

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Normale Supérieure d'Enseignement Technologique المدرسة العليا لأماة التعليم التكنولوجي بمسعدة

Département des Sciences Naturelles

قسم العلوم الطبيعية



## Mémoire de fin d'étude مذكرة التخرج

من إعداد :

Merabti Asma  
Mezhoud Aya

مرابطي أسماء  
مزهود آية

En vue de l'obtention du diplôme : Professeur d'Enseignement  
moyen

لنيل شهادة : أستاذ التعليم المتوسط

*Thème*

الموضوع

**Bilan et perspectives de la thérapie génique : cas de la  
technique CRISPR/Cas 9**

Sous la direction de : Dr MEZIRI Fayçal

تحت إشراف الأستاذ : د. مزيري فيصل

Jury composé de : Dr CHAOUCH Rabeh

«MCA » (Président)

Dr KHELFAOUI Mohamed Sabri

« MCA » (Examinateur)

Promotion Juin 2025 دفعة جوان 2025



# Remerciements

Au terme de ce modeste travail, nous rendons grâce à Allah, Le Tout-Puissant, pour la force, la patience et la persévérance qu'Il nous a accordées tout au long de ce parcours.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadrant, **Dr. Meziri Fayçal**, pour sa disponibilité, ses conseils précieux, sa rigueur scientifique et son accompagnement bienveillant. Malgré ses nombreuses responsabilités, il a toujours su nous guider avec patience et humilité. Nous vous remercions sincèrement pour votre confiance et votre engagement. Vous demeurez pour nous un modèle d'excellence et d'intégrité.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire, et pour l'attention qu'ils y ont portée.

Nous remercions vivement l'ensemble des enseignants du département des sciences naturelles de l'ENSET de Skikda, pour la qualité de leur enseignement et leur contribution essentielle à notre formation académique et humaine.

Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à nos familles respectives, pour leur soutien indéfectible, tant moral que matériel, et pour les sacrifices qu'ils n'ont cessé de faire pour nous voir réussir.

Enfin, nous remercions toutes les personnes, de près ou de loin, qui ont contribué à la réalisation de ce travail, par un conseil, une aide, un mot d'encouragement ou un simple geste de soutien. Merci à toutes et à tous.



# Dédicace

*Ce travail est bien plus qu'un aboutissement académique : il est le reflet d'un chemin parcouru grâce à l'amour, le soutien et la bienveillance de ceux qui m'entourent. C'est avec un cœur rempli de reconnaissance que je dédie ces pages :*

*À ma famille, mon premier sanctuaire et ma plus grande fierté :*

*À mon père, Rabah, dont la sagesse, l'intégrité et la générosité ont tracé la voie de mes aspirations.*

*À ma mère, Radhia, source inépuisable de tendresse, de courage et de prières, dont la force silencieuse a guidé chacun de mes pas.*

*À mes sœurs, Marwa et Assif, mes confidentes et alliées, dont la présence a illuminé mes moments de doute.*

*À mes frères, Zakaria, Riyad et Amir, piliers solides et constants, toujours prêts à me soutenir.*

*À ma grand-mère bien-aimée, gardienne des traditions et d'un amour sans conditions.*

*À mes amies, compagnes de route précieuses, pour leurs rires, leurs encouragements et leur loyauté.*

*Une pensée spéciale pour Samar, Hana et Manar, dont l'amitié a été une lumière dans les moments les plus exigeants.*

*À mes enseignants, artisans de ma formation, pour leur savoir, leur patience et leur engagement à éveiller les esprits.*

*À toi, Asma, bien plus qu'un binôme : une amie de cœur, une complice dont la fidélité, l'enthousiasme et la complicité ont transformé ce parcours en une aventure inoubliable.*

*Ce mémoire est le fruit d'efforts, mais aussi de rencontres, de solidarité et d'amitiés qui ont donné un sens à chaque étape. Merci, du plus profond de moi-même, pour votre présence à mes côtés.*

*Aya*

2025





# Dédicace

*Avant toute chose, je rends grâce à Dieu, source de toute force et sagesse, dont la guidance a illuminé chaque étape de ce parcours.*

*Je dédie ce travail :*

*À mon père bien-aimé, Kamel, pour son amour silencieux mais infailible, ses sacrifices invisibles et sa patience qui a été mon refuge.*

*À ma mère adorée, Nadjete, mon pilier et mon inspiration, dont les prières, la tendresse et la foi inébranlable ont porté mes rêves.*

*À ma sœur Maram, lumière de ma vie, dont la présence et les mots réconfortants ont transformé mes doutes en espoir.*

*À mes frères Yahia et Choaiib, mes héros discrets, dont le soutien sans faille a été ma force tranquille.*

*À Aya, bien plus qu'un binôme : une sœur de cœur, dont la complicité, la loyauté et l'enthousiasme ont fait de cette aventure un souvenir précieux.*

*À mes amies, Samar, Manar, Hana, Hadil, compagnes de route, merci d'avoir égayé mon parcours universitaire par votre amitié, vos rires et votre soutien inconditionnel dans les moments tantôt joyeux, tantôt tumultueux.*

*À Monsieur Meziri Fayçal, pour son encadrement bienveillant et son précieux accompagnement.*

*Enfin, à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire, je dis merci du fond du cœur.*

*Asma*

2025



## Sommaire

Titre	Page
<b>Introduction</b>	1
<b>CHAPITRE I : Le génie génétique &amp; la thérapie génique</b>	4
Introduction	5
1. Le génie génétique	5
1.1. Définition	5
1.2. Historique	6
1.3. Rappels sur les gènes et l'ADN	6
1.4. Outils enzymatiques du génie génétique	19
1.5. La stratégie de clonages et ses vecteurs	20
1.6. Les applications du génie génétique	22
2. La thérapie génique	25
2.1. Définition	25
2.2. Historique	26
2.3. Les types de la thérapie génique	28
2.4. Voies de transfert de gène : stratégies in vivo / ex vivo	29
2.5. Les méthodes de la thérapie génique	31
2.6. Les vecteurs utilisés dans la thérapie génique	24
2.7. Questions éthiques	44
<b>CHAPITRE II : Le système CRISPR-Cas9</b>	47
Introduction	48
1. Définition	48
2. La découverte	49
2.1. Découverte de CRISPR et des gènes Cas	49
2.2. Découverte du SgRNA	51

3. Anatomie de base et mécanisme du système CRISPR-Cas chez les bactéries	52
4. Classification du système CRISPR	53
4.1. Les systèmes CRISPR/Cas de classe I	53
4.2. Les systèmes CRISPR/Cas de classe II	55
5. Relation Structure-Activité	57
5.1. Protéines cas9	57
5.2. Structure et fonction de l'ARNg (crRNA-tracrRNA)	59
5.3. Assemblage du complexe-effecteur CRISPR/cas9	60
5.4. Recherche et reconnaissance de la cible	60
5.5. Clivage de cible :	61
6. Deux mécanismes de réparation de l'ADN	63
7. Modification de la cas9	65
7.1. Ncas9 ou cas9 nickase	65
7.2. Dcas9 ou Dead cas9	66
8. Stratégie de formulation	66
9. Mécanisme de livraison	67
10. Les avantages de CRISPR/Cas9	68
<b>CHAPITRE III : Etude de cas d'application du système CRISPR/Cas9</b>	69
Introduction	70
1. Le cancer du poumon	70
1.1. La définition de la maladie	70
1.2. Patient traité	71
1.3. La méthode utilisée	71
1.4. Les résultats de la thérapie	72
2. La drépanocytose (DC)	72
2.1. Définition de la maladie	72

2.2. Patient traité	73
2.3. La méthode utilisée	73
2.4. Les résultats de la thérapie	74
3. La $\beta$ -thalassémie dépendante des transfusions (TDT)	76
3.1. Définition de la maladie	76
3.2. La méthode utilisée	77
3.3. Les résultats de la thérapie	78
4. Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)	79
4.1. Définition de la maladie	79
4.2. Patient traité	80
4.3. La méthode utilisée	80
4.4. Les résultats de la thérapie	80
5. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires	81
5.1. Définition de la maladie	81
5.2. La méthode utilisée	82
5.3. Les résultats de la thérapie	82
6. Discussion critique sur l'efficacité, les limites et les enjeux éthiques du système CRISPR/Cas9 en thérapie génique	83
<b>Conclusion</b>	85
<b>Références bibliographiques</b>	87

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Molécule d'ADN double brins	7
<b>Figure 2</b>	Les gènes procaryotes sont souvent groupés en opéron	9
<b>Figure 3</b>	Structure d'un gène eucaryote	9
<b>Figure 4</b>	Le complexe d'initiation eucaryote	12
<b>Figure 5</b>	Maturation d'un ARNm	14
<b>Figure 6</b>	Représentation du code génétique	15
<b>Figure 7</b>	Évolution et développement de la thérapie génique	28
<b>Figure 8</b>	Les deux voies de la thérapie génique	31
<b>Figure 9</b>	Mode de pénétration de l'adénovirus	36
<b>Figure 10</b>	Schématisation de la structure des virus adénoassociés	37
<b>Figure 11</b>	Barrières intracellulaires des vecteurs non viraux	40
<b>Figure 12</b>	Les polymères cationiques et lipides cationiques : vecteurs synthétique de thérapie génique	41
<b>Figure 13</b>	Structure d'un liposome	43
<b>Figure 14</b>	Structure d'une nanoparticule lipidique	44
<b>Figure 15</b>	La découverte du système CRISPR/cas	51
<b>Figure 16</b>	Architectures des loci génomiques pour les sous-types des systèmes CRISPR/Cas9	56
<b>Figure 17</b>	Gène codant spCas9	57

<b>Figure 18</b>	Structure globale de la Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> (SpyCas9) à l'état apo	58
<b>Figure 19</b>	Illustration des réarrangements de la Cas9 après contact avec le guide ARN.	60
<b>Figure 20</b>	Représentations schématiques des mécanismes pour la reconnaissance et la coupure de l'ADN cible médiées par le système CRISPR-Cas9	63
<b>Figure 21</b>	L'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9	64
<b>Figure 22</b>	Les différentes formes de Cas9 et leur vectorisation	68
<b>Figure 23</b>	Ciblage du site d'édition	78

## Liste des abréviations

AAV : Adeno-Associated Virus (Virus adéno-associé)

AdV : Adenovirus (Adénovirus)

ARV : Antirétroviral

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNpm : ARN pré-messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

BCL11A : B-cell lymphoma/leukemia 11A (Facteur de transcription)

CAR : Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (Récepteur viral)

Cas9 : CRISPR-associated protein 9

CCR5 - C-C chemokine receptor type 5 (Corécepteur du VIH)

CEP290 : Centrosomal protein 290 (Protéine centrosomale)

CMV : Cytomégalovirus

CPNPC : Carcinome pulmonaire non à petites cellules

CPPC : Carcinome pulmonaire à petites cellules

CPP : Cell-Penetrating Peptides (Peptides pénétrants)

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNA : CRISPR RNA (ARN CRISPR)

DCas9 : dead Cas9 (Cas9 inactive)

DC : Drépanocytose

DSBs : Double-Strand Breaks (Cassures double brin)

eIF : Eukaryotic Initiation Factor (Facteur d'initiation eucaryote)

EMA : European Medicines Agency (Agence européenne des médicaments)

FST : Full-Field Stimulus Testing (Test de stimulus lumineux en champ complet)

GFP : Green Fluorescent Protein (Protéine fluorescente verte)

GTFs : General Transcription Factors (Facteurs généraux de transcription)

GVHD : Graft-versus-Host Disease (Maladie du greffon contre l'hôte)

HBB : Gene de la  $\beta$ -globine

HbA : Hémoglobine adulte normale

HbF : Hémoglobine fœtale

HbS : Hémoglobine S

HDR : Homology-Directed Repair (Réparation dirigée par homologie)

HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Greffe de cellules souches hématopoïétiques)

ITR : Inverted Terminal Repeat (Séquences terminales inversées répétées)

LAL-T ; Leucémie aiguë lymphoblastique de type T

logMAR ; Logarithm of the Minimum Angle of Resolution (Mesure d'acuité visuelle)

LNP : Lipid Nanoparticles (Nanoparticules lipidiques)

LTR : Long Terminal Repeat (Séquences terminales longues répétées)

LV : Lentivirus

NEI VFQ-25 : National Eye Institute Visual Function Questionnaire

NHEJ : Non-Homologous End Joining (Jonction d'extrémités non homologues)

NMD : Nonsense-Mediated Decay (Dégradation des ARNm non-sens)

NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer (Carcinome pulmonaire non à petites cellules)

OAN : Oligonucléotide Antisens

PABP : Poly(A)-Binding Protein (Protéine de liaison à la queue poly-A)

PAM : Protospacer Adjacent Motif (Motif adjacent au protospacer)

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase

PD-1: Programmed cell death protein 1

PDCD1 : Gene encoding PD-1

PDMAEMA : Poly(2-diméthylaminoéthyl méthacrylate)

PEI : Polyéthylèneimine

PIC : Pre-Initiation Complex (Complexe de pré-initiation)

PLL : Poly-L-Lysine

RES : Réticulo-Endothélial System (Système réticulo-endothélial)

RNP: Ribonucleoprotein (Ribonucléoprotéine)

SCID: Severe Combined Immunodeficiency (Déficit immunitaire combiné sévère)

sgRNA : single-guide RNA (ARN guide unique)

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nucleases

TBP : TATA-Binding Protein (Protéine de liaison à la boîte TATA)

TDT :  $\beta$ -thalassémie dépendante des transfusions

TEP scan : Tomographie par émission de positrons

tracrRNA : trans-activating CRISPR RNA (ARN trans-activateur CRISPR)

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

ZFN : Zinc Finger Nucleases (Nucléases à doigts de zinc)

# Introduction

## Introduction

Ces dernières années, les avancées technologiques en thérapie génique ont considérablement progressé. Les méthodes de modification ou de réparation du génome sont désormais nombreuses, qu'elles soient en phase d'essai clinique, pré-clinique ou déjà appliquées en médecine. Plus récemment, le développement de l'outil CRISPR/Cas9, des ciseaux moléculaires, a ouvert la voie vers de nouvelles possibilités de réparation des cellules pour soigner les maladies génétiques, dont certains cancers (Eva, 2023).

Le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated Protein 9, ou en français courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées associées à la protéine 9) constitue l'outil le plus innovant dans la panoplie du généticien (Hartenian et Doench, 2015). Initialement trouvé dans de nombreux organismes archéens et bactériens où il fait partie de leur réponse immunitaire mettant en œuvre un mécanisme de résistance acquise aux infections virales (Pourcel, 2017), ce système permet désormais aux chercheurs d'éditer l'ADN avec une précision, une rapidité et une facilité inégalées, révolutionnant ainsi les approches de recherche. De plus, il offre une méthode puissante pour réaliser des criblages génomiques à grande échelle, facilitant la découverte des fonctions des gènes (Hartenian et Doench, 2015).

Le système CRISPR/Cas9 comporte deux composants essentiels. Le premier est constitué par les loci CRISPR, qui comprennent des séquences répétées non contiguës, séparées par de courts segments d'ADN appelés "espaceurs". Le deuxième composant est représenté par les gènes codant la nucléase Cas9, généralement situés à proximité des loci CRISPR (Roublin, 2017).

Ainsi, l'outil CRISPR/Cas9 ne constitue plus uniquement une avancée technique en biologie moléculaire, mais incarne une véritable révolution thérapeutique. Grâce à sa capacité à modifier précisément des séquences d'ADN, il ouvre désormais des perspectives cliniques prometteuses pour de nombreuses maladies génétiques et acquises. Dans le cancer, notamment les hémopathies malignes et certains cancers solides, CRISPR/Cas9 permet de reprogrammer des lymphocytes T en cellules CAR-T, ce qui améliore leur persistance, réduit leur épuisement et augmente leur

## Introduction

pouvoir cytotoxique contre les cellules tumorales (Tao et al., 2023). Ces modifications renforcent à la fois la spécificité et la durabilité de la réponse immunitaire antitumorale, tout en minimisant les effets indésirables associés aux approches conventionnelles d'immunothérapie (Tao et al., 2024).

Dans les hémoglobinopathies monogéniques, telles que la drépanocytose et la  $\beta$ -thalassémie, l'édition via CRISPR/Cas9 a induit une réactivation stable de l'hémoglobine fœtale (HbF), menant à l'indépendance transfusionnelle et à la suppression des crises vaso-occlusives, sans effets hors-cibles détectés. Plusieurs études précliniques et cliniques confirment l'efficacité et la sécurité de cette approche, consolidant la place de CRISPR/Cas9 dans le traitement des maladies de l'hémoglobine (Frangoul et al., 2021).

Concernant le VIH, l'édition ex vivo des cellules souches hématopoïétiques a prouvé son efficacité : CRISPR/Cas9 a généré une résistance substantielle à l'infection virale, tout en maintenant une intégration cellulaire satisfaisante dans les modèles humains, ouvrant la voie à une immunorésistance potentiellement durable (Dudek et al., 2024).

CRISPR-Cas9 s'impose comme une technologie de rupture en thérapie génique, offrant des possibilités inédites de modifications génomiques précises (Doudna, 2020).

L'objectif de ce travail est de présenter cette technique en détaillant les différents essais, leurs effets prometteurs et leurs effets secondaires.



**CHAPITRE I.**  
**Le génie génétique &  
la thérapie génique**

**Introduction :**

Le génie génétique repose sur l'exploration de l'ADN et de ses éléments par James Watson et Francis Crick. Cette technologie basée sur une série de réorganisations ou de corrections : c'est-à-dire l'élimination des gènes et leur fusion avec d'autres gènes d'origine différente, puis leur introduction dans des cellules puis dans un organisme vivant, qu'il s'agisse d'une plante ou d'un animal (khattat, 2021).

Depuis son apparition, le génie génétique a représenté une véritable révolution dans le domaine de la médecine, car il entraîne une transformation industrielle de la composition génétique d'un organisme. Avant qu'elle ne soit utilisée en médecine et dans la lutte contre les maladies, la modification génétique était utilisée dans l'agriculture pour doubler les cultures et améliorer leur rendement. Il s'agissait d'une méthode performante qui a été utilisée par la suite dans de multiples fins et usages, tels que l'amélioration des caractéristiques animales, la gestion des maladies et les expériences scientifiques (Hamel, 2024).

**1. Le génie génétique :****1.1. Définition :**

Le génie génétique est une technique, un remodelage, un art, une manipulation, ou une méthode de lier entre deux parties ou plus d'ADN d'origines différentes et l'injecter dans une cellule receveuse d'un être vivant (plante , bactérie..) pour obtenir une ou plusieurs caractères souhaitables ou fabriquer des protéines (khattat, 2021), «Le génie génétique c'est-à-dire l'art des constructions génétiques, le terme de méthodologie des recombinants d'ADN est plus précis et probablement mieux approprié: il s'agit de l'ensemble des techniques utilisant la recombinaison de fragment d'ADN, c'est-à-dire la liaison entre eux de fragments d'origines différentes» selon (Bachrach *et al.*, 1983).

Le génie génétique repose principalement sur le clonage moléculaire., permettant la recombinaison d'un fragment double brin d'ADN avec un vecteur que l'on introduit dans un hôte adapté. Le clonage est une technique de manipulation génétique qui consiste à extraire des fragments d'ADN de leur organisme d'origine et à les propager

dans un organisme-hôte qui peut être le même que l'organisme d'origine ou un organisme différent. Néanmoins, le génie génétique offre également la possibilité de modifier des gènes en utilisant une mutagenèse dirigée, ce qui entraîne la production de protéines modifiées ou recombinantes (Mebarki, 2021).

## **1.2. Historique :**

La révolution scientifique du génie génétique remonte à notre époque moderne, avec la découverte de l'ADN en 1953 par les scientifiques James Watson et Francis Crick (Raimbault, 2021). Le terme « génie génétique » a été introduit au milieu des années 1970 à la suite de la découverte de moyens artificiels permettant le transfert de gènes (facteurs génétiques, segments d'ADN) entre des espèces très proches. En 1973, on a réussi à synthétiser le premier organisme vivant génétiquement modifié, la "bactérie". Après cela, les expériences d'ADN et les modifications ont commencé à se répandre et à se manifester plus loin (Hamel, 2024). La première souris génétiquement modifiée a été une souris, inventée en 1974 par Rudolf Jaenisch. La technologie a été mise sur le marché en 1976, avec l'apparition des bactéries génétiquement modifiées qui ont produit la somatostatine, puis l'insuline en 1978. La première plante génétiquement modifiée a été créée en 1983 avec l'ajout d'un gène résistant aux antibiotiques dans le tabac. En réalité, depuis la fin des années 1990, une nouvelle génération de technologies tire parti de connaissances et de technologies plus récentes, telles que les nucléases programmables (ZNFs, TALENs et CRISPR). Elles offrent la possibilité d'agir sur une région précise de l'ADN pour augmenter la précision de la correction ou de l'insertion effectuée, prévenir les toxicités cellulaires et garantir une reproductibilité fiable de l'intervention (Mebarki, 2021).

## **1.3. Rappels sur les gènes et l'ADN :**

### **1.3.1. L'ADN (Abréviation d'acide DésoxyriboNucléique) :**

La molécule d'ADN est la plus volumineuse au sein de l'organisme, sa masse moléculaire allant de  $3,3 \times 10^9$  chez l'homme à  $10^5$  chez les bactéries. C'est une double hélice composée de deux monomères qui s'enroulent l'un autour de l'autre

Cette molécule est constituée d'une série répétitive de nucléotides, chaque nucléotide étant composé, dans cet ordre précis, d'une base purique ou pyrimidique, d'un sucre appelé Désoxyribose et d'un acide phosphorique. L'ordre sucre-acide phosphorique est la séquence immuable de l'ADN. Les nucléotides ne se différencient les uns des autres que par la base qu'ils contiennent. L'ADN contient quatre types de bases : l'adénine (A) et la guanine (G), qui sont des purines, ainsi que la cytosine (C) et la thymine (T), qui appartiennent aux pyrimidines. La Thymine est la seule base spécifique de l'ADN, elle ne se retrouve pas dans l'Acide RiboNucléique, ARN, où elle est remplacée par l'Uridine, U (Swynghedauw et Slivester, 2008).

Les deux chaînes de nucléotides sont reliées entre elles par des liaisons hydrogène pour créer un hybride en forme de double hélice (modèle de J.D. Watson et F.H.C. Crick, 1953). Cette structure présente les caractéristiques suivantes :

- Anti-parallélisme : une chaîne s'étend de gauche à droite tandis que l'autre va de droite à gauche (Housset et Raisonnier, 2009).
- Complémentarité : chaque adénine (A) d'une chaîne est liée par deux liaisons hydrogène à la thymine (T) de l'autre, et chaque guanine (G) d'une chaîne se lie à trois liaisons hydrogène avec la cytosine (C) de l'autre (Housset et Raisonnier, 2009).

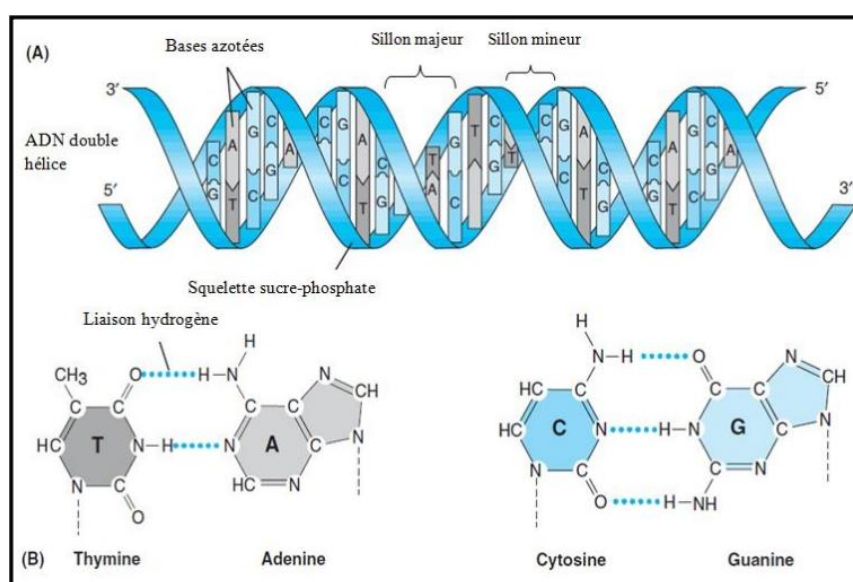


Figure 1. Molécule d'ADN double brins (Buckingham et Flaws, 2007).

(A) représente la double hélice. (B) représente les liaisons hydrogènes qui se forment entre les bases azotés (deux liaisons entre C et G, trois liaisons entre T et A).

### 1.3.2. Les Gènes :

Un être vivant est donc caractérisé par la nature des protéines qui le constituent, c'est-à-dire la séquence en acides aminés de toutes ses protéines. C'est cette information qui est transmise de génération en génération par ses gènes (Maryline *et al.*, 2011).

Un gène est une partie de chromosome, ou plus exactement une partie de l'ADN qui le constitue, une partie qui porte une instruction déterminant un caractère physique de l'organisme vivant, végétal, animal ou humain. Exemple : chez l'humain, l'instruction concernant la couleur des yeux est inscrite à un emplacement précis du chromosome 15 (Alain Boudet, 2003).

Il s'agit de la composante physique et fonctionnelle de l'hérédité qui transmet les informations génétiques d'une génération à la suivante. Il s'agit d'une séquence d'ADN nécessaire à la formation d'un polypeptide ou d'une molécule d'ARN fonctionnel (ARNt ou ARNr).

#### 1.3.2.1. Les gènes des procaryotes :

Il s'agit de gènes qui, une fois traduits, produisent des ARNm continus qui seront traduits sans modification préalable. Chez les bactéries, on retrouve généralement des gènes codant pour des enzymes qui jouent un rôle commun sur le chromosome, ce qui forme une seule unité de transcription appelée "Opéron" (Figure 2). Grâce à ce type d'organisation, tous les gènes de l'opéron sont exprimés de manière coordonnée grâce à leur transcription dans un ARNm appelé polycistronique. Il s'agit d'un ARNm qui code pour plusieurs protéines. Les ARNm des bactéries ne sont pas modifiés et seront traduits directement.

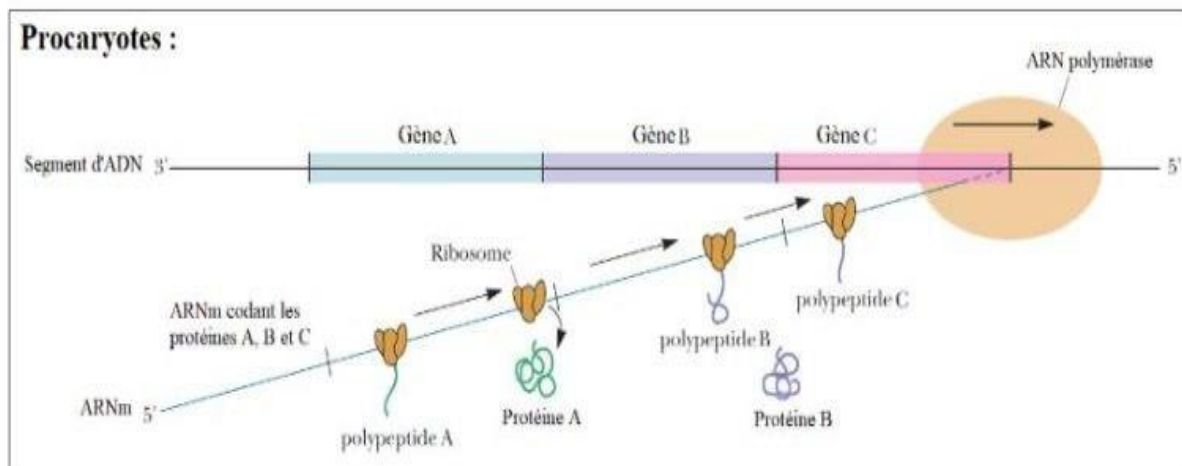


Figure 2. Les gènes procaryotes sont souvent groupés en opéron (Boudiaf, 2022).

### 1.3.2.2. Les gènes des eucaryotes:

Chez les eucaryotes, les gènes sont "discontinus", en effet, chaque gène comprend:

- des exons: qui contiennent de l'information génétique qui sera exprimée .
- des introns (ou séquences intercalaires): s'intercalent au milieu des régions codantes, ils sont transcrits mais non traduits (Figure 3).

Une molécule d'ARNm est produite par la transcription du gène eucaryotique, qui sera ensuite modifiée après la transcription pour éliminer les régions non codantes. Le résultat est une molécule d'ARNm mature qui ne contient que des régions codantes. ARNm mature qui ne contient que des régions codantes (Boudiaf, 2022).

