donc facilement emballé dans un AAV apparié avec la cassette d'expression de l'ARN guide pour l'édition *in vivo* du génome¹⁷⁰. SaCas9 démontre une activité nucléasique très efficace avec des séquences cibles de 21 à 24 Nt par rapport aux cibles de 20 Nt utilisées pour SpCas9, tout en employant un PAM 5'-NNGRRT par opposition au 5'-NGG de SpCas9. SaCas9 démontre également une efficacité de clivage sur les sites PAM de 5'-NNGRR. Il reste donc à comprendre comment une séquence cible plus longue et une préférence plus longue de PAM affectent le génome de l'activité « hors cible » de SaCas9. Bien que les premiers résultats obtenus avec les méthodes non biaisées BLESS et les protocoles GUIDE-seq semblent prometteurs¹⁵³. Donner des guides identiques ciblant des sites avec des PAM RRT 5'-NGG imbriqués, éditer avec SaCas9 contrairement à SpCas9, ont donné des fréquences d'InDels plus faibles dans moins de sites « hors cible »¹⁵³.

Les Cas9 dérivés de *Neisseria meningitides* (NmCas9) et de *Streptococcus thermophilus* (StCas9) CRISPR1 et CRISPR3 ont également été conçus pour l'édition du génome spécifique dans les cellules de mammifères^{171,172}. Similaire à SaCas9, NmCas9 nécessite un PAM 5'-NNNNGATT plus complexe et utilise un espaceur plus long d'ARNt (21-24Nt) que SpCas9. Il est également important de noter que même si les PAM limitent la plage de ciblage dans le génome, ils limitent également le nombre de sites « hors cible » pour un guide donné. Par exemple, les motifs NGG apparaissent environ tout les 8 paires de base (pB), tandis que NNNNGATT est présent tous les 128pB¹⁷³. Une étude de NmCas9 a montré que le nombre de discordance et d'InDel était globalement amélioré par rapport à SpCas9, et que ceci est prometteur puisqu'il y avait une absence d'édition sur tous les sites avec moins de trois mésappariements¹⁷³. Cependant, l'efficacité de modification de la cible est toujours inférieure à celle de SpCas9, probablement en raison d'une faible activité de déroulement de l'ADN. De même, les deux orthologues StCas9 pourraient être plus spécifiques que les SpCas9 de type sauvage, mais ils souffrent également d'une efficacité plus faible¹⁷².

Cependant, les orthologues de Cas9 avec des profils de spécificité améliorés pourraient probablement être découverts ou améliorés par ingénierie. En examinant les bases de données génomiques disponibles pour les loci de CRISPR de type II, plus de 56 espèces bactériennes ont ainsi été identifiées avec de nouveaux tracrARN¹⁷⁴. De plus, les protéines Cas9 regroupées phylogénétiquement dans le même sous-groupe utilisent de manière interchangeable leurs duplexes d'ARNt-tracrRNA (double ARN) pour cliver l'ADN, ce qui suggère que les paires d'ARN guide Cas9 pourraient être optimisées en exploitant la diversité naturelle ou l'ingénierie afin d'améliorer les architectures de guidage¹⁷⁵ (Figure 41).

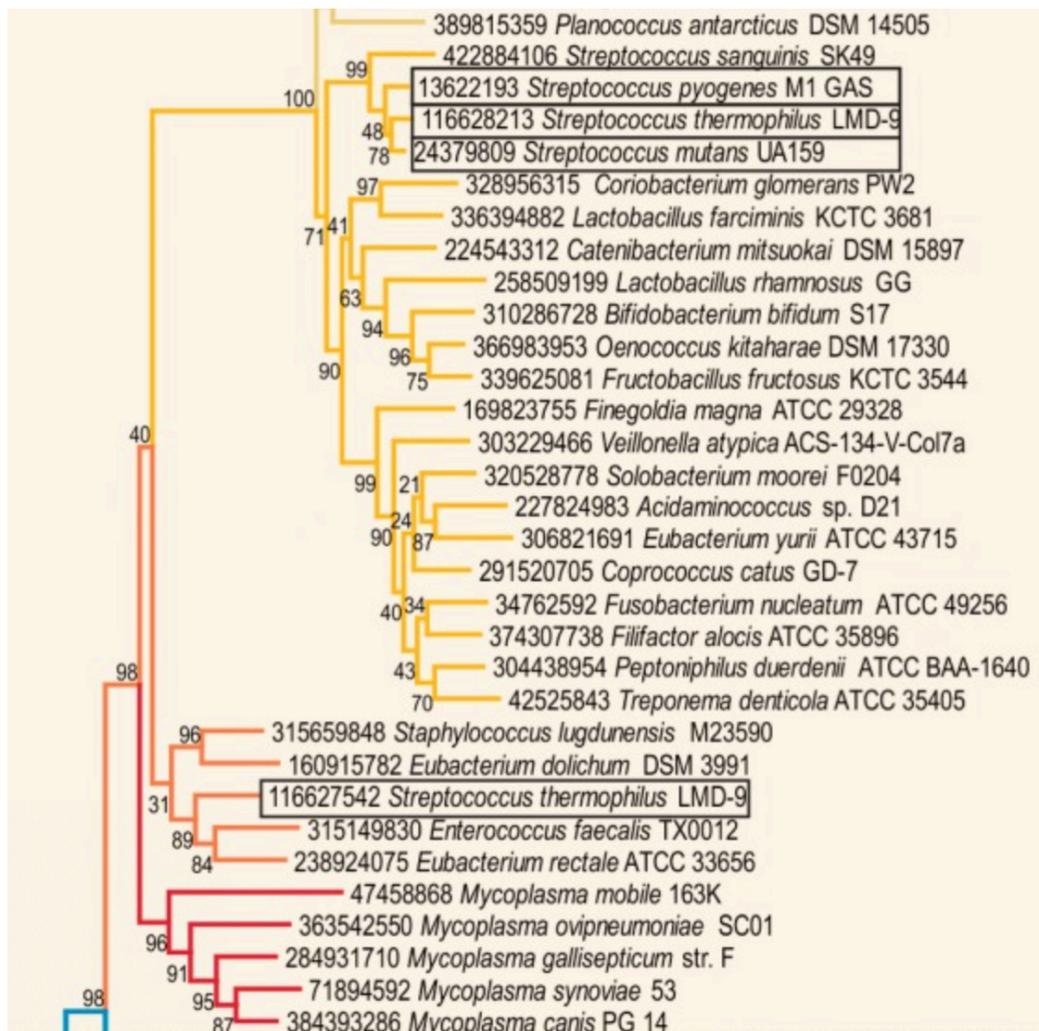


Figure 41: Arbre phylogénétique des orthologues de Cas9 reconstitué à partir de la sélection des séquences multiples d'orthologues alignés¹⁷⁵

En outre, la grande diversité des systèmes CRISPR bactériens s'étend au-delà du système avec Cas9 de type II comme seule nucléase effectrice. Récemment, une nouvelle protéine CRISPR nommée Cpf1 a été découverte et a aussi été utilisée pour l'édition du génome humain¹⁷⁶. Également ciblé par un seul guide ARN, Cpf1 reconnaît un PAM 5'-TTN en amont (plutôt que en aval) du site cible et crée une épingle à cheveux de 5Nt pour faire une coupure double brin (DSB) distalement à la PAM (Figure 42). La spécificité de Cpf1 à l'échelle du génome a été récemment analysée avec Digenome-seq et GUIDE-seq, et peut être comparable ou supérieure à l'efficacité de SpCas9 pour de nombreux ARN guides.



Figure 42: Schéma représentatif de la structure du pre-crRNA.

→ Cpf1 clive au niveau du triangle noir

II.2.5 Ingénierie des protéines et PAM sur-mesure

Par ailleurs, les ingénieurs en biologie ont rapidement optimisé et réussi à exploiter l'outil SpCas9, en atteignant une précision croissante dans la compréhension de sa structure moléculaire et son mécanisme exact (Figure 43).

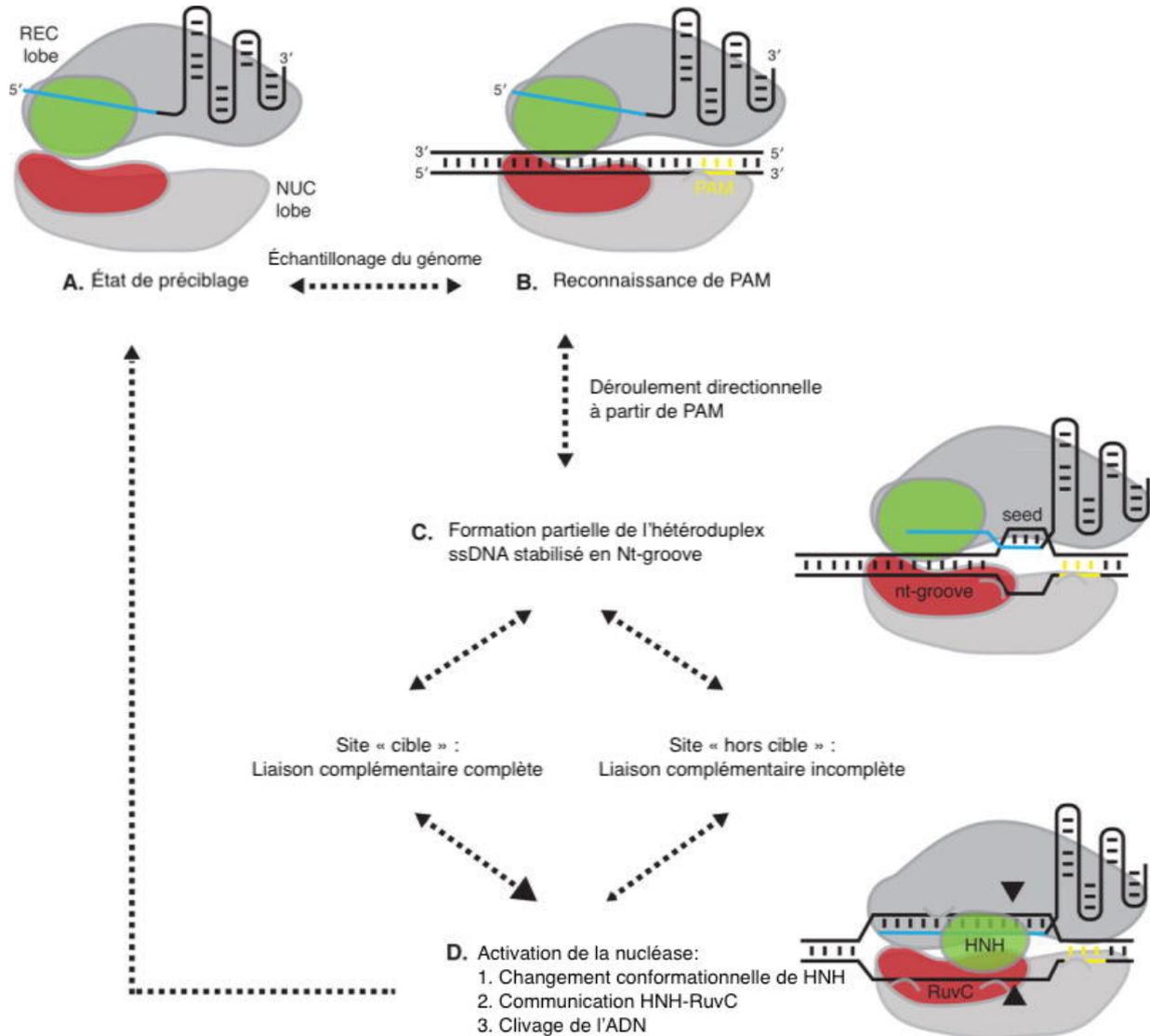


Figure 43 : Modèle de ciblage de l'ADN par Cas9 et clivage¹⁷⁷

A. Cas9 en complexe avec l'ARN guide échantillonne le génome pour trouver des correspondances de PAM, et sous-échantillonne les régions d'hétérochromatine dans certaines conditions.

B. Lors de la reconnaissance de PAM et de la liaison de l'ADN double brin, l'ADN est déroulé de manière directionnelle lorsque l'ARN guide interroge le brin cible pour rechercher des séquences complémentaires.

C. Le brin d'ADN simple brin « hors cible » est stabilisé de manière non spécifique à la séquence dans le Nt-groove de Cas9. Une complémentarité incomplète ou une courte région de complémentarité PAM-proximale de 15 Nt est suffisante pour la liaison Cas9. La complémentarité presque complète de plus de 17 Nt d'ARN conduit à la formation d'un hétéroduplex d'ADN qui est requis pour l'activation de la nucléase.

D. Après cette liaison au brin d'ARN, le domaine HNH subit un changement de conformation et communique via un lieu au domaine RuvC. Les domaines catalytiques HNH et RuvC coupent simultanément et respectivement le brin ADN simple brin cible et non cible. Cas9 peut rester liée au site de coupe pendant une période prolongée avant de revenir à l'état pré-ciblage.

