



RÉFÉRENCES

- Paulsen IT, Banerjee L, Myers GSA, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 2003 ; 299 : 2071-4.
- Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2010 ; 13 : 632-9.
- Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio* 2010 ; 1 : e00227-10.
- Price VJ, Huo W, Sharifi A, Palmer KL. CRISPR-Cas and restriction-modification act additively against conjugative antibiotic resistance plasmid transfer in *enterococcus faecalis*. *mSphere* 2016 ; 1 : e00064-16.
- Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 7267-72.

NOUVELLE

Ingénierie du génome bactérien grâce à l'outil CRISPR/Cas12a

Paul Castagné¹, Armelle Guingand¹, Alexandra Moderc¹, Sarah Monard¹

¹ École normale supérieure de Lyon, département de biologie, Master biologie, Lyon, France.

► CRISPR/Cas9 est le système de ciseaux moléculaires le mieux décrit. Le couplage du système CRISPR/Cas9 avec une recombinase a permis de révolutionner la modification de génomes bactériens par recombinaison homologue. En effet, les méthodes utilisées jusqu'alors comprenaient de nombreuses étapes qui marquaient de façon indélébile le chromosome bactérien sous la forme de « cicatrices ». La machinerie Cas9 peut, elle, couper l'ADN avant qu'une recombinaison avec une séquence choisie ne soit réalisée par la recombinase, permettant alors la modification désirée sans cicatrice exogène au niveau de l'ADN. Cependant, comme Cas9 reconnaît des séquences adjacentes à la séquence ciblée par l'ARN guide (séquence dite PAM, *protospacer adjacent motif*), riches en guanine (séquence 5'-NGG-3'), les séquences géniques, mais aussi les espèces bactériennes auxquelles cette méthode s'applique, sont limitées et son utilisation semble même être toxique chez certaines espèces dont le génome est riche en GC [1].

Récemment, le système CRISPR/Cas12a (Cpf1) a été découvert chez la bactérie *Francisella novicida* [2]. L'endonuclease Cas12a reconnaît des séquences PAM de type YTN (CTN ou TTN) et peut être guidée par un seul ARN CRISPR (crARN), sans l'aide d'un ARN agissant *in trans*. Ainsi, elle présente des caractéristiques communes avec CRISPR/Cas9 mais diffère par la séquence PAM reconnue et par son mode de guidage. L'équipe de Yan *et al.* a donc voulu déterminer l'efficacité et l'utilité du système CRISPR/Cas12a sur différentes espèces bactériennes comme alternative au système CRISPR/Cas9 [3].

Premièrement, un système de recombinaison du génome d'*Escherichia coli* a été construit, montrant ainsi que CRISPR/Cas12a associé à la recombinase lambda Red fonctionne parfaitement dans ce modèle bactérien et qu'il permet de générer avec des fréquences élevées (60 à 80 %) des mutations ponctuelles, des délétions ou des insertions (insertion réussie du gène *gfp* codant la protéine GFP [*green fluorescent protein*] en remplacement du gène *aroA* d'*E. coli*). Par conséquent, le génome d'*E. coli* peut être manipulé grâce à Cas9 ou Cas12a, ce qui accroît ainsi les possibilités de remaniements (Figure 1).

Ensuite, des résultats similaires ont été obtenus pour manipuler le chromosome de *Yersinia pestis*, l'agent étiologique de la peste qui a causé des millions de morts à travers les siècles. De plus, les auteurs ont montré que ce système CRISPR/Cas12a est aussi utilisable pour modifier (mutation, délétion, insertion) ou pour éliminer les plasmides bactériens natifs chez *Y.*

pestis, qui peuvent coder des facteurs impliqués dans des processus comme l'adaptation, la résistance ou la virulence, et dont la manipulation est donc un enjeu fort. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé le système CRISPR/Cas12a ciblé vers le plasmide grâce à un ARN guide, mais sans fournir de matrice pour la recombinaison. Coupé, le plasmide ne se réplique plus et est perdu. Ce potentiel de l'endonuclease Cas12a est ici prometteur. En effet, à une époque où la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème de santé publique majeur, elle permettrait d'éliminer certains plasmides conférant aux bactéries leur résistance aux antibiotiques.

Enfin, l'équipe de Yan *et al.* s'est intéressée à *Mycobacterium smegmatis*. Cette mycobactérie n'est pas pathogène pour l'homme ; cependant, elle est proche de *Mycobacterium tuberculosis*, principal agent étiologique de la tuberculose pulmonaire. Pour des raisons pratiques, les essais ont été menés sur *M. smegmatis* en espérant pouvoir transposer les résultats vers *M. tuberculosis*. Les auteurs ont ainsi montré que CRISPR/Cas12a, couplé à la recombinase lambda Red, permet d'effectuer des recombinaisons homologues simple brin et double brin de façon efficace, autorisant des délétions allant jusqu'à