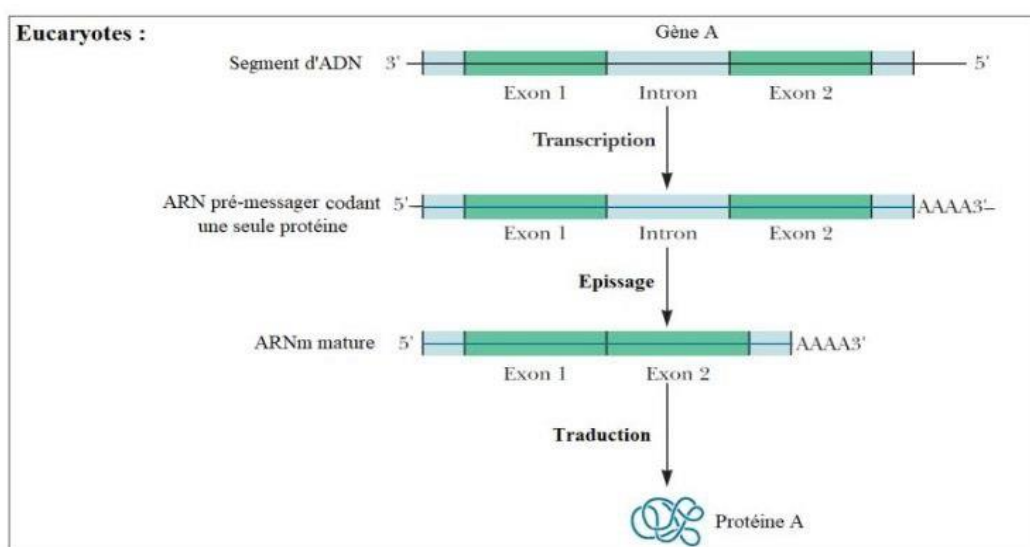


Figure 3. Structure d'un gène eucaryote (Boudiaf, 2022).

### 1.3.3. Le génome :

Un génome est généralement le matériel génétique d'un organisme ou l'ensemble des molécules d'ADN d'une cellule (génome nucléaire et génome d'organites, incluant les mitochondries et les chloroplastes d'une espèce particulière) (Bousmat, 2022). Ils se manifestent sous la forme de chromosomes dans le noyau cellulaire. Il y a 46 chromosomes dans chaque cellule humaine, soit 23 paires de chromosomes, dont un chromosome est hérité de la mère et l'autre du père. Les gamètes, qui sont les cellules reproductives, ne sont constitués que de 23 chromosomes (une version de chaque paire) (Eva, 2023).

### 1.3.4. Régulation de l'expression des gènes :

Tous les êtres vivants, qu'ils soient simples ou complexes, ont besoin de réguler l'expression de leurs gènes pour produire les protéines nécessaires à leurs diverses fonctions biologiques. Cette régulation peut s'opérer à différentes étapes : la transcription, la maturation de l'ARN, le transport des ARNs, la dégradation de l'ARN et la traduction... (Haidara, 2021). L'expression d'un gène dans une cellule résulte donc de la régulation coordonnée de chacune de ces étapes (Pallier, 2001).

#### 1.3.4.1. La transcription :

La première étape que la cellule entreprend pour fabriquer une protéine est de copier, ou transcrire, la séquence de nucléotides dans un brin du gène en une molécule à simple brin complémentaire appelée acide ribonucléique (RNA). Comme l'ADN, l'ARN est composé de nucléotides, mais ces nucléotides contiennent le sucre ribose au lieu de désoxyribose. De plus, à la place de la thymine, l'ARN contient de l'uracile (U), qui, comme la thymine, s'apparie avec l'adénine. D'où les bases de l'ARN sont A, G, C et U (Griffiths *et al.*, 2001).

La régulation de la transcription est plus complexe chez les eucaryotes que chez les procaryotes, ceci est dû en particulier à la compartimentalisation qui existe chez les eucaryotes, l'élément régulateur majeur est constitué par des protéines, les facteurs de transcription lesquels sont synthétisés dans le cytoplasme, ils doivent pénétrer dans

le noyau pour agir. Par ailleurs l'ADN des eucaryotes est beaucoup plus condensé en hétérochromatine que ne l'est celui des procaryotes. Cette condensation gêne l'accès des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase et empêche la transcription. Sa levée participe donc indirectement à la régulation de la transcription (swynghedauw et Slivester, 2008).

#### **1.3.4.1.1. Régulation au niveau de l'ARN polymérase :**

Dans les cellules, la régulation se produit principalement au niveau transcriptionnel, effectuée par les ARN polymérases (ARNpol), qui catalysent la synthèse de molécules d'ARN à partir d'une matrice d'ADN.

Les procaryotes possèdent une unique ARN polymérase capable de synthétiser différentes classes d'ARN, tandis que les eucaryotes ont trois types de polymérases nucléaires pour générer divers types d'ARN. Ces trois ARNpol sont : ARNpol I, ARNpol II et ARNpol III (Goodfellow et Zomerdijk, 2013).

— La polymérase RNA I qui produit les RNA cytoplasmiques : RNA ribosomiques (18 S, 5,8 S, 28 S).

— L'ARN polymérase II est responsable de la synthèse des ARN messagers qui renferment les données nécessaires à la traduction et une partie des snARN.

— La polymérase III de l'ARN qui produit les petits ARN (ARNt, ARNr 5 S, snRNA, 7SL-ARN) (Housset et Raisonier, 2009).

#### **1.3.4.1.2. Mécanismes de la transcription chez les eucaryotes :**

Chez les eucaryotes, le processus de transcription s'effectue selon les mêmes principes que chez les procaryotes et se divise également en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Nous allons examiner le cas de la transcription effectuée par l'ARN polymérase II (Bruno *et al.*, 2022).

##### **a) Initiation : formation du pré-complexe d'initiation :**

L'étape initiale de la transcription chez les eucaryotes, appelée initiation, est marquée par la reconnaissance du promoteur d'un gène par l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et un ensemble de facteurs de transcription généraux (GTFs) (Alberts *et al.*, 2015).

Le promoteur contient souvent une séquence consensus, la boîte TATA, située environ 25 à 30 paires de bases en amont du site de démarrage de la transcription (Lodish *et al.*, 2016). La protéine de liaison à la boîte TATA (TBP), une sous-unité du facteur TFIID, se lie à cette séquence, ce qui permet le recrutement d'autres facteurs de transcription (TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIE et TFIIH) et de l'ARN Pol II pour former le complexe de pré-initiation (PIC) (Roeder, 1996). Ce complexe facilite l'ouverture locale de l'ADN, créant une bulle de transcription, et positionne l'ARN Pol II pour commencer la synthèse de l'ARN (Sainsbury *et al.*, 2015). Cependant, avant d'entrer dans la phase d'élongation, l'ARN Pol II peut subir plusieurs cycles d'initiation abortive, produisant de courts transcrits qui sont libérés jusqu'à ce qu'un transcrit stable soit formé (Kuehner *et al.*, 2011).

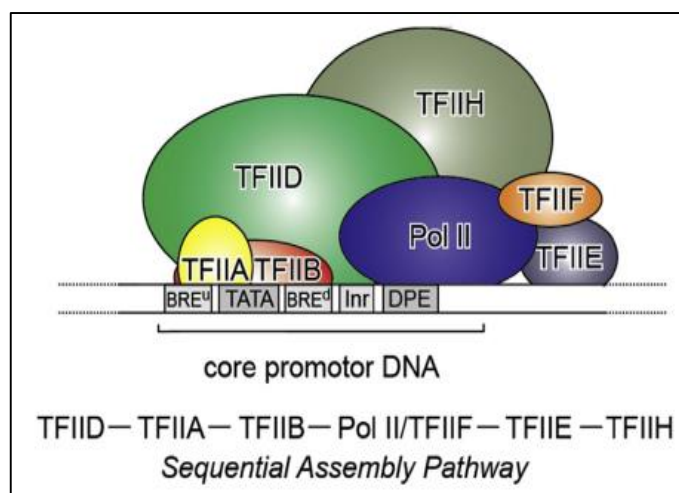


Figure 4. Le complexe d'initiation eucaryote (Kapil *et al.*, 2016).

### b) Élongation :

L'élongation de la transcription chez les eucaryotes implique la synthèse de l'ARNm par l'ARN Pol II, qui se déplace le long de l'ADN en formant une bulle de transcription (Alberts *et al.*, 2015). Des facteurs comme DSIF et NELF régulent sa progression et induisent des pauses (Jonkers *et al.*, 2015). La chromatine, remodelée par des facteurs comme FACT et des modifications d'histones, facilite la transcription (Saunders *et al.*, 2006). Les pauses permettent la coordination avec la maturation de l'ARN (Core *et al.*, 2008). Après la terminaison, l'ARN Pol II est

recyclé via des facteurs comme CPSF et CstF (Proudfoot *et al.*, 2002). L'élongation est un processus dynamique et régulé.

### c) Terminaison :

Chez les eucaryotes, l'extrémité de l'ARNm mature ne correspond pas directement au transcrit primaire. Pendant l'élongation, le transcrit est clivé au niveau d'un site spécifique (souvent AAUAAA), puis une queue poly-A 3' de 100 à 200 adénines est ajoutée par la poly-A polymérase. Une exonucléase dégrade ensuite l'ARN excédentaire, libérant le complexe de transcription. La queue poly-A stabilise l'ARNm en le protégeant de la dégradation. Pour les transcrits non polyadénylés, la terminaison utilise un mécanisme différent (Raven *et al.*, 2017).

#### 1.3.4.2. Maturation des ARN pré-messager :

Le transcrit primaire est une duplication complète des exons et des introns d'un gène. La forme finale est désignée par l'ARNm mature, obtenu suite aux modifications suivantes :

- Addition de la coiffe à l'extrémité 5' :

La première base du transcrit est généralement une Adénine (A) ou une Guanine (G). Cette base est ensuite modifiée par l'ajout d'une molécule de GTP au groupement phosphate en position 5', formant ainsi la coiffe. Cette structure protège l'extrémité 5' de l'ARNm contre les enzymes de dégradation et joue également un rôle essentiel dans l'initiation de la traduction.

- Addition de la queue poly(A) à l'extrémité 3' :

La majorité des ARN messagers (ARNm) chez les eucaryotes possèdent une queue poly(A) à leur extrémité 3', composée de 100 à 200 résidus d'adénine. Cette queue est ajoutée après la transcription par une enzyme nommée poly(A) polymérase, qui utilise l'ATP comme substrat. La queue poly(A) est supposée jouer un rôle important dans le transport de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme, ainsi que dans la protection de l'ARNm contre la dégradation pendant le processus de traduction, contribuant ainsi à sa stabilité et à son efficacité fonctionnelle (Boudiaf, 2022).

- Epissage :

L'épissage est un mécanisme biologique essentiel chez les eucaryotes, permettant la maturation des ARN messagers (ARNm) par l'élimination des introns (régions non codantes) et la conservation des exons (régions codantes). Ce processus est principalement catalysé par le splicéosome, un complexe ribonucléoprotéique composé de snRNP (U1, U2, U4, U5, U6) qui reconnaît les jonctions intron-exon (Black, 2003). L'épissage alternatif, quant à lui, permet à un même gène de produire plusieurs ARNm matures, augmentant ainsi la diversité protéique. Par exemple, le gène DSCAM chez la drosophile peut générer jusqu'à 38 016 variants d'ARNm (Schmucker *et al.*, 2000). Des anomalies dans ce processus peuvent entraîner des maladies génétiques, comme la neurofibromatose de type 1 (Cichowski et Jacks, 2001). L'épissage alternatif est également une cible thérapeutique prometteuse, avec des molécules chimiques développées pour moduler ce mécanisme dans le traitement de certaines pathologies (Hua *et al.*, 2008).

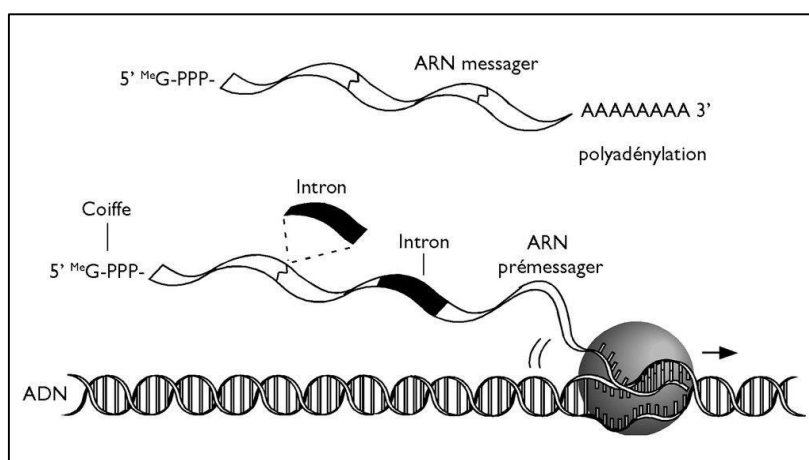


Figure 5. Maturation d'un ARNm (Joëlle et Martin, 2007).

### 1.3.4.3. La traduction :

La traduction est le processus par lequel les informations génétiques codées dans l'ADN sont utilisées pour synthétiser les protéines, essentielles à la plupart des fonctions cellulaires. Ce processus est hautement régulé et précis, garantissant l'incorporation des acides aminés corrects dans la chaîne polypeptidique en cours de

formation. La dysrégulation de la traduction peut entraîner diverses maladies, notamment des troubles neurodégénératifs et le cancer (Pestova et Hellen, 2018).

### 1.3.4.3.1. le code génétique :

Le code génétique permet de passer du langage nucléique composé de 4 signes représentés par les 4 bases de l'ARNm, au langage protéique composé de 20 signes représentés par les 20 acides aminés qui peuvent être impliqués dans la formation d'un polypeptide (Boudiaf ,2022).

1 <sup>re</sup> position (extrémité 5')	2 <sup>e</sup> position								3 <sup>e</sup> position (extrémité 3')
	U		C		A		G		
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

Figure 6. Représentation du code génétique

Les acides aminés sont représentés par les trois premières lettres de leurs noms, les bases des nucléotides par leurs initiales (Bruno *et al.*, 2022).

Le code est dégénéré, mais spécifique : Il est possible de remarquer certaines caractéristiques dans le tableau (la figure 4). D'abord, 61 des 64 codons envisageables sont utilisés pour déterminer les acides aminés. Trois codons, UAA, UGA et UAG, jouent un rôle supplémentaire, à savoir les codons stop. Le codon initiateur est la seule autre forme de "ponctuation" AUG, qui est un signal de "départ". Ce codon joue un double rôle en codant également un acide aminé, la méthionine (Met).

Il est possible de constater que les 61 codons sont amplement adéquats pour coder 20 acides aminés. Cela génère de nombreux codons supplémentaires. Il serait possible

de gérer cette abondance en utilisant seulement 20 des 61 codons, cependant, les cellules ne le font pas. En réalité, tous les 61 codons sont utilisés, et le code est dégénéré, ce qui signifie que certains acides aminés sont spécifiés par plusieurs codons. On n'a par contre jamais trouvé l'inverse, un même codon ne peut spécifier plusieurs acides aminés (Jules *et al.*, 2017).

#### 1.3.4.3.2. Mécanismes de la traduction chez les eucaryotes :

Avant la traduction, dans le cytoplasme, les 2 sous unités du ribosome sont dissociées et libres. Les ribosomes ont trois sites de liaisons :

\* Le site A (de l'Aminoacyl-ARNt) : Où viendra se placer l'ARNt porteur de l'acide aminé.

\* Le site P (site du Peptidyl-ARNt) : Où viendra se placer l'ARNt porteur de la chaîne polypeptidique en cours d'élongation.

\* Le site E (site de sortie ou Exit) : Où viendra se placer l'ARNt avant d'être libéré du ribosome (Boudiaf, 2022).

De même que la transcription, la traduction présente trois phases distinctes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Fransky, 2017).

##### a) L'initiation :

L'initiation de la traduction classique liée à la coiffe fait intervenir de nombreuses protéines qui sont principalement les facteurs eIF ainsi que la PABP (Fransky, 2017). La petite sous-unité 40S ne reconnaît pas une séquence interne, mais se fixe au contraire à l'extrémité 5' de l'ARNm. Ce mécanisme implique la coiffe qui est reconnue par le facteur eIF4F (Bruno *et al.*, 2022). Le complexe eIF4F est composé de trois facteurs d'initiation : eIF4E, eIF4A, eIF4G (Fransky, 2017). eIF4F reconnaît également la PAB qui est fixée à la queue poly(A) provoquant une circularisation de l'ARNm traduit. L'autre partie du complexe est formée par la petite sous-unité (40s) du ribosome. Celle-ci fixe le Met-ARNti (ARNt initiateur chargé), eIF2 et une molécule de GTP grâce aux trois autres facteurs d'initiation eIF1A, eIF1 et eIF3. Cet ensemble forme le complexe 43S (Bruno *et al.*, 2022). Le complexe eIF4F recrute le complexe de pré-initiation 43S pour former le complexe de pré-initiation 48S, Le

complexe d'initiation 48S commence le balayage (scanning) ARNm de 5' vers 3' jusqu'à la rencontre du codon initiateur AUG (Fransky, 2017). eIF5 catalyse l'hydrolyse du GTP entraînant la dissociation de ce complexe. La sous-unité 60S s'assemble alors pour former le ribosome 80S. Ainsi l'élongation peut commencer (Bruno *et al.*, 2022).

b) L'élongation :

Après l'initiation, le premier acide aminé alors en place, il va falloir maintenant, au cours de la phase appelée élongation, former une liaison peptidique. Pour chaque acide aminé à accrocher, c'est-à-dire pour chaque liaison à fabriquer, un même cycle à 3 étapes est à chaque fois décrit (Boudiaf, 2022).

1. Chargement de l'aminoacyl-ARNt sur le site A du ribosome:

L'aminoacyl-ARNt (portant l'acide aminé suivant) est transporté vers le site A du ribosome via le facteur d'élongation eEF1 $\alpha$  (eukaryotic Elongation Factor 1 alpha), qui hydrolyse le GTP pour assurer la fidélité de l'appariement codon-anticodon (Lodish, 2016).

2. Formation de la liaison peptidique :

La peptidyl transférase, qui contient la grosse sous-unité, catalyse la formation d'une liaison peptidique entre le groupement amine de l'acide aminé au site A et le groupement carboxyle de la chaîne en croissance. En parallèle, la liaison entre cette chaîne et l'ARNt est rompue au site P, qui est libre (il n'est plus chargé). Le résultat final est le passage de la chaîne en croissance à l'ARNt au site A (Jules *et al.*, 2017).

3. Translocation du ribosome :

Ce mécanisme est piloté par le facteur d'élongation (eEF2), une GTPase qui hydrolyse le GTP pour fournir l'énergie nécessaire au mouvement. Lors de cette étape, le ribosome avance d'un codon (3 nucléotides), transférant l'ARNt portant la chaîne polypeptidique naissante du site A (aminoacyl) au site P (peptidyl), tandis que l'ARNt déchargé (vide) est déplacé vers le site E(exit) avant d'être libéré (Spahn, 2004). Ce cycle d'élongation se poursuit par l'addition de nouveaux acides aminés.

Le ribosome descend le long de l'ARNm dans le sens 5-3' en lisant les codons successifs. Les ARNt traversent le ribosome dans le sens Oppose, du site A au site P et finalement, au site E, avant leur éjection sous la forme d'ARNt libres, susceptibles d'être chargés d'un autre acide aminé et de servir à nouveau. (Jules *et al.*, 2017)

c) La terminaison :

La terminaison de la traduction a lieu lorsque la fin de la séquence de codage est atteinte par le ribosome et un codon d'arrêt (UAA, UGA, ou UAG) entre dans le site A (Thomas et Rachel, 2012). Il n'existe aucun ARNt qui viendra dans le site A. il se produira alors une coupure de la liaison entre le dernier ARNt et la chaîne peptidique, la liaison qui unissait ce dernier ARNt au dernier acide aminé est hydrolysée libérant ainsi la chaîne peptidique. C'est la peptidyl transférase qui fera cette dernière coupure. Le ribosome se redissocie en 2 sous unités qui pourront recommencer de nouvelles traductions d'autres ARNm (Boudiaf ,2022).

La structure des gènes eucaryotes, avec leurs séquences codantes interrompues, complique le processus de l'expression génique et la nature de l'information génétique. Cela implique la nécessité d'une maturation entre la transcription et la traduction, et donc, un même gène peut être à l'origine de plusieurs messages. Chez les eucaryotes, la transcription s'effectue en outre dans le noyau, tandis que la traduction se déroule dans le cytoplasme. ce qui nécessite le transfert de l'ARNm vers le cytoplasme par les pores avant la traduction (Jules et al, 2017).

#### **1.3.4.3.3. Le repliement des protéines :**

Une fois synthétisée, la chaîne polypeptidique doit se replier pour donner naissance à la protéine fonctionnelle. En effet, ce qui détermine principalement le rôle d'une protéine, ce n'est pas tant sa composition précise (c'est-à-dire la séquence de ses acides aminés), mais plutôt sa structure tridimensionnelle. Cette forme spécifique est essentielle, car elle conditionne la fonction de la protéine. Par exemple, la structure en Y des anticorps leur permet de se lier aux agents pathogènes, déclenchant ainsi une réponse immunitaire. Par ailleurs, certaines maladies résultent d'un mauvais

repliement des protéines, qui adoptent alors une conformation incorrecte (Louapre, 2021).

#### **1.4. Outils enzymatique du génie génétique :**

Les enzymes jouent un rôle essentiel dans le génie génétique en agissant comme des catalyseurs biologiques. Elles accélèrent les réactions chimiques, qui, sans leur intervention, seraient trop lentes pour assurer le bon fonctionnement des cellules. Ces molécules remplissent leur fonction en interagissant directement avec les substrats, facilitant ainsi la formation ou la rupture de liaisons chimiques (Fatima, 2018).

##### **1.4.1. Les enzymes de restriction (Endonucléases) :**

Les enzymes de restriction sont des endonucléases capables de reconnaître et de couper des séquences spécifiques d'ADN. Leur utilisation permet d'obtenir des fragments d'ADN dont les extrémités sont bien définies, certains pouvant contenir des gènes. Ces enzymes sont produites par les bactéries pour se protéger contre les infections par des bactériophages (Creveaux *et al.*, 2013).

La plupart des sites de restriction correspondent à des séquences palindromiques de 4 à 8 paires de bases. Si le site de coupure se trouve sur l'axe de symétrie de la séquence, les extrémités générées sont dites "franches". En revanche, si le site de coupure n'est pas situé sur cet axe, les extrémités sont dites "cohésives". Il existe trois types d'enzymes de restriction isolées à partir de bactéries :

- 1- Type I : Dont l'action nécessite la présence de  $Mg^{++}$ , d'ATP comme cofacteur, et de S- adénosyle-méthionine. Leur site de coupure est éloigné de leur site de reconnaissance (jusqu'à plusieurs milliers de nucléotides, plus loin dans certain cas).
- 2- Type II : Pratiquement les seules utilisées en génie génétique, reconnaissent l'ADN à des sites particuliers et coupent dans ces sites ou à proximité immédiate d'eux. Ce sont des nucléases qui coupent à l'intérieur, donc ce sont des endonucléases (Type II restriction endonucléases).

- 3- Type III : Ressemblent à celles du type I pour la séparation des sites de reconnaissance et de coupure, mais qui s'apparentent à celles du type II par leur mode d'action.

#### **1.4.2. Méthylation des sites de restriction et inactivation des enzymes de restriction :**

L'ADN bactérien contient des sites de restriction qui pourraient être reconnus et coupés par les enzymes de restriction produites par la bactérie elle-même. Pour éviter une autodestruction, des enzymes de modification, appelées méthylases bactériennes (ou enzymes de méthylation), entrent en jeu. Ces enzymes méthylent la cytosine (au niveau du carbone 5) ou l'adénine (au niveau de l'azote 6) situées dans les sites de restriction, ce qui empêche l'action des enzymes de restriction correspondantes. La méthylation peut concerner une seule base ou plusieurs bases au sein du site de restriction. Les méthylases bactériennes sont hautement spécifiques dans leur action (Brek *et al.*, 2005).

#### **1.4.3. Les enzymes de modification :**

Les enzymes de modification sont extraites et purifiées de virus, bactéries ou cellules eucaryotes qui les utilisent. Par exemple, les ligases permettent de lier ensemble deux acides nucléiques, elles sont à la base de clonage puisqu'elles permettent de lier les fragments en créant une molécule recombinées (T4 DNA ligase); les kinases permettent de changer ou d'ajouter un groupe phosphate a un nucléotide terminal 5' d'un acide nucléique mono ou double brin (T4 polynucléotide kinase); Les phosphatases, comme la phosphatase alcaline, ont pour rôle d'éliminer les groupements phosphate. Quant aux polymérase, elles permettent la synthèse d'acides nucléiques à partir d'une matrice d'ADN ou d'ARN, en se déplaçant dans le sens 5' vers 3' (Creveaux *et al.*, 2013).

#### **1.5. La stratégie de clonages et ses vecteurs :**

Le clonage moléculaire est une des bases du génie génétique, le principe du clonage moléculaire consiste à copier et à amplifier un fragment d'ADN (contenant un ou plusieurs gènes) à l'aide d'un vecteur. Les vecteurs employés peuvent être des virus,

des chromosomes artificiels et, plus fréquemment utilisés, des plasmides bactériens. Les plasmides sont des vésicules au moyen desquels les bactéries, qui ne se reproduisent pas par voie sexuée, échangent leur ADN. Y insérer un fragment d'ADN d'intérêt pour la recherche et en obtenir des grandes quantités identiques rend possible l'expérimentation scientifique. Développée dans les années 1970, cette méthode de clonage est à la base des technologies de l'ADN recombinant. Elle a permis, entre autres, la fabrication des hormones, telle l'insuline, pour traiter le diabète ou l'érythropoïétine, pour traiter les anémies associées à plusieurs maladies (Dumitru,2007).

Le procédé de clonage de gènes s'appuie sur quatre étapes biochimiques et biologiques distinctes :

1. Isolement d'une séquence d'ADN : Un fragment d'ADN est découpé à l'aide d'enzymes de restriction, puis fusionné à un autre ADN d'origine différente.
2. Transfert du fragment d'ADN : Le fragment sélectionné est inséré dans un vecteur, capable de se répliquer tout en reproduisant le segment d'ADN étranger qui lui est associé.
3. Incorporation dans une cellule hôte : Le vecteur recombinant est introduit dans une cellule fonctionnelle, souvent bactérienne, pour permettre sa répllication.
4. Sélection et amplification : Parmi une population de cellules réceptrices, un clone contenant le fragment d'ADN souhaité est identifié et amplifié pour obtenir des quantités suffisantes.

Aujourd'hui, le clonage de gènes est largement utilisé dans de nombreux laboratoires, et ses applications ne cessent de s'étendre (Monteny, 1987).

#### **1.5.1. Les vecteurs du clonage :**

Un vecteur est une séquence d'ADN permettant la propagation, la sélection, la modification d'une séquence d'ADN d'intérêt. En bref, l'étude et la manipulation d'une séquence d'ADN isolée (Fatima, 2018).

### **1.5.1.1. Les plasmides :**

Les plasmides sont des petits éléments génétiques circulaires, extra chromosomiques, double brin. Les plasmides sont de bons vecteurs de clonage chez les bactéries parce qu'ils se multiplient en nombre de copies important et qu'ils sont aisément purifiables. Les marqueurs de sélection (Ex. gènes de résistance aux antibiotiques) permettent l'identification des bactéries recombinantes (transformées) qu'ils les portent (Maftah *et al.*, 2007).

### **1.5.1.2. Les bactériophages :**

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

### **1.5.1.3. Les cosmides :**

Les cosmides sont des vecteurs artificiels constitués d'un plasmide classique auquel ont été ajoutées les séquences cos du phage  $\lambda$ . Ces vecteurs sont des molécules d'ADN circulaires hybrides. Ils rassemblent à la fois les propriétés intéressantes des plasmides comme :

- L'origine de répllication.
- Gène de résistance à un antibiotique et celles du bactériophage.
- Encapsidation in vitro de grand fragment d'ADN (Maftah *et al.*, 2007).

## **1.6. Les applications du génie génétique :**

Le génie génétique sont aujourd'hui considérés comme des techniques transversales comportant un spectre extrêmement large d'applications variées recouvrant les disciplines des sciences naturelles les plus diverses (VSU,2005).