La première génération d'améliorations s'est basée sur la connaissance des deux domaines de nucléase de Cas9 initialement identifiés à partir de la séquence homologie¹⁷⁸. Par exemple, une mutation ponctuelle (D10A) peut inactiver le domaine RuvC et changer la nucléase SpCas9 en une nickase capable de ne couper que le brin d'ADN complémentaire de l'ARN guide¹⁷⁹. En utilisant une paire d'ARN guide appariée, on peut créer deux cassures décalées qui vont permettre la formation d'un InDel qui sera plus efficace, tout en améliorant la spécificité jusqu'à 1500 fois. Ce phénomène est probablement lié au fait que les cassures simples brins sont réparées avec une plus grande fidélité que les cassures double brin¹⁸⁰.

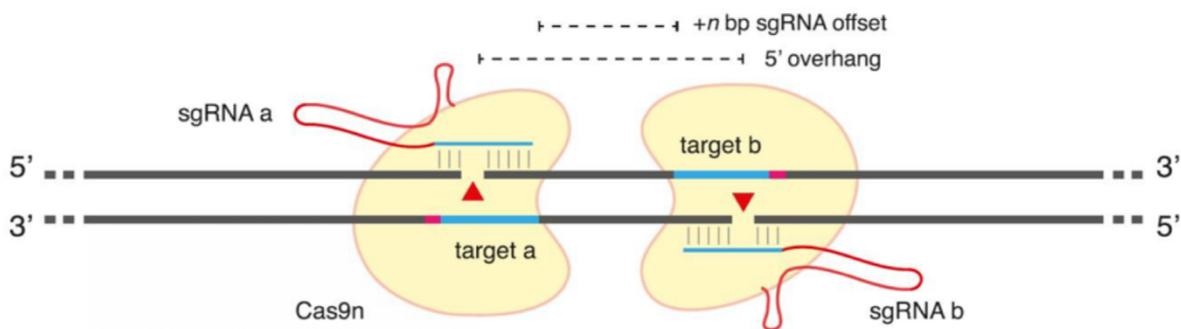


Figure 44 : Illustration d'une paire de cassure simple brin décalée¹⁸¹

Les paires de nickases appariées ont été utilisées pour générer efficacement des modèles de souris sans modifications « hors cible » détectables, alors que le type sauvage Cas9 peut générer des modifications non ciblées dont héritent les cellules filles¹⁸². Au-delà des nickases, une seconde mutation ponctuelle dans le domaine catalytique de HNH crée une «dCas9» qui est une nucléase-inactive. En fusionnant dCas9 avec le domaine nucléasique FokI, et en utilisant les ARN guides appariés, on peut créer un système dépendant de la dimérisation du système ce qui améliore encore la spécificité (Figure 45)¹⁸³.

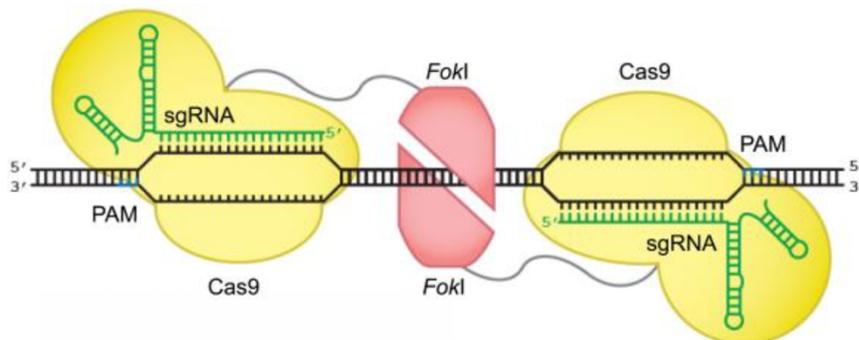


Figure 45: Illustration d'une paire de cassure simple brin décalée avec fusion FokI¹⁸³

Une autre approche récente d'ingénierie des protéines est connue sous le nom de fusion SpCas9^{MT}-pDBD. Elle implique la liaison d'une Cas9 mutée avec une liaison PAM atténuée (SpCas9^{MT}) à un domaine de liaison à l'ADN programmable (pDBD) tel qu'un ZF ou TALE qui cible l'ADN génomique proche (vu précédemment). SpCas9^{MT}-pDBD a apporté des améliorations qui ont

permis d'améliorer jusqu'à 150 fois la spécificité, probablement en tirant parti de la coopérativité entre deux événements indépendants de liaison à l'ADN pour améliorer la spécificité, un peu comme les stratégies nickase et FokI précédemment développées.

Cependant, ces stratégies ont l'inconvénient de nécessiter des composants supplémentaires et de plus grands transgènes. Récemment, une stratégie d'ingénierie rationnelle se basant sur la structure cristallographique des nucléases SpCas9 et SaCas9 a généré une spécificité accrue (respectivement eSpCas9 et eSaCas9). Ces Cas9 ne diffèrent que par 3 et 4 substitutions de codons au sein du Nt-groove qui est le sillon de brin d'ADN non ciblé de Cas9¹⁵⁶. Il est donc possible que ces mutations affaiblissent la liaison de la protéase au brin non cible, ce qui encourage la réhybridation de l'ADN en compétition avec la pénétration par l'ARN guide du brin d'ADN cible. Avec la rigueur accrue de la correspondance ARN-ADN, ces Cas9 démontrent une réduction drastique du nombre de sites « hors cible » à l'échelle du génome, qui sont détectables par BLESS ou le suivi séquençage ciblé. En outre, l'efficacité des cibles d'eSpCas9 semble comparable à celle de SpCas9 de type sauvage pour les 24 ARN guides testés dans cette publication¹⁵⁶, suggérant un découplage surprenant de l'efficacité et de la spécificité sans modifier considérablement le mécanisme d'action (par simple addition de stratégies de coopérativité).

Une autre approche a été de modifier la séquence de reconnaissance de PAM de Cas9 elle-même. Puisque le PAM est peut-être le déterminant le plus strict de la spécificité de Cas9, Cas9 avec d'autres PAM pourraient non seulement augmenter le nombre de sites pouvant être ciblés sur un génome d'intérêt, mais aussi potentiellement démontrer une spécificité améliorée à l'échelle du génome en utilisant un PAM plus long ou un PAM moins abondant dans le génome cible. La stratégie consiste à échanger le domaine d'interaction supposée avec le PAM (PID) de la protéine par le PID d'un orthologue qui reconnaît un autre PAM. Cela a déjà été démontré avec SpCas9 et *Streptococcus thermophilus* CRISPR3 Cas9 (St3Cas9), qui partage 60% d'identité de séquence et peut échanger des séquences d'ARN à double guidage tout en conservant sa fonction¹⁷⁵.

Plus puissant encore, il est possible d'exploiter l'évolution dirigée pour modifier la spécificité de PAM, c'est d'ailleurs ce qui a récemment été le cas pour SpCas9¹⁸⁴ et SaCas9¹⁸⁵. Ainsi, avec seulement 4 mutations les scientifiques ont donné naissance à un SpCas9 'VRER' modifié avec une spécificité élevée pour les PAM NCGC, qui sont environ 23 fois moins abondants dans le génome humain que les PAM NGG canonique pour les ARN guides 5'-G-N₁₉ standard. L'évolution dirigée a également permis de produire une mutation ponctuelle en un seul point (D1135E) de SpCas9 ce qui augmente la spécificité des PAM NGG plus que l'alternative PAM NAG¹⁸⁶. Dans le cas de SaCas9, une évolution dirigée a été appliquée pour modifier le PAM de NNGRRT à NNNRRT, afin d'augmenter la plage de ciblage de deux à quatre fois¹⁸⁶.

Un avantage de cette approche d'évolution dirigée non biaisée est qu'elle ne nécessite pas de données structurales et peut être rapidement appliquée à divers orthologues. Cela pourrait s'avérer important pour des cibles thérapeutiques nécessitant une édition très spécifique et dépourvues de PAMs canoniques à proximité. Enfin, les PAM sur mesure sont probablement compatibles avec la spécificité accrue et les mutations haute-fidélité. Chimères, évolutions dirigées et autres approches d'ingénierie des protéines peuvent également être des méthodes très fructueuses pour générer des Cas9 qui reconnaissent les PAM riches en AT, ce qui pourrait être utile pour cibler des régions introniques ou des génomes riches en AT.

II.2.6 Spécificité de dCas9

Outre le clivage de l'ADN, un grand nombre d'applications de Cas9 utilisent des techniques catalytiques. Par exemple, Cas9 inactivée (dCas9) peut être fusionnée à divers domaines effecteurs pour des applications allant du marquage chromosomique au matériel transcriptionnel en passant par le contrôle épigénétique¹⁸⁷. Cependant, le profil de spécificité de la liaison de dCas9 par rapport au type sauvage (wtCas9) pour les applications de clivage doit être soigneusement considéré. Des travaux récents ont étudié les mécanismes de recherche de cibles (Figure 43) de l'enzyme Cas9 active, ces derniers indiquent que Cas9 scanne au départ le génome à la recherche de sites PAM¹⁶⁴, ce qui entraîne un état transitoire de liaison qui est stabilisé par une séquence « seed » (trad. Ensemencement) de 5 Pb de l'ARN guide¹⁸⁸. Des bases supplémentaires sont interrogées pour la complémentarité ADN cible - ARN guide jusqu'à ce que la nucléase atteigne un état actif lors de l'hybridation complète entre l'ARN guide et la cible¹⁶⁵.

Conformément à ce modèle, les études d'immunoprécipitation de dCas9 démontrent qu'une forte promiscuité de la liaison de Cas9 est faiblement corrélée au clivage de Cas9¹⁵³ : sur près de 300 loci de liaison « hors cible » identifiés via dCas9 ChIP-seq, seul un de ces sites a subi une mutation légèrement supérieure au niveau de base de wtCas9¹⁸⁸. Dans une étude GUIDE-seq, sur le clivage de l'ADN menée dans le génome, seulement 2% des sites hors cible ont été clivés sur un ensemble de 585 sites de liaison « hors cible » de dCas9 mesuré par ChIP-seq. En outre, ChIP-seq a identifié des sites attaqués par dCas9 avec environ 7 inadéquations en moyenne, alors que les sites de clivage hébergeaient en moyenne environ 3 inadéquations¹⁵⁴. Bien qu'un dosage non biaisé soit utile à l'échelle du génome pour la spécificité des applications de dCas9, il ne faut pas considérer dCas9 ChIP-seq comme un moyen fidèle pour la détection d'événements de clivage « vrais » dans l'ensemble du génome.

Le transcriptome entier RNA-seq fonctionne également comme méthode non biaisée pour l'analyse « hors cible » de l'effecteur dCas9¹⁸⁹. En règle générale, ce test confirme la régulation à la hausse hautement spécifique des gènes ciblés par les activateurs de dCas9. Cette spécificité n'est pas surprenante étant donné que les activateurs dCas9 ne sont efficaces que dans une fenêtre limitée du site d'initiation de la transcription - événements de liaison supérieurs à 200-Nt en amont d'un site d'initiation qui aura peu d'effet sur la transcription¹⁹⁰. Une étude sur l'ARN-seq a notamment mis en évidence une régulation négative mais significative de l'ARNm - une cytokine proinflammatoire - en réponse à des activateurs transcriptionnels de dCas9-VP64 même sans l'ARN guide¹⁸⁹. Ce résultat souligne l'importance de considérer les effets « hors cible » de Cas9 au-delà du risque de se lier ou de couper l'activité sur un site cible dégénéré telle qu'une activité biologique involontaire en réponse à l'introduction de composants d'édition du génome.

II.2.7 Guides modifiés

Bien que les stratégies d'ingénierie susmentionnées permettent d'améliorer la protéine Cas9, des améliorations de la spécificité peuvent également être obtenues en modifiant l'ARN guide. C'est le cas de deux modifications de l'ARN guide que sont les Tru-guides¹⁹¹ et les 5'GGX20 guides¹⁹².

La caractérisation récente de systèmes à ARN à un ou deux guides pour les systèmes CRISPR de type II a identifié six modules fonctionnels efficaces avec le guide¹⁹³. Ces modules peuvent être mutés, prolongés et supprimés pour moduler l'efficacité sur la cible. Par exemple, l'extension de l'ARN guide simple brin (sgRNA) duplex sur 5 Nt et / ou en mutant la chaîne de 4 thymines un peu en aval de l'espaceur, peut améliorer l'efficacité en modifiant respectivement la structure et le taux de transcription de l'ARN¹⁹⁴¹⁹⁵. Cette approche améliore également l'efficacité pour les sgRNA SaCas9, ce qui semble indiquer l'applicabilité générale des modifications du guide à travers plusieurs orthologues de Cas9¹⁹⁶¹⁹⁷. En approfondissant notre compréhension des

caractéristiques de l'ARN guide, ceci devrait permettre de servir de base à l'optimisation des ARN guides notamment en terme de spécificité, de fonctionnalisation et étendre cette technique à d'autres applications.