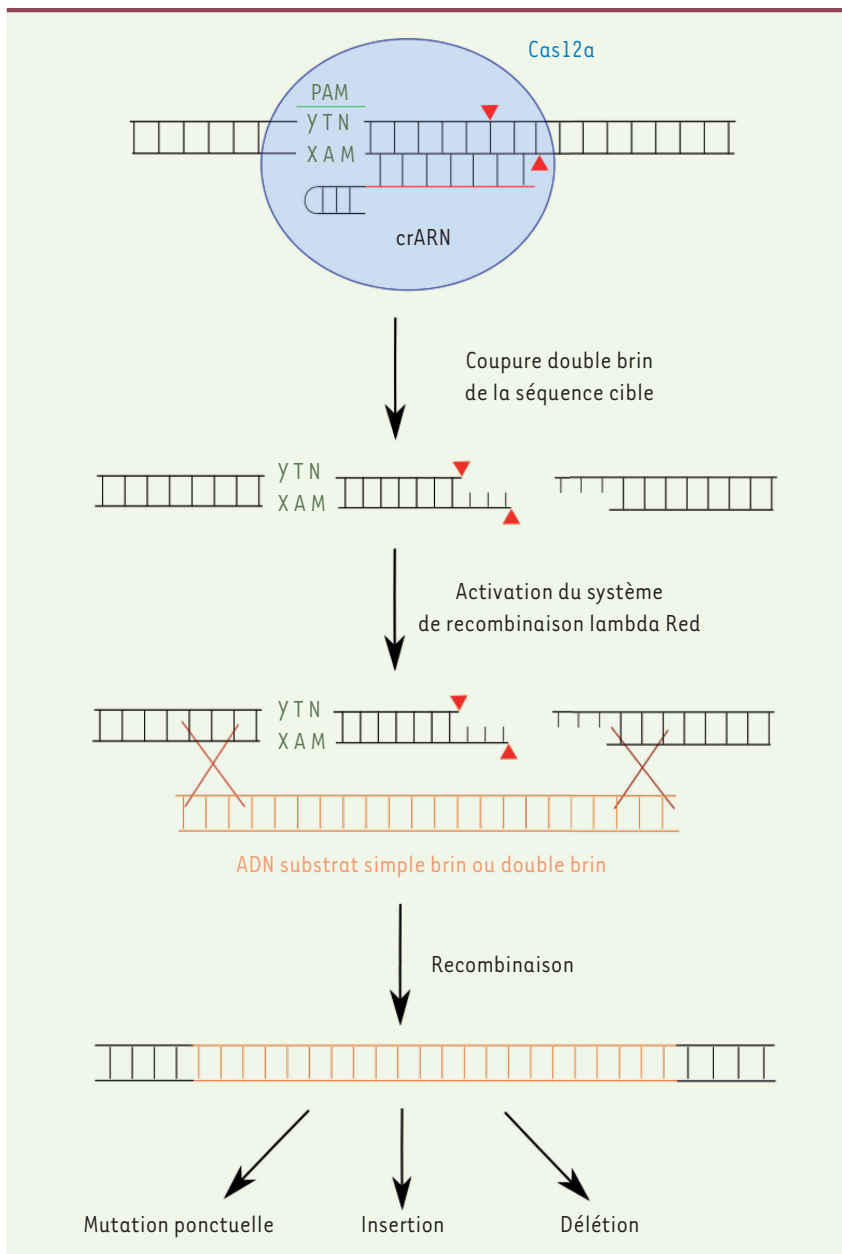


Figure 1. Manipulation du génome bactérien par association du système CRISPR/Cas12a et de la recombinaison lambda Red. Le crARN se fixe à une séquence génomique qui lui est complémentaire et qui est localisée à proximité d'une courte séquence PAM de type YTN (TTN ou GTN). La double reconnaissance (crARN et PAM) par la nucléase Cas12a permet sa fixation sur l'ADN cible. L'ADN double brin est alors coupé et l'activation du système de recombinaison lambda Red permet d'induire la recombinaison homologue avec un oligonucléotide (ADN simple brin ou double brin) afin de générer des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions selon l'ADN fourni pour la recombinaison.

chez certaines espèces bactériennes, l'utilisation de phages comme véhicules a permis de pallier ce problème et ouvre des perspectives intéressantes [4].

Bacterial genome editing using the CRISPR/Cas12a system

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Jiang Y, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 15179.
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 2015 ; 163 : 759-71.
- Yan MY, Yan HQ, Ren GX, et al. CRISPR/Cas12a assisted recombineering in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2017 ; 83 : e00947-17.
- Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 7267-72.

plusieurs milliers de paires de bases dans le génome de la mycobactérie. Cas12a est par ailleurs le premier système CRISPR/Cas à permettre l'ingénierie du génome de cette bactérie dans laquelle Cas9 est toxique. Il ressort de ces récents travaux que CRISPR/Cas12a est un système d'ingénierie du génome bactérien efficace chez plusieurs espèces bactériennes d'intérêt. Cas12a et Cas9 sont deux systèmes proches et complémentaires

puisque, d'une part, les séquences PAM reconnues sont différentes, et que, d'autre part, le premier peut être une alternative lorsque le second est toxique. Dans ces expériences, les systèmes CRISPR/Cas et Lambda Red ont été introduits sur des plasmides par des techniques de transformation bactérienne, et la difficulté à ce jour reste le choix du véhicule permettant d'apporter le système CRISPR/Cas dans la bactérie au sein de son écosystème. Mais déjà,

m/s
médecine/sciences

Abonnez-vous à médecine/sciences

Bulletin d'abonnement page 490 dans ce numéro de m/s