### **1.6.1. Les applications dans domaine médical :**

Le génie génétique a révolutionné la médecine en offrant des outils innovants pour prévenir, diagnostiquer et traiter des maladies. Parmi ses applications les plus marquantes, la thérapie génique permet de corriger des mutations génétiques responsables de maladies héréditaires comme la mucoviscidose ou la drépanocytose (David *et al.*, 2019). Ces traitements, bien que prometteurs, restent coûteux et peu accessibles dans les régions défavorisées, ce qui soulève des questions d'équité (Kenneth *et al.*, 2022).

La production de médicaments a également été transformée. Par exemple, l'insuline humaine, essentielle pour les diabétiques, est désormais produite par des bactéries génétiquement modifiées, ce qui a réduit les coûts et amélioré la qualité du traitement (Irl *et al.*, 2020). De même, les vaccins à ARN messager, comme ceux développés contre la COVID-19, ont marqué une avancée majeure en matière de prévention des maladies infectieuses (Hannah *et al.*, 2022).

Le génie génétique améliore aussi le diagnostic précoce des maladies. Des tests génétiques permettent désormais d'identifier des mutations associées à des risques élevés de cancer, comme celles des gènes BRCA1 et BRCA2, liés au cancer du sein et des ovaires (NHS England, 2015). Ces tests aident les patients à prendre des décisions éclairées sur leur santé. Enfin, le génie génétique ouvre la voie à la médecine personnalisée, où les traitements sont adaptés au profil génétique unique de chaque patient. Par exemple, certains médicaments anticancéreux sont prescrits en fonction des mutations spécifiques d'une tumeur, augmentant ainsi l'efficacité du traitement (Arun, 2024).

### **1.6.2. Les applications dans domaine agriculture :**

Le génie génétique a révolutionné l'agriculture en développant des cultures résistantes aux maladies, tolérantes aux conditions extrêmes et enrichies en nutriments (Qaim, 2013). Par exemple, le riz doré enrichi en vitamine A et le maïs Bt résistant aux insectes ont amélioré la sécurité alimentaire et réduit l'usage de pesticides (Tabashnik et Carrière, 2015). Cependant, ces innovations sont souvent inaccessibles aux petits agriculteurs des pays en développement en raison de leur coût

élevé et des brevets détenus par des multinationales (Flores, 2019). Les cultures génétiquement modifiées pour résister à la sécheresse ou à la salinité, comme le riz tolérant à la sécheresse, pourraient aider les régions vulnérables face au changement climatique. Pourtant, leur adoption est limitée par le manque d'infrastructures et de ressources financières (FAO, 2015).

### **1.6.3. Les applications dans domaine industrielles :**

Le génie génétique trouve des applications majeures dans le domaine industriel, notamment à travers la production de protéines recombinantes, d'enzymes et de biocarburants. Par exemple, l'insuline humaine, produite par des bactéries génétiquement modifiées, a transformé le traitement du diabète (Smith *et al.*, 2003). Les enzymes issues de la biotechnologie, comme celles utilisées dans la fabrication de fromage ou de détergents, permettent des procédés industriels plus efficaces et respectueux de l'environnement (Johnson, 2010). De plus, les micro-organismes modifiés jouent un rôle clé dans la production de biocarburants, offrant une alternative durable aux énergies fossiles (Brown *et al.*, 2015). Cependant, ces avancées soulèvent des préoccupations éthiques et environnementales, notamment en ce qui concerne les risques de dissémination des organismes génétiquement modifiés (OGM) et leurs impacts potentiels sur les écosystèmes (Garcia, 2018). Ainsi, bien que prometteur, le génie génétique industriel nécessite une régulation rigoureuse pour concilier innovation et sécurité, tout en tenant compte des enjeux de marginalisation liés à l'accès inégal à ces technologies dans les pays en développement (UNESCO, 2021).

### **1.6.4. Autres domaines d'applications :**

Le génie génétique trouve des applications variées en dehors de la médecine, de l'agriculture et de l'industrie, notamment dans la protection de l'environnement, la production de matériaux innovants et la conservation des espèces. Par exemple, des microorganismes génétiquement modifiés sont utilisés pour dégrader des polluants comme les hydrocarbures ou les métaux lourds, contribuant ainsi à la bioremédiation des sols et des eaux contaminés (Singh, 2011). Dans le domaine de la biologie de

synthèse, des organismes sont conçus pour produire des matériaux durables tels que des bioplastiques ou des fibres synthétiques (Keasling, 2010). Enfin, des outils comme CRISPR-Cas9 sont explorés pour renforcer la résistance des espèces menacées aux maladies ou aux changements climatiques, aidant à préserver la biodiversité (Piaggio, 2017). Ces applications illustrent le potentiel du génie génétique à relever des défis environnementaux et sociétaux.

## **2. La thérapie génique :**

### **2.1. Définition :**

La thérapie génique s'appuie sur l'emploi d'un gène en tant qu'agent thérapeutique (Dufay, 2012), Elle est une stratégie qui consiste à transférer un matériel génétique sous forme d'acides nucléiques dans des cellules d'un individu pour guérir une maladie ou améliorer l'état clinique des patients (Cécilia *et al.*, 2014). Le concept de départ de la thérapie génique était le transfert « additif » d'une copie saine d'un gène endogène afin de restaurer l'expression qualitative ou quantitative d'une protéine déficiente dans le cadre de maladies monogéniques, Cependant, ces approches se sont élargies et incluent désormais le transfert de gènes codant des protéines thérapeutiques, visant par exemple à induire une réponse vaccinale ou à cibler et éliminer spécifiquement des cellules cancéreuses ou infectées. Plus récemment, le transfert d'acides nucléiques a été développé pour permettre une réparation génétique directe, plutôt qu'une simple supplémentation. Par ailleurs, il est désormais possible de moduler l'expression des gènes endogènes en agissant au niveau de l'ARN, que ce soit pour restaurer une expression normale (par exemple via le saut d'exon) (Goyenvalle, 2004) ou pour dégrader l'ARN (grâce à des mécanismes tels que l'ARN interférence ou les ribozymes) (Meister, 2004).

la thérapie génique constitue une troisième étape, La première étape consiste à purifier des protéines à partir de tissus ou de fluides d'origine animale ou humaine. La deuxième étape fait appel au génie génétique, permettant la production de protéines recombinantes par des microorganismes ou des organismes génétiquement modifiés. Enfin, la thérapie génique consiste à transférer directement l'ADN dans

l'organisme à traiter, transformant ainsi certaines cellules en micro-usines productrices du médicament (Kahn, 2000).

## 2.2. Historique :

L'évolution des connaissances scientifiques et technologiques a conduit à l'émergence d'une nouvelle catégorie de médicaments : les médicaments de thérapie innovante. Parmi ceux-ci, la thérapie génique se distingue comme l'une des avancées les plus prometteuses de ces dernières décennies (Cyrielle, 2024). Voici les étapes clés et les évolutions majeures qui ont marqué le développement de ce concept et des thérapies associées :

### d) La phase de recherche fondamentale de la thérapie génique (1909–1973):

a débuté avec l'introduction du terme "gène" par Wilhelm Johannsen, suivi de la découverte de la structure de l'ADN par Crick et Watson (Fatemeh *et al.*, 2022). Dans les années 1930, le "génie génétique" est apparu, et dans les années 1960, les techniques de transfert de gènes ont été adaptées aux eucaryotes (Wolff et Lederberg, 1994). Les années 1970 ont marqué la découverte des enzymes de restriction et de ligation, cruciales pour la manipulation génétique. L'ADN recombinant et les vecteurs viraux ont ensuite permis le transfert de gènes thérapeutiques dans les cellules mammifères, posant les bases de la thérapie génique moderne (Arabi *et al.*, 2022).

### e) Les débuts de la thérapie génique, entre espoirs et défis (lancement des essais cliniques) (1989-2003) :

En 1989, un rétrovirus a été utilisé pour marquer des lymphocytes dans le traitement du mélanome. En 1990, le premier essai réussi a eu lieu sur Ashanti Desilva, une enfant atteinte d'un déficit immunitaire sévère (SCID), grâce à l'insertion d'une copie fonctionnelle du gène ADA dans ses cellules T (Arabi *et al.*, 2022). Cependant, l'utilisation de vecteurs viraux a entraîné des effets indésirables, comme la mutagenèse insertionnelle et des réactions immunitaires. En 2000, un essai sur le SCID lié à l'X a montré des résultats prometteurs (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000), mais 5 des 20 enfants traités ont développé une leucémie. En 1999, le décès de Jesse

Gelsinger, suite à l'utilisation d'un vecteur adénoviral, a été le premier décès directement lié à la thérapie génique. Ces revers ont ralenti les progrès, mais ont aussi confirmé le potentiel de cette approche pour traiter des maladies génétiques graves (Arabi *et al.*, 2022).

f) La période 2003–2022 marque une transition majeure pour la thérapie génique:

Passant des premiers essais à l'approbation de produits thérapeutiques. En 2003, la Chine a approuvé Gendicine, le premier produit de thérapie génique pour le cancer de la tête et du cou, suivi en 2005 par Oncorine, un virus oncolytique. En 2012, l'Agence européenne des médicaments (EMA) a approuvé Glybera, premier traitement pour le déficit en lipoprotéine lipase. En 2016, Strimvelis, première thérapie génique ex-vivo, a été approuvée (Arabi *et al.*, 2022). En 2019, Zolgensma, traitement pédiatrique contre l'amyotrophie spinale, est devenu le médicament le plus cher à ce jour (Mahajan, 2019).

L'essor des technologies génétiques comme CRISPR et les doigts de zinc accélère le développement de thérapies innovantes, avec des applications ex-vivo (drépanocytose, bêta-thalassémie) et in-vivo (amylose à transthyréline). Ces avancées, approuvées par la FDA, l'EMA et la SFDA, illustrent le potentiel croissant de la thérapie génique (Arabi *et al.*, 2022).

D'après les essais cliniques précédents et les produits actuellement approuvés, il semble que ce domaine prometteur de la médecine progresse plus rapidement que jamais, avec des dizaines de nouveaux produits attendus dans un avenir proche. Plusieurs traitements sont en attente d'approbation par les agences de régulation. Avec leur validation, la thérapie génique s'intégrera progressivement dans le traitement d'un éventail plus large de maladies (Arabi *et al.*, 2022). en 2023, 31 médicaments de thérapie génique ont été autorisés en Europe, aux États-Unis ou en Asie. Quinze concernent diverses formes de cancer, treize les maladies rares, deux les maladies cardiovasculaires, et un l'ostéoarthrite du genou. On

dénombrer plus de 3 000 produits en développement clinique ou préclinique, dont 60% en oncologie (Chneiweiss, 2023).

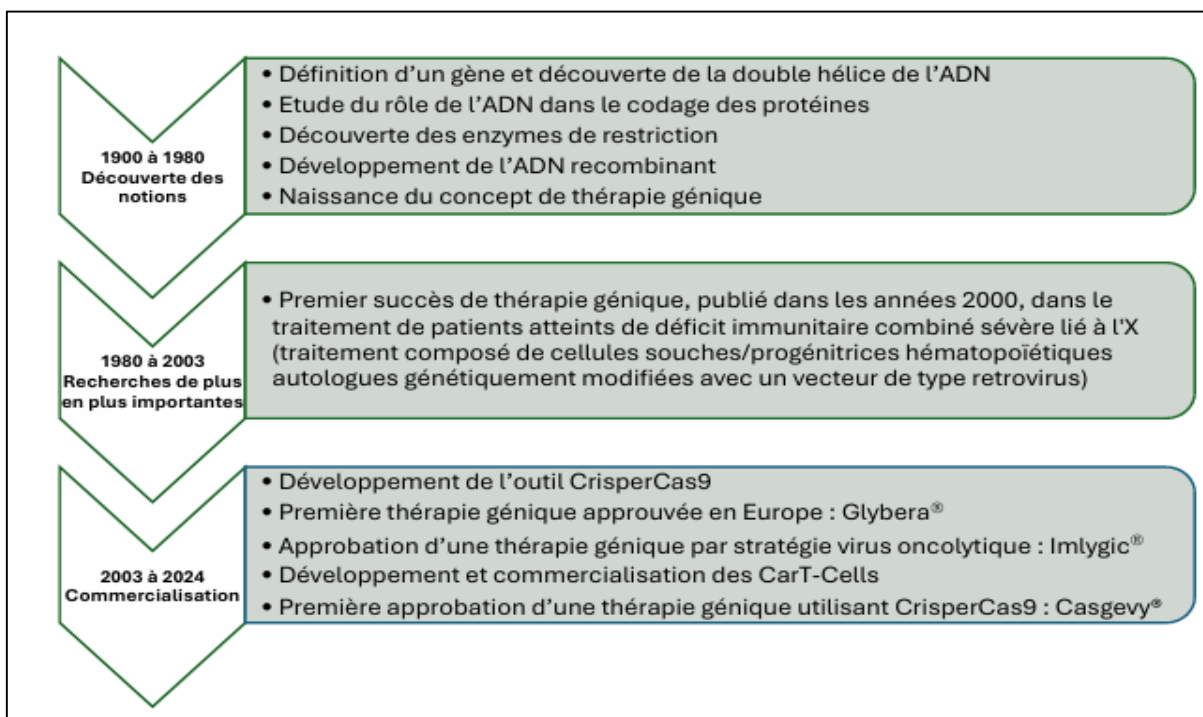


Figure 7. Évolution et développement de la thérapie génique (Cyrielle, 2024).

### 2.3. Les types de la thérapie génique :

On distingue deux types de la thérapie génique : les thérapies somatiques et les thérapies germinales (Lydie, 2014).

La thérapie génique a été créée pour pouvoir s'appliquer à toutes les cellules eucaryotes, aux cellules germinales comme aux cellules somatiques (Hellez, 2014). Dans le cas des thérapies somatiques, la correction du défaut génétique au sein d'un groupe de cellules cibles ne modifie pas le patrimoine génétique constitutionnel de l'individu. Ces thérapies agissent uniquement sur le patient traité, sans influencer le patrimoine génétique de ses descendants.

En revanche, les thérapies germinales impliquent une correction effectuée dans une cellule germinale, ce qui a un impact non seulement sur le patient, mais aussi sur sa descendance (Lydie, 2014), donc Il serait possible d'éliminer certaines maladies de la descendance des sujets traités (Hellez, 2014).

Cette dernière approche soulève des questions éthiques majeures, car elle ouvre la possibilité de créer des lignées transgéniques dès lors que la modification du génome est autorisée au stade embryonnaire (Lydie, 2014).

La thérapie génique humaine intéresse exclusivement les cellules somatiques. Les techniques de thérapie génique germinale sont uniquement utilisées en transgénèse animale, chez les modèles animaux, afin de créer et contrôler leur génotype pour les besoins de la recherche (Hellez, 2014).

#### 2.4. Voies de transfert de gène : stratégies *in vivo* / *ex vivo* :

L'introduction du gène thérapeutique chez le patient peut être réalisée selon deux principaux modes desquels découlent deux grands types de thérapie génique : la thérapie génique *ex vivo* et la thérapie génique *in vivo*.

##### 2.4.1. La thérapie *ex vivo* :

La thérapie *ex vivo* consiste à prélever des cellules ou des tissus du patient ou d'un donneur (Cyrielle, 2024). Ces cellules sont modifiées et sélectionnées *in vitro* avant d'être réimplantées chez le patient (Mauger *et al.*, 2015) par voie locale ou intraveineuse. Selon l'origine des cellules, on parle de **thérapie autologue** lorsque le prélèvement est issu du patient lui-même, et de **thérapie allogénique** lorsque les cellules proviennent d'un donneur. L'avantage de cette approche *ex vivo* réside dans la réduction de l'utilisation de vecteurs et dans l'évitement de l'action du gène thérapeutique sur des organes non ciblés, ce qui pourrait entraîner des effets indésirables importants. Aujourd'hui, cette méthode est principalement utilisée pour traiter les maladies impliquant les cellules sanguines, notamment en oncologie. En effet, les cellules sanguines sont facilement accessibles par une simple prise de sang (Cyrielle, 2024).

La procédure *ex vivo* se réalise en trois étapes principales :

1. Prélèvement des cellules de l'hôte (selon la maladie, il peut s'agir de cellules sanguines ou de leurs précurseurs, qui seront réinjectées dans la circulation, ou de fibroblastes, qui seront greffés comme un néo-organe).

2. Transfection en culture *in vitro* des cellules prélevées.
3. Réinjection ou greffe chez le sujet des cellules transfectées (Hellez, 2014).

Cette méthode permet de cibler la thérapie génique exclusivement sur les cellules ou le tissu à corriger, évitant ainsi la formation de foyers ectopiques d'expression du transgène. Elle prévient également toute réaction immunitaire dirigée contre le vecteur, car celui-ci n'est pas en contact direct avec l'organisme (Nayerossadat *et al.*, 2012).

Cela permet d'évaluer l'ampleur de la modification pour éviter tout problème dans l'organisme du patient. C'est donc la technique la plus utilisée (Lydie, 2014).

#### **2.4.2. La thérapie *in vivo* :**

Dans une thérapie génique *in vivo*, le gène est directement réimplanté dans les cellules du patient à l'aide de vecteurs (Lydie, 2014). La séquence d'acide nucléique recombinant, correspondant au gène thérapeutique, est administrée au patient par voie locale ou intraveineuse. Dans cette approche, un système de vectorisation, qu'il soit viral ou non viral, est essentiel pour cibler précisément les cellules à modifier génétiquement et pour garantir la fonctionnalité et l'intégrité du gène médicament. Ce type de thérapie est généralement employé lorsque les cellules cibles ne peuvent pas être atteintes par des méthodes de prélèvement traditionnelles (Cyrielle, 2024).

Il est également possible d'injecter le vecteur directement dans le tissu cible. Cette méthode est appelée administration « *in situ* ». Toutefois, le taux de transfection demeure faible en raison de la diffusion limitée du vecteur, ce qui est souvent incompatible avec une guérison complète, sauf dans le cas de tumeurs localisées (Hellez, 2014)

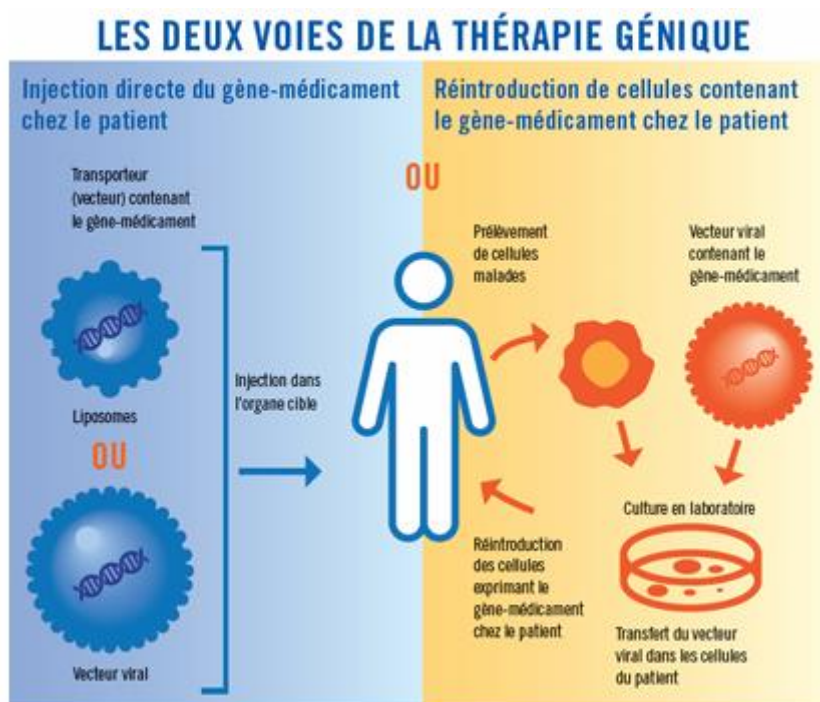


Figure 8. Les deux voies de la thérapie génique (Lannoy, 2017).

## 2.5. Les méthodes de la thérapie génique :

### 2.5.1. L'édition du génome :

L'édition du génome consiste à éliminer ou réparer un gène muté directement dans l'ADN nucléaire d'une cellule. Cette technique, encore expérimentale, nécessite l'introduction de deux éléments clés : une enzyme capable de couper l'ADN à un endroit précis et une séquence d'ADN sain servant de modèle pour restaurer la version fonctionnelle du gène. En théorie, cette modification génétique est permanente, car elle est transmise à toutes les cellules filles lors des divisions cellulaires, offrant ainsi un traitement potentiellement définitif. Cependant, cette approche présente des limites pratiques. Par exemple, la dégradation des ARNm par le mécanisme de surveillance non-sens (NMD) peut empêcher la traduction des ARNm corrigés en protéines fonctionnelles, compromettant l'efficacité de la réparation. Il faut aussi prendre en compte l'immunogénicité des enzymes utilisées, c'est-à-dire leur capacité à provoquer une réaction immunitaire, ce qui pose un problème évident pour le corps hôte. L'outil de CRISPR-Cas9, que nous étudierons en chapitre II, correspond à une méthode d'édition du génome. Ce cas particulier

permet de comprendre le fonctionnement global de cette approche ([Thérapie génique : Inserm, La science pour la santé](#)).

### **2.5.2. Modification de l'expression des gènes :**

Certaines méthodes de thérapie génique visent à moduler l'expression d'un gène en agissant sur les ARN messagers ou pré-messagers, responsables de transporter l'information génétique de l'ADN nucléaire vers les ribosomes. L'objectif n'est pas d'introduire un nouveau matériel génétique ni de modifier celui déjà présent dans la cellule, mais plutôt d'intervenir au moment de la traduction de ce matériel génétique. Pour y parvenir, on peut utiliser des ARN interférents ou des oligonucléotides antisens (OAN), qui agissent comme des sortes de messagers pour les messagers (Eva, 2023).

#### **2.5.2.1. Les ARN interférents :**

Les ARN interférents (siRNA et miRNA) sont des molécules d'ARN non codantes qui jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression génétique. En se liant spécifiquement à des séquences d'ARN messager (ARNm), ils empêchent la traduction de ces ARNm en protéines, bloquant ainsi l'expression du gène ciblé. Cela permet à l'organisme de contrôler la production de protéines et de dégrader les ARNm défectueux qui pourraient produire des protéines anormales ou dysfonctionnelles. Ce mécanisme est naturel et vital pour éviter la production de protéines potentiellement nocives. La découverte des ARN interférents par les chercheurs Andrew Z. Fire et Craig C. Mello leur a valu le prix Nobel de médecine en 2006 (Eva, 2023). En effet, ces ARN présentent un intérêt double : ils peuvent révéler la fonction d'un gène (en inhibant son expression, on peut observer les effets sur le phénotype), et évidemment utilisés comme outil thérapeutique en empêchant l'expression d'une mutation (Ibarrondo et Camus, 2005).

#### **2.5.2.2. ARN anti-sens :**

Les oligonucléotides antisens sont des fragments d'ARN synthétiques dont la séquence est complémentaire à celle d'un ARNm ciblé (le Gall *et al.*, 2021), il est

en théorie possible d'empêcher la traduction de cet ARNm soit en bloquant mécaniquement les ribosomes, soit en faisant intervenir une RNase (Sullivan *et al.*, 2011).

### **2.5.2.3. Ribozymes et ADNzymes (ou désoxyribozymes) :**

Les ribozymes et les ADNzymes (ou désoxyribozymes) sont des acides nucléiques capables de cliver spécifiquement des ARN. Ils se fixent par complémentarité à un ARN messager (ARNm) et le coupent à un site précis, bloquant ainsi sa traduction. Ces molécules peuvent être encodées et transcrites à partir d'ADN (Barar et Omid, 2012), ce qui permet leur utilisation dans des applications biotechnologiques et thérapeutiques, notamment pour réguler l'expression génique ou cibler des ARN pathogènes (Silverman, 2005).

### **2.5.3. Autres molécules régulatrices :**

De nouvelles approches pour réguler l'expression des gènes ont été développées, reposant principalement sur des molécules d'ARN, telles que les (ARN switches). Les ARN switches (ou commutateurs d'ARN) représentent une classe innovante de molécules régulatrices à base d'ARN, conçues pour moduler l'expression génique de manière dynamique et spécifique. Ces molécules sont structurées en deux domaines fonctionnels : un domaine sensitif, capable de détecter des signaux cellulaires spécifiques tels que la présence de ligands, des changements de température ou de pH, et un domaine acteur, qui influence directement l'expression des gènes en réponse à ces signaux. Ces ARN switches peuvent agir comme des capteurs moléculaires, activant ou inhibant la traduction ou la stabilité des ARNm en fonction des conditions cellulaires. Leur modularité et leur capacité à répondre à des stimuli variés en font des outils précieux en biologie synthétique et en thérapie génique, notamment pour le développement de biocapteurs ou de systèmes de régulation conditionnelle de gènes (Schmidt et Smolke, 2019).

## 2.6. Les vecteurs utilisés dans la thérapie génique :

En thérapie génique, l'utilisation d'un système de transport et de protection du gène thérapeutique est indispensable (Cyrielle, 2024). Pour cela le vecteur doit promouvoir l'interaction spécifique avec la cellule cible (ciblage cellulaire), assurer la pénétration intra cytoplasmique, transporter le gène recombiné jusqu'au noyau et assurer le maintien stable de l'expression du gène thérapeutique (Lannoy, 2017). Il en existe différents types : les vecteurs viraux ou non viraux (chimiques, organiques) (Lydie, 2014). Les vecteurs viraux, les plus efficaces actuellement mais qui peuvent déclencher des réponses immunitaires ou provoquer des cancers en s'insérant dans certaines séquences du génome, et les vecteurs non viraux qui ont été conçus pour répondre aux problèmes de sécurité, pour leur facilité de fabrication et pour assurer le transport de grandes quantités d'ADN (Lannoy, 2017).

Le vecteur idéal a plusieurs propriétés :

- Culture/production facile et de faible coût,
- Faible immunogénicité,
- Non cytotoxique ou pathogène,
- Possibilité d'insérer une séquence d'ADN relativement longue,
- Protection de la séquence insérée contre les nucléases,
- Capacité d'infection des cellules quiescentes comme en division,
- Ciblage des cellules à transfecter possible,
- Ciblage du site d'insertion ou insertion en un site non mutagène,
- Expression à long terme du transgène chez l'hôte. (Hellez, 2014)

### 2.6.1. Les vecteurs viraux :

Les débuts de la thérapie génique ont été marqués par l'utilisation de vecteurs viraux. Les virus sont composés au minimum d'une séquence d'acide nucléique, ADN ou ARN, simple ou double brin, portant l'information génétique, ainsi que d'une capsid (Cyrielle, 2024).

Les virus sont naturellement capables de pénétrer dans les cellules et d'y injecter leur propre génome afin de se répliquer. En réussissant à supprimer les gènes responsables

de la pathogénicité des virus sans modifier leurs capacités de pénétration, ces derniers sont devenus des vecteurs de choix pour le transport et la livraison des gènes en thérapie génique. Le principal risque de l'utilisation de virus en tant que vecteurs est leur pathogénicité résiduelle pour l'hôte, malgré les délétions des gènes à effet pathogène, et le risque qu'ils le redeviennent par mutation (Hellez, 2014). Les lentivirus, les adénovirus et les virus associés à l'adénovirus étaient les vecteurs viraux les plus largement utilisés entre 2013 et 2016, et ils sont désormais les principaux vecteurs de thérapie génique (Lannoy, 2017). Enfin, le principal défaut des virus est leur immunogénicité (Hellez, 2014).

#### **2.6.1.1. Les adénovirus :**

Ad est un virus non enveloppé connu pour causer principalement des infections des voies respiratoires supérieures, mais il peut également infecter d'autres organes tels que le cerveau et la vessie (Bulcha, 2021). Ce sont des virus possédant un génome d'ADN double brin (ADNdb) avec une capacité d'encapsulation allant jusqu'à 7,5 kb d'ADN étranger. Cependant, des vecteurs navettes Ad ont été conçus pour accueillir jusqu'à 14 kb d'ADN étranger (Lundstrom, 2023). Ils sont des vecteurs non intégratifs très utilisés dans le passé (Lannoy, 2017).

Ces virus ont la capacité de cibler à la fois les cellules quiescentes et les cellules en division. Ils entrent naturellement dans les cellules via les récepteurs membranaires CAR. Les fibres présentes sur la capsid virale se fixent d'abord aux récepteurs CAR, puis les pentons se lient aux intégrines situées à la surface cellulaire. Cette liaison déclenche une endocytose dépendante de la clathrine (Cyrielle, 2024). La protéine virale VI permet l'échappement de l'endosome. Les dynéines cytoplasmiques permettent le transport de la capsid le long des microtubules. Jusqu'aux pores nucléaires où la capsid est désassemblée via l'interaction avec différentes protéines pour libérer le matériel génétique dans le noyau sous forme d'épisome (Figure09) (Coughlan *et al.*, 2010).