La longueur de la séquence guide elle-même est également un important déterminant de spécificité. Bien que l'extension de la séquence guide de 20 Nt de SpCas9 à 30 Nt, a semblé entraîner raccourcissement naturel à la longueur naturelle de 20 Nt¹⁹⁸, le raccourcissement de la séquence guide s'est avéré être une stratégie réussie. Des séquences d'espacement de 17Nt ou de 18Nt ont permis une édition plus précise du génome, et ont potentiellement augmenté la sensibilité de liaison de Cas9 aux mésappariements du fait d'une séquence complémentaire plus courte¹⁹⁹. Puisque les guides tronqués peuvent éliminer l'activité sur de nombreux sites « hors cible », ils peuvent également créer de nouveaux sites « hors cible » en raison de leur longueur plus courte^{200 201}. Élément intéressant, les guides tronqués ne sont pas compatibles avec les mutants Nt-groove « à haute-fidélité » ou SpCas9-HF, car la combinaison entraîne de faible efficacité sur cible²⁰²²⁰³. Il sera donc intéressant par la suite d'investiguer si cette simple modification de la conception du guide pourrait améliorer la spécificité des autres orthologues tout en maintenant l'efficacité de l'édition, laquelle varie également en fonction de la longueur du guide ¹⁷⁰.

Fait notable, raccourcir davantage le guide à 14 Nt ou 15 Nt crée un « guide mort » qui peut assurer la liaison efficace de Cas9 de type sauvage sans activation par la nucléase, permettant ainsi les applications multiplexes du clivage de l'ADN et de l'activité effectrice ciblée ²⁰⁴. Cette approche d'ingénierie du guide a bénéficié d'un aperçu du mécanisme entre le mécanisme de clivage de Cas9, lequel a été démontré comme nécessitant une invasion presque complète des brins et une complémentarité (Figure 43). Le transcriptome entier analysé par ARN-seq révèle le profil hautement similaire en terme de spécificité pour les guides de 15 Nt et 20 Nt utilisés dans l'activation de la transcription ²⁰⁴. Bien que les « guides morts » pourraient avoir plus de prédiction de liaison aux sites « hors cible », ils présentent probablement une spécificité acceptable (inférieur à 3 gènes « hors cible » significativement activés) puisque les sites « hors cible » doivent se situer dans une fenêtre limitée d'un site d'initiation de la transcription afin de perturber la transcription.

Une autre modification simple, appelée « GGX20 », ajoute aux nucléotides deux guanines supplémentaires qui sont incompatibles à l'extrémité 5' de l'ARN guide¹⁹². Plusieurs études ont démontré des améliorations de la spécificité de 10 à 100 fois ou mieux, bien que les variations d'efficacité sur la cible varient de « comparable » à « sévèrement réduite »²⁰⁵. Malgré cette variabilité, 'GGX20' et les guides tronqués sont faciles à générer et à évaluer, même s'ils doivent quand même être comparés aux guides de longueur standard au cas par cas pour optimiser l'efficacité sur la cible.

Enfin, la modification chimique des ARN guides peut également avoir un impact sur la spécificité de Cas9. La synthèse de l'ARN guide avec du 2'-O-méthyle (M), 2'-O-méthyle 3' phosphorothioate (MS) ou du 2'-O-méthyle 3' thioPACE (MSP) aux extrémités 5' et 3' améliore significativement l'efficacité de l'édition des cellules T primaires humaine et des cellules souches hématopoïétiques CD34+ et progénitrices ²⁰⁶. Cependant, ces modifications d'ARN ont augmenté l'activité hors cible sur certains sites « hors cibles ». Compte tenu des premiers résultats mitigés aujourd'hui disponibles, la capacité de moduler la stabilité de l'ARN et la cinétique de liaison et de

mésappariement par le biais de manipulations chimiques alternatives des nucléotides de l'ARN guide, une exploration plus poussée semble se justifier.

II.2.8 Cinétique et régulation

Un déterminant critique et sous-exploré de la spécificité de Cas9 est son profil pharmacocinétique notamment au niveau de la délivrance de ces composants au travers de la cellule et des tissus., et spécialement le composant effecteur dans l'édition du génome qui peut être sous la forme d'ADN, d'ARN ou de protéine, et le véhicule de transport qui est soit viral soit non-viral comme cela a pu être développé dans les parties précédentes.

L'intégration de Cas9 par médiation lentivirale et l'ARN guide dans des lignées cellulaires de mélanome a été signalé comme étant capable de saturer jusqu'à 100 % des sites ciblés pour former des InDels²⁰⁷. Alors que les activités ciblées et non ciblées semblaient généralement stables entre le 7^{ème} et 14^{ème} jour, les indels sur un site « hors cible » avec 3 inadéquations sont passés d'environ 40 % à environ 50 %. Puisque le niveau « hors cible » peut augmenter avec une exposition prolongée à Cas9, le fait de contrôler ou limiter la durée d'expression de Cas9 dans la cellule ou le noyau peut améliorer la spécificité.

En tant que telle, la modalité de la distribution de Cas9 est un important médiateur de spécificité. Par exemple, la libération de ribo-nucléo-protéine (RNP) par des lipides cationiques a amélioré la spécificité de 3 guides SpCas9 sur 11 sites « hors cible » évalués (généralement 10 fois plus) par rapport à la transfection d'ADN plasmidique, après la normalisation pour une efficacité sur « cible » équivalente²⁰⁸. Dans une étude similaire, la forme de Cas9 sous RNP a amélioré le rapport d'activation / désactivation d'environ 3 fois pour deux guides testés²⁰⁹. La délivrance d'ARN guide par MS (2'-O-méthyl 3' phosphorothioate) synthétiques modifié permet également d'améliorer significativement le ratio « cible » / « hors cible », c'est d'ailleurs ce qui a été évalué sur les trois sites de l'étude par rapport à la co-livraison de Cas9 par plasmide ou ARNm²⁰⁶. Cet avantage de spécificité est peut-être dû à la rupture avec la cinétique de la délivrance par RNP et l'exposition associée de Cas9 par rapport à l'exposition plus stable d'un plasmide d'expression²⁰⁹.

La dosage de Cas9 peut également affecter la cinétique et moduler sa spécificité, à la fois *in vitro*¹⁴⁶²¹⁰ que dans des cellules¹⁵². Par exemple, lorsque l'on procède par transfection du plasmide, une diminution de 5 fois la dose entraîne une augmentation de 7 fois le rapport de spécificité au prix d'une diminution d'environ 2 fois de l'efficacité sur la cible, soulignant ainsi l'importance de titrer les conditions de délivrance pour optimiser la spécificité pour une application donnée¹⁵². En utilisant le plus faible promoteur H1 pour l'expression de l'ARN guide, cela donne une plus grande diminution de l'activité « hors cible » que de l'activité sur cible¹⁵¹. Une telle non-linéarité dans le ratio d'édition « cible » / « hors cible » avec Cas9 ou la concentration d'ARN guide, reflète le couplage significatif mais incomplet des activités de recherche de la cible et de l'activité nucléasique de l'enzyme. Des études d'imagerie ont permis de réaliser, avec de très faibles concentrations de Cas9, un sous-échantillonnage des régions d'hétérochromatine, ce qui suggère que l'accessibilité des sites d'ADN peut également jouer un rôle dans la spécificité dans certaines conditions²¹¹.

Les petites molécules peuvent également moduler la cinétique de l'édition CRISPR. Par exemple, une petite molécule dépendante de Cas9 a été développée génétiquement en insérant un ligand dépendant, l'intéine, ce qui a augmenté la spécificité lors de l'induction de 2 à 25 fois chez 11 sites « hors cible » pour 3 ARN guides, tout en montrant une activité nucléasique très limitée en absence de la petite molécule²¹². Cependant, les gains d'efficacité sur la cible ont été généralement

moins importants que ceux de Cas9 de type sauvage, démontrant de nouveau le coût associé à l'ingénierie pour mettre au point une spécificité améliorée. Les petites molécules peuvent également être utilisées pour moduler la réponse cellulaire à l'édition du génome. Par exemple, le taux de réparation homologue par rapport à celles par liaison des extrémités non homologues a été améliorée en utilisant un inhibiteur de l'ADN ligase IV ²¹³. De plus, il a été suggéré que la synchronisation du cycle cellulaire augmente le taux de réparation dirigé par l'homologie avec la livraison de RNP dans des cellules humaines²¹⁴.

II.2.9 Implications plus larges de la spécificité

La prise en considération de la spécificité génomique de Cas9 devrait inclure non seulement le nombre de sites potentiellement « hors cible » pour un ARN guide donné, mais aussi l'impact physiologique d'événements individuels « hors cible ». Bien que la tumorigenèse et l'édition indésirable des suppresseurs de tumeurs oncogènes soient une préoccupation commune, éditer des événements qui négative l'impact sur la viabilité de la cellule ou les capacités fonctionnelles de ces dernières doivent également être pris en compte. En outre, la capacité à mesurer l'édition « hors cible » diffère considérablement d'un tissu à l'autre. Alors que le sang peut être échantillonné relativement facilement pour le séquençage de l'ADN génomique, d'autres tissus ne peuvent pas être aussi simplement analysés. En conséquence, la liaison des phénotypes observés avec les modifications du génome induites par Cas9 pourrait être difficile dans certains organes. Les seuils d'acceptabilité pour les taux « hors cible » pourraient également différer dans les cellules terminales différenciées, par opposition aux cellules en division. Certes, les seuils d'acceptabilité de la spécificité peuvent ne pas être universels pour toutes les applications, s'ils sont déterminables, la démonstration empirique de la sécurité sera primordiale pour la mise en œuvre de cette technologie dans la clinique.

De plus, la spécificité des nucléases Cas9 ne se limite pas nécessairement à la spécificité génomique, spécialement pour les applications *in vivo*. Par exemple, la spécificité des types de tissus et de cellules est également une considération importante lorsque l'on cible des troubles génétiques qui touchent principalement certains organes ou certaines cellules. Cependant, la distribution sélective peut être médiée par un choix judicieux de la vectorisation. Par exemple, différents sérotypes d'AAV présentent différents tropismes de type cellulaire et différents taux de clairance sanguine lorsqu'ils sont administrés par voie systémique²¹⁵. D'autres voies d'administration peuvent également fournir une expression localisée ou spécifique du tissu, ainsi que des avantages d'immunogénicité ²¹⁶ ²¹⁷. Tandis que des approches de thérapie par augmentation génique qui exigeaient auparavant des sérotypes viraux fournissant une expression transgénique soutenue et élevée, les applications de Cas9 peuvent être plus sûres avec des vecteurs qui fournissent une expression à court terme dans un type de cellule très spécifique.

La spécificité du type cellulaire peut également être obtenue avec des éléments régulateurs de la transcription. Les promoteurs spécifiques de l'ARN polymérase II dans les tissus et dans des cellules types (par exemple : la synapsin qui est une protéine impliquée dans la régulation de la synthèse de neurotransmetteur au niveau des synapses, ou encore la GFAP pour Glial fibrillary acidic protein qui est donc une protéine acide fibrillaire gliale) sont capables de conduire la transcription de protéine codante comme Cas9 qui pourrait être combinée avec le promoteur d'un nouvel ARN guide et les stratégies d'expression autres que les promoteurs d'ARN polymérase III U6 et H1 utilisés depuis longtemps dans le domaine de l'ARNi pour exprimer les transcrits de siRNA et de shRNA. Une méthode dépendante de Csy4 permet aux promoteurs de l'ARN polymérase II d'exprimer des ARN guides²¹⁸, permettant un multiplexage simple ainsi qu'une

expression restreinte à certains types de cellules. De plus, des sites de liaison aux microARN pourraient être ajoutés à l'extrémité 3' du récepteur Cas9 pour limiter l'expression des mARN dans certaines cellules. Il a été rapporté que les cellules présentatrices d'antigène spécifique (CPA) mir-142-3p ont été utilisées de cette manière pour limiter efficacement les anticorps et la réponse cellulaire aux transgènes en réprimant l'expression et la présentation peptidique dans les CPA²¹⁹.

Enfin, un autre moyen de contrôler la spécificité de l'activité médiée par Cas9 peut être réalisé par contrôle optogénétique. Comme indiqué précédemment avec les TALEs, en exploitant des protéines d'hétérodimérisation inductibles par la lumière à dCas9 (CIB1-dCas9) et un activateur transcriptionnel (CRY2-VP64) permettent de contrôler de manière optogénétique l'activation transcriptionnelle ²²⁰. Bien que l'activité de fond reste à optimiser, cette approche pourrait faciliter une manipulation efficace de l'espace, du temps et la spécificité génomique d'un facteur de transcription synthétique de dCas9.