Dans ces vecteurs, tous les gènes natifs de l'adénovirus sont supprimés et remplacés par la cassette d'expression génique thérapeutique. Cette approche permet de limiter

l'immunogénicité des adénovirus via l'absence des protéines et permet d'augmenter la capacité d'encapsulation (Cyrielle, 2024).

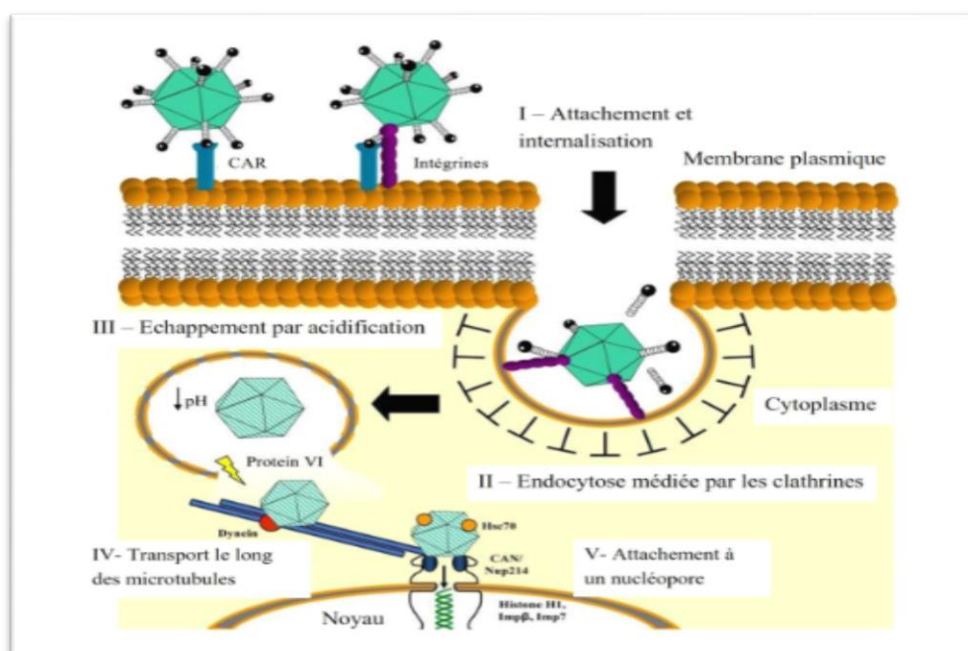


Figure 9. Mode de pénétration de l'adénovirus (Coughlan *et al.*, 2010).

### 2.6.1.2. Les virus adéno-associés (AAV) :

Les virus associés aux adénovirus sont des virus à ADN simple brin appartenant à la famille des parvovirus, non pathogènes et très répandus chez l'homme (Lannoy, 2017). Ils sont des virus incapables de se répliquer sans un virus « helper » tel que les adénovirus, les herpesvirus, ... Ce sont de petits virus (18-26 nm) (Hellez, 2014). Le génome d'un AAV contient 3 principales régions et se compose sous le schéma suivant : ITR – Rep – Cap – ITR. La région Rep code pour quatre protéines régulatrices non structurales, a un rôle dans la répllication du virus. La région Cap code pour trois protéines structurales de la capsid (VP1, VP2 et VP3) ainsi que pour la protéine chaperonne accessoire d'activation de l'assemblage (AAP) (Korneyenkov et Zamyatnin, 2021). Les régions ITR (Inverted Terminal Repeats) forment des structures complexes palindromiques permettant la répllication et l'encapsulation du génome. La stabilité du transgène est assez importante avec ce type de vecteur non intégratif (Cyrielle, 2024).

Lors de la production du vecteur viral (schématisée en figure 10), les gènes « Rep » et « Cap » du virus d'origine sont supprimés et remplacés par une cassette d'expression génique, composée généralement d'un promoteur, du gène d'intérêt et d'une séquence polyA (Isalan *et al.*, 2022). Les vecteurs créés à partir d'AAV sont capables de transporter des acides nucléiques de taille inférieure à 4,8kb (Hellez, 2014).

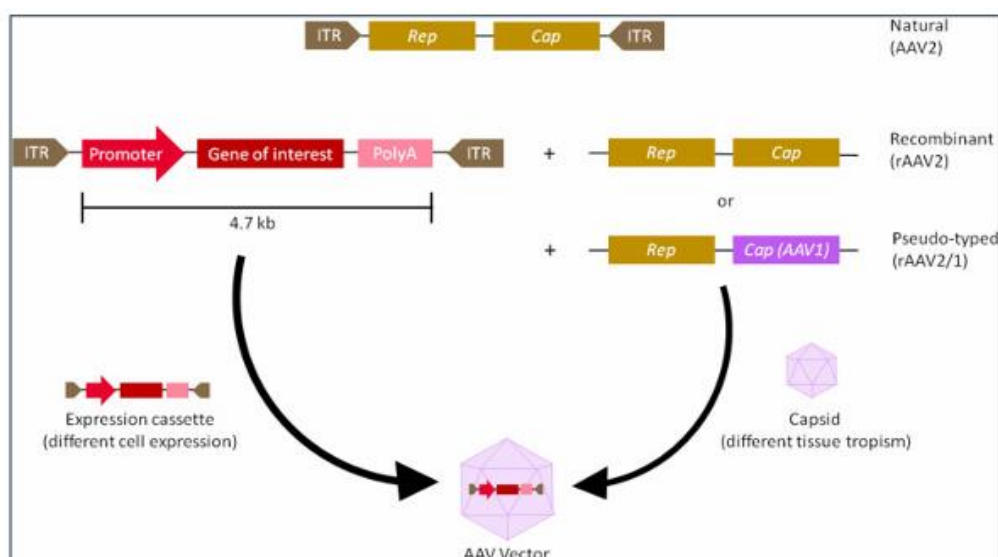


Figure 10. Schématisation de la structure des virus adénoassociés (Isalan *et al.*, 2022).

### 2.6.1.3. Les rétrovirus :

Les rétrovirus (Retroviridae) sont des vecteurs viraux intégratifs enveloppés. Ils ont été les premiers virus étudiés et utilisés en thérapie génique (Cyrielle, 2024). La famille des Retroviridae est une famille de virus enveloppés possédant un génome d'ARN simple brin. Ces virus se caractérisent par la présence d'une transcriptase inverse, qui permet de transcrire leur matériel génétique de l'ARN en ADN, et d'une intégrase, qui facilite l'intégration du matériel génétique viral dans le génome de la cellule hôte. De plus, ces virus possèdent trois gènes principaux : **pol** : code pour les enzymes transcriptase inverse et intégrase, **gag** : code pour les protéines de la capsid virale et **env** : code pour les protéines de l'enveloppe virale (Hellez, 2014). Les autres gènes représentés codent pour des protéines régulatrices. Ces gènes sont encadrés par des séquences terminales longues répétées appelées « LTR », qui contrôlent leur expression (Cyrielle, 2024).

Ils pénètrent dans la cellule cible par endocytose, puis, après une étape de décapsidation, libèrent le génome viral sous forme d'ARN dans le cytoplasme. Cet ARN viral est ensuite rétro-transcrit en ADN grâce à l'action de la transcriptase inverse. Une intégrase permet alors l'intégration du matériel génétique viral dans le génome de la cellule hôte. Ce type de vecteur est capable d'infecter uniquement les cellules en division, car il pénètre dans le noyau lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire pendant la division cellulaire. Ces vecteurs peuvent intégrer des transgènes d'une taille approximative comprise entre 6 et 8 kb (Lundstrom, 2023).

On peut classer les rétrovirus en deux catégories : les simples (alpharétrovirus, betarétrovirus, gammarétrovirus et epsilon-rétrovirus) et les complexes (deltarétrovirus, lentivirus et spumavirus) selon la diversité des protéines codées par le génome viral. En effet, les rétrovirus complexes sont capables de pénétrer dans le noyau cellulaire via un transport actif alors que les rétrovirus simples profitent de la mitose pour pénétrer le noyau (Hellez, 2014).

#### **2.6.1.3.1. Vecteurs gammarétroviraux (simples)**

Les vecteurs gammarétroviraux, dérivés de virus comme le virus de la leucémie murine (MuLV), sont des outils classiques de transfert de gènes. Ces vecteurs ciblent exclusivement les cellules en division, car leur intégration dans le génome de l'hôte nécessite la rupture de l'enveloppe nucléaire pendant la mitose (Coffin *et al.*, 1997).

Sur le plan clinique, ils ont marqué l'histoire de la thérapie génique en traitant avec succès le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (SCID-X1). Dans ces cas, les cellules souches hématopoïétiques des patients étaient modifiées *ex vivo* avant réinjection (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002). Cependant, leur utilisation est limitée par un risque élevé de mutagenèse insertionnelle, où l'intégration aléatoire près de promoteurs cellulaires peut activer des oncogènes (McCormack *et al.*, 2013). De plus, leur incapacité à infecter les cellules quiescentes (comme les neurones) réduit leur applicabilité à certains tissus (Darlix, 2023).

**2.6.1.3.2. Vecteurs lentiviraux (complexes) :**

Les vecteurs lentiviraux, issus de virus comme le VIH-1, représentent une avancée majeure grâce à leur capacité à infecter cellules en division et quiescentes. Contrairement aux gammarétrovirus, ils pénètrent dans le noyau indépendamment de la mitose, via des mécanismes dépendants de la protéine matrice virale (Naldini, 2015).

Ces vecteurs sont utilisés dans des thérapies innovantes, comme le traitement de la bêta-thalassémie par modification des cellules souches sanguines (Cavazzana *et al.*, 2017). Ils sont également prometteurs en neurologie, comme dans l'essai clinique de 2014 pour la maladie de Parkinson, où un gène thérapeutique a été délivré directement dans les neurones (Palfi *et al.*, 2014). Leur capacité à transporter des transgènes plus larges (jusqu'à 8 kb) et leur profil d'intégration plus sûr en font des outils polyvalents (Kay *et al.*, 2001).

**2.6.2. Les vecteurs non-viraux (synthétiques) :**

Face aux limitations sur la sécurité, l'immunogénicité et le risque de mutagenèse liés aux vecteurs viraux, des vecteurs non viraux ont été développés (Cyrielle, 2024). Comparés aux vecteurs viraux, les vecteurs non viraux présentent des niveaux plus faibles de cytotoxicité, d'immunogénicité et de mutagenèse, ce qui attire davantage de chercheurs à explorer ce système d'administration prometteur et à faire progresser le domaine de la thérapie génique (Zu et Gao, 2021).

Pour garantir une vectorisation efficace, les vecteurs non viraux utilisés dans les stratégies *in-vivo* doivent d'abord former un complexe stable avec le gène médicament. Ensuite, ils doivent être capables de cibler spécifiquement un type cellulaire et d'être internalisés dans la cellule cible, que ce soit par une interaction spécifique ou non avec la membrane cellulaire. Les barrières intracellulaires pour les vecteurs non viraux sont nombreuses. Parmi elles, on peut mentionner le risque de dégradation du gène dans le lysosome ou encore l'échappement endosomal (Shtykalova, 2023).

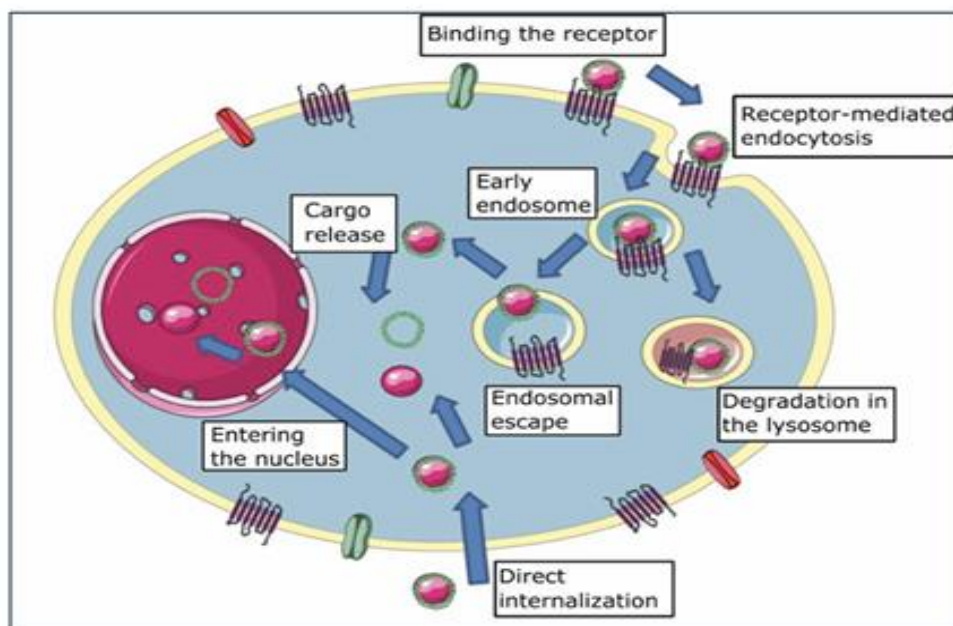


Figure 11. Barrières intracellulaires des vecteurs non viraux (Shtykalova, 2023).

Ce système de vectorisation, très prometteur, repose principalement sur des techniques chimiques, physiques ou biologiques non virales. Les principales méthodes explorées aujourd'hui sont présentées dans ce rapport.

### 2.6.2.1. Les méthodes physiques :

Les techniques physiques sont principalement utilisées pour transférer de l'ADN « nu » sous forme de plasmide. Parmi les techniques physiques employées pour le transfert de gènes, les méthodes les plus étudiées actuellement sont l'électroporation et la micro-injection. L'électroporation est une méthode qui utilise des impulsions électriques pour augmenter la perméabilité des membranes cellulaires, permettant ainsi l'entrée de matériel génétique dans le cytoplasme. Par exemple, elle est utilisée pour l'introduction de la protéine du complexe CRISPR-Cas9. La micro-injection consiste en l'injection directe du gène thérapeutique dans le noyau d'une cellule à l'aide d'une aiguille fine. D'autres méthodes physiques sont en cours de développement, telles que la biolistique, le laser, la température élevée, les ultrasons ou encore le transfert hydrodynamique de gènes (Cyrielle, 2024).

### 2.6.2.2. Les méthodes chimiques :

L'objectif des méthodes chimiques de vectorisation va être de masquer les charges négatives de l'ADN tout assurant la fonctionnalité et le ciblage du matériel génétique (Nsairat, 2022). Par interactions ioniques, un complexe est créé entre des éléments cationiques et les charges négatives des groupements phosphates des acides nucléiques, permettant ainsi une condensation de l'ADN (Dufay, 2012).

Les polymères et lipides cationiques sont capables de s'associer par interactions électrostatiques avec le polymère anionique qu'est l'ADN. Les auto-assemblages vecteur/ADN qui en résultent forment des complexes nanométriques (appelés polyplexes ou lipoplexes) pouvant être internalisés par les cellules (Mauger *et al.*, 2015). L'ADN, généralement un plasmide comportant une cassette d'expression eucaryote du transgène, doit ensuite être libéré de son vecteur, sortir de l'endosome, atteindre le cytoplasme, puis le noyau afin d'y être transcrit (Pichon *et al.*, 2010). Contrairement aux virus, ces vecteurs non viraux sont plus faciles à produire, à manipuler et à stocker (Lannoy, 2017).

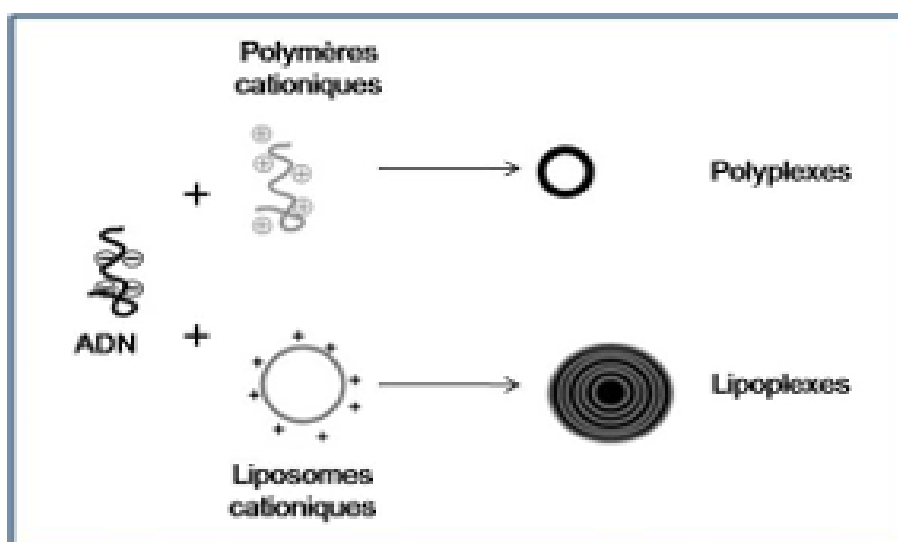


Figure 12. Les polymères cationiques et lipides cationiques : vecteurs synthétique de thérapie génique (Pichon *et al.*, 2010).

#### **2.6.2.2.1. Les polymères cationiques :**

Les polymères cationiques sont composés d'une séquence chimique répétée plusieurs fois. Ils portent plusieurs charges positives leur permettant de former un complexe avec les acides nucléiques (Mauger *et al.*, 2015). Il existe différentes structures, cycliques, linéaire ou ramifié. On peut citer par exemple les polyéthylènimines (PEI), la Poly-L-Lysine (PLL) et le Poly(2-diméthylaminoéthyl méthacrylate) (PDMAEMA) (Zu et Gao, 2021).

L'efficacité de tels systèmes polymériques dépend de leur aptitude à protéger l'ADN, ce qui est plus difficile à garantir qu'avec l'utilisation de bicouches autoassemblées (Dufay, 2012). Ceci étant, ces systèmes sont de bons agents pour des voies présentant peu de nucléases comme la voie intramusculaire (Roques *et al.*, 2009), à condition qu'ils soient capables de relarguer convenablement le plasmide (Dufay, 2012).

#### **2.6.2.2.2. Les lipides cationiques :**

Les lipides cationiques ont généralement une même organisation structurale (Mauger *et al.*, 2015). Les liposomes sont de petites vésicules sphériques composées de lipides. Ils sont capables d'encapsuler des gènes thérapeutiques et de fusionner avec les membranes cellulaires, permettant ainsi la libération du matériel génétique dans la cellule. Ce processus est appelé lipofection. Ces complexes sont constitués d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques organisées sous forme de sphères (Nsairat *et al.*, 2022) (Figure13).

Les phospholipides, avec leurs têtes hydrophiles et leurs queues hydrophobes, forment un noyau hydrophile qui permet la délivrance de substances hydrosolubles aux cellules. Ils peuvent également transporter des agents thérapeutiques hydrophobes, soit en les absorbant à leur surface, soit en les incorporant (Cyrielle, 2024).

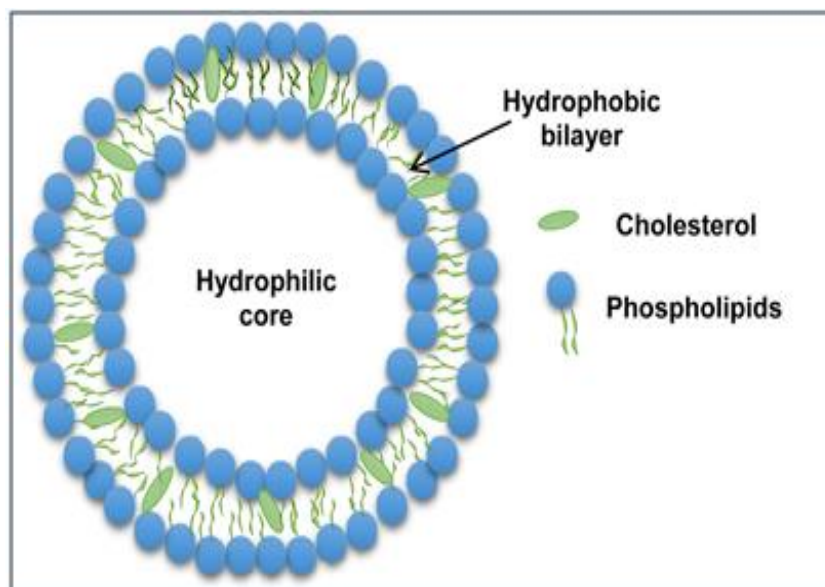


Figure 13. Structure d'un liposome (Nsairat, 2022).

L'utilisation des liposomes est cependant limitée en raison de leur capacité à l'agrégation et à une dégradation rapide par le système réticuloendothélial (RES), via opsonisation et phagocytose (Shtykalova *et al.*, 2023).

#### 2.6.2.2.3. Des nanoparticules :

Des nanoparticules inorganiques ou organiques peuvent également être utilisées pour délivrer des gènes thérapeutiques dans les cellules cibles. Parmi les types couramment utilisés, on trouve les nanoparticules d'or, de silice, de polymères ou lipidiques. Ces particules sont composées de plusieurs constituants dont les concentrations varient. Les nanoparticules chargées positivement, appelées nanoparticules cationiques, ont la capacité d'encapsuler des gènes, dont la taille peut varier de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres, grâce à des interactions électrostatiques ou hydrophobes entre leurs groupes cationiques et les groupes phosphates de l'ADN (Kularatne *et al.*, 2022).

Les nanoparticules lipidiques (LNP) présentent des caractéristiques intéressantes en termes de vectorisation. Elles se composent de différents lipides regroupés en monocouches. On retrouve généralement :

- Du cholestérol, associé à un lipide auxiliaire, assurant l'intégrité de la nanoparticule.
- Un lipide PEGylé permettant d'augmenter la stabilité du complexe dans l'organisme et d'augmenter la demi-vie de la nanoparticule.
- Un lipide ionisable contenant une amine (charge positive) permettant de complexer le gène thérapeutique (Cyrielle, 2024).

La figure 14 ci-dessous présente la structure d'une nanoparticule lipide pouvant être utilisée dans le transfert de gène

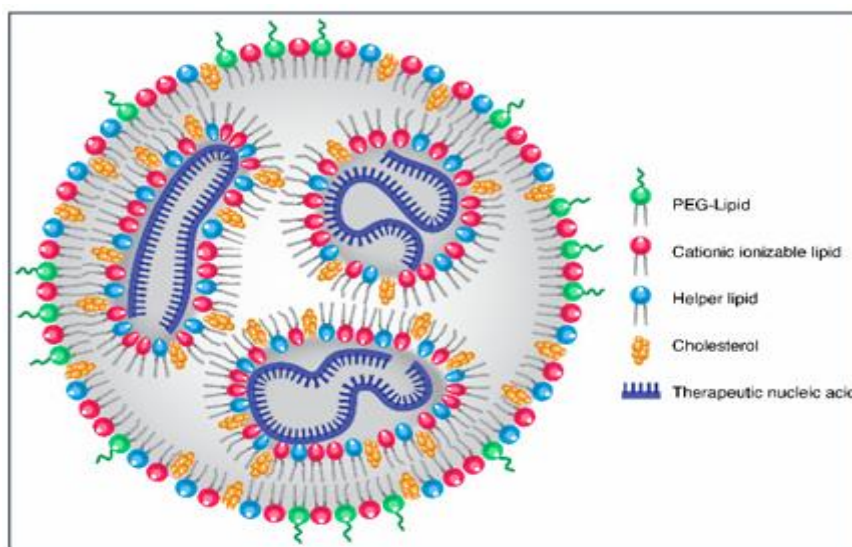


Figure 14. Structure d'une nanoparticule lipidique (Kularatne *et al.*, 2022).

Ces particules lipidiques, grâce à leur composition, présentent une excellente biocompatibilité, solubilité et biodisponibilité. Selon les composants utilisés, elles peuvent présenter un profil de stabilité important et permettre de contrôler la libération des gènes. Leur production à échelle industrielle est facilitée (Dhiman, 2021).

## 2.7. Questions éthiques :

Les enjeux éthiques liés à l'intervention humaine sur le génome, et plus spécifiquement à l'édition génomique, sont nombreux et complexes. L'analyse éthique et déontologique de cette discipline va de pair avec sa pratique et la manière dont elle est appréhendée. Parmi les questions globales qui reviennent, on retrouve

les suivantes : « Quelle légitimité de modifier la nature pour l'homme ? », « Quelle égalité d'accès aux techniques d'édition du génome ? », « Est-ce que nous pouvons définir la valeur d'un individu par son code génétique ? », « Quelles conséquences pour les générations futures ? », « Comment articuler la notion de consentement avec les techniques d'édition du génome ? », et bien d'autres encore (Eva, 2023).

Pour soigner les maladies génétiques, L'avantage majeur de la thérapie génique réside dans sa capacité à traiter les maladies génétiques à leur source, en ciblant directement les mutations responsables au niveau cellulaire. Contrairement aux traitements pharmacologiques classiques, qui agissent souvent sur les symptômes ou les conséquences de la maladie, la thérapie génique permet de corriger ou de remplacer les gènes défectueux, offrant ainsi une solution potentiellement curative et durable. Par exemple, dans le cas de maladies génétiques identifiées précocement, il est possible d'intervenir avant que la maladie ne se développe pleinement, empêchant ainsi son apparition ou sa progression (Cavazzana, 2017). Chez l'Homme, les techniques de modification ciblée du génome suscitent des espoirs considérables pour traiter des maladies actuellement incurables. Début 2020, à travers le monde, environ 35 essais cliniques de modification du génome de cellules somatiques étaient en cours. Ils concernent notamment le traitement de maladies monogéniques, d'hémopathies, certains cancers ou encore des maladies neurologiques ou infectieuses. Toutefois, à partir du moment où il y a une modification du génome sur les gamètes, nous influençons des générations, ce qui s'avère plus problématique. A-t-on envie de devenir des modificateurs de la loi naturelle des choses ? C'est souvent la limite bioéthique actuelle, et arbitraire, que s'imposent les chercheurs en thérapie génique : guérir la personne mais s'interdire de toucher à l'hérédité.

En France, pratiquer la thérapie génique germinale est interdite par la loi de bioéthique de 1994, Cette loi interdit explicitement toute modification génétique sur les cellules germinales ou embryonnaires, afin de prévenir les risques de transmission héréditaire des modifications génétiques et de respecter des principes éthiques fondamentaux. L'article 16-4 du Code civil français stipule que « toute intervention ayant pour but de modifier le génome de la descendance d'une personne est interdite».

Mais comme nous l'avons vu, la thérapie génique somatique est quant à elle appliquée pour soigner certaines maladies génétiques. Ce type de thérapie ne touche pas aux cellules germinales et n'a pas d'influence héréditaire (Claeys, 2022).

En juin 2015, Jennifer Doudna a souligné l'importance de poursuivre la recherche sur l'édition génomique tout en encadrant son utilisation de manière éthique et en éduquant le public (Doudna, 2015).



# CHAPITRE II.

## Le système CRISPR/Cas9

**Introduction :**

La médecine moderne connaît une transformation radicale grâce aux progrès de la thérapie génique. Cette approche novatrice permet désormais de s'attaquer à la racine même des maladies en modifiant directement notre patrimoine génétique. En corrigeant les anomalies à leur source - par insertion, suppression ou modification de gènes défectueux -, elle ouvre des perspectives thérapeutiques inédites pour des pathologies génétiques mais aussi pour certaines maladies acquises.

Parmi ces avancées, un outil se distingue particulièrement : le système CRISPR-Cas9. Véritable scalpel moléculaire, cette technologie d'édition génomique combine une précision inégalée, une rapidité d'exécution et une efficacité remarquable. Sa capacité à cibler spécifiquement des séquences d'ADN, d'y effectuer des coupures programmées et de réparer des mutations avec une exactitude sans précédent en fait une révolution scientifique. La relative simplicité de son utilisation démultiplie ses applications potentielles, promettant des avancées thérapeutiques majeures (Salomé, 2024).

**1. Définition :**

CRISPR" signifie "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", soit en français : "Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées" (Jinek *et al.*, 2012). CRISPR-Cas9 est une technique d'altération du génome (ou d'édition génomique) qui autorise l'ajout, la modification ou l'élimination d'une séquence spécifique de l'ADN (Lassalas et Borges, 2018). CRISPR et sa protéine associée (Cas-9) sont l'outil d'édition du génome le plus efficace le plus précis dans toutes les cellules vivantes (Asmamaw et Zawdie, 2021). Cet outil permet la correction des erreurs génétiques ainsi que l'activation ou l'inhibition des gènes dans les cellules et les êtres vivants de manière rapide, économique et relativement simple. CRISPR/Cas9 est une méthode d'édition génique qui repose sur deux éléments essentiels : un ARN guide pour cibler un gène désiré, et l'endonucléase Cas9 qui induit la cassure de l'ADN à double brin, ouvrant la voie à des modifications génétiques. L'outil d'édition de gènes CRISPR/Cas-9 a un large éventail

d'utilisations dans une variété de domaines, y compris la médecine, l'agriculture et la biotechnologie (Benathmane et Meziani, 2022).

Cas9 est la protéine effectrice des systèmes immunitaires bactériens CRISPR-Cas de type II et est la première protéine effectrice associée à CRISPR qui a été réutilisée pour l'édition génomique. Dans la nature, Cas9 nécessite deux molécules d'ARN, un crRNA et un ARN crRNA trans-activateur (tracrRNA), qui s'apparie avec la séquence répétée du crRNA. Le complexe Cas9-ARN résultant doit d'abord reconnaître un court motif de séquence d'ADN appelé motif adjacent au protospacer (PAM) puis teste l'ADN double brin adjacent pour la complémentarité de séquence avec le crRNA.

Important pour les efforts d'ingénierie génomique, le crRNA et le tracrRNA peuvent être combinés en un ARN guide unique (sgRNA) pour simplifier les applications de Cas9 sans affecter les activités de liaison et de clivage cibles médiées par Cas9 (Xue et Greene, 2021).

## **2. La découverte :**

### **2.1. Découverte de CRISPR et des gènes Cas :**

Les CRISPR ont été identifiés pour la première fois en 1987 par des chercheurs de l'Université d'Osaka dans le génome d'*Escherichia coli*. Ils ont été décrits comme des séquences répétées courtes de 29 nucléotides, espacées par des séquences aléatoires de 32 nucléotides (Ishino *et al.*, 1987). Ces motifs répétés ont par la suite été également identifiés en 1993 dans le génome d'*Haloferax mediterranei*, d'*Haloferax volcanii* et d'autres bactéries avec de légères variations au niveau du nombre de nucléotides (Mojica *et al.*, 2000).

Au début des années 2000, les séquences CRISPRs ont commencé à être étudiées par une poignée de microbiologistes et bio-informaticiens, conduisant en 2002 à l'hypothèse que les CRISPR pourraient être impliqués dans des mécanismes de réparation de l'ADN (Makarova *et al.*, 2002). La même année, une famille de gènes composée initialement de quatre gènes, dénommée cas pour CRISPR-associated-genes, a été identifiée comme systématiquement associée aux motifs CRISPR (Jansen

*et al.*, 2002). La présence d'activités hélicase et endonucléase sur les protéines de la famille Cas a été avérée dès 2005 (Haft *et al.*, 2005). Simultanément, des séquences communes dans les CRISPRs et le génome de certains pathogènes des bactéries ont été découvertes par des analyses de bioinformatique. Cela a permis d'émettre l'hypothèse d'une possible origine virale ou plasmidique des CRISPRs bactériens, par insertion entre les séquences répétées de petites séquences exogènes provenant de bactériophages (Pourcel *et al.*, 2005).

Ces deux notions, associées à l'identification de transcrits ARN de ces CRISPRs (Tang *et al.*, 2002), ont permis de supposer dès 2007 que ceux-ci étaient impliqués dans ce que les chercheurs ont alors appelé une « activité immunitaire adaptative primitive » (Makarova *et al.*, 2006). Cette théorie a été confirmée la même année grâce à des expériences impliquant l'infection de *Streptococcus thermophilus* par des phages à activité lytique (Barrangou *et al.*, 2007). L'équipe de Barrangou et al. a ainsi cherché à exploiter le système CRISPR pour immuniser les cultures de *S. thermophilus* en exposant la bactérie à certains bactériophages. Après sélection des souches bactériennes ayant survécu et séquençage de leur génome, les scientifiques ont constaté l'insertion de fragments d'ADN correspondant au phage infecté au sein du génome bactérien dans une structure similaire aux CRISPRs.

Plus récemment, la structure caractéristique d'un locus CRISPR/Cas a été identifiée. Celui-ci comprend une séquence leader suivie des séquences CRISPRs d'ADN répétées, séparées par des séquences d'ADN correspondant à un ARN guide (ARNsg) spécifique. Les séquences CRISPRs encadrées par les séquences répétées agissent en tandem avec les protéines codées par les gènes Cas dont la séquence codante est située en 5'. Des séquences dites spacers d'ADN issues d'un ARN exogène ou protospacer sont insérées entre des séquences répétées au sein du génome bactérien. Cette collaboration entre les CRISPRs et les enzymes Cas confère aux bactéries une immunité adaptative contre certains pathogènes et notamment les phages (Wiedenheft *et al.*, 2012).

## 2.2. Découverte du SgRNA :

Les équipes de Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier ont entamé une collaboration transatlantique pour élucider le mécanisme d'action du système CRISPR-Cas9. Elles ont utilisé la protéine Cas9 recombinante (Provenant de *Streptococcus* et exprimée chez *Escherichia coli*), ainsi que deux ARN transcrits in vitro : un crARN et un tracrARN. Comme Siksnys, ils dévoilèrent que la Cas9 pouvait couper de l'ADN purifié in vitro, qu'elle pouvait être reprogrammée en utilisant des crARNs sur-mesures et que les deux domaines nucléases coupaient chacun un fragment opposé. Mais l'originalité de leur étude résidait dans la démonstration que, in vitro, ces deux ARNs pouvaient fonctionner sous forme fusionnée. Cet ARN unique, appelé sgARN (single-guide ARN ou ARN guide unique) (Roublin, 2017).

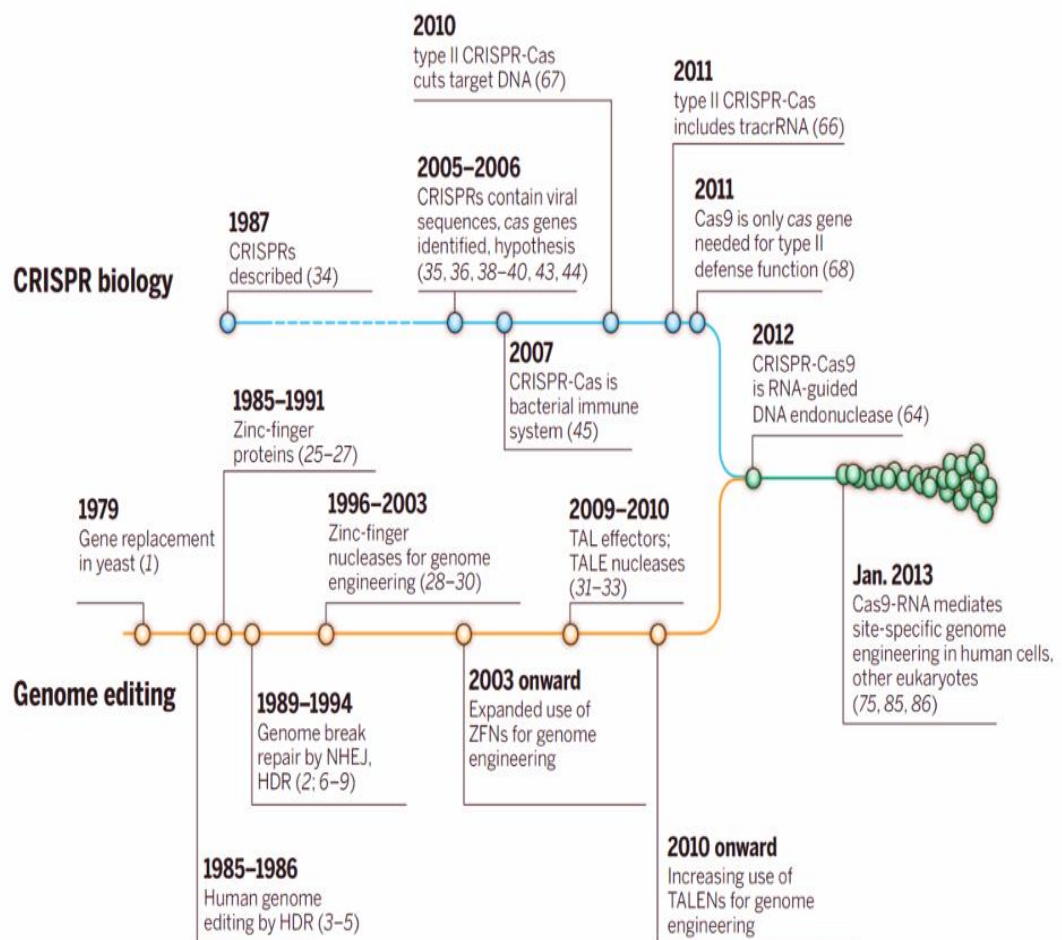


Figure 15. La découverte du système CRISPR-cas (Doudna et Charpentier, 2014).

### 3. Anatomie de base et mécanisme du système CRISPR-Cas chez les bactéries :

Le système CRISPR-Cas fonctionne en éliminant l'infection virale en ciblant directement l'ADN ou l'ARN viral. Le génome bactérien contient un locus CRISPR comprenant un tableau CRISPR. Ce tableau est formé de répétitions palindromiques entrecoupées de séquences espaceurs uniques acquises à partir du matériel génétique de bactériophages ou de virus envahisseurs. Ces séquences espaceurs confèrent une résistance en agissant comme une mémoire génétique et empêchent l'hôte d'être infecté par des virus contenant la même séquence (Rajan *et al.*, 2022). Le tableau CRISPR est flanqué d'une séquence leader et d'un opéron comprenant un groupe de gènes codant pour des protéines Cas (Makarova *et al.*, 2013). Ces protéines Cas sont nécessaires au fonctionnement de la réponse immunitaire adaptative (Makarova *et al.*, 2015). Parmi le groupe diversifié de protéines Cas, Cas1 et Cas2 sont universels et existent dans tous les types de systèmes CRISPR-Cas ; ils sont impliqués dans l'intégration des espaceurs (Rajan *et al.*, 2022).

Le système CRISPR-Cas est divisé en deux classes principales, à savoir la classe I et la classe II, et en six types différents (I-VI) (Makarova *et al.*, 2020). Ces types sont ensuite divisés en sous-types, chaque type ayant une composition caractéristique de modules fonctionnels. Les types ayant un complexe effecteur crRNA multi-sous-unités sont classés dans la classe I, tandis que les types ayant un complexe effecteur crRNA à sous-unité unique sont regroupés dans la classe II (Makarova *et al.*, 2015).

La réponse immunitaire adaptative contre le matériel génétique étranger, médiée par le système CRISPR-Cas, se déroule principalement en trois étapes : adaptation/acquisition d'espaceurs, expression du pré-crRNA et interférence.

1. L'adaptation/l'acquisition d'espaceurs implique la reconnaissance d'une courte séquence conservée de nucléotides appelée PAM (motif adjacent au protospacer) qui se trouve à proximité du protospacer (séquence d'ADN étranger intégrée comme espaceur), suivie de son clivage et de son acquisition par le complexe nucléasique Cas1-Cas2. Le protospacer acquis à partir du

matériel génétique viral envahissant est intégré comme espaceur entre deux répétitions. Le nouvel espaceur est intégré à l'extrémité leader du tableau CRISPR (rajan *et al.*,2022).

2. Dans la deuxième étape, **l'expression**, le locus CRISPR est transcrit pour former le pré-crRNA, qui est ensuite transformé en crRNA mature ou ARN guide par les protéines Cas (rajan *et al.*,2022).
3. Dans l'étape finale, **l'interférence**, le crRNA/ARN guide mature, lié à un complexe multiprotéique de traitement, reconnaît et s'apparie avec la séquence complémentaire du matériel génétique viral envahissant, qui est ensuite clivé par les protéines Cas à côté du site. Les sites PAM sur le matériel génétique viral sont cruciaux pour distinguer les matériels génétiques du soi et du non-soi. Des études montrent que des mutations dans les sites PAM contournent l'immunité conférée par le système CRISPR-Cas (rajan *et al.*, 2022).

#### 4. Classification du système CRISPR :

La pression de sélection continue exercée par les phages sur les systèmes CRISPR/Cas bactériens a mené à l'émergence d'une diversité hétérogène de ces systèmes chez les bactéries (Chardès, 2018). Les génomes peuvent contenir un ou plusieurs loci CRISPR, et chez certaines espèces, ces loci peuvent représenter une partie importante du chromosome. Tous les loci CRISPR ne sont pas associés à des gènes cas adjacents, mais dépendent plutôt de facteurs transcrits (Hsu *et al.*,2014).

La distinction entre les types de CRISPR-Cas est basée sur les gènes spécifiques à chaque type et l'organisation typique des loci correspondants (Makarova et Koonin, 2015).

##### 4.1 . Les systèmes CRISPR/Cas de classe 1 :

Les systèmes CRISPR-Cas de classe 1 sont définis par la présence d'un complexe effecteur crRNA à sous-unités multiples. Cette classe inclut les systèmes CRISPR-Cas de type I et de type III, ainsi que le nouveau type putatif IV (Makarova *et al.*,2015).

#### 4.1.1. Les systèmes de type I :

Les loci de type I contiennent généralement le gène *cas3*, qui code pour une grande protéine dotée d'activités hélicase et DNase distinctes. Ils incluent également des gènes codant pour des protéines formant probablement des complexes de type Cascade avec des compositions variées. (Makarova *et al.*, 2015).

Les systèmes de type I sont actuellement divisés en sept sous-types, I-A à I-F et I-U, Dans le cas du sous-type I-U, le "U" signifie "non caractérisé" car le mécanisme de clivage du pré-crRNA et l'architecture du complexe effecteur de ce système restent inconnus (Makarova *et al.*, 2011). Les systèmes CRISPR-Cas de type I-C, I-D, I-E et I-F sont généralement encodés par un seul opéron (prédit) qui comprend les gènes *cas1*, *cas2* et *cas3*, ainsi que les gènes des sous-unités du complexe Cascade. En revanche, de nombreux loci de type I-A et I-B semblent avoir une organisation différente, où les gènes *cas* sont regroupés en deux ou plusieurs opérons (prédits) (Makarova *et al.*, 2015).

#### 4.1.2. Les systèmes de type III :

Tous les systèmes de type III possèdent le gène signature *cas10*, qui code une protéine multidomaine contenant un domaine Palm (une variante du motif de reconnaissance de l'ARN (RRM)). Ce domaine est homologue au domaine central de nombreuses polymérases et cyclases d'acides nucléiques, et constitue la plus grande sous-unité des complexes effecteurs crRNA de type III. (Makarova *et al.*, 2015). Chaque locus de type III encode également d'autres sous-unités des complexes effecteurs, telles qu'un gène pour la petite sous-unité, un gène pour une protéine RAMP du groupe Cas5, et généralement plusieurs gènes pour les protéines RAMP du groupe Cas7 (Makarova et Koonin, 2015).

Actuellement, le type III comprend deux sous-types : III-A (anciennement appelé sous-type Mtube ou module Csm) et III-B (anciennement appelé module RAMP ou module Cmr), qui sont clairement apparentés mais peuvent être distingués par la présence de gènes distincts codant les petites sous-unités des complexes effecteurs, respectivement *csm2* et *cmr5*. Les loci du sous-type III-A possèdent souvent *cas1*,

cas2 et cas6 (Makarova *et al.*, 2013). Et ciblent l'ADN, tandis que la plupart des systèmes III-B manquent de ces gènes et dépendent donc d'autres systèmes CRISPR-Cas présents dans le même génome. Les systèmes CRISPR-Cas de type III-B ciblent l'ARN (Makarova et Koonin, 2015).

#### 4.1.3. Les systèmes de type IV :

Les systèmes CRISPR/Cas de type IV, retrouvés dans plusieurs génomes bactériens, souvent sur des plasmides, peuvent être représentés par le locus CRISPR-Cas d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 (opéron AFE\_1037-AFE\_1040). Similairement au sous-type III-A, ce système manque des gènes cas1 et cas2 et n'est souvent pas associé à des réseaux CRISPR (Makarova et Koonin, 2015). Les systèmes de type IV encodent un complexe effecteur crRNA multisubunités minimal prédit, composé d'une grande sous-unité partiellement dégradée, Csf1, Cas5 et en une seule copie Cas7, ainsi que, dans certains cas, une petite sous-unité putative ; csf1 peut servir de gène signature pour ce système (Makarova *et al.*, 2011).

Il existe deux variants distincts des systèmes CRISPR-Cas de type IV, dont l'un contient une hélicase de la famille DinG, et un second qui manque de DinG mais contient généralement un gène codant une petite protéine  $\alpha$ -hélicoïdale, qui est une sous-unité putative (Makarova *et al.*, 2011).

#### 4.2. Les systèmes CRISPR/Cas de classe 2 :

Les systèmes CRISPR/Cas de classe 2 sont définis par la présence d'un module effecteur crRNA à sous-unité unique. Cette classe inclut les systèmes CRISPR-Cas de type II, ainsi qu'une nouvelle classification putative, le type V (Makarova *et al.*, 2015).

##### 4.2.1. Les systèmes de type II :

Les systèmes CRISPR-Cas de type II diffèrent considérablement des types I et III, et sont de loin les plus simples en termes de nombre de gènes. Le gène signature pour le type II est cas9, qui code une protéine multidomaine combinant les fonctions du complexe effecteur crRNA avec le clivage de l'ADN cible (Jinek *et al.*, 2012), et

contribue également à l'adaptation (Heler *et al.*,2015). Chaque locus CRISPR-Cas de ce sous-type, en plus du gène *cas9*, contient également les gènes *cas1* et *cas2*, qui sont omniprésents (Makarova *et al.*,2015).

La grande protéine Cas9 (~800–1,400 acides aminés) contient deux domaines nucléasiques, à savoir la nucléase de type RuvC (structure RNase H) et le domaine nucléasique HNH (de type McrA) situé au milieu de la protéine (Makarova *et al.*,2011). Les deux nucléases sont nécessaires pour le clivage de l'ADN (Sapranaukas *et al.*,2011).

Les systèmes CRISPR-Cas de type II se divisent en trois sous-types distincts. Le sous-type II-A se caractérise par la présence d'un gène supplémentaire, *csn2*, codant une protéine formant des anneaux homotétramériques capables de se lier à l'ADN double brin via un site central. Bien que non essentiel pour l'interférence, Csn2 semble jouer un rôle mal défini dans l'intégration des espaceurs. Sa structure dérive d'un repliement de type P-loop ATPase, mais avec un site de liaison à l'ATP inactif. Le sous-type II-B, quant à lui, ne possède pas le gène *csn2* mais inclut un gène *Cas4*, appartenant à la famille des nucléases PDEDxK. *Cas4* présente une activité exonucléase 5' -single-stranded DNA, mais son rôle précis dans les mécanismes CRISPR-Cas reste inconnu. Enfin, le sous-type II-C, récemment décrit, est minimaliste, ne contenant que *cas1*, *cas2* et *cas9*, et est fréquent dans les génomes bactériens séquencés (Makarova et Koonin, 2015). Récemment, les systèmes de type II ont été développés en un outil puissant pour l'édition du génome et l'ingénierie génétique, offrant un potentiel biotechnologique majeur (Wei *et al.*,2013).

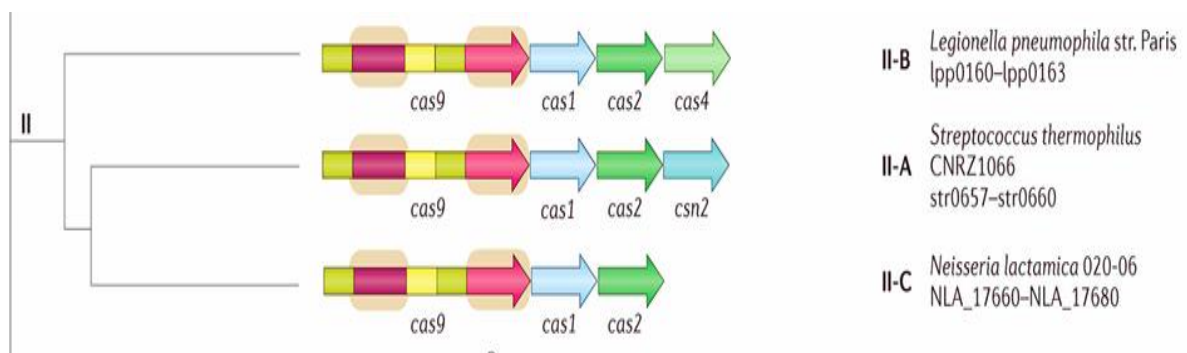


Figure 16. Architectures des loci génomiques pour les sous-types des systèmes CRISPR-Cas9(Makarova *et al.*, 2015).

#### 4.2.2. Les systèmes de type V :

Le gène *cpf1*, présent dans plusieurs génomes bactériens et un génome archéen, définit un cinquième type de système CRISPR-Cas (type V). *Cpf1* est une grande protéine (~1,300 acides aminés) avec un domaine RuvC-like, mais sans domaine HNH présent dans Cas9. Les systèmes de type V, classés dans la classe 2, ressemblent parfois aux sous-types II-B (avec Cas4) ou II-C (sans Cas4), et *cpf1* semble récemment recruté à partir d'éléments transposables (Makarova *et al.*, 2015).

### 5. Relation Structure-Activité :

#### 5.1. Protéines cas9 :

Les protéines Cas9 sont abondantes dans le règne bactérien, mais elles varient considérablement en termes de séquence et de taille. Toutes les enzymes Cas9 connues contiennent un domaine HNH qui clive le brin d'ADN complémentaire à la séquence d'ARN guide (brin cible), ainsi qu'un domaine nucléase RuvC nécessaire pour cliver le brin non complémentaire (brin non cible), entraînant des cassures double brin de l'ADN (DSBs). De plus, les enzymes Cas9 contiennent une région riche en arginine (Arg-rich) hautement conservée, qui a été précédemment suggérée pour médier la liaison aux acides nucléiques. Sur la base de l'architecture des loci CRISPR-Cas et de la phylogénie des séquences protéiques, les gènes Cas9 se regroupent en trois sous-familles : les types II-A, II-B et II-C. Les protéines Cas9 des sous-familles II-A et II-C contiennent généralement respectivement environ 1400 et 1100 acides aminés (Jinek *et al.*, 2014).

L'enzyme Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9), est la plus étudiée et la plus largement utilisée en ingénierie génomique. Il s'agit d'une grande endonucléase à ADN multifonctionnelle, composée de 1368 acides aminés (Jiang et Doudna, 2017).

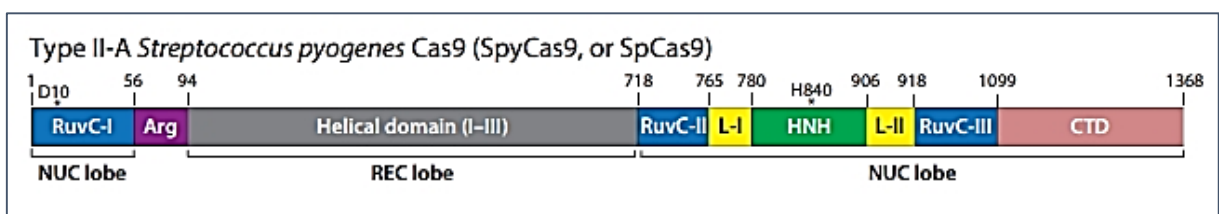


Figure 17. Gène codant *spCas9* (Jiang et Doudna, 2017).

### 5.1.1. Structure de Cas9 :

Les structures de Cas9 à l'état apo présentent deux lobes distincts : le lobe de reconnaissance (REC)  $\alpha$ -hélicoïdal et le lobe nucléasique (NUC) comprenant les domaines catalytiques conservés HNH et RuvC clivé, ainsi que le domaine C-terminal (CTD) plus variable. Ces deux lobes sont connectés par deux segments de liaison : une hélice pont riche en arginine et une région désordonnée (résidus 712–717).

Le lobe REC est constitué de trois domaines  $\alpha$ -hélicoïdaux (Hel-I, Hel-II et Hel-III) sans homologie structurale connue avec d'autres protéines. Le CTD allongé adopte également un repliement spécifique à Cas9 et contient les sites d'interaction avec le PAM, essentiels pour sa reconnaissance. Cependant, cette région de reconnaissance du PAM est largement désordonnée dans la structure apo-Cas9, indiquant que l'enzyme est maintenue dans une configuration inactive, incapable de reconnaître l'ADN cible avant sa liaison avec un ARN guide (Jiang et Doudna, 2017).

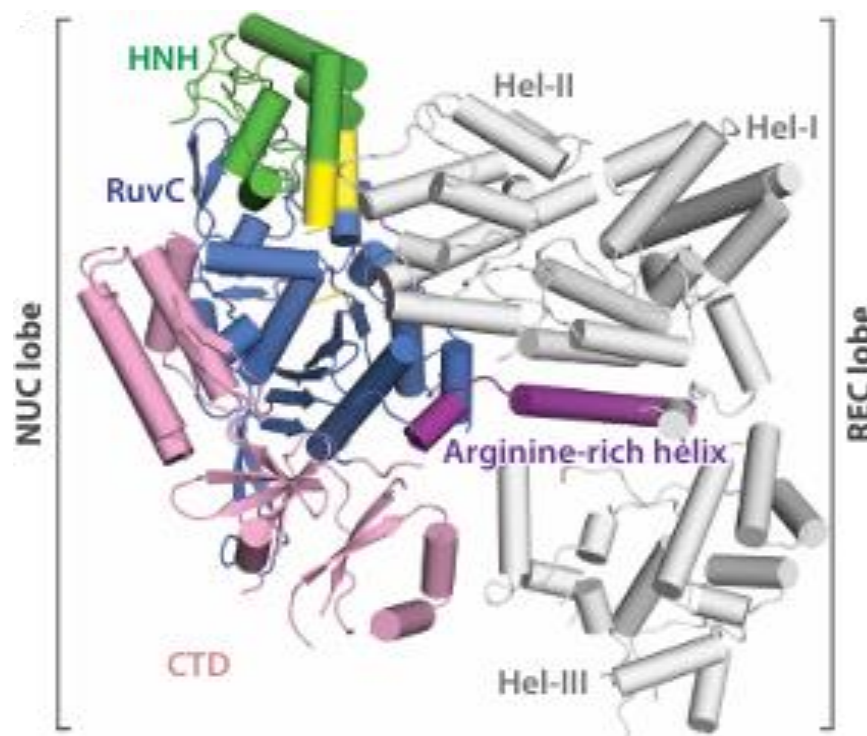


Figure 18. Structure globale de la Cas9 de Streptococcus pyogenes (SpyCas9) à l'état apo (Jiang et Doudna, 2017).

### 5.2. Structure et fonction de l'ARNg (crRNA-tracrRNA) :

Dans le système Cas9 de type II, le crRNA a une longueur de 42 nucléotides et contient une séquence unique de 20 nucléotides à son extrémité 5' qui peut former des interactions d'appariement de bases Watson-Crick avec la séquence cible (protospacer)(Jinek *et al.*,2012). Le tracrRNA a une longueur de 80 nucléotides et se lie à une séquence répétée de 22 nt à l'extrémité 3' du crRNA, formant une structure hybride double-ARN unique qui est essentielle pour le recrutement de la protéine Cas9 afin de former un complexe de surveillance de l'ADN actif (Xue et Greene, 2021). Cependant, le crRNA et le tracrRNA peuvent être fournis sous forme d'un sgRNA chimérique unique simplifié d'environ 100 nucléotides de longueur qui remplit toutes les fonctions du système double crRNA-tracrRNA présent dans la nature (Jinek *et al.*,2012). SgRNA se compose de trois régions principales 5' à 3' : le guide ARN - région de réplication de brin d'ADN cible où la base d'ARN s'apparie avec l'ADN cible, une antirépétition double face qui représente une région d'hybridation entre le crARN et le tracrARN, et des épitopes souches supplémentaires se trouvent dans le tracrRNA au locus CRISPR endogène(Wang *et al.*,2016). ; dans la suite, nous utiliserons le terme générique "gRNA" pour désigner soit le sgRNA unique, soit le système double tracrRNA-crRNA.