Conclusion intermédiaire

Après avoir réalisé un état des lieux sur les limites actuelles de la méthode, une liste des principaux axes d'amélioration a été dressée. Bien que CRISPR-Cas9 soit reconnue comme une révolution pour l'édition du génome, il est possible d'en attendre encore d'avantage.

Transition

A présent, il est important d'aborder les applications de cette biotechnologie. Ce ciseau moléculaire, sujet de tant d'ovations, pourrait être la solution pour le traitement de nombreuses pathologies qui actuellement restent incurables. Il sera donc abordé dans cette prochaine partie, les premières pathologies éligibles à cette technologie et les essais cliniques actuellement mis en place.

III. DEMAIN

La technologie CRISPR offre la promesse de guérir toutes les maladies génétiques humaines. Mais quelles sont les premières pathologies candidates pour ce ciseau moléculaire ? En quelques années à peine, la technologie a acquis une notoriété fulgurante grâce à sa promesse de rendre l'édition du génome plus rapide, moins chère et plus simple que jamais. Dans son analyse prospective de l'innovation en santé : Santé 2030, le Leem place CRISPR-Cas9 comme premier vecteur d'innovation²²¹. André Choulika, CEO de Collectis parle d'ailleurs « d'une révolution qui va secouer la planète, à une profondeur dont on n'a même pas idée ».

CRISPR a déjà révolutionné la façon dont les scientifiques mènent leurs recherches, mais ce que tout le monde attendait, avec enthousiasme ou crainte, est son utilisation chez l'homme. En théorie, la technologie CRISPR pourrait nous permettre d'éditer toute mutation à volonté et de guérir la maladie qu'elle provoque. En pratique, nous ne sommes qu'au début du développement de CRISPR en tant que thérapie et il reste encore de nombreuses inconnues.

III.1 Point sur les essais cliniques

Les perspectives d'utilisation de CRISPR-Cas9 étant abordées par la suite, c'est pourquoi il semble intéressant, dans un premier temps, de faire le point sur les essais cliniques ayant actuellement cours afin d'apprécier les domaines jugés comme étant les plus prometteurs. A l'heure actuelle, on compte 25 essais cliniques déclarés, dont 6 ont été suspendus pour diverses raisons²²². Afin de simplifier la lecture, les essais ont été catégorisés par domaine d'application dans la partie suivante (II.2.2.). L'ensemble des essais cliniques enregistrés sont disponibles sur le site internet : <https://clinicaltrials.gov>.

Essais cliniques en cours non catégorisés :

Statut	Titre de l'étude	Conditions	Interventions	Localisation
Recrutement	Malignant Hyperthermia Registry and Genetic Testing	Hyperthermie maligne		Hôpital des enfants de Cincinnati, Centre médical Cincinnati, Ohio, États-Unis
Active, mais ne recrutant pas	Exploiting Epigenome Editing in Kabuki Syndrome: a New Route Towards Gene Therapy for Rare Genetic Disorders	Syndrome de Kabuki 1	Génétique par intervention sur la culture de cellules primaires	Hospital Arnaud de villeneuve Montpellier, Herault, France

III.2 Le cancer

III.2.1 Physiopathologie et contexte clinique

Ce qui est couramment appelé cellule cancéreuse résulte de l'accumulation d'un certain nombre de mutations qui ont conduit à la modification du phénotype de la cellule, mais qui, suite à un défaut d'élimination de la cellule mutée a permis sa prolifération non contrôlée dans l'organisme. Une cascade métastatique découle parfois de cet événement (Figure 46).

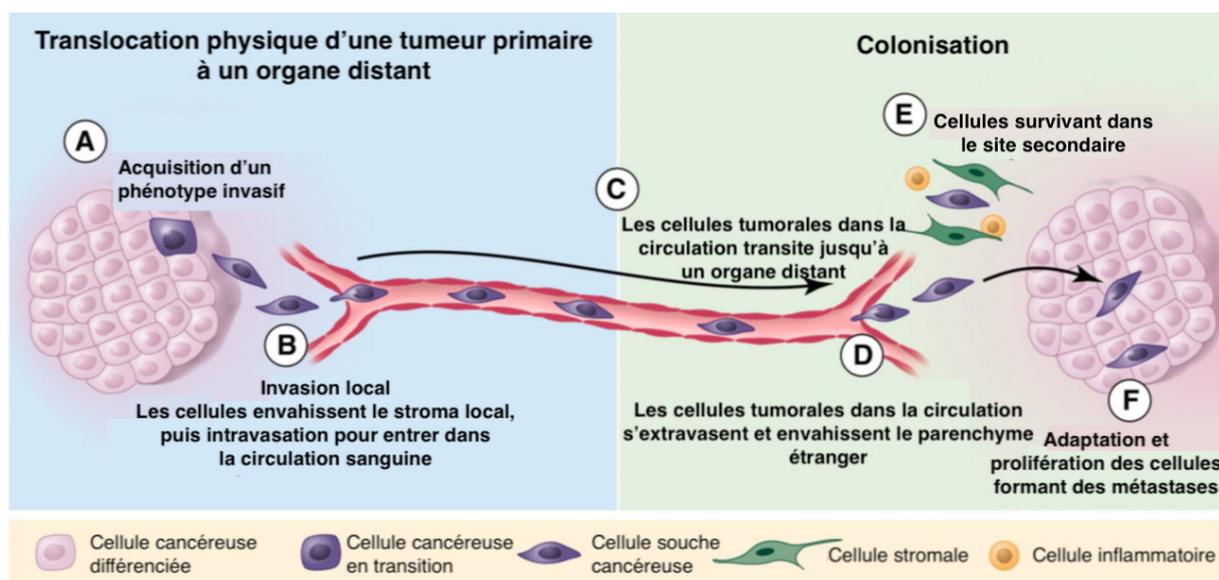


Figure 46 : Illustration de la cascade métastatique²²³

La métastase peut être envisagée comme un processus se déroulant en deux phases. La première, la translocation physique de cellules cancéreuses de la tumeur primitive à un organe distant, puis la deuxième, la colonisation des cellules transférées au sein de cet organe²²³. Pour commencer la cascade métastatique (Figure 46 - A), les cellules cancéreuses de la tumeur primitive acquièrent un phénotype invasif. Les cellules cancéreuses peuvent ensuite envahir la matrice environnante et se diriger vers les vaisseaux sanguins, où elles s'intègrent pour pénétrer dans la circulation, qui leur sert de principal moyen de passage vers des organes distants (Figure 46 - B). Les cellules cancéreuses circulant dans la circulation ont des propriétés de survie indépendantes de leur ancrage dans le parenchyme (Figure 46 - C). Au niveau de l'organe distant, les cellules cancéreuses circulantes quittent la circulation et envahissent le microenvironnement du tissu étranger (Figure 46 - D). Sur ce site étranger, les cellules cancéreuses doivent pouvoir échapper à la réponse immunitaire innée et survivre également sous la forme d'une cellule unique (ou d'un petit groupe de cellules) (Figure 46 - E). Pour finir par se transformer en un dépôt macrométastatique actif, la cellule cancéreuse doit être capable de s'adapter au microenvironnement et d'initier la prolifération (Figure 46 - F).

Ces dernières années, les cellules souches cancéreuses ont été reconnues comme des composants importants de la cancérogenèse et pourraient constituer la base de nombreux types de tumeurs²²⁴. Ces cellules ont été isolées dans des cancers du sein, du cerveau, du sang (leucémie), de la peau (mélanome), de la tête et du cou, de la thyroïde, du col utérin, du poumon, des organes du tractus gastro-intestinal et reproducteur, et de la rétine²²⁵. L'identification des ensembles de marqueurs spécifiques de ces cellules et la destruction thérapeutique ciblée de ces dernières restent un défi. Les traitements anticancéreux actuels ne parviennent généralement pas à éradiquer l'ensemble de ces clones mais favorisent plutôt l'expansion du pool de cellule et / ou la sélection de clones résistants.

L'une des premières applications de CRISPR pourrait donc concerner le cancer. L'un des premiers et des plus avancés des essais cliniques CRISPR en cours en Chine teste le potentiel de l'outil d'édition de gènes chez des patients atteints d'un cancer du poumon à un stade avancé²²⁶.

Le traitement testé à l'hôpital du cancer de Chengdu commence par l'extraction des lymphocytes T du patient. À l'aide de CRISPR, les cellules sont modifiées pour supprimer le gène qui code pour

un récepteur appelé PD-1 auquel certaines tumeurs sont capables de se lier et qui ordonne au système immunitaire de ne pas attaquer. Les cellules sont ensuite réinjectées au patient avec une plus grande capacité à attaquer les cellules tumorales.

Jusqu'à présent, au moins 86 personnes atteintes de différentes formes de cancer ont été traitées avec CRISPR en Chine et les résultats devraient être disponibles sous peu.

Le premier essai CRISPR prévu aux États-Unis ciblera également le cancer. Il utilisera CRISPR pour éliminer le PD-1 et un récepteur des lymphocytes T conçus pour exprimer un récepteur ciblant le cancer.

Dans le cadre de ces essais, des « green light » ont été édités par l'US National Institutes of Health afin d'encadrer les pratiques et permettre d'assurer la sécurité des patients admis dans ces études²²⁷.

III.2.2 Essais cliniques en cours

Statut	Titre de l'étude	Conditions	Interventions	Localisation
Recrutement	NY-ESO-1-redirected CRISPR (TCRendo and PD1) Edited T Cells (NYCE T Cells)	Myélome multiple Mélanome Sarcome synovial Liposarcome à cellules rondes / myxoïdes	Biologique par NY-ESO-1 cellules T autologues redirigées avec le TCR et le PD-1 endogènes édités par CRISPR Médicaments utilisés : cyclophosphamide, fludarabine	Université de Pennsylvanie Philadelphie, Pennsylvanie, États-Unis
Recrutement	Study of CRISPR-Cas9 Mediated PD-1 and TCR Gene-knocked Out Mesothelin-directed CAR-T Cells in Patients With Mesothelin Positive Multiple Solid Tumors.	Tumeur solide chez l'adulte	Biologique par CAR-T cells anti-mésothéline	Département de Biothérapeutique et d'hématologie Hôpital général du PLA Pékin, Pékin, Chine
Recrutement	Study of PD-1 Gene-knocked Out Mesothelin-directed CAR-T Cells With the Conditioning of PC in Mesothelin Positive Multiple Solid Tumors	Tumeur solide chez l'adulte	Biologique par CAR-T cells anti-mésothéline	Hôpital général du PLA Pékin, Pékin, Chine
Recrutement	A Study Evaluating UCART019 in Patients With Relapsed or Refractory CD19+ Leukemia and Lymphoma	Leucémie à cellules B Lymphome à cellules B	Biologique par UCART019	Département de Biothérapeutique et d'hématologie Hôpital général du PLA Pékin, Pékin, Chine

Statut	Titre de l'étude	Conditions	Interventions	Localisation
Recrutement	Lavage of the Uterine Cavity for Diagnosis of Ovarian Cancer	Adénocarcinome ovarien séreux de haut grade Cancer ovarien de stade III AJCCv8 Cancer ovarien de stade IIIA AJCCv8	Collection de biospecimen Analyse de biomarqueurs de laboratoire Lavage Pap Smear	Fred Hutch Université du Consortium sur le Cancer de Washington Seattle, Washington, États-Unis
Recrutement	PD-1 Knockout Engineered T Cells for Advanced Esophageal Cancer	Cancer de l'œsophage	Cellules T éteintes pour PD-1	Hôpital du Cancer de Hangzhou Hangzhou, Zhejiang, Chine
Recrutement	Stem Cells in NF1 Patients With Tumors of the Central Nervous System	Neurofibromatose de type 1 Tumeur du système nerveux central	Test diagnostique par collection de cellules souches	Centre Médical National des Enfants Washington, District of Columbia, États-Unis
Recrutement	A Feasibility and Safety Study of Universal Dual Specificity CD19 and CD20 or CD22 CAR-T Cell Immunotherapy for Relapsed or Refractory Leukemia and Lymphoma	Leucémie à cellules B Lymphome à cellules B	Biologique par CAR-T cells double spécificité pour CD19 et CD20 ou CD22	Département de Biothérapeutique et d'hématologie Hôpital général du PLA Pékin, Pékin, Chine
Recrutement	First-time-in-human (FTIH) Study of GSK3145095 Alone and in Combination With Other Anticancer Agents in Adults With Advanced Solid Tumors	Cancer du pancréas néoplasique	Médicaments utilisés : GSK3145095, Pembrolizumab	Site d'investigation de GSK Indianapolis, Indiana, États-Unis Site d'investigation de GSK New York, New York, États-Unis Site d'investigation de GSK New York, New York, États-Unis