Pour les applications d'édition du génome, le gRNA peut être produit in situ ou ex situ(Yin *et al.*,2017). Par exemple, le gRNA peut être produit à l'intérieur de la cellule par transcription à partir d'un modèle plasmidique ou d'un ADN viral (par exemple, les virus adéno-associés (AAV), les adénovirus (AdV) et les lentivirus (LV), et le gRNA résultant se liera à la protéine Cas9 co-exprimée pour former le complexe actif Cas9-gRNA (Xue et Greene, 2021). Le gRNA peut également être produit ex situ par transcription in vitro ou synthèse chimique, et ces approches permettent un contrôle rigoureux de la livraison de Cas9, qui est réalisée soit par livraison directe du complexe Cas9-gRNA, soit par transfection transitoire des gRNAs dans des cellules exprimant la protéine Cas9 (Derdelinckx *et al.*,2016).

### 5.3. Assemblage du complexe-effecteur CRISPER-cas9 :

Une fois les crRNA-tracrRNA (ou l'ARNg) formés, ces derniers vont complexer avec la Cas9 pour former une RNP, unité capable d'activité endonucléasique dirigée par ARN (Cullot, 2019).

Lors de la liaison du guide crRNA-tracrRNA, les deux lobes structurels de Cas9 se réorientent de telle sorte que les deux fentes de liaison d'acide nucléique se font face. Cela génère un canal central de liaison à l'ADN, qui permet d'accéder à l'ADN dB. La liaison à l'ADN cible dans le canal central et la formation de boucles R (ou l'hybride ARN-ADN) dépendantes de PAM entraînent un autre réarrangement structural. Ici, le lobe du domaine de la nucléase subit une rotation supplémentaire par rapport au lobe  $\alpha$ -hélicoïdal, enfermant complètement la cible d'ADN, et les deux domaines de la nucléase engagent les deux brins d'ADN pour le clivage (Jinek *et al.*, 2014).

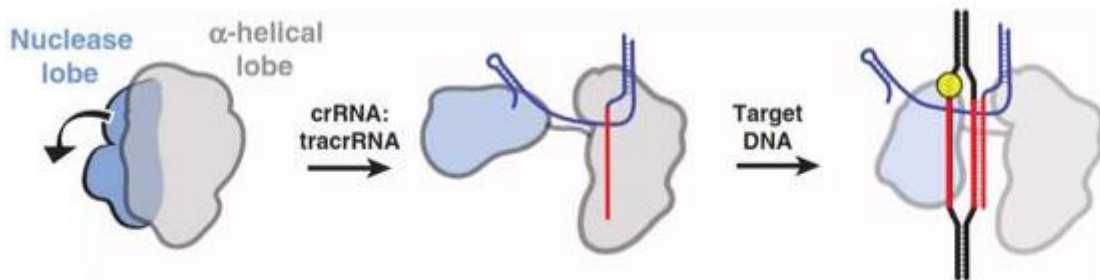


Figure 19. Illustration des réarrangements de la Cas9 après contact avec le guide ARN. En rouge : séquence ARN complémentaire à l'ADN cible et portion du double brin d'ADN contenant cette séquence complémentaire. En jaune : séquence PAM, en Noir double brin d'ADN non ciblé (Jinek *et al.*, 2014).

### 5.4. Recherche et reconnaissance de la cible :

Une fois que Cas9 est lié à son ARN guide, le complexe est prêt à rechercher des sites d'ADN cibles complémentaires (Jiang *et al.*, 2015). La recherche et la reconnaissance de la cible nécessitent à la fois un appariement de bases complémentaires entre la séquence « spacer » de 20 nucléotides et un protospacer dans l'ADN cible, ainsi que la présence d'une séquence PAM conservée adjacente au site cible (Gasiunas *et al.*,

2012 ; Jinek *et al.*, 2012). La séquence PAM est cruciale pour la discrimination entre l'ADN du soi et du non-soi (Marraffini et Sontheimer, 2010), et des mutations ponctuelles dans le PAM peuvent inhiber l'activité de clivage de Cas9 *in vitro* (Jinek *et al.*, 2012) et permettre aux bactériophages d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Bikard *et al.*, 2012 ; Jiang *et al.*, 2013).

Le PAM natif pour SpyCas9, couramment utilisé, est 5'-NGG-3', où N représente n'importe quelle base de l'ADN. Des expériences sur des molécules uniques ont montré que Cas9 initie le processus de recherche de la cible en sondant d'abord la présence d'une séquence PAM adéquate, avant d'interroger l'ADN adjacent pour une éventuelle complémentarité avec l'ARN guide (Sternberg *et al.*, 2014).

La reconnaissance de la cible se produit via des collisions tridimensionnelles : Cas9 se dissocie rapidement de l'ADN dépourvu de PAM approprié, tandis que le temps de résidence augmente en fonction de la complémentarité entre l'ARN guide et l'ADN adjacent lorsqu'un PAM adéquat est présent (Sternberg *et al.*, 2014 ; Ma *et al.*, 2016 ; Knight *et al.*, 2015).

Une fois qu'un site cible porteur du PAM approprié est identifié, Cas9 induit une dénaturation locale de l'ADN au niveau du site de nucléation adjacent au PAM, suivie par l'invasion du brin d'ARN qui forme un hybride ARN-ADN et un brin d'ADN déplacé (appelé boucle R, ou R-loop), s'étendant de l'extrémité proximale vers l'extrémité distale par rapport au PAM (Sternberg *et al.*, 2014 ; Szczelkun *et al.*, 2014).

Une complémentarité parfaite au sein de la région « seed » (région amorce) entre l'ARN guide et l'ADN cible est nécessaire pour le ciblage et le clivage de l'ADN par Cas9, tandis qu'un appariement imparfait dans la région « non-seed » est davantage toléré en ce qui concerne la spécificité de liaison (Wu *et al.*, 2014).

### **5.5. Clivage de cible :**

Lors de la formation de la boucle R(R-loop), la protéine Cas9 subit un changement conformationnel passant d'un état nucléase inactive à active, exposant ainsi le brin

d'ADN cible au site actif de la nucléase HNH (Xue et Greene,2021). Dans sa conformation active :

-Le domaine HNH coupe le brin cible de l'ADN 3 paires de bases en amont du motif PAM.

-Le domaine RuvC coupe le brin non cible à 3–5 paires de bases de distance (Jiang et Doudna,2017).

Les effets hors cible (off-target) lors de l'édition génomique par Cas9 résultent de sa capacité à tolérer des mismatches entre le gRNA et l'ADN cible potentiel (Xue et Greene,2021). Bien qu'un seul mismatch dans le PAM ou la région "seed" réduise l'activité de Cas9, plusieurs mismatches dans la région distale au PAM peuvent être tolérés (Jinek *et al.*,2012). Ces effets limitent les applications cliniques (Tsai et Joung, 2016).

Pour y remédier, des variantes haute-fidélité de Cas9 ont été développées :

eSpCas9(1.1) : Diminue les effets hors cible en affaiblissant les interactions avec le brin non cible, rendant les appariements partiels ADN-ARN moins stables (Slaymaker *et al.*, 2016).

SpCas9-HF1 : Réduit les interactions avec le brin cible (Kleinstiver *et al.*,2016).

HypaCas9 (mutations dans le domaine REC3) : Empêche l'activation de Cas9 en présence de mismatches (Xue et Greene,2021).

Les mutations du domaine REC3 améliorent aussi la fidélité de reconnaissance. Ces variants pourraient révolutionner les applications cliniques (Xue et Greene,2021).

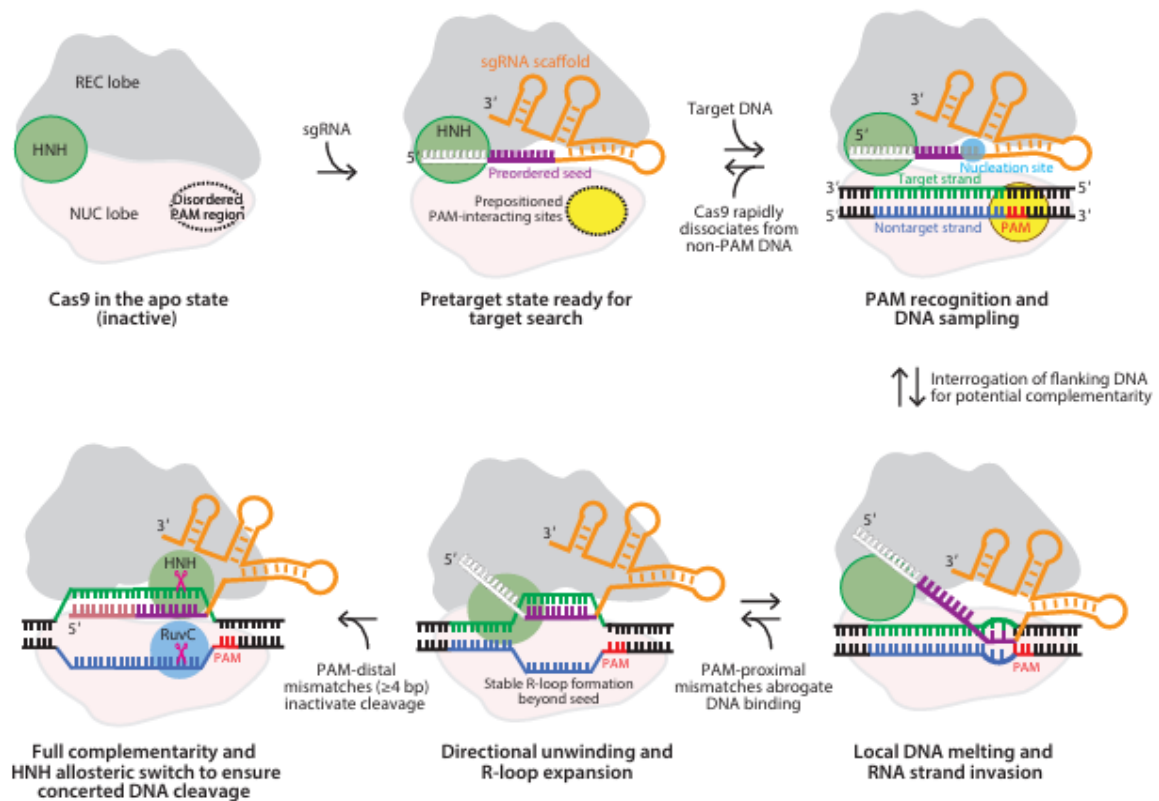


Figure 20. Représentations schématiques des mécanismes pour la reconnaissance et la coupure de l'ADN cible médiées par le système CRISPR-Cas9 (Jiang et Doudna, 2017).

## 6. Deux mécanismes de réparation de l'ADN :

La jonction d'extrémités non homologues (Non-Homologous End Joining, NHEJ) et la réparation dirigée par homologie (Homology-Directed Repair, HDR) sont les deux principaux mécanismes permettant de réparer les cassures double-brin (DSBs) induites par la protéine Cas-9 dans le système CRISPR/Cas-9 (Liu *et al.*, 2019).

**La NHEJ** répare les DSBs en reliant les fragments d'ADN via un processus enzymatique sans nécessiter d'ADN homologue exogène. Ce mécanisme est actif durant toutes les phases du cycle cellulaire. Bien qu'il s'agisse du principal et du plus efficace système de réparation cellulaire, il est sujet aux erreurs et peut entraîner des insertions ou délétions aléatoires (indels) au niveau du site de clivage. Ces

modifications peuvent générer des mutations par décalage du cadre de lecture (frameshift) ou des codons stop prématurés.

**La HDR**, en revanche, est un mécanisme extrêmement précis qui nécessite un modèle d'ADN homologue. Elle est principalement active durant les phases S tardive et G2 du cycle cellulaire. Dans l'édition génique par CRISPR, la HDR requiert une quantité importante d'ADN donneur exogène (50 à 2000 nucléotides) contenant la séquence d'intérêt. Ce mécanisme permet une insertion ou un remplacement précis du gène en intégrant une matrice d'ADN donneur présentant une homologie de séquence avec le site prédit de la cassure double-brin (Asmamaw et Zawdie, 2021).

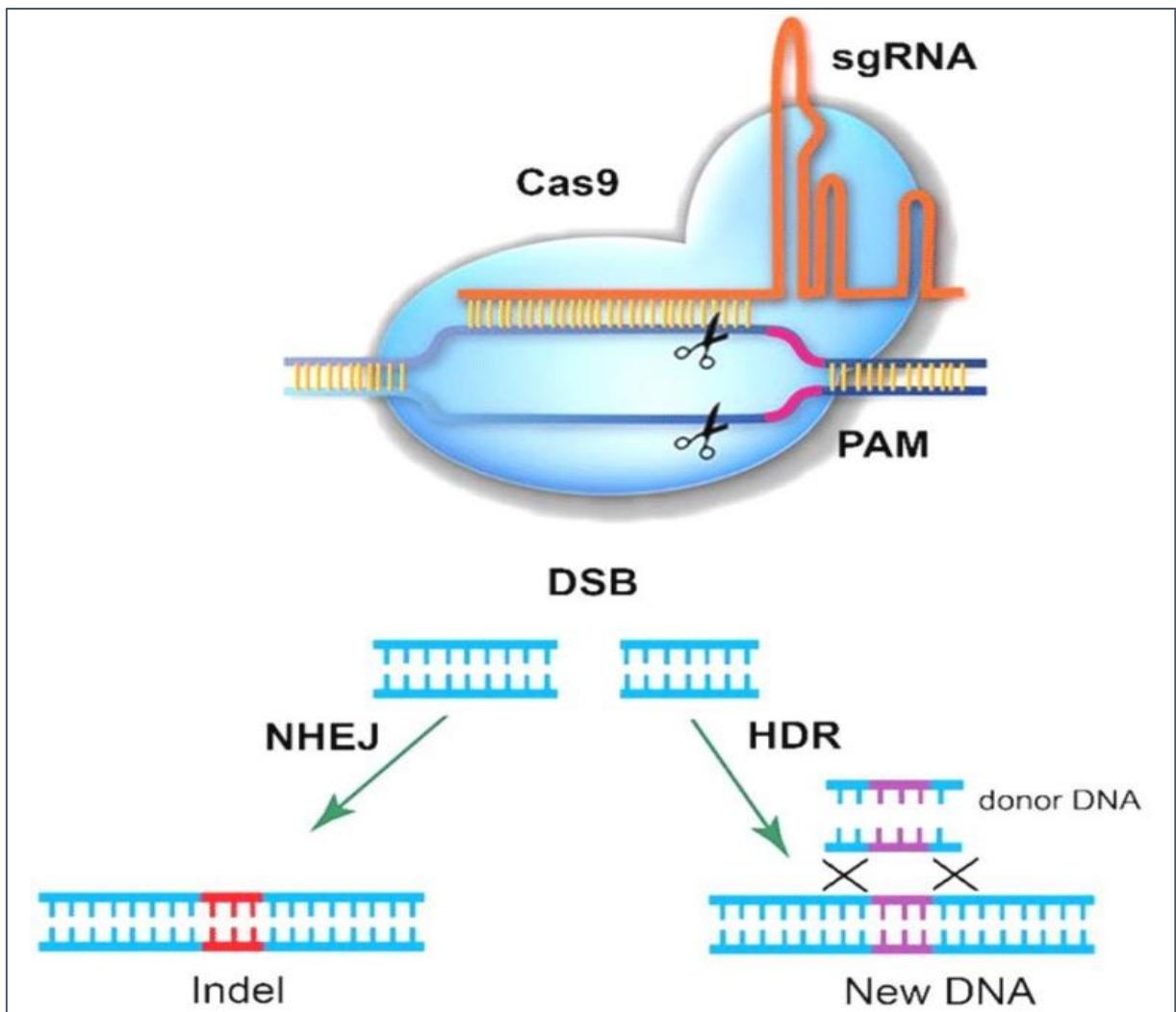


Figure 21. L'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9 (Zaynitdinova *et al.*, 2021).

## 7. Modification de la cas9 :

### 7.1. ncas9 ou cas9 nickase :

Le système CRISPR-Cas9 est un outil d'édition du génome puissant et révolutionnaire pour les génomes eucaryotes. Ici, nous avons étudié l'utilisation du système *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9 dans l'édition du génome de *Clostridium cellulolyticum*, un microorganisme modèle pour la recherche sur la bioénergie (Xu *et al.*, 2015).

Les ruptures double brin induites par Cas9 de type sauvage étaient mortelles pour *C. cellulolyticum* en raison de l'expression minimale de composants de jonction d'extrémité non homologues (NHEJ) dans cette souche. Pour contourner cette létalité, la nickase Cas9 qui découle de la mutation de l'un des deux domaines de nucléase Cas9 (domaine de nucléase HNH et domaine de nucléase de type RuvC) et clive un seul brin d'ADN, a été appliquée pour développer une stratégie de recombinaison homologue déclenchée par une seule entaille.

Cette stratégie permet :

- Une édition précise en une étape aux locus génomiques prévus en transformant un seul vecteur.
- Une efficacité d'édition élevée (>95%) même avec des bras homologues courts (0,2 kb).
- La délivrance de gènes étrangers dans le génome en une seule étape sans
- Une édition précise même sur deux sites cibles très similaires.
- Une densité de sites cibles très élevée (Wang *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2015).

Ces résultats démontrent qu'une stratégie de nickase appariée multiplex est efficace pour la modification de plusieurs gènes *in vivo*, avec un minimum de dommages. On

s'attend à ce que les nickases Cas9 induisent peu ou pas de dommages au génome (Shen et al.,2014)

### **7.2. dcas9 ou Dead cas9 :**

La dead Cas9 (dCas9) est également une autre variante mutée de SpCas9 où les domaines HNH et RuvC sont tous les 2 mutés (Figure 28). La dCas9 et son ARNg ne servent que pour le ciblage ADN spécifique. Ils sont fusionnés avec des domaines d'activation de la transcription, de répression, et d'édition de base pour créer des changements épigénétiques (activation ou répression du gene) et de bases dans le génome, plutôt que de créer des DSB (Gilbert *et al.*,2013; Perez-Pinera *et al.*,2013).

Le système CRISPR dead-Cas9 est incapable d'effectuer des DSB, mais va être utilisé afin de véhiculer différentes molécules à des endroits précis du génome grâce au ciblage par l'ARNg. Ses principales utilisations sont l'activation ou la répression d'un gène d'intérêt. On peut aussi visualiser la présence d'une séquence ADN particulière via un système rapporteur, comme la GFP par exemple, pour évaluer l'efficacité d'une thérapie génique dans le cadre d'une transduction d'un L.V intégratif contenant le gène sain (boutin, 2021).

### **8. Stratégie de formulation :**

Pour l'édition du génome, plusieurs méthodes de formulation du système CRISPR-Cas9 existent. La plus simple utilise un vecteur plasmidique codant à la fois pour Cas9 et l'ARNsg, permettant la formation du complexe sgRNA-Cas9 directement dans les cellules. Une deuxième approche combine l'ARNm de Cas9 avec l'ARNsg ; après traduction de l'ARNm en protéine Cas9, le complexe actif se forme. La troisième stratégie consiste à délivrer directement un complexe sgRNA-Cas9 préassemblé in vitro à la cellule (Tiruneh et al., 2021). Ces systèmes CRISPR/Cas9 présentent l'avantage d'un ciblage génétique facilité. Deux composants sont essentiels : une version optimisée de l'endonucléase Cas9 et les ARN crRNA et tracrRNA. Le crRNA, d'environ 20 nucléotides, inclut une séquence PAM de 2 pb à l'extrémité 3' (GG ou AG). Il peut être conçu selon le brin cible de l'ADN, et sa séquence peut être fusionnée à celle du tracrRNA dans un sgRNA. Des vecteurs

exprimant Cas9 et sgRNA à partir d'un même plasmide sont disponibles via Addgene<sup>1</sup>. Une bibliothèque génomique peut être générée en clonant des oligonucléotides courts dans ces vecteurs CRISPR, en utilisant soit Cas9 sauvage, soit des variantes telles que la nickase ou la Cas9 inactive. De nombreux protocoles gratuits existent pour la structuration des plasmides et le sous-clonage. Des systèmes automatisés ont aussi été développés pour le clonage à grande échelle, notamment dans la génération de bibliothèques de shARN (Heintze *et al.*, 2013).

### 9. Mécanisme de livraison :

La délivrance d'acides nucléiques, en particulier du système CRISPR-Cas9, au tissu ou à la cellule cible demeure un défi majeur. Deux grandes stratégies sont utilisées : les approches physiques et les approches vectorielles (virales ou non virales). Parmi les méthodes physiques, on retrouve l'électroporation, les micro-injections ainsi que la livraison hydrodynamique. Du côté des vecteurs viraux, les virus adénoassociés (AAV) sont largement utilisés en raison de leur caractère non pathogène et de leur capacité à infecter aussi bien les cellules en division que non divisantes. Des recherches sont également en cours sur l'utilisation de lentivirus dotés d'enzymes intégrases inactives (Tiruneh *et al.*, 2021).

Une autre méthode prometteuse est la lipofection, c'est-à-dire la transfection via des nanoparticules à base de lipides. Cette technologie, considérée comme l'une des plus efficaces pour l'administration de CRISPR-Cas9 *in vivo*, fait actuellement l'objet d'essais cliniques (Tiruneh *et al.*, 2021).

Les vecteurs non viraux, quant à eux, présentent plusieurs avantages par rapport aux vecteurs viraux et font l'objet d'un intérêt croissant dans la recherche. Parmi ces systèmes figurent les nanoparticules lipidiques, les peptides pénétrants (CPP), les nanoclews d'ADN ainsi que les nanoparticules d'or (Lino *et al.*, 2018). Les méthodes citées ici représentent les principales approches actuellement utilisées en laboratoire.

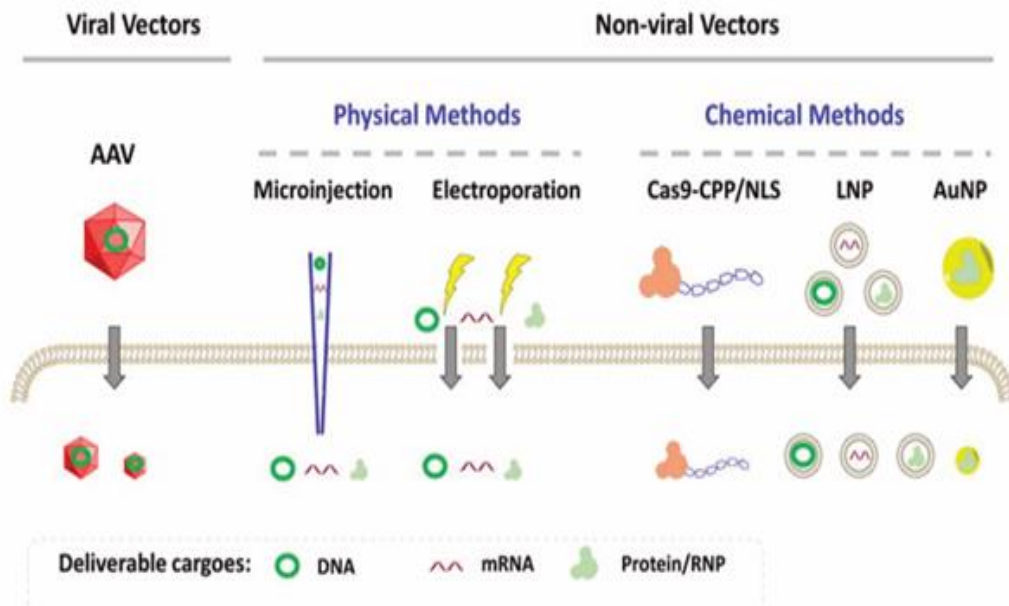


Figure 22. Les différentes formes de Cas9 et leur vectorisation (Julian, 2021).

### 10. Les avantages de CRISPR-Cas9 :

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

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



## **CHAPITRE III.**

# **Etude de cas d'application du système CRISPR/Cas9**

**Introduction :**

Le système CRISPR-Cas9 a transformé la thérapie génique en permettant une modification ciblée et efficace du génome. Cette technologie offre de nouvelles opportunités pour traiter une large gamme de maladies, incluant des pathologies génétiques, des cancers et des troubles neurodégénératifs.

Les applications principales concernent la correction des mutations génétiques responsables de maladies héréditaires, l'ingénierie des cellules immunitaires pour renforcer leur capacité à combattre les tumeurs, ainsi que l'exploration de traitements pour des maladies complexes telles que la maladie de Huntington et l'amyotrophie spinale (Wang et al., 2024).

Les avancées récentes montrent également une amélioration de la précision et de la sécurité des interventions basées sur CRISPR-Cas9, renforçant son potentiel thérapeutique tout en soulignant l'importance de poursuivre les études cliniques pour évaluer les effets à long terme (Zhao et al., 2023).

**1. Le cancer du poumon :****1.1 La définition de la maladie :**

Le cancer du poumon est une prolifération maligne des cellules épithéliales des voies respiratoires inférieures, représentant l'une des principales causes de mortalité liée au cancer dans le monde. Il existe deux types histologiques principaux : le carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC), qui représente environ 85 % des cas, et le carcinome pulmonaire à petites cellules (CPPC), plus agressif mais moins fréquent, représentant environ 15 % des cas (Siegel et al., 2024 ; Duma et al., 2019). Le CPNPC comprend principalement l'adénocarcinome, le carcinome épidermoïde et le carcinome à grandes cellules (Travis et al., 2015). Le tabagisme est reconnu comme le facteur de risque dominant, responsable de la majorité des cas de cancer du poumon (Islami et al., 2015).

### 1.2 Patient traité :

La première application clinique de la technologie CRISPR-Cas9 chez l'humain a été réalisée en Chine en 2016. Une équipe dirigée par le professeur Lu You à l'hôpital West China de l'université du Sichuan a mené un essai clinique (NCT02793856) sur des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) réfractaire.

### 1.3 La méthode utilisée :

Dans le cadre de l'essai clinique pionnier mené en Chine en 2016, les chercheurs ont appliqué la technologie CRISPR-Cas9 pour modifier génétiquement les lymphocytes T de patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules en phase avancée. La procédure commence par une leucaphérèse, une technique permettant de collecter spécifiquement les lymphocytes T du sang du patient. Ces cellules immunitaires sont ensuite isolées en laboratoire et soumises à un processus d'édition génétique : à l'aide du complexe CRISPR-Cas9, le gène PDCD1, qui code la protéine PD-1, est ciblé et désactivé. Cette protéine joue normalement un rôle régulateur de la réponse immunitaire en inhibant l'activation excessive des lymphocytes T ; cependant, les cellules cancéreuses exploitent ce mécanisme pour échapper à la détection immunitaire. En supprimant PD-1, les cellules T deviennent capables de reconnaître et d'attaquer plus efficacement les cellules tumorales.

Après l'édition génétique, les cellules T modifiées sont soumises à un processus d'expansion in vitro, permettant de produire une quantité suffisante de cellules pour un traitement thérapeutique. Ces cellules sont ensuite réinjectées dans le patient par voie intraveineuse. Contrairement à certaines approches utilisant des cellules souches hématopoïétiques, cette méthode se base exclusivement sur des cellules T matures. Ce traitement vise à renforcer la réponse immunitaire du patient de manière spécifique contre sa tumeur, tout en réduisant le risque de rejet ou de réaction auto-immune, car les cellules utilisées proviennent du propre système immunitaire du patient (Lu et al., 2020).

#### **1.4 Les résultats de la thérapie :**

Les résultats ont démontré que ce traitement était bien toléré, sans événements indésirables graves attribuables aux cellules modifiées. Aucun signe de tempête cytokinique (CRS) ou de neurotoxicité n'a été observé. Les effets secondaires signalés étaient modérés, notamment de la fatigue et de la fièvre légère, et ont été facilement contrôlés (Lu et al., 2020).

Sur le plan de l'efficacité de l'édition génétique, le taux de délétion du gène PD-1 variait entre 5 % et 45 % des cellules T réinjectées. Les analyses génomiques approfondies n'ont révélé aucune mutation hors cible significative, ce qui confirme la précision relative de CRISPR dans un contexte clinique (Lu et al., 2020).

Concernant la réponse clinique, bien que seuls trois patients aient été analysés de manière approfondie, les résultats sont encourageants. Deux d'entre eux ont présenté une stabilisation de la maladie, indiquant que la taille des tumeurs est restée stable sans progression significative pendant plusieurs semaines après l'infusion. Chez l'un des patients, une réduction partielle du métabolisme tumoral a été observée par TEP scan, traduisant une activité immunologique positive des cellules modifiées. Aucun patient n'a cependant connu de rémission complète, ce qui souligne la nécessité d'améliorer l'efficacité fonctionnelle de cette approche, notamment par une optimisation du taux d'édition ou une combinaison avec d'autres formes d'immunothérapie (Lacey et Fraietta, 2020 ; Lu et al., 2020).

Enfin, les cellules T modifiées ont persisté dans le sang des patients jusqu'à sept mois après l'infusion, ce qui démontre une bonne survie cellulaire et un potentiel thérapeutique prolongé (Lu et al., 2020).

## **2. La drépanocytose (DC) :**

### **2.1 Définition de la maladie :**

La drépanocytose (DC) est une maladie sanguine héréditaire caractérisée par la production de molécules d'hémoglobine anormales qui provoquent la déformation des globules rouges en forme de croissant ou de faucille.

Cette affection touche des millions de personnes dans le monde. La DC a un impact considérable sur la santé et la qualité de vie des personnes atteintes.

La cause principale de la DC est une mutation du gène responsable de la fabrication de l'hémoglobine, connu sous le nom de gène de la bêta-globine (HBB). Cette mutation génétique conduit à la production d'une hémoglobine anormale appelée hémoglobine S (HbS), qui diffère de l'hémoglobine adulte normale (HbA) par sa structure moléculaire. L'HbS rend les globules rouges rigides et collants, entraînant leur déformation et une capacité réduite à circuler dans les petits vaisseaux sanguins. La forme altérée des globules rouges contribue aux diverses complications de santé associées à la DC.

Les manifestations cliniques de la DC sont variées et peuvent différer en gravité selon les individus. Le symptôme caractéristique est la survenue récurrente d'épisodes de douleur intense, appelés crises vaso-occlusives, qui résultent de l'obstruction du flux sanguin dans les petits vaisseaux par les globules rouges falciformes. La fatigue, l'anémie et la susceptibilité accrue aux infections sont également des symptômes fréquents de la DC (Elendu *et al.*, 2023)

## **2.2 Patient traité :**

En 2019, Victoria Gray, une Américaine âgée de 34 ans originaire du Mississippi, est devenue la première patiente au monde à recevoir un traitement basé sur l'édition génique CRISPR/Cas9 pour soigner la drépanocytose (Frangoul *et al.*, 2021).

## **2.3 La méthode utilisée :**

La thérapie génique développée repose sur l'utilisation du système CRISPR/Cas9 dans un protocole *ex vivo*, où les cellules du patient sont modifiées en dehors de son corps avant d'être réintroduites. Le processus commence par une collecte des cellules souches hématopoïétiques autologues, prélevées directement chez le patient. Ces cellules sont ensuite mises en culture en laboratoire.

L'objectif de la modification génétique est de désactiver un élément régulateur spécifique (enhancer) du gène BCL11A, situé dans les cellules érythroïdes. BCL11A est un facteur de transcription qui supprime naturellement l'expression de

l'hémoglobine fœtale (HbF) après la naissance. Chez les patients atteints de drépanocytose, la mutation dans le gène HBB conduit à la production d'une hémoglobine anormale appelée HbS, qui cause la déformation des globules rouges. Or, l'expression réactivée de l'HbF peut compenser cette anomalie car l'HbF ne porte pas la mutation responsable de la falciformation des cellules.

En utilisant CRISPR/Cas9, une coupure double brin est induite précisément dans la région enhancer de BCL11A. Cette coupure est réparée par les mécanismes naturels de la cellule (NHEJ – non-homologous end joining), ce qui entraîne des mutations qui diminuent fortement voire abolissent l'activité du gène dans les précurseurs érythroïdes. Ainsi, les cellules corrigées reprennent la production de HbF à des niveaux significatifs.

Après l'étape d'édition génomique, les cellules sont amplifiées, puis réinjectées au patient par voie intraveineuse. Avant la réinjection, le patient reçoit un traitement de conditionnement par chimiothérapie, destiné à libérer de l'espace dans la moelle osseuse afin de permettre aux cellules modifiées de s'y implanter durablement. Cette implantation permet la production continue de globules rouges exprimant l'hémoglobine fœtale, réduisant ainsi les effets pathologiques liés à la drépanocytose (Frangoul *et al.*, 2021).

#### **2.4 Les résultats de la thérapie :**

Les résultats obtenus chez Victoria Gray ont marqué un tournant majeur dans l'histoire de la médecine génomique. Avant le traitement, elle subissait en moyenne sept à dix crises vaso-occlusives par an, des épisodes douloureux extrêmement invalidants qui nécessitaient souvent des hospitalisations et des traitements opioïdes.

Après l'administration de CTX001 (nom de code de l'édition CRISPR utilisée), les cellules souches hématopoïétiques modifiées ont été réinjectées après un conditionnement intensif. Dès les premiers mois, la production d'hémoglobine fœtale (HbF) a augmenté rapidement, atteignant près de 47 % de l'hémoglobine totale dans son sang au bout d'un an. Par ailleurs, près plus de 80 % de ses globules rouges

contenaient exclusivement de l'HbF, ce qui a empêché la formation de cellules falciformes (Frangoul *et al.*, 2021).

Sur une période de 36 mois de suivi, Victoria Gray n'a connu aucune crise vaso-occlusive, aucun besoin d'hospitalisation lié à sa maladie, et n'a plus eu besoin de transfusions sanguines. Son taux d'hémoglobine total est passé de 7 g/dL à plus de 12 g/dL, ce qui correspond à une normalisation presque complète de son état hématologique (Vertex Pharmaceuticals & CRISPR Therapeutics, 2023).

Au-delà des chiffres, l'amélioration de sa qualité de vie a été considérable : elle a pu reprendre une vie active, voyager, prendre soin de ses enfants, et témoigner publiquement de son parcours, devenant ainsi une ambassadrice mondiale du potentiel de CRISPR (Matloff, 2023).

Ces résultats ne sont pas limités à un cas unique : dans l'étude clinique CLIMB-121, 31 patients atteints de drépanocytose ont été traités avec CTX001. Tous ont montré des résultats similaires, avec une disparition complète des crises chez 29 d'entre eux au moment du dernier suivi, et des niveaux stables et élevés d'HbF (Frangoul *et al.*, 2021).

Cependant, comme tout traitement de thérapie génique, cette intervention n'est pas sans risques. Le protocole a nécessité un conditionnement myéloablatif à base de busulfan, une chimiothérapie intense permettant de faire place aux cellules modifiées dans la moelle osseuse. Cette étape est associée à des effets secondaires significatifs, notamment :

- Nausées, vomissements, perte de cheveux et fatigue sévère.
- Risques d'infections en raison de la suppression temporaire du système immunitaire.
- Stérilité potentielle, un effet indésirable bien connu des traitements myéloablatifs.

- Dans certains cas, une cytopénie prolongée (diminution prolongée des cellules sanguines) a été observée, nécessitant des suivis réguliers (Frangoul *et al.*, 2021).

### 3. La $\beta$ -thalassémie dépendante des transfusions (TDT) :

#### 3.1 Définition de la maladie :

La  $\beta$ -thalassémie dépendante des transfusions (TDT) est l'une des maladies monogéniques les plus fréquentes dans le monde, en particulier dans les régions de la Méditerranée orientale, d'Asie du Sud-Est et du sud de la Chine, avec environ 60 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Cette maladie est causée par des mutations dans le gène HBB (gène de la  $\beta$ -globine), qui entraînent une production réduite ( $\beta^0$ ) ou absente ( $\beta^-$ ) de la chaîne  $\beta$ -globine.

Le déséquilibre résultant entre la production de chaînes  $\beta$ -globine et  $\alpha$ -globine conduit à une accumulation de chaînes  $\alpha$  non appariées. Ces chaînes  $\alpha$  excédentaires forment des agrégats qui précipitent et endommagent les membranes des globules rouges, entraînant leur hémolyse intravasculaire et contribuant à une érythropoïèse inefficace.

Cliniquement, les patients atteints de TDT souffrent d'une anémie chronique sévère nécessitant des transfusions régulières et à vie de globules rouges ainsi qu'une thérapie de chélation du fer afin d'éviter les complications liées à la surcharge en fer.

Bien que la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques (HSCT) à partir d'un donneur compatible HLA puisse offrir un traitement curatif, cette approche reste limitée par le manque de donneurs compatibles et par les risques associés à la transplantation, notamment la mortalité liée à la greffe, l'échec de la greffe, et la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) (Li *et al.*, 2024).

La disruption de l'activateur érythroïde du gène BCL11A par le système CRISPR-Cas9 entraîne une diminution de l'expression de BCL11A et une induction de la production de globine  $\gamma$  fœtale, constituant ainsi une stratégie thérapeutique prometteuse pour le traitement de la bêta-thalassémie majeure (TDT) dépendante des transfusions.

### 3.2 La méthode utilisée :

Des cellules souches hématopoïétiques CD34+ autologues ont été mobilisées et prélevées chez dix patients atteints de bêta-thalassémie majeure (TDT). Quatre patients ont été inclus dans un essai clinique de phase I/II sponsorisé (NCT05577312), et six patients ont participé à des études cliniques de phase I/II menées par des investigateurs (NCT04211480, NCT04205435). Les cellules recueillies ont été soumises à une édition génique ex vivo par la technologie CRISPR-Cas9, ciblant l'élément régulateur érythroïde +58 kb du gène BCL11A, afin de réprimer son expression dans les progéniteurs érythroïdes et d'induire une réactivation de la production d'hémoglobine fœtale (HbF).

Après l'édition, les cellules génétiquement modifiées ont été réinjectées aux patients à l'issue d'un conditionnement myéloablatif par busulfan, permettant leur engraftment et la restauration d'une érythropoïèse efficace.

Le suivi post-thérapeutique a permis d'évaluer les effets indésirables, le délai d'engraftment des neutrophiles et des plaquettes, ainsi que les marqueurs d'efficacité clinique, incluant la proportion de patients atteignant une indépendance transfusionnelle (TI), les niveaux d'hémoglobine totale et d'HbF, ainsi que la proportion de globules rouges exprimant l'HbF dans le sang périphérique. L'indépendance transfusionnelle a été définie par l'absence de transfusions au-delà de 42 jours après la dernière transfusion, avec un taux d'hémoglobine supérieur à 90 g/L (Zheng et al., 2023).

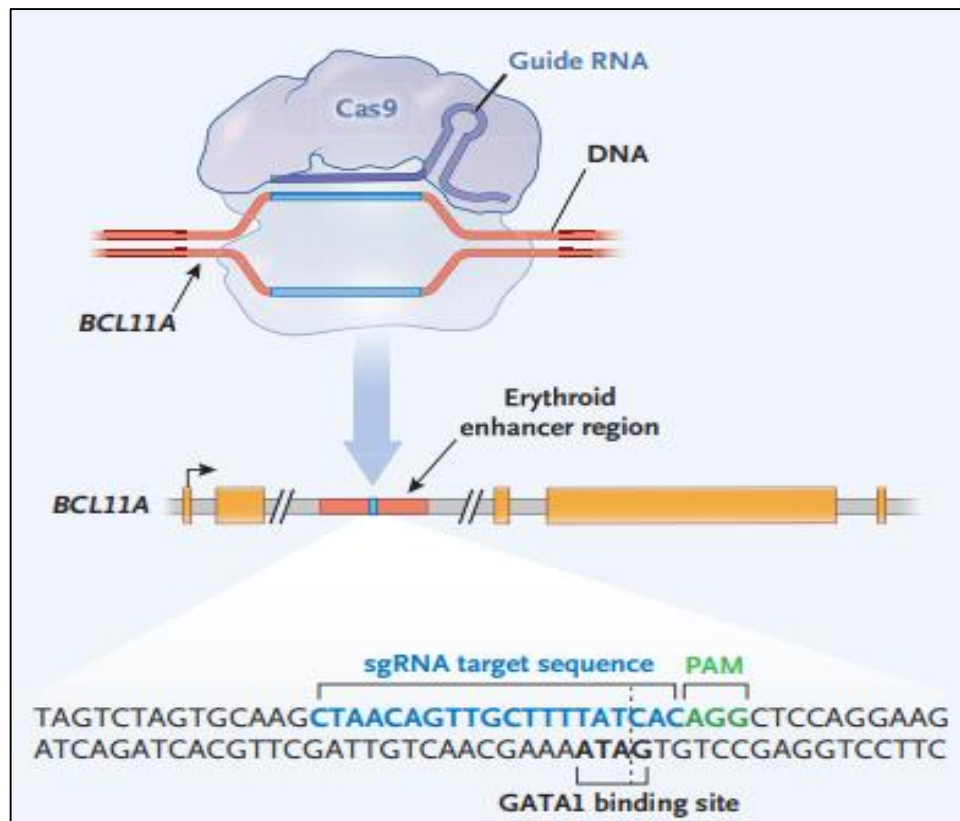


Figure 23. Ciblage du site d'édition (Frangoul et al., 2021).

### 3.3 Les résultats de la thérapie :

Entre le 15 octobre 2019 et le 20 novembre 2022, dix patients atteints de bêta-thalassémie majeure (TDT) ont été inclus et ont reçu le traitement par BRL-101. L'âge médian des patients était de 12,4 ans (intervalle : 6 à 26 ans). Parmi les patients traités, cinq présentaient un génotype  $\beta^0/\beta^0$ , quatre avaient un génotype  $\beta^0/\beta^+$  et un patient présentait un génotype  $\beta^+/\beta^+$ . Au 20 juillet 2023, la durée médiane de suivi était de 24,6 mois (intervalle : 4,3 à 39,2 mois).

Tous les patients inclus (10/10) ont atteint une indépendance transfusionnelle (TI). La durée médiane de l'indépendance transfusionnelle était de 22,1 mois (intervalle : 1,3 à 37,2 mois), avec une durée maximale observée de 37,2 mois. Les concentrations d'hémoglobine fœtale (HbF) variaient de 2,3 à 140,7 g/L, tandis que les niveaux d'hémoglobine totale allaient de 105,7 à 149 g/L. Six mois après l'infusion de BRL-101, la proportion de globules rouges exprimant l'HbF dans le sang périphérique atteignait 96,5 %, avant de continuer à augmenter pour se stabiliser autour de 98-99 %.

Les effets indésirables liés au traitement étaient principalement ceux classiquement associés au conditionnement myéloablatif et à la greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques, se manifestant principalement par des toxicités hématologiques. Trois patients ont présenté des effets indésirables (EI) de grade  $\geq 3$  considérés comme liés à BRL-101. Par ailleurs, quatre patients ont développé des effets indésirables graves (EIG), incluant une thrombopénie, un état de choc, des infections fébriles, des infections des tissus mous et une maladie veino-occlusive hépatique. Seule la thrombopénie a été jugée potentiellement liée à BRL-101, tandis que les autres EIG étaient attribués au traitement par busulfan. Tous les effets indésirables graves ont été résolus, et aucun décès ou arrêt de traitement lié au médicament n'a été rapporté au cours de l'étude.

En conclusion, quel que soit le génotype ( $\beta^0/\beta^0$  ou non- $\beta^0/\beta^0$ ), BRL-101 a induit une augmentation rapide et durable de l'hémoglobine totale et de l'HbF. Son profil de tolérance reste conforme à celui du conditionnement myéloablatif et de la greffe autologue. Les données récentes confirment les résultats antérieurs et soutiennent son potentiel en tant que traitement curatif pour la bêta-thalassémie transfusion-dépendante (TDT) (Zheng et al., 2023).

#### **4. Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) :**

##### **4.1 Définition de la maladie :**

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie systémique causée par l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dont le type le plus courant est le VIH-1. Le VIH cible et détruit les lymphocytes T CD4+ (cellules T auxiliaires), qui coordonnent la réponse immunitaire en stimulant d'autres cellules immunitaires comme les lymphocytes CD8+ et les macrophages afin de lutter contre l'infection (Zhang et al., 2023).

Des études ont montré que l'éradication à long terme du VIH-1 peut être obtenue après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSPCs) portant une mutation naturelle du gène CCR5, un corécepteur clé pour l'entrée du virus. Inspirés par ces résultats, des chercheurs ont utilisé un système CRISPR sans virus pour désactiver artificiellement CCR5 dans des HSPCs humaines avec une efficacité

de 27 %. Transplantées dans un modèle animal, ces cellules ont généré un système immunitaire résistant au VIH-1. Cette stratégie a ensuite été appliquée à un patient atteint du VIH-1 et de leucémie aiguë lymphoblastique (Xu et al., 2019).

#### **4.2 Patient traité :**

Un homme de 27 ans, atteint du VIH-SIDA et d'une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL-T), a reçu un traitement antirétroviral efficace et six cures de chimiothérapie, obtenant une rémission complète.

En juillet 2017, il a bénéficié d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, combinant des cellules CD34+ éditées par CRISPR (modification du gène CCR5 pour bloquer l'entrée du VIH) et des cellules non éditées.

Des traitements immunosuppresseurs ont été administrés pour prévenir et traiter la maladie du greffon contre l'hôte.

#### **4.3 La méthode utilisée :**

Chez ce patient atteint de VIH et de leucémie aiguë lymphoblastique, le traitement par CRISPR-Cas9 a consisté à isoler les cellules souches hématopoïétiques CD34+ d'un donneur HLA-compatible, puis à modifier leur gène CCR5 ex vivo en les cultivant dans un milieu sans sérum pendant 48 heures avant de les transfecter avec un complexe ribonucléoprotéique formé de la protéine Cas9 et de deux ARN guides spécifiquement conçus pour cibler le locus CCR5 ; après cette étape de modification, les cellules ont été réinjectées au patient en combinaison avec les cellules non modifiées, avec un suivi par séquençage (Sanger, séquençage profond et séquençage du génome complet) afin d'évaluer l'efficacité de l'édition génétique et de détecter les effets hors-cible éventuels.

#### **4.4 Les résultats de la thérapie :**

Le patient a montré une prise de greffe réussie, avec une reconstitution des neutrophiles (J13), des plaquettes (J27), et des lymphocytes (CD4+ à  $592,94 \times 10^6/L$  à 6 mois). Une rémission complète de la leucémie aiguë lymphoblastique a été obtenue et maintenue pendant 19 mois, avec une maladie résiduelle minimale

indétectable et une expression normale du gène WT1. L'efficacité de l'édition génique de CCR5 était d'environ 17,8 % dans les cellules souches greffées, et une persistance de l'édition (5-8 %) a été observée dans les lignées hématopoïétiques (CD4+, CD8+, CD19+, CD33+, CD235a+).

Sur le plan de la sécurité, aucun effet indésirable lié à l'édition du gène CCR5 n'a été détecté. Les effets indésirables notés étaient liés au conditionnement et aux complications habituelles post-greffe (neutropénie fébrile, infection bactérienne, GvHD cutané léger, réactivation du CMV et de l'herpès). Aucun effet hors-cible significatif ou réarrangement chromosomique n'a été observé par séquençage à haut débit après 19 mois.

Cependant, une interruption contrôlée du traitement antirétroviral (ARV) a été tentée à 7 mois post-greffe. Cela a entraîné une reprise rapide de la charge virale ( $3 \times 10^4$  copies/mL en 4 semaines) et une baisse des lymphocytes CD4+, nécessitant la reprise de la trithérapie. Après reprise, la charge virale est redevenue indétectable.

En conclusion, le traitement a permis une greffe réussie et une rémission durable de la leucémie, mais n'a pas suffi à éradiquer le réservoir viral du VIH, ni à contrôler l'infection sans traitement antirétroviral (Xu et al., 2019).

## **5. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires :**

### **5.1 Définition de la maladie :**

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires sont des maladies mendéliennes causées par des mutations pathogènes dans plus de 280 gènes, entraînant la dysfonction et la mort des photorécepteurs, ce qui provoque une déficience visuelle. Les mutations du gène CEP290 sont la cause la plus fréquente de cécité rétinienne génétique chez l'enfant, notamment dans la maladie historiquement appelée amaurose congénitale de Leber. La variante intronique c.2991+1655A→G (IVS26), qui provoque l'insertion d'un exon cryptique dans l'ARNm de CEP290, est retrouvée chez jusqu'à 77 % des patients atteints aux États-Unis.

Cette mutation altère l'expression d'une protéine essentielle au bon fonctionnement des cils sensoriels des photorécepteurs. Il n'existe actuellement aucun traitement

approuvé pour cette pathologie, bien que plusieurs approches expérimentales soient en cours, telles que l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou de versions miniaturisées du gène CEP290.

Le traitement EDIT-101 est une thérapie génique fondée sur l'édition génomique CRISPR-Cas9, visant à supprimer définitivement la mutation IVS26. Il utilise un vecteur viral AAV5 ciblant spécifiquement les photorécepteurs, transportant un gène Cas9 dérivé de *Staphylococcus aureus* et deux ARN guides. L'étude BRILLIANCE a évalué la sécurité et l'efficacité de ce traitement par une dose unique croissante chez des patients porteurs homozygotes ou hétérozygotes composites de la mutation IVS26 (Pierce et al., 2024).

### **5.2 La méthode utilisée :**

Un essai clinique de phase 1–2, ouvert et à doses croissantes, a été mené chez des patients âgés de 3 ans ou plus, porteurs de formes homozygotes ou hétérozygotes composées du variant IVS26. Une seule injection sous-rétinienne d'EDIT-101 a été administrée dans l'œil le plus atteint. Les objectifs principaux de l'étude étaient d'évaluer la sécurité du traitement, les effets indésirables et la toxicité limitant la dose. Les critères secondaires incluaient l'acuité visuelle corrigée, la sensibilité rétinienne mesurée par test de stimulus lumineux en champ complet (FST), la mobilité (test Ora) et la qualité de vie visuelle évaluée par des questionnaires spécifiques (NEI VFQ-25 pour les adultes, ou le Children's Visual Function Questionnaire pour les enfants).

### **5.3 Les résultats de la thérapie :**

Douze participants âgés de 17 à 63 ans (âge médian : 37 ans) ont reçu EDIT-101 : deux à faible dose, cinq à dose intermédiaire, et cinq à forte dose. Deux enfants (9 et 14 ans) ont été traités à la dose intermédiaire. Au départ, l'acuité visuelle corrigée médiane était de 2,4 logMAR. Aucun effet indésirable grave ou lié au traitement n'a été observé. Six participants ont montré une amélioration significative de la vision nocturne évaluée par le FST, dont cinq avec une amélioration dans au moins un autre critère secondaire. Neuf participants (soit 64 %) ont présenté une amélioration dans

au moins une des mesures suivantes : acuité visuelle, sensibilité à la lumière rouge (FST) ou test de mobilité. Par ailleurs, six participants ont également montré une amélioration de la qualité de vie visuelle.

En conclusion, l'étude suggère que le traitement par EDIT-101 est bien toléré et pourrait améliorer la fonction des photorécepteurs dans les formes héréditaires de dégénérescence rétinienne associées à CEP290. Ces résultats encouragent la poursuite des recherches sur l'édition génique *in vivo* par CRISPR-Cas9 pour traiter les dégénérescences rétiniennes d'origine génétique, en particulier celles causées par le variant IVS26 du gène CEP290 (Pierce et al., 2024).

#### **6. Discussion critique sur l'efficacité, les limites et les enjeux éthiques du système CRISPR-Cas9 en thérapie génique :**

Le système CRISPR-Cas9, issu d'un mécanisme de défense bactérienne contre les phages, représente aujourd'hui une avancée majeure dans le domaine de l'édition génomique, notamment en thérapie génique. Il repose sur l'utilisation d'une enzyme, Cas9, guidée par un ARN synthétique (sgRNA) vers une séquence spécifique de l'ADN, permettant ainsi une coupure ciblée du génome. Cette coupure est ensuite réparée par la cellule, ce qui permet soit d'inactiver un gène, soit de le corriger si un modèle de réparation est fourni (Doudna et charpentier, 2014). Cette technologie a montré une grande efficacité dans le traitement de maladies héréditaires comme la drépanocytose ou la bêta-thalassémie. Par exemple, une étude de 2020 a démontré que l'édition de cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints de drépanocytose a permis de restaurer une production de globules rouges normaux après une seule intervention (Frangoul et al., 2021). Dans le domaine de l'oncologie, CRISPR est également utilisé pour reprogrammer des cellules immunitaires afin d'améliorer leur capacité à combattre les tumeurs, comme cela a été démontré dans des essais cliniques impliquant des cellules T modifiées (Stadtmauer et al., 2020). D'autres études explorent son potentiel pour éradiquer des infections virales chroniques, telles que le VIH ou l'hépatite B, en ciblant et en détruisant le génome viral intégré dans les cellules infectées (Xu et al., 2019). L'un des principaux avantages de CRISPR-Cas9 est sa précision, sa rapidité d'action et son faible coût, ce

qui le rend plus accessible que les méthodes antérieures comme les TALEN ou les nucléases à doigts de zinc (Ledford, 2015). Néanmoins, cette technologie n'est pas exempte de risques, notamment les effets hors cible (off-target), c'est-à-dire des modifications accidentelles ailleurs dans le génome, pouvant engendrer des mutations imprévues (Kosicki et al., 2018). De plus, les considérations éthiques sont nombreuses, en particulier lorsqu'il s'agit de modifications des cellules germinales, susceptibles d'être transmises aux générations futures. L'affaire des jumeaux génétiquement modifiés en Chine en 2018 a soulevé une vive controverse et conduit à des appels internationaux pour réglementer strictement l'usage de CRISPR sur l'embryon humain (Cyranski, 2019). Malgré ces limites, les recherches se poursuivent pour perfectionner la technologie, notamment avec l'apparition de variantes comme Cas12, Cas13, ainsi que des approches plus précises telles que le base editing et le prime editing, qui permettent des modifications plus sûres sans coupures de l'ADN double brin (Anzalone et al., 2019). Ainsi, le système CRISPR-Cas9 continue de démontrer son immense potentiel thérapeutique, bien que son utilisation doive s'accompagner d'une réflexion éthique rigoureuse et de contrôles scientifiques stricts.

# Conclusion

## Conclusion

Le système CRISPR/Cas9 représente une avancée majeure en thérapie génique, offrant des possibilités sans précédent pour le traitement des maladies génétiques. Ses applications cliniques, notamment dans le traitement de la drépanocytose et de la bêta-thalassémie, ont démontré son efficacité avec des résultats prometteurs. Cependant, des défis persistent, comme les effets hors cibles, la réponse immunitaire et les considérations éthiques, particulièrement concernant les modifications germinales. Les innovations récentes, telles que le prime editing et les améliorations des systèmes de livraison, laissent entrevoir un avenir où CRISPR pourrait traiter des maladies plus complexes, comme les cancers et les maladies neurodégénératives. Pour que ce potentiel se concrétise pleinement, une collaboration internationale est essentielle afin d'établir des cadres réglementaires robustes tout en garantissant un accès équitable à ces thérapies révolutionnaires. Les progrès continus dans ce domaine positionnent CRISPR/Cas9 comme un outil incontournable pour la médecine personnalisée de demain.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

### A

Alain, B. (2003). L'ADN ET LES CHAMPS COSMIQUES D'INFORMATION. French National Centre for Scientific Research. ISSN 2430-5626.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). Garland Science.

Arbi, F., Mansouri, V., Ahmedbeigi, N. (2022). Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 153.113324.

Asmamaw, M. & Zawdie, B. (2021). Mechanism and applications of CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Biologics: Targets & Therapy*, 15, 353–361.

### B

Bachrach, H. L.; Callis, J. J.; Brown, F.; Strohmaier, K. (1983). Applications des progrès du génie génétique à la lutte contre les maladies animales, in *Revue scientifique et technique* (international office of Epizooties). 655, 675.

Barar, J., Omidi, Y. (2012). Translational approaches toward cancer gene therapy: hurdles and hopes, *BioImpacts*, 2(3). 127-143.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709–1712.

Benathmane, B. Meziani, S. (2022). "Le système d'édition du génome CRISPR-Cas9" Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master. Université frères mentouri constantine 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Microbiologie.

Bikard, D., Hatoum-Aslan, A., Mucida, D., & Marraffini, L.A. (2012). CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during in vivo bacterial infection. *Cell Host & Microbe*, 12(2), 177–186.

Black, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 291–336.

Boudiaf, k. (2022). Cours génétique final. université Mustafa Boulaid. Faculté des sciences de la nature et de la vie.

Bousmat, Y. (2022). Mémoire de Fin d'études Master. K-means & K-mers pour le regroupement et la comparaison de grands ensembles de séquences biologiques. Université de 8 Mai (1945) – Guelma.