Statut	Titre de l'étude	Conditions	Interventions	Localisation
Pas de recrutement pas pour le moment	Cell Therapy for High Risk T-Cell Malignancies Using CD7-Specific CAR Expressed On Autologous T Cells	Leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T Lymphome lymphoblastique aiguë à cellules T Lymphome non Hodgkinien à cellules T	Génétique par CAR-T cells CD7.CAR/28zeta CAR T cells Médicaments utilisés : Fludarabine, Cytosan	Hôpital Méthodiste de Houston Houston, Texas, États-Unis Hôpital des enfants du Texas Houston, Texas, États-Unis
Active, mais ne recrutant pas	PD-1 Knockout Engineered T Cells for Metastatic Non-small Cell Lung Cancer	Cancer métastatique du poumon non à petites cellules	Cellules T éteintes pour PD-1 Médicament utilisé : Cyclophosphamide	Hôpital de l'ouest de la Chine, Université de Sichuan Chengdu, Sichuan, Chine
Recrutement	PD-1 Knockout EBV-CTLs for Advanced Stage Epstein-Barr Virus (EBV) Associated Malignancies	Carcinome gastrique de stade IV Carcinome nasopharyngien de stade IV Lymphome à cellules T de stade IV	Médicaments utilisés : Fludarabine, cyclophosphamide, interleukine 2	Centre de Nanjing Drum pour la compréhension du cancer, Hôpital de la tour Drum Nanjing, Jiangsu, Chine

III.3 Les troubles sanguins

III.3.1 Contexte clinique

Le premier essai CRISPR en Europe visera à traiter la bêta-thalassémie, une maladie du sang qui affecte le transport de l'oxygène dans le sang. La thérapie, développée par CRISPR Therapeutics et Vertex Pharmaceuticals, consiste à récolter les cellules souches hématopoïétiques du patient et à utiliser la technologie CRISPR pour leur permettre de produire de l'hémoglobine fœtale, une forme naturelle de la protéine transportant l'oxygène qui le lie beaucoup mieux que l'adulte (Figure 47) ²²⁸.

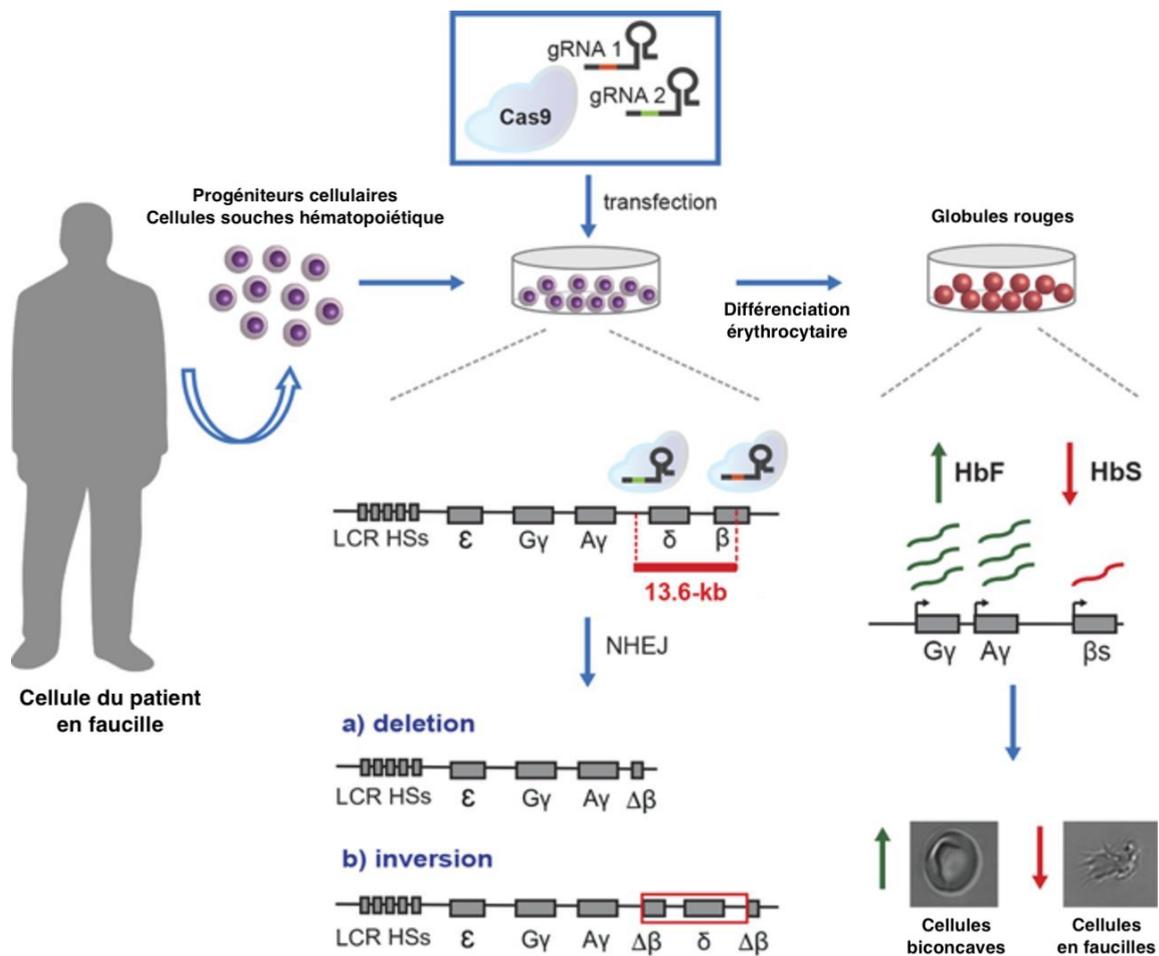


Figure 47 : Schéma du protocole du traitement de la drépanocytose par CRISPR-Cas9²²⁹

En effet, de grandes délétions naturelles dans le locus de la β -globine entraînent une persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale, ce qui atténue la gravité clinique de la drépanocytose et de la β -thalassémie. La stratégie associée à CRISPR permet de perturber une région génomique de 13,6 kb englobant les gènes δ et β -globine et un gène putatif γ - δ intergénique de l'hémoglobine fœtale (HbF) silencieux. La perturbation d'un silencer supposé d'HbF entraîne une légère augmentation de l'expression de la γ -globine, alors que la suppression ou l'inversion d'une région de 13,6 kb entraîne une réactivation robuste de la synthèse d'HbF dans les érythroblastes adultes (associée à des modifications épigénétiques et à des modifications des contacts de la chromatine au sein le locus β -globine). Dans les cellules souches / progénitrices hématopoïétiques dérivées du patient, cibler la région de 13,6 kb entraîne une proportion élevée d'expression de la γ -globine dans les érythroblastes, une synthèse accrue de l'HbF et une amélioration du phénotype de la cellule en faucilles. Dans l'ensemble, cette étude fournit des indices sur une approche potentielle d'édition du génome CRISPR-Cas9 pour le traitement des β -hémoglobinopathies.

Un premier essai de bêta-thalassémie devrait commencer mi-2019 après l'approbation de l'EMA. Un deuxième essai testera le même traitement dans le traitement de la drépanocytose, un autre trouble sanguin affectant le transport de l'oxygène.

L'hémophilie est un autre trouble sanguin auquel la technologie CRISPR pourrait s'attaquer. CRISPR Therapeutics travaille d'ailleurs avec Casebia sur un traitement CRISPR *in vivo* dans lequel l'outil d'édition des gènes est administré directement dans le foie.

III.3.2 Les essais cliniques en cours

Statut	Titre de l'étude	Conditions	Interventions	Localisation
Recrutement	A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Transfusion-Dependent β -Thalassemia	Béta-thalassémie	Biologique par CTX001	Hôpital des enfants malades Toronto, Canada Hôpital Universitaire de Regensburg Regensburg, Allemagne Hôpital Universitaire de Tübingen Tuebingen, Allemagne Collège Impériale de Santé Londres, Royaume-Unis
Recrutement	A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Severe Sickle Cell Disease	Maladie des cellules en faucilles Hémoglobinopathie	Biologique par CTX001	Site de Recherche de Nashville, Tennessee, États-Unis
Pas de recrutement pas pour le moment	iHSCs With the Gene Correction of HBB Intervent Subjects With β -thalassemia Mutations	Thalassémie	Biologique par traitement via iHSC	

III.4 La cécité

CRISPR est un excellent candidat pour traiter la cécité génétique. Pour de nombreuses formes de cécité héréditaires, les mutations spécifiques à l'origine de la maladie sont connues, ce qui permet de modifier facilement à l'aide de CRISPR-Cas9 ces gènes.

De plus, l'œil est une partie immunoprotégée du corps, ce qui signifie que l'activité du système immunitaire y est limitée. Cela devient un avantage compte tenu des préoccupations qui ont récemment été soulevées concernant la possibilité que CRISPR puisse induire des réactions immunitaires à son encontre, ce qui bloquerait son activité et entraînerait des effets secondaires.

Editas Medicine travaille sur un traitement CRISPR de l'amaurose congénitale de Leber, la cause la plus courante de cécité infantile héréditaire, pour laquelle il n'existe aucun traitement²³⁰. La société vise à cibler la mutation la plus commune derrière la maladie, en utilisant CRISPR pour restaurer le fonctionnement des cellules photoréceptrices avant que les enfants ne perdent complètement la vue.

III.5 L'infectiologie

III.5.1 Contexte clinique du SIDA

La technologie CRISPR peut aider de plusieurs manières dans la lutte contre le SIDA. L'une d'entre elles utilise CRISPR pour éliminer le virus du VIH de l'ADN des cellules immunitaires. Cette approche pourrait présenter le principal avantage de pouvoir attaquer la forme latente du virus, qui est insérée dans notre ADN et inactive, rendant impossible le ciblage de la plupart des thérapies.

Une autre approche pourrait être de rendre résistants aux infections par le VIH. Certains individus naissent avec une résistance naturelle au VIH grâce à une mutation d'un gène appelé CCR5, qui code pour un récepteur situé à la surface des cellules immunitaires que le VIH doit pénétrer dans les cellules. La mutation change de structure pour que le virus ne puisse plus se lier au récepteur. C'est d'ailleurs le projet qui a été mené par le docteur He Jankui qui a modifié génétiquement deux embryons humains par CRISPR afin de muter le gène CCR5 pour rendre les deux jumelles, Lulu et Nana, naturellement résistantes au VIH¹⁴². Aujourd'hui aucunes informations supplémentaires n'ont été communiquées à la suite de leur naissance concernant le succès de l'expérience, et les effets secondaires potentiels subis par ces deux enfants.

La plupart des applications CRISPR dans le traitement du VIH sont à un stade précoce de développement et sont encore testées sur des animaux avant qu'un essai clinique sur l'homme puisse être planifié.

III.5.2 Les essais cliniques en cours

Statut	Titre de l'étude	Conditions	Interventions	Localisation
Recrutement	Safety of Transplantation of CRISPR CCR5 Modified CD34+ Cells in HIV-infected Subjects With Hematological Malignancies	Infection par HIV-1	Génétique par modification du gène CCR5	307 Hôpitaux du PLA (Hôpitaux affiliés à l'Académie de Science médicale militaire) Pékin, Pékin, Chine
Pas de recrutement pas pour le moment	A Safety and Efficacy Study of TALEN and CRISPR/Cas9 in the Treatment of HPV-related Cervical Intraepithelial Neoplasia I	Tumeur maligne liée au papillomavirus humain	Biologique par TALEN et CRISPR-Cas9	Le premier hôpital affilié à l'Université du Soleil de Yat-sen Guangzhou, Guangdong, Chine
Recrutement	Identification of Host Factors of Norovirus Infections in Mini-Gut Model	Infection gastro-intestinale	Procédurale par biopsie duodénale et prélèvement salivaire	Centre endoscopique, Hôpital Prince de Galles Hong Kong, Chine

III.6 La fibrose kystique

La fibrose kystique est une maladie génétique causant de graves problèmes respiratoires. Bien que des traitements soient disponibles pour traiter les symptômes, l'espérance de vie d'une personne atteinte de cette maladie n'est que de 40 ans environ. La technologie CRISPR pourrait aider à identifier l'origine du problème en modifiant les mutations responsables de la fibrose kystique, localisées dans un gène appelé CFTR.

Les chercheurs ont prouvé qu'il était possible d'utiliser CRISPR dans des cellules pulmonaires humaines dérivées de patients atteints de fibrose kystique et de corriger la mutation la plus commune derrière la maladie. Les chercheurs ont ainsi généré des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) chez des patients atteints d'une fibrose kystique porteurs d'une délétion homozygote F508 dans le gène CFTR, ce qui entraîne le fonctionnement défectueux de la protéine CFTR sur la membrane cellulaire²³¹. Cette mutation a donc été corrigée avec précision au moyen de CRISPR afin de cibler des séquences correctrices sur le locus génomique CFTR endogène, en combinaison avec un système de sélection totalement excisable, ce qui a considérablement amélioré l'efficacité de cette correction (Figure 48). Les iPSC corrigées ont ensuite été différenciées en cellules épithéliales des voies aériennes matures où la récupération de l'expression et de la fonction normales du CFTR a été démontrée. Ce système modèle isogénique basé sur la protéine iPSC pour la mucoviscidose pourrait être adapté au développement de nouvelles approches thérapeutiques.

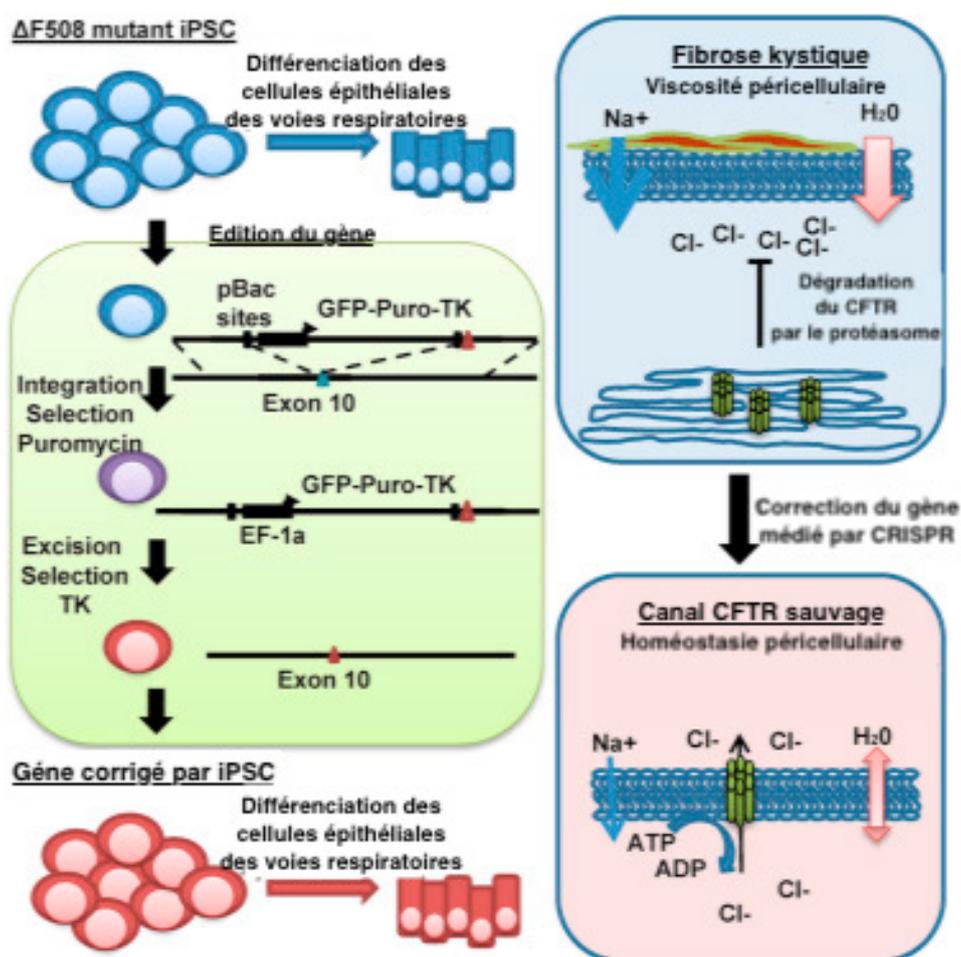


Figure 48 : Schématisation de la mutation du canal CFTR²³¹

La prochaine étape consistera à le tester chez l'homme, ce que font à la fois les sociétés Editas Medicine et CRISPR Therapeutics.

Cependant, la fibrose kystique peut être causée par plusieurs mutations différentes du gène CFTR, ce qui signifie que différentes thérapies CRISPR devront être développées pour différentes anomalies génétiques. La société Editas a déclaré qu'elle se pencherait sur les mutations les plus courantes ainsi que sur les rares mutations pour lesquelles il n'existe aucun traitement.

III.7 La dystrophie musculaire

La dystrophie musculaire de Duchenne est causée par des mutations du gène DMD, qui code pour une protéine nécessaire à la contraction des muscles. Les enfants nés avec cette maladie souffrent d'une dystrophie musculaire progressive et il n'existe actuellement aucun traitement disponible exception faite des soins palliatifs.

Des recherches sur des souris ont montré que la technologie CRISPR pourrait être utilisée pour réparer les mutations génétiques à l'origine de la dystrophie musculaire de Duchenne²³². Récemment, un groupe de chercheurs américains a révélé une méthode qui, au lieu de fixer chaque mutation individuellement, a utilisé CRISPR pour supprimer 12 zones stratégiques de mutation couvrant la majorité des 3 000 mutations différentes à l'origine de cette maladie musculaire. Une société appelée Exonics Therapeutics a été créée pour développer cette approche.

La société Editas Medicine quant à elle travaille également sur un traitement CRISPR pour la dystrophie musculaire de Duchenne. Elle suit également une approche plus large où, au lieu de réparer les mutations, CRISPR supprime des pans entiers de la protéine contenant des mutations qui rendent la protéine plus courte mais restant fonctionnelle ²³³.

III.8 La maladie de Huntington

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative à forte composante génétique. La maladie est causée par une répétition anormale d'une certaine séquence d'ADN dans le gène de la huntingtine. Plus le nombre de copies est élevé, plus la maladie se manifesterait tôt.

Traiter Huntington peut être délicat, car tout effet « hors cible » pourrait avoir des conséquences plus dangereuses pour le cerveau que n'importe où ailleurs dans le corps. Les scientifiques cherchent donc des moyens de modifier l'outil de modification génétique pour le rendre plus sûr.

Des chercheurs américains ont mis au point KamiCas9, une version de CRISPR-Cas9 comprenant un « bouton d'autodestruction » pour l'enzyme Cas9²³⁴. Cela signifie que CRISPR a pour instruction de couper la séquence de sa propre enzyme Cas9. Un groupe de chercheurs polonais a opté pour l'appariement de CRISPR-Cas9 avec une enzyme appelée nickase afin de rendre l'édition des gènes plus précise (le mécanisme d'action des nickases a été développé précédemment).

CONCLUSION

En l'espace d'un siècle la science est passée de la découverte du matériel génétique à son édition. CRISPR-Cas9 élargit aujourd'hui le champ des possibles. De nombreuses améliorations restent à appliquer, mais les perspectives en médecine semblent illimitées. La possibilité de modifier de manière spécifique l'ensemble du génome laisse entrevoir l'idée que le cancer, comme l'ensemble des maladies génétiques, actuellement incurables, pourraient l'être dans les prochaines années. Mais comme toutes révolutions, certaines dérives semblent se profiler et des questions éthiques seront à étudier.

Comme la boîte de Pandore, cette biotechnologie pourrait être à l'origine d'une nouvelle forme de transhumanisme. Jusqu'où l'Homme devra-t-il ainsi aller si le fait de « pouvoir » n'était plus une limite ?

RÉFÉRENCES

1. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. (1953) *Nature* **171**, 737.
2. Ishino, Y., *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 5429–33.
3. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. (2014) *Science* **346**, 12580-96.
4. Griffith, F. The Significance of Pneumococcal Types (1928) *J Hyg (Lond)* **27**, 113–159.
5. O'Connor, C. Isotoping Hereditary Material: Frederick Griffith, Oswald Avery, Alfred Hershey, and Martha Chase (2008) *Nature Éducation*.
6. Avery, O. T., *et al.* Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types (1944) *J Exp Med* **79**, 137–58.
7. Hershey, A. D. Spontaneous Mutations in Bacterial Viruses. (1946) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **11**, 67–77.
8. Hershey, A. D. & Chase, M. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. (1952) *The Journal of General Physiology* **36**, 39–56.
9. Levene, P. A. The Structure of Yeast Nucleic Acid Iv. Ammonia Hydrolysis. (1919) *J. Biol. Chem.* **40**, 415–24.
10. Ressources Éducatives Libres - data.abuledu.org | Les ressources libres du projet AbulÉdu. *data.abuledu.org* Disponible sur: <http://data.abuledu.org/wp/index.php?LOM=5957>. (Consulté : 30 Mars 2019)
11. Rudner, R., *et al.* Separation of *B. subtilis* DNA into complementary strands. 3. Direct analysis. (1968) *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**, 921–22.
12. A. Lemonnier, *et al.* De la découverte de l'ADN nucléaire à son utilisation par la police scientifique. Disponible sur : <http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=1891&lang=en>. (Consulté le : 30 Mars 2019)
13. Chargaff, E. *et al.* The nucleic acids: chemistry and biology. (1955) *New York, Academic Press*.
14. Chargaff, E. *et al.* Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. (1950) *Experientia* **6**, 201–09.
15. La structure de l'ADN. Disponible sur : <http://tp-svt.pagesperso-orange.fr/adn.htm>. (Consulté le : 30 Mars 2019)
16. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. (1953) *Nature* **171**, 964.
17. Aulas | Biologia Celular e Molecular / Genética UFF - Nova Friburgo. Disponible sur : <https://biocelbiomoluff.wixsite.com/punf/img-dna-estrutura-e-replicao>. (Consulté le : 30 Mars 2019)
18. Barrère, J. *et al.* Universalité et variabilité de la molécule d'ADN. Disponible sur : <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/genetic/adn/html/histoire.htm> (Consulté le : 30 Mars 2019)

19. Fiche Schema - Reproduction conforme de la cellule et réplication de l'ADN - Afterclasse. Disponible sur : <https://www.afterclasse.fr/fiche/267/reproduction-conforme-de-la-cellule-et-replication-de-ladn>. (Consulté le : 30 Mars 2019)
20. Nirenberg, M. W. & Matthaei, J. H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. (1961) *PNAS* **47**, 1588–602.
21. W. Nirenberg, M. *et al.* The RNA Code and Protein Synthesis. (1966) *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **31**, 11–24.
22. La synthèse des protéines [biologie cellulaire] - ARNm. Disponible sur : http://ressources.unisciel.fr/biocell/chap6/co/module_Chap6_4.html. (Consulté le : 30 Mars 2019)
23. Cohen, S. N., *et al.* Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. (1973) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 3240–4.
24. Nilsson, J., *et al.* Integrated production of human insulin and its C-peptide. (1996) *J. Biotechnol.* **48**, 241–50.
25. Benne, R. *et al.* Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. (1986) *Cell* **46**, 819–26.
26. Jarmuz, A. *et al.* An Anthropoid-Specific Locus of Orphan C to U RNA-Editing Enzymes on Chromosome 22. (2002) *Genomics* **79**, 285–96.
27. Harris, R. S., *et al.* RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. (2002) *Mol. Cell* **10**, 1247–53.
28. Zych, A. O., *et al.* Application of Genome Editing Techniques in Immunology. (2018) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 1–10.
29. Stoddard, B. L. Homing endonuclease structure and function. (2005) *Quarterly Reviews of Biophysics* **38**, 49–95.
30. Boch, J. *et al.* TALEs of genome targeting. (2011) *Nat. Biotechnol.* **29**, 135–36.
31. Boch, J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. (2009) *Science* **326**, 1509–12.
32. Hockemeyer, D. *et al.* Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. (2011) *Nat. Biotechnol.* **29**, 731–34.
33. Kim, Y. G., *et al.* Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1156–60.
34. What is Zinc Finger Nuclease (ZFN) Technology? *Sigma-Aldrich* Disponible sur : <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/learning-center/what-is-zfn.html>. (Consulté le : 24 Avril 2018)
35. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. (2012) *Science* **337**, 816–21.
36. Heler, R. *et al.* Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. (2015) *Nature* **519**, 199–202.
37. *CRISPR Overview* Disponible sur : <https://www.addgene.org/crispr/guide/> (Consulté le 24 Avril 2018)

38. Philippon, A. *et al.* Structure et définition des virus Disponible sur : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01191535> (Consulté le 24 Avril 2018)
39. Mayo M. A. *et al.* Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses. (1995) *Springer-Verlag*, **143**, 164-5.
40. Morgan, C., *et al.* Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. (1954) *J Exp Med* **100**, 195–202.
41. Diagram of the HIV virus. Disponible sur : <https://www.projectinform.org/glossary/hiv-structure-function> (Consulté le : 24 Avril 2018).
42. Canopé. Structure virale. Disponible sur : <https://www.reseau-canope.fr/corpus/scenario-pedagogique/les-virus-45.html> (Consulté le : 24 Avril 2018).
43. Goffard, A. Capsides virales icosaédrique et hélicoïdale. Disponible sur : <http://moodle.univ-lille2.fr/enrol/index.php?id=4613> (Consulté le : 24 Avril 2018).
44. Kozarsky, K. F., *et al.* Gene therapy: adenovirus vectors. (1993) *Current Opinion in Genetics & Development* **3**, 499–503.
45. Wyckoff, R. W. *et al.* The ultracentrifugal crystallization of tobacco mosaic virus protein. (1936) *Science* **84**, 513.
46. Gaboyer, F. *et al.* Bactériophages de type Myoviridae. Disponible sur : <https://microbiomedigest.com/author/eliesbik/page/64/> (Consulté le : 24 Avril 2018)
47. Sulakvelidze, A., *et al.* Bacteriophage Therapy. (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 649–59.
48. Goffard, A. *Image d'un Herpesviridae en microscopie électronique.* Disponible sur : <http://moodle.univ-lille2.fr/enrol/index.php?id=4613> (Consulté le : 24 Avril 2018).
49. Lwoff, A. *et al.* The Classification of Viruses. (1966) *Annual Review of Microbiology* **20**, 45–74.
50. Escurier V. *et al.* Cycle de reproduction du virus de la grippe. (2011) *Springer-Verlag* **20**, 169-77.
51. Carnec, X., *et al.* Molecular mechanisms of HIV entry in target cells. (2007) *Virologie* **11**, 86–94.
52. Goffard, A. Principe généraux de la réplication virale. *Méthodes de diagnostic en virologie* Disponible sur : <http://moodle.univ-lille2.fr/enrol/index.php?id=4613> (Consulté le : 24 Avril 2018).
53. Verma, I. M. *et al.* The reverse transcriptase. (1977) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **473**, 1–38.
54. Young, L. S. *et al.* Epstein–Barr virus: 40 years on. (2004) *Nature Reviews Cancer* **4**, 757–68.
55. Zhou, Y., *et al.* PHAST: A Fast Phage Search Tool. (2011) *Nucleic Acids Res* **39**, 347–52.
56. Universalis, E. Thérapeutique - Thérapie génique. *Encyclopædia Universalis* Disponible sur : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/therapeutique-therapie-genique/>. (Consulté le : 20 Juillet 2018)
57. Koontz, L. Chapter Three - Explanatory Chapter: Introducing Exogenous DNA into Cells. (2013) *Methods in Enzymology* (ed. Lorsch, J.) **529**, 29–34.

58. Philippe, S. Développement de vecteurs lentiviraux non-intergratifs en vue du transfert de gènes dans le système nerveux central. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00185704/document>. (Consulté le : 20 Juillet 2018)
59. Baum, C., *et al.* Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. (2006) *Hum. Gene Ther* **17**, 253–63.
60. Alba, R., *et al.* Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. (2005) *Gene Therapy* **12**, 18.
61. CNRS. Evaluation des dangers et des risques liés aux étapes de construction des OGM. Disponible sur : <http://www.cnrs.fr/infoslabos/reglementation/OGMdanger.htm> (Consulté le : 20 Juillet 2018)
62. Thomas, C. E., *et al.* Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. (2003) *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–58.
63. Wang, H.-X. *et al.* CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. (2017) *Chem. Rev.* **117**, 9874–906.
64. Graessmann, M. *et al.* Microinjection of tissue culture cells. *Methods in Enzymology* **101**, 482–92 (1983).
65. Zuckermann, M. *et al.* Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. (2015) *Nat. Com.* **6**, 7391.
66. Xue, W. *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. (2014) *Nature* **514**, 380–84.
67. Yin, H. *et al.* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. (2014) *Nature Biotechnology* **32**, 551–53.
68. Lin, S.-R. *et al.* The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. (2014) *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **3**, 186.
69. Wightman, L. *et al.* Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. (2001) *J. Gene Med.* **3**, 362–72.
70. Buscail, L. *et al.* First-in-man Phase 1 Clinical Trial of Gene Therapy for Advanced Pancreatic Cancer: Safety, Biodistribution, and Preliminary Clinical Findings. (2015) *Molecular Therapy* **23**, 779–89.
71. Hanna, N. *et al.* Phase 1/2a, dose-escalation, safety, pharmacokinetic and preliminary efficacy study of intratumoral administration of BC-819 in patients with unresectable pancreatic cancer. (2012) *Cancer Gene Therapy* **19**, 374–81.
72. Ramakrishna, S. *et al.* Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. (2014) *Genome Res.*, **24**, 1020-27.
73. Dash, M., *et al.* A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. (2011) *Progress in Polymer Science* **36**, 981–1014.
74. Kiang, T., *et al.* The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. (2004) *Biomaterials* **25**, 5293–301.
75. Huang, M., *et al.* Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. (2005) *J. Control. Release* **106**, 391–406.

76. Kim, Y. H. *et al.* Structural Characteristics of Size-Controlled Self-Aggregates of Deoxycholic Acid-Modified Chitosan and Their Application as a DNA Delivery Carrier. (2001) *Bioconjugate Chem.* **12**, 932–38.
77. Dt, T. Preparation of Fully Deacetylated Chitosan for Adsorption of Hg(II) Ion from Aqueous Solution. (2015). *Chemical Sciences Journal* **6**, 2.
78. Fink, T. L. *et al.* Plasmid size up to 20 kbp does not limit effective *in vivo* lung gene transfer using compacted DNA nanoparticles. (2006) *Gene Therapy* **13**, 1048–51.
79. Poly(L-lysine)-PEGs. *NSP-Functional Polymers & Copolymers* Disponible sur : <https://www.nanosoftpolymers.com>. (Consulté le : 3 Août 2018)
80. Liang, X. *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. (2015) *Journal of Biotechnology* **208**, 44–53.
81. Zuris, J. A. *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. (2015) *Nature Biotechnology* **33**, 73–80.
82. Wang, M. *et al.* Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. (2016) *PNAS* **113**, 2868–73.
83. Mintzer, M. A. *et al.* Nonviral Vectors for Gene Delivery. (2009) *Chem. Rev.* **109**, 259–302.
84. Luo, D. *et al.* Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. (2000) *Nature Biotechnology* **18**, 893–5.
85. Ghosh, P., H *et al.* Gold nanoparticles in delivery applications. (2008) *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1307–15.
86. Bates, K. *et al.* Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: Past achievements, present challenges and future goals. (2013) *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 2023–33.
87. Wang, T., *et al.* Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies. (2012) *International Journal of Pharmaceutics* **427**, 3–20.
88. Kogure, K. *et al.* Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method. (2004) *Journal of Controlled Release* **98**, 317–23.
89. Nakamura, T., *et al.* Multifunctional Envelope-type Nanodevice for Use in Nanomedicine: Concept and Applications. (2012) *Acc. Chem. Res.* **45**, 1113–21.
90. Liang, X. *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. (2015) *Journal of Biotechnology* **208**, 44–53.
91. Thess, A. *et al.* Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. (2015) *Molecular Therapy* **23**, 1456–64.
92. Kormann, M. S. D. *et al.* Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. (2011) *Nature Biotechnology* **29**, 154–7.
93. Karikó, K., *et al.* Increased Erythropoiesis in Mice Injected With Submicrogram Quantities of Pseudouridine-containing mRNA Encoding Erythropoietin. (2012) *Molecular Therapy* **20**, 948–53.
94. Pollard, C. *et al.* Type I IFN Counteracts the Induction of Antigen-Specific Immune Responses by Lipid-Based Delivery of mRNA Vaccines. (2013) *Molecular Therapy* **21**, 251–9.
95. Rejman, J., *et al.* mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers. (2010) *J. Control. Release* **147**, 385–91.

96. Geall, A. J. *et al.* Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. (2012) *Harvard Medical School* **109**, 14604-09.
97. Kauffman, K. J. *et al.* Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. (2015) *Nano Lett.* **15**, 7300–06.
98. Mahiny, A. J. *et al.* In vivo genome editing using nuclease-encoding mRNA corrects SP-B deficiency. (2015) *Nature Biotechnology*, **33**, 584-6.
99. Kallen, K.-J. *et al.* A novel, disruptive vaccination technology. (2013) *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **9**, 2263–76.
100. Üzgün, S. *et al.* PEGylation Improves Nanoparticle Formation and Transfection Efficiency of Messenger RNA. (2011) *Pharm Res* **28**, 2223–32.
101. Weide, B. *et al.* Direct Injection of Protamine-protected mRNA: Results of a Phase 1/2 Vaccination Trial in Metastatic Melanoma Patients. (2009) *Journal of Immunotherapy* **32**, 498.
102. Kim, S., *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. (2014) *Genome Res.* **24**, 1012–9.
103. Hendel, A. *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. (2015) *Nature Biotechnology* **33**, 985–9.
104. Ain, Q. U., *et al.* Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. (2015) *Journal of Controlled Release* **205**, 120–7.
105. Lu, Y., *et al.* Stimuli-responsive nanomaterials for therapeutic protein delivery. (2014) *J. Control. Release* **194**, 1–19.
106. Gu, Z., B *et al.* Tailoring nanocarriers for intracellular protein delivery. (2011) *Chem. Soc. Rev.* **40**, 3638–55.
107. Sun, W. *et al.* Self-Assembled DNA Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR–Cas9 for Genome Editing. (2015) *Angewandte Chemie* **127**, 12197–201.
108. Schumann, K. *et al.* Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. (2015) *PNAS* **112**, 10437–42.
109. Woo, J. W. *et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. (2015) *Nature Biotechnology* **33**, 1162–4.
110. Roberts, M. J., *et al.* Chemistry for peptide and protein PEGylation. (2012) *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 116–27.
111. Cárdenas-Bailón, F., *et al.* Microencapsulation of insulin using a W/O/W double emulsion followed by complex coacervation to provide protection in the gastrointestinal tract. (2015) *J. Microencapsul.* **32**, 308–16.
112. The Sequence of the Human Genome | Science. Disponible sur : <http://science.sciencemag.org/content/291/5507/1304>. (Consulté le : 12 Février 2019)
113. Khorana, H. G. *et al.* Polynucleotide Synthesis and the Genetic Code. (1966) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **31**, 39–49.
114. Kosuri, S. *et al.* Large-scale *de novo* DNA synthesis: technologies and applications. (2014) *Nature Methods* **11**, 499–507.

115. Solid-phase oligonucleotide synthesis. Disponible sur : <https://www.atdbio.com/content/17/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>. (Consulté le : 16 Février 2019)
116. ServiceOct. 2, R. F., 2018 & Pm, 4:30. New way to write DNA could turbocharge synthetic biology and data storage. (2018) *Science | AAAS*. Disponible sur : <https://www.sciencemag.org/news/2018/10/new-way-write-dna-could-turbocharge-synthetic-biology-and-data-storage>. (Consulté le : 16 Février 2019)
117. Service, R. F. DNA printers poised to jump from paragraphs to pages. (2018) *Science* **362**, 143.
118. Doench, J. G. *et al.* Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. (2014) *Nature Biotechnology* **32**, 1262–7.
119. Van der Oost, J., *et al.* Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. (2014) *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 479–92.
120. Hsu, P. D., *et al.* Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. (2014) *Cell* **157**, 1262–78.
121. Shalem, O. *et al.* Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. (2014) *Science* **343**, 84–7.
122. CRISPR Systems | Santa Cruz Biotechnology. Disponible sur : <https://www.scbt.com/scbt/fr/whats-new/crispr-systems>. (Consulté le : 17 Février 2019)
123. Sander, J. D. *et al.* CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. (2014) *Nature Biotechnology* **32**, 347–55.
124. Gilbert, L. A. *et al.* CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. (2013) *Cell* **154**, 442–51.
125. Maeder, M. L. *et al.* CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. (2013) *Nature Methods* **10**, 977–9.
126. Chavez, A. *et al.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. (2015) *Nature Methods* **12**, 326–8.
127. Addgene: What is a Plasmid? Disponible sur : <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/plasmid-background/>. (Consulté le : 16 Février 2019)
128. Prielhofer, R. *et al.* GoldenPiCS: a Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast *Pichia pastoris*. (2017) *BMC Syst Biol* **11**, 123.
129. Sakuma, T., *et al.* Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. (2014) *Sci Rep* **4**, 5400.
130. BpiI (BbsI) (10 U/L) - Thermo Fisher Scientific. Disponible sur : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1011>. (Consulté le : 17 Février 2019)
131. Engler, C., *et al.* Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. (2009) *PLOS ONE* **4**, 5553.
132. Liang, X. *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. (2015) *J. Biotechnol.* **208**, 44–53.

133. CRISPR/Cas9 RNP Delivery. Disponible sur : <https://www.mirusbio.com/applications/genome-editing-using-crispr-cas/rnp-delivery>. (Consulté le : 17 Février 2019)
134. Kim, S., *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. (2014) *Genome Res.* **113**, 171322.
135. Leader, B., *et al.* Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. (2008) *Nat Rev Drug Discov* **7**, 21–39.
136. Zuris, J. A. *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. (2015) *Nature Biotechnology* **33**, 73–80.
137. Abremski, K. *et al.* Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1509–14.
138. Chu, V. T. *et al.* Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. (2015) *Nature Biotechnology* **33**, 543–8.
139. Koike-Yusa, H., *et al.* Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. (2014) *Nat. Biotechnol.* **32**, 267–73.
140. Addgene: CRISPR Guide. Disponible sur : <https://www.addgene.org/crispr/guide/> (Consulté le : 17 Février 2019).
141. The CRISPR/Cas9 and Genome Editing Products Market. *BioInformatics Inc.* Disponible sur : <https://bioinfoinc.com/product/genome-editing-products-market-2017/> (Consulté le : 17 Février 2019).
142. Chinese Clinical Trial Register (ChiCTR) - The world health organization international clinical trials registered organization registered platform. Disponible sur : <http://www.chictr.org.cn/showprojen.aspx?proj=32758>. (Consulté le : 18 Février 2019)
143. Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. (2007) *Science* **315**, 1709–12.
144. Gasiunas, G., *et al.* Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 2579-86.
145. Fu, Y. *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. (2013) *Nat. Biotechnol.* **31**, 822–6.
146. Nissim, L., *et al.* Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. (2014) *Mol. Cell* **54**, 698–710.
147. Fu, Y. *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. (2013) *Nat. Biotechnol.* **31**, 822–6.
148. Kiani, S. *et al.* Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. (2015) *Nat. Methods* **12**, 1051–4.
149. Mali, P. *et al.* CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. (2013) *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–8.
150. Guschin, D. Y. *et al.* A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. (2010) *Methods Mol. Biol.* **649**, 247–56.
151. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. (2013) *Nat Protoc* **8**, 2281–308.

152. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. (2013) *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–32.
153. Rahdar, M. *et al.* Synthetic CRISPR RNA-Cas9-guided genome editing in human cells. (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 7110–7.
154. Tsai, S. Q. *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. (2014) *Nat. Biotechnol.* **32**, 569–76.
155. Kim, S., *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. (2014) *Genome Res.* **24**, 1012–9.
156. Singh, R., *et al.* Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. (2015) *Nucleic Acids Res.* **43**, 118.
157. Gabriel, R., *et al.* Mapping the precision of genome editing. (2015) *Nat. Biotechnol.* **33**, 150–2.
158. Frock, R. L. *et al.* Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. (2015) *Nat. Biotechnol.* **33**, 179–86.
159. Tsai, S. Q. *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. (2014) *Nat. Biotechnol.* **32**, 569–76.
160. Vouillot, L., *et al.* Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. (2015) *Bethesda* **5**, 407–15.
161. Kiani, S. *et al.* Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. (2015) *Nat. Methods* **12**, 1051–4.
162. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponible sur : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ressources-electroniques.univ-lille.fr/Blast.cgi>. (Consulté le : 3 Mars 2019)
163. CRISPR RGEN Tools. Disponible sur : <http://www.rgenome.net/cas-offinder/>. (Consulté le : 3 Mars 2019)
164. Sternberg, S. H., *et al.* Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. (2015) *Nature* **527**, 110–3.
165. Jiang, F., *et al.* Structural Biology: A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. (2015) *Science* **348**, 1477–81.
166. Chari, R., *et al.* Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. (2015) *Nat. Methods* **12**, 823–6.
167. Doench, J. G. *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. (2016) *Nat. Biotechnol.* **34**, 184–91.
168. Zetsche, B. *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. (2015) *Cell* **163**, 759–71.
169. Ma, E., *et al.* Single-Stranded DNA Cleavage by Divergent CRISPR-Cas9 Enzymes. (2015) *Mol. Cell* **60**, 398–407.
170. Friedland, A. E. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. (2015) *Genome Biol.* **16**, 257.
171. Makarova, K. S. *et al.* Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. (2015) *Methods Mol. Biol.* **1311**, 47–75.

172. Moscou, M. J. *et al.* A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. (2009) *Science* **326**, 1501.
173. Kuscu, C., *et al.* Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. (2014) *Nat. Biotechnol.* **32**, 677–83.
174. Chylinski, K., *et al.* The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. (2013) *RNA Biol* **10**, 726–37.
175. Fonfara, I. *et al.* Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. (2014) *Nucleic Acids Res.* **42**, 2577–90.
176. Yu, C. *et al.* Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. (2015) *Cell Stem Cell* **16**, 142–7.
177. Tycko, J., *et al.* Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. (2016) *Mol Cell* **63**, 355–70.
178. Sander, J. D. *et al.* CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. (2014) *Nat. Biotechnol.* **32**, 347–55.
179. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. (2013) *Science* **339**, 819–23.
180. Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. (2013) *Cell* **154**, 1380–9.
181. Collin and Ramos - Modèles animaux de maladies génétiques-Zebrafish. Disponible sur : Collin and Ramos - Modèles animaux de maladies génétiques-Zebrafish. (Consulté le : 5 Mars 2019)
182. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. (2014) *Science* **343**, 84–7.
183. Guilinger, J. P., *et al.* Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. (2014) *Nat. Biotechnol.* **32**, 577–82.
184. Kleinstiver, B. P. *et al.* Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. (2015) *Nat. Biotechnol.* **33**, 1293–8.
185. Kleinstiver, B. P. *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. (2016) *Nature* **529**, 490–5.
186. Kleinstiver, B. P. *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. (2015) *Nature* **523**, 481–5.
187. Hsu, P. D., *et al.* Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. (2014) *Cell* **157**, 1262–78.
188. Wright, A. V., *et al.* Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. (2016) *Cell* **164**, 29–44.
189. Polstein, L. R. *et al.* A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. (2015) *Nat. Chem. Biol.* **11**, 198–200.
190. Gilbert, L. A. *et al.* Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. (2014) *Cell* **159**, 647–61.
191. Fu, Y., *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. (2014) *Nat Biotechnol* **32**, 279–84.

192. Cho, S. W. *et al.* Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. (2014) *Genome Res.* **24**, 132–41.
193. Briner, A. E. *et al.* Guide RNA functional modules direct Cas9 activity and orthogonality. (2014) *Mol. Cell* **56**, 333–9.
194. Chen, B. *et al.* Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. (2013) *Cell* **155**, 1479–91.
195. Dang, Y. *et al.* Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. (2015) *Genome Biol.* **16**, 280.
196. Chen, B. *et al.* Expanding the CRISPR imaging toolset with *Staphylococcus aureus* Cas9 for simultaneous imaging of multiple genomic loci. (2016) *Nucleic Acids Res.* **44**, 75.
197. Sung, Y. H. *et al.* Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. (2014) *Genome Res.* **24**, 125–31.
198. Ran, F. A. *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. (2015) *Nature* **520**, 186–91.
199. Fu, Y., *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. (2014) *Nat Biotechnol* **32**, 279–84.
200. Wu, X. *et al.* Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. (2014) *Nat. Biotechnol.* **32**, 670–6.
201. Singh, R., *et al.* Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. (2015) *Nucleic Acids Res.* **43**, 118.
202. Singh, R., *et al.* Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. (2015) *Nucleic Acids Res.* **43**, 118.
203. Kim, S., *et al.* Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. (2014) *Genome Res.* **24**, 1012–9.
204. Dahlman, J. E. *et al.* Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease. (2015) *Nat. Biotechnol.* **33**, 1159–61.
205. Kim, D., *et al.* Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. (2016) *Genome Res.* **26**, 406–15.
206. Hendel, A. *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. (2015) *Nat. Biotechnol.* **33**, 985–9.
207. Sapranauskas, R. *et al.* The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. (2011) *Nucleic Acids Res.* **39**, 9275–82.
208. Zincarelli, C., *et al.* Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. (2008) *Mol. Ther.* **16**, 1073–80.
209. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. (2013) *Genome Biol.* **14**, 36.
210. Fu, B. X. H., *et al.* Landscape of target:guide homology effects on Cas9-mediated cleavage. (2014) *Nucleic Acids Res.* **42**, 13778–87.
211. Kleinstiver, B. P. *et al.* Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. (2016) *Nat. Biotechnol.* **34**, 869–74.

212. Al, D. K., *et al.* Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. (2015) *Nature Chemical Biology*. **11**, 316-8.
213. Martínez-Bartolomé, S., *et al.* The Minimal Information about a Proteomics Experiment (MIAPE) from the Proteomics Standards Initiative. (2014) *Methods Mol. Biol.* **1072**, 765–80.
214. Limberis, M. P. *et al.* Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 12993–8.
215. Zhu, L. J., *et al.* CRISPRseek: a bioconductor package to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome-editing systems. (2014) *PLoS ONE* **9**, 108424.
216. Lee, C. M., *et al.* The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 System Enables Specific Genome Editing in Mammalian. (2016) *Cells. Mol. Ther.* **24**, 645–54.
217. Ge, Y., P *et al.* Factors influencing the development of an anti-factor IX (FIX) immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. (2001) *Blood* **97**, 3733–7.
218. Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. (2014) *Cell* **156**, 935–49.
219. Blogger, G. *et al.* The CRISPR Software Matchmaker: A New Tool for Choosing the Best CRISPR Software for Your Needs. (2016) *Molecular Cell*, **63**, 355-70.
220. Perez-Pinera, P. *et al.* RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. (2013) *Nat. Methods* **10**, 973–6.
221. Santé 2030 : une analyse prospective de l'innovation en santé. Disponible sur : <https://www.leem.org/evenement/sante-2030-une-analyse-prospective-de-linnovation-en-sante>. (Consulté le : 31 Mars 2019)
222. Search of: CRISPR - List Results - ClinicalTrials.gov. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CRISPR&cntry=&state=&city=&dist=>. (Consulté le : 10 Mars 2019)
223. Chaffer, C. L. *et al.* Perspective on Cancer Cell Metastasis. (2011) *Science* **331**, 1559–64.
224. Klonisch, T. *et al.* Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. (2008) *Trends in Molecular Medicine* **14**, 450–60.
225. Mimeault, M., *et al.* Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. (2007) *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 981–1011.
226. Cyranoski, D. *et al.* CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. (2016) *Nature News* **539**, 479.
227. Reardon, S. *et al.* First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. (2016) *Nature News*
228. Mullard, A. *et al.* First in vivo gene-editing drugs enter the clinic. (2017) *Nature Reviews Drug Discovery* **17**, 7.
229. Antoniani, C. *et al.* Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. (2018) *Blood* **131**, 1960–73.
230. Ruan, G.-X. *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. (2017) *Molecular Therapy* **25**, 331–41.

231. Firth, A. L. *et al.* Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. (2015) *Cell Reports* **12**, 1385–90.
232. Zhang, Y. *et al.* CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice. (2017) *Science Advances* **3**, 1602814.
233. Nelson, C. E. *et al.* In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. (2016) *Science* **351**, 403–7.
234. Merienne, N. *et al.* The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes. (2017) *Cell Reports* **20**, 2980–91.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2018/2019

Nom : Daure

Prénom : Antoine

Titre de la thèse : CRISPR-Cas 9 : De la biotechnologie d'aujourd'hui aux applications cliniques de demain

Mots-clés : CRISPR-Cas9, biotechnologie, thérapie génique, clinique, ciseau moléculaire, maladie génétique, cancer

Résumé : Après avoir rappelé les fondements de la génétique, de sa découverte aux méthodes d'éditions, puis le virus en tant que potentiel vecteur, la biotechnologie CRISPR-Cas9 est présentée. Un état des lieux est ensuite établi afin d'envisager les axes d'amélioration de cette technologie. Enfin, les perspectives pour demain en clinique sont présentées ainsi que les essais chez l'homme ayant actuellement cours en 2019.

La technique d'édition CRISPR-Cas9, qui signifie *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* dont l'origine vient d'un mécanisme de défense bactérien développé contre les bactériophages, a été découverte par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna. Cette technologie permet de cliver spécifiquement un brin d'ADN afin de mettre au silence un gène, de l'éditer, de réprimer son expression ou de l'activer. Cette méthode dont la rapidité, la facilité et le faible coût représentent une révolution dans l'édition du génome peut encore s'améliorer. Son potentiel majeur en tant qu'outil potentiellement curatif a d'ailleurs donné lieu à la mise en place de nombreux essais cliniques portant sur différentes pathologies impliquant un facteur génétique ; c'est le cas du cancer.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Jean-Louis CAZIN
Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)
Docteur ès Sciences Pharmaceutiques
Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie Clinique en Cancérologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre Régional de Lutte Contre le Cancer en Hauts de France)
Conseil National de l'Ordre des Pharmaciens : Conseiller Ordinal élu (section H).

Assesseurs : Madame le Professeur Sophie LESTAVEL
Professeur de Biologie Cellulaire et Moléculaire à la Faculté de Pharmacie (Université de Lille)
Monsieur le Docteur Cyril COUTURIER
Docteur en Sciences (Paris VI)
Maître de conférence à l'Université de Lille
Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Membre extérieur : Monsieur le Docteur Hai Pascal DAO PHAN

Docteur en Pharmacie
Responsable Opérations Cliniques chez Bayer Pharmaceuticals