## Références bibliographiques

- Boutin, J. (2021). "Sécurisation de la thérapie génique par CRISPR-Cas9 dans les pathologies du globule rouge" thèse présentée Pour obtenir le grade de docteur de l'université de Bordeaux. Thèse de Génétique. Université de Bordeaux. Français. NNT : 2021BORD0291.
- Brek, K., Roberts, R.J., & Bhagwat, A.S. (2005). DNA methylation and restriction enzyme inactivation in bacterial systems. *Nucleic Acids Research*, 33(8), 2567–2575.
- Brek, L., Kaiser, M., Scoti, K. & Darnell, Z. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*. 3e éd., Bruxelles: De Boeck Université, 361–365.
- Brodeur, J., & Toussaint, M. (2006). Maturation d'un ARNm [Figure]. In *Biologie moléculaire* (p. 23). Projetbleu. CCDMD.
- Brown, T., Leclerc, P., & Dubois, M. (2015). *Biocarburants et micro-organismes génétiquement modifiés*. Presses Universitaires de Technologie.
- Bruno, A. Christophe, C. Céline, R. (2022). *le cours de biologie cellulaire et moleculaire licence. santé, capes. 4 -ème édition*. Dunod.
- Buckingham, L., & Flaws, M.L. (2007). *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, and Clinical Applications*. Philadelphia: F. A. Davis Company.
- Bulcha, J. Wang, Y. Ma, H. Phillip, W Guangping, G. (2021). Review article Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*.

### C

---

- Cavazzana, M. (2017). Thérapie génique : beaucoup plus de questions que de réponses. *Médecine/Sciences (Paris)*, 33(5), 461–462.
- Cavazzana, M. (2017). Thérapie génique : principes et applications. *Médecine/Sciences*, 33(1). 73–79.
- Cavazzana, M. Antoniani, C. Miccio, A.(2017). Gene Therapy for Beta-Hemoglobinopathies. *Molecular Therapy*. 25(5). 1142-1154.
- Cavazzana-Calvo, M. Hacein-Bey, S. de Saint Basile, G. Gross, F. Yvon, E. Nusbaum, P. et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*,(288). 669–672.
- Chardès, B. (2018). « Édition du génome par l'outil CRISPR/Cas, nouvel horizon de la thérapie génique. Sciences pharmaceutiques » Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie de Montpellier en vue d'obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de montpellier. UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques. dumas-04244605.

## Références bibliographiques

- Chneiweiss H. (2023). Premiers succès et nouveaux enjeux de l'édition du génome en thérapeutique humaine. *Med Sci (Paris)*. 39.589-90.
- Cichowski, K., & Jacks, T. (2001). NF1 tumor suppressor gene function: Narrowing the GAP. *Cell*, 104(4). 593–604.
- Claeys, S. (2022). Rapporteur de la concertation. Espace de réflexion éthique Île-de-France, Hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010. Directeur de la publication : Emmanuel Hirsch. Création graphique : Valentine Thébaud. Comité éditorial : Brugeron, P.-E., Clause-Verdreau, A.-C., Gzil, F., Ponelle, V., Weil-Dubuc, P.-L.
- Coffin, J. Hughes, S. Varmus, H. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United states.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., & Lis, J.T. (2008). Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science*, 322(5909), 1845–1848
- Cornetta, K., Bonamino, M., Mahlangu, J., Mingozi, F., Rangarajan, S., & Rao, J. (2022). Gene therapy access: Global challenges, opportunities, and views from Brazil, South Africa, and India. *Molecular Therapy*, 30(6), 2122-2129.
- Cornetta, K., Bonamino, M., Mahlangu, J., Mingozi, F., Rangarajan, S., & Rao, J. (2022). Gene therapy access: Global challenges, opportunities, and views from Brazil, South Africa, and India. *Molecular Therapy*, 30(6), 2122–2129
- Creveaux, I., Bardot, O., Blanchon, L. & Marceau, J. (2013). *La biologie moléculaire en 12 étapes*. Paris : Éditions Ellipses.
- Creveaux, J., Smith, H.O., & Nathans, D. (2013). Bacterial restriction enzymes as defense mechanisms against bacteriophages. *Journal of Molecular Biology*, 45(2), 112–130.
- Cullot, G. (2019). «Génotoxicité des systèmes CRISPR-Cas9». These pour le doctorat de l'université de bordeaux. Université de Bordeaux.Médecine humaine et pathologie.
- Cyrielle, D. (2024). « La thérapie génique : état des lieux et place du pharmacien. Sciences pharmaceutiques » thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. dumas-04830485.
- Cécilia. Laure. Marie. (2014). Mise au point de stratégies d'édition de gène à l'aide d'endonucléases artificielles pour le traitement des hépatopathies héréditaires application à la maladie de Crigler Najjar de type I. ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ.Spécialité: Biochimie et biologie moléculaire.

## Références bibliographiques

### D

---

- Darlix J. (2023). Rétrovirus : Classification et mécanismes. Encyclopædia Universalis.
- Derdelinckx, J. Berneman, Z. Cools, N. (2016). GMP-Grade mRNA Electroporation of Dendritic Cells for Clinical Use. *Methods Mol Biol.*1428. 139–50.
- Dhiman, N. Awasthi, R. Sharma, B. Kharkwal, H. Kulkarni, G. (2021). Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. *Frontiers in Chemistry.* (9):580118.
- Dor, E. (2023). La thérapie génique pour soigner les maladies génétiques. *Sciences de l'Homme et Société.* <https://hal.science/ffdu...04530380f>
- Doudna, J.A. (2015). Perspective: Embryo editing needs scrutiny. *Nature*, 528(7580), S6.
- Dudek, A.M. Feist, W.N. Sasu, E.J. Luna, S.E. Ben-Efraim, K. Bak, R.O. Cepika, A.M. Porteus, M.H. (2024). CRISPR/Cas9 genome editing of CCR5 and CXCR4 mediated resistance to HIV-1 infection in human HSPCs. *Cell Stem Cell.* 31(4). 499–518.
- Dufay, A. (2012). Conception et évaluation d'un vecteur ciblé de thérapie génique anticancéreuse destiné à la voie intraveineuse. *Médecine humaine et pathologie.* Université Paris Sud- Paris XI. Français. NNT : 2012PA114818.
- Duma, N. Santana-Davila, R. Molina, J. R. (2019). Non-small cell lung cancer: Epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings.* 94(8). 1623–1640.
- Dumitru, S. (2007). Clonage. In M. Marzano (Ed.), *Dictionnaire du corps*: 205-208. Paris: PUF.

### E

---

- Elendu, C. Amaechi, D. C. Alakwe-Ojimba, C. E. Elendu, T. C. Elendu, R. C. Ayabazu, C. P. Aina, T. O. Aborisode, O. Adenikinju, J. S. (2023). Understanding Sick cell disease: Causes, symptoms, and treatment options. *Medicine.* 102(34). e34561.
- Eva, D. (2023). La thérapie génique pour soigner les maladies génétiques. *Sciences de l'Homme et Société.* dumas-04530380.

### F

---

- FAO. (2015). Environmental impact of genetically modified plants: Drought and salinity resistance in developing countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: FAO Press.
- Fatima, N. (2017–2018). *Biologie moléculaire et génie génétique.* Faculté des sciences de la nature et de la vie.

## Références bibliographiques

Flores, V. (2019). The impact of intellectual property rights on smallholder farmers in developing countries. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 32(4), 565–582.

Frangoul, H. Altshuler, D. Cappellini, M. D. Chen, Y.-S., Domm, J. Eustace, B. K. Foell, J. de la Fuente, J. Grupp, S. Handgretinger, R. Ho, T. W. Kattamis, A. Kernytsky, A. Lekstrom-Himes, J. Li, A. M. Locatelli, F. Mapara, M. Y. de Montalembert, M. Rondelli, D. Sharma, A. Sheth, S. Soni, S. Steinberg, M. H. Wall, D. Yen, A. Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 384(3), 252-260.

Fransky, H. (2017). Régulateurs traductionnels de l'expression génique de la différenciation et du stress cellulaire. *Physiologie [q-bio.TO]*. Université Paul Sabatier- Toulouse III.

### G

---

Garcia, L. (2018). Risques environnementaux des OGM. Éditions Environnement et Société.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *PNAS*, 109(39), E2579–E2586.

Gilbert, L. Larson, M. Morsut, L. et al. (2013). Régulation de la transcription guidée par l'ARN modulaire médiée par CRISPR chez les eucaryotes. *Cell*.154(2). 442-451.

Giovagnoli, S. (2024). CRISPR/Cas9 en thérapie génique : étude de cas sur une maladie neurodégénérative de la rétine, autres applications et enjeux de son utilisation. Mémoire de master en sciences pharmaceutiques. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04954238>

Goodfellow, S.J., & Zomerdijk, J.C.B.M. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcellular Biochemistry*, 61, 211–236.

Goyenvalle, A. Vulin, A. Fougerousse, F. Leturcq, F. Kaplan, J. C. García, L. F. Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, 306(5702), 1796–1799.

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W., Miller, J.H., & Lewontin, R.C. (2001). *Analyse génétique moderne (Modern Genetic Analysis)*. 1<sup>re</sup> édition. De Boeck.

### H

---

Hacein-Bey-Abina, S. Le Deist, F. Carlier, C., Bouneaud, C. Hue, C. De Villartay, J. P. Thrasher, A. J. Wulffraat, N. Sorensen, R. Dupuis-Girod, S. Cavazzana-Calvo, M. Fischer, A. (2002). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*,302(5644). 415-419.

## Références bibliographiques

Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F. & Nelson, K.E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 1, e60.

Haidara, N.E.M. (2021). Analyse du rôle de la terminaison de la transcription des ARN non-codants dans la régulation de l'expression des gènes. Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay.

Hamel, S. (2024). Le Génie génétique et les droits de l'homme : Vers une quatrième génération des droits de l'homme ? *Recherches Juridiques et Politiques*. 1079-1092.

Hartenian, E. Doench, J.G. (2015). Screenings génétiques et génomique fonctionnelle utilisant la technologie CRISPR/Cas9. *La revue FEBS*, 282 (8), 1383-1393.

Heintze, J., Luft, C. & Ketteler, R. (2013). A CRISPR case for high-throughput silencing. *Frontiers in Genetics*, 4, 193.

Heler, R. Samai, P. Modell, J. Weiner, C. Goldberg, G. Bikard, D. Marraffini, L. (2015). Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation. *Nature*. 519. 199–202.

Hellez, J. (2014). « Les utilisations de la thérapie génique » thèse pour l'obtention le grade de Docteur Vétérinaire. Université CLAUDE-BERNARD- LYON I (Médecine - Pharmacie).

Hirsch, I. B., Juneja, R., Beals, J. M., Antalis, C. J., & Wright, E. E. Jr. (2020). The evolution of insulin and how it informs therapy and treatment choices. *Endocrine Reviews*, 41(5), 733–755.

Hirsch, I.B., Juneja, R., Beals, J.M., Antalis, C.J., & Wright, E.E. Jr. (2020). The evolution of insulin and how it informs therapy and treatment.

Housset, C., & Raisonier, A. (2009–2010). *Biologie moléculaire – Biochimie PAES*. Université Pierre et Marie Curie (UPMC).

Hsu, P. D. Lander, E. S. Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR Cas9 for genome engineering. *Cell*. 157(6). 1262-1278.

Hua, Y., Vickers, T.A., Baker, B.F., Bennett, C.F., & Krainer, A.R. (2008). Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biology*, 5(4), e73.

---

### I

---

Ibarrondo, F., & Camus, G. (2005). Une nouvelle classe d'ARN : les petits ARN interférents. École Normale Supérieure, Planet-Vie.

Inserm. (2018). Thérapie génique – Une recherche de longue haleine qui porte ses fruits. [En ligne]. Disponible sur :

## Références bibliographiques

Isalan, M. Au, HKE. Mielcarek, M. (2022). Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. *Front Med.* 8:809118.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169, 5429–5433.

Islami, F. Torre, L. A. Jemal, A. (2015). Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Translational Lung Cancer Research.* 4(4). 327–338.

### J

---

Jansen, R., van Embden, J.D.A., Gaastra, W. & Schouls, L.M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, 1565–1575.

Jiang, F. & Doudna, J.A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46, 505–529.

Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S., & Doudna, J.A. (2015). A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*, 348(6242), 1477–1481.

Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L.A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233–239.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.

Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D.W., Sternberg, S.H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A.T., Charpentier, E., Nogales, E., & Doudna, J.A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997.

Johnson, R. (2010). Applications industrielles des enzymes en biotechnologie. Éditions Techniques et Ingénierie.

Jonkers, I., & Lis, J.T. (2015). Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Genetics*, 16(3), 167–177.

Jules, B. Pierre, L. Charles, V. (2017). Raven, Johnson, Mason, Losos, Singer, *Biology*. 4<sup>ème</sup> édition. deboek supérieur.

### K

---

Kahn, A. (2000). Dix ans de thérapie génique : déceptions et espoirs. *Biofutur*, 202 (2000), 16-20.

Keasling, J.D. (2010). Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science*, 330(6009), 1355–1358.

Khattat, A. (2021). Le génie génétique et l'éthique de la responsabilité. *ATTAKAMUL Journal of Social and Sports Sciences Researches*. 677-697. ISSN 2716-9391.

Kleinstiver, B. Pattanayak, V. Prew, M. Tsai, S. Nguyen, N. Zheng, Z. Joung, J. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. 529 (7587), 490–495.

Knight, S.C., Xie, L., Deng, W., Guglielmi, B., Witkowsky, L.B., Bosanac, L., Zhang, E.T., El Beheiry, M., Masson, J.-B., Dahan, M., & Tjian, R. (2015). Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*, 350(6262), 823–826.

Korneyenkov, M. Zamyatnin, A. (2021). Next Step in Gene Delivery: Modern Approaches and Further Perspectives of AAV Tropism Modification. *Pharmaceutics*. 13(5),750.

Kuehner, J.N., Pearson, E.L., & Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Genetics*, 12(5), 283–294.

Kularatne, R. Crist, R. Stern, S. (2022). The Future of Tissue-Targeted Lipid Nanoparticle Mediated Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics*.15(7):897.

### L

---

Lacey, S. Fraietta, J. (2020). First Trial of CRISPR-Edited T cells in Lung Cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 26(8). 713–715.

Lannoy, N. Hermans, C. (2017). Thérapie génique en (2017) :tat des lieux et perspectives. *Thérapie Génique*.

Lassalas, C. Borges, R. (2018). « La technologie CRISPR-Cas9 : enjeux juridiques », *Le Dossier : Quelles limites pour les technosciences en santé ? Actes du colloque de Clermont Ferrand du 13 mars (2018), textes réunis par RM. Borgès et C. Lassalas, La Revue du Centre Michel de l'Hospital [édition électronique]. 15. 39-47.*

Le Guen, Y.T., Le Gall, T., Laurent, V., et al. (2021). Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 205(5), 509–518.

## Références bibliographiques

- Li, H. Wang, Q. Martinez, A. Robinson, T. (2024). CRISPR-Cas9 applications in neurodegenerative disease models. *Cell Reports*. 39(3). 110547.
- Li, S., Ling, S., Wang, D., Wang, X., Hao, F., Yin, L., Yuan, Z., Liu, L., Zhang, L., Li, Y., Chen, Y., Luo, L., Dai, Y., Zhang, L., Chen, L., Deng, D., Tang, W., Zhang, S., Wang, S., & Cai, Y. (2024). Modified lentiviral globin gene therapy for pediatric  $\beta^0/\beta^0$  transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia: A single-center, single-arm pilot trial. *Cell Stem Cell*, 31(7), 961–973.
- Liu, M., Rehman, S., Tang, X. et al. (2019). Methodologies for improving HDR efficiency. *Frontiers in Genetics*, 9, 1–9.
- Lodish, H. Berk, A. Kaiser, C. Krieger, M. Bretscher, A. Ploegh, H. Amon, A. Martin, K.C. (2016). *Molecular Cell Biology*. (8th édition). New York: W.H. Freeman and Company.
- Louapre, D. (2021). Le repliement des protéines : résolu par l'intelligence artificielle AlphaFold ?. *Science Étonnante*.
- Lu, Y. Xue, J. Deng, T. Zhou, X. Yu, K. Deng, L. Huang, M. Yi, X., Shen, M. Tong, X. Wang, W. Li, L. Qin, D. Wang, Y. Huang, Y. Wei, Y. (2020). Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nature Medicine*. 26(5). 732-740.
- Lundstrom, K. (2023). Viral Vectors in Gene Therapy: Where Do We Stand in (2023)? *Viruses* (2023), 15, 698.
- Lydie, H. (2014). THERAPIE GENIQUE ET CELLULAIRE : Deux voies de recherche prometteuses pour traiter la surdité. Université de Lorraine. Faculté de pharmacie.

### M

- Ma, H., Tu, L.-C., Naseri, A., Huisman, M., Zhang, S., Grunwald, D., & Pederson, T. (2016). CRISPR-Cas9 nuclear dynamics and target recognition in living cells. *Journal of Cell Biology*, 214(5), 529–537.
- Maftah, A. Petit, J M. Julien, R. (2007). *Mini manuel de biologie moléculaire*. 2ème édition. (Ed) DUNOD, P71-119.
- Mahajan, R. (2019). Onasemnogene abeparvovec for spinal muscular atrophy: the costlier drug ever, *Int. J. Appl. Basic Med.* (9)127–128.
- Makarova, K. Aravind, L. Wolf, Y. Koonin, E. (2011). Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR–Cas systems. *Biol Direct*. 6:38.
- Makarova, K. Koonin, E. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol*. 1311. 47–75.

## Références bibliographiques

- Makarova, K. Wolf, Y. Alkhnbashi, O. Costa, F. Shah, S. Saunders, S. Barrangou, R. Brouns, S. Charpentier, E. Haft, D. Horvath, P. Moineau, S. Mojica, F. Terns, R. Terns, M. White, M. Yakunin, A. Garrett, R. Oost, J. Backofen, R. Koonin, E. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 13(11). 722–736.
- Makarova, K. Wolf, Y. Koonin, E. (2013). The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems. *Biochem Soc Trans.* 41. 1392–1400.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Grishin, N.V., Rogozin, I.B. & Koonin, E.V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Research*, 30, 482–496.
- Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes. *Biology Direct*, 1, 7.
- Makarova, K.S. Wolf, Y. Iranzo, J. Shmakov, S. Alkhnbashi, O. Brouns, S. Charpentier, E. Cheng, D. Haft, D. Horvath, P. Moineau, S. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Micro biol*, 18, 67–83.
- Marraffini, L.A. & Sontheimer, E.J. (2010). Self-versus non-self-discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 463(7280), 568–571.
- Maryline, C. Magali, F. Stéphane, T. (2008). La génomique entre science et éthique, de nouvelles perspectives à enseigner. P 17. Groupe d'étude évolution des SVT et enjeux de formation ENS de cachan – INRP. ISSN (1952)-1723.
- Matloff, E. (2023). First CRISPR Sickle Cell Patient Reborn: FDA Approves Treatment. *Forbes*.
- Mauger, P. Le gall, T. Montier, T. (2015). Vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes : application à la thérapie génique de la mucoviscidose. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 199(6). 1001-1014.
- Mebarki, L. (2021). Génie génétique Polycopie de cours à l'usage des étudiants de 1 ère année Master. Université tahar mohammed bechar. Faculte des sciences de la nature et de la vie.
- Meister, G. Tuschl, T.(2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349.
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36, 244–246.
- Monteny, N. (1987). Mise au point sur le clonage des gènes, la préparation et l'utilisation des sondes d'ADN. *Cahiers ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie, numéro spécial*, 31–43

### N

Naldini L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573), 351-360.

Nayerossadat, N., Maedeh, T., Abas Ali, P. (2012). Viral and non-viral delivery systems for gene therapy. *Advanced biomedical research*, 1, 3-27.

NHS England. (2015). Genetic testing for BRCA1 and BRCA2: Commissioning policy. NHS England Documents.

Nsairat, H. Khater, D. Sayed, U. Odeh, F. Al Bawab, A. Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*.8(5): e09394.

### P

Palfi, S. Gurruchaga, J. M. Ralph, G. S. Lepetit, H. Lavis, S. Buttery, P. C. Watts, C. Miskin, J. Kelleher, M. Deeley, S. Iwamuro, H. Lefaucheur, J.P. Thiriez, C. Fenelon, G. Lucas, C. Brugières, P. Gabriel, I. Abhay, K. Drouot, X. Mitrophanous, K. A. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet*, 383(9923), 1138–1146.

Pallier, C. (2001). Les régions non traduites des ARN messagers et leur rôle dans la synthèse protéique. *Med Sci (Paris)*, 17(1), 23–32.

Perez-Pinera, P. Kocak, D. Vockley, C. et al. (2013). Activation génique guidée par l'ARN par des facteurs de transcription basés sur CRISPR-Cas9. *Nat Methods*. 10(10). 973-976.

Piaggio, A.J., Segelbacher, G., Seddon, P.J., Alphey, L., Bennett, E.L., Carlson, R.H., ... & Serr, M. (2017). Is it time for synthetic biodiversity conservation? *Trends in Ecology & Evolution*, 32(2), 97–107.

Pierce, E.A., Aleman, T.S., Jayasundera, K.T., Ashimatey, B.S., Kim, K., Rashid, A., Jaskolka, M.C., Myers, R.L., Lam, B.L., Bailey, S.T., Comander, J.I., Lauer, A.K., Maguire, A.M., & Pennesi, M.E. (2024). Gene editing for CEP290-associated retinal degeneration. *The New England Journal of Medicine*.

Pourcel, C. (2017). Historique de la découverte des systèmes CRISPR-Cas. *Biologie Aujourd'hui*. 211(4), 247-254.

Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA. *Microbiology*, 151, 653–663.

Proudfoot, N.J. (2002). Connecting transcription to messenger RNA processing. *Cell*, 108(4), 501–512

### Q

---

Qaim, M. & Kouser, S. (2013). Genetically modified crops and food security: ex post analysis of smallholder income and dietary quality in India. *PLoS ONE*, 8(6), e64879

### R

---

Raimbault B, (2021). Dans l'ombre du génie génétique : le génie métabolique, *Natures Sciences Sociétés*, page 264.

Rajan, A. Shrivastava, S. Janhawi. Kumar, A. Kumar Singh, A. Kumar Arora, A. (2022). CRISPR/Cas system: from diagnostic tool to potential antiviral treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 106. 5863–5877.

Raven, P.H., Johnson, G.B., Mason, K.A., Losos, J.B., & Singer, S.R. (2017). *Biology* (11th ed.). McGraw-Hill Education.

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(9), 327–335.

Roques, A.C. Rocha, A.M. Gomas, C.M. (2009). Protein-based nanomaterials for biomedical application : A review. *Journal of nanomaterials*. 663-675. ISSN:0960-7412.

Rosenblum, H. G., Gee, J., Liu, R., Marquez, P. L., Zhang, B., Strid, P., Abara, W. E., McNeil, M. M., Myers, T. R., Hause, A. M., Su, J. R., Markowitz, L. E., Shimabukuro, T. T., & Shay, D. K. (2022). Safety of mRNA vaccines administered during the initial 6 months of the US COVID-19 vaccination programme: An observational study of reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System and v-safe. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(6), 802–812.

Roubin, J. B. (2017). CRISPR/Cas9: histoire, méthode, potentiel & impact (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

### S

---

Sainsbury, S., Bernecky, C., & Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 129–143

Sapranaukas, R. Gasiunas, G. Fremaux, C. Barrangou, R. Horvath, P. Siksny, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39. 9275–9282.

Saunders, A., Core, L.J., & Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), 557–567.

## Références bibliographiques

- Schmidt, C.M., & Smolke, C.D. (2019). RNA switches for synthetic biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(1), a032532.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., & Zipursky, S.L. (2000). *Drosophila Dscam* is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*, 101(6), 671–684.
- Shen, B., Zhang, W. Zhang, J. Zhou, J. Wang, J. Chen, L....&Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature methods*. 11(4). 399-402.
- Shtykalova, S. Deviatkin, D. Freund, S. Egorova, A. Kiselev, A. (2023). Non-Viral Carriers for Nucleic Acids Delivery: Fundamentals and Current Applications. *Life Basel Switz*. 13(4):903.
- Siegel, R. L. Miller, K. D. Wagle, N. S. Jemal, A. (2024). Cancer statistics, (2024). CA: A Cancer Journal for Clinicians. 74(1). 7–33.
- Silverman, S.K. (2005). In vitro selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. *Nucleic Acids Research*, 33(19), 6151–6163.
- Singh, J.S., Abhilash, P.C., Singh, H.B., Singh, R.P., & Singh, D.P. (2011). Genetically engineered bacteria: An emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene*, 480(1–2), 1–9.
- Slymaker, I. Gao, L. Zetsche, B. Scott, D. Yan, W. Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 351(6268). 84–88.
- Smith, J., Dupont, A., Martin, C., & Laurent, N. (2003). *Biotechnologie et production de protéines recombinantes*. Éditions BioSciences.
- Spahn, C. Gomez, M. Grassucci, R. Jørgensen, R. Andersen, G. Beckmann, R. Penczek, P. Ballesta, J. Frank, J. (2004). Domain Movements of Elongation Factor eEF2 and the Eukaryotic 80S Ribosome Facilitate tRNA Translocation. *Cell*. 373-386.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., & Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67.
- Sullivan, J.M., Yau, E.H., Kolniak, T.A., Sheflin, L.G., Taggart, R.T., & Abdelmaksoud, H.E. (2011). Variables and strategies in development of therapeutic post-transcriptional gene silencing agents. *Journal of Ophthalmology*, (2011), 1–31.
- Swynghedauw, B., & Silvestre, J.-S. (2008). *Aide-mémoire de biologie et génétique moléculaire* (3<sup>e</sup> éd.). Dunod.

## Références bibliographiques

Szczelkun, M.D., Tikhomirova, M.S., Sinkunas, T., Gasiunas, G., Karvelis, T., Pschera, P., Siksnyš, V., & Seidel, R. (2014). Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), 9798–9803.

### T

---

Tabashnik, B.E. & Carrière, Y. (2015). Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*, 26(1), 199–202.

Tang TH, Bachellerie JP, Rozhdestvensky T, Bortolin ML, Huber H, Drungowski M, Elge T, Brosius J, Hüttenhofer A. (2002). Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 7536–7541.

Tao, Y., Han, Q., Bai, L., Yu, R., Ma, Y., Chen, Z., Zhang, L., Li, C. (2023). CRISPR/Cas9: A Powerful Strategy to Improve CART Cell Persistence. *Frontiers in Immunology*. 14. Article 37569693.

Tao, Y., Han, Q., Bai, L., Yu, R., Ma, Y., Chen, Z., Zhang, L., Li, C. (2024). Enhancing CART cell therapy with CRISPR/Cas9 gene editing. *Frontiers in Immunology*. 15. Article 38449862.

Thomas, E. Rachel, G.(2012). *The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes*. cold spring harbor perspectives in biology.

Tiruneh, G., Medhin, M., Chekol Abebe, E., Sisay, T., Berhane, N., Bekele, T., & Asmamaw Dejenie, T. (2021). Current Applications and Future Perspectives of CRISPR-Cas9 for the Treatment of Lung Cancer. *Biologics: Targets & Therapy*, 15, 199–204

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., et al. (2015). The (2015) World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*. 10(9). 1243–1260.

Tremblay, J. (2015). CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Médecine/Sciences*. 31(11). 1014-1022.

### U

---

UNESCO. (2021). *Éthique et équité dans les biotechnologies modernes*. Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture.

## Références bibliographiques

### V

Vertex Pharmaceuticals, & CRISPR Therapeutics. (2023). Press release and clinical updates. <https://investors.vrtx.com>.

VSU, Economiesuisse. (2005, 7 février). Le génie génétique dans l'agriculture et l'alimentation : La technologie clé du futur (DossierPolitique, n° 5). Zurich et Genève: Economiesuisse.

### W

Wang, H. La Russa, M. Qi, L. (2016). CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annual review of biochemistry*. 85. 227-264.

Wang, Y. Smith, J. Liu, R. Chen, M. (2024). Advances in CRISPR-Cas9 mediated gene editing for inherited disorders. *Nature Biotechnology*. 42(1). 34-46.

Wei, C. Liu, J. Yu, Z. Zhang, B. Gao, G. Jiao, R. (2013).TALEN or Cas9 - rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *J Genet Genomics*. 40. 281–289.

Wiedenheft, B., Sternberg, S.H. & Doudna, J.A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482, 331–338.

Wolff, J. Lederberg, J. (1994). An early history of gene transfer and therapy, *Hum. Gene Ther.* (5), 469–480.

Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., Cheng, A.W., Trevino, A.E., Konermann, S., Chen, S., Jaenisch, R., Zhang, F. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 32(7), 670–676.

### X

Xu, L., Wang, J., Liu, Y., Xie, L., Su, B., Mou, D., Wang, L., Liu, T., Wang, X., Zhang, B., Zhao, L., Hu, L., Ning, H., Zhang, Y., Deng, K., Liu, L., Lu, X., Zhang, T., Xu, J., Li, C., Wu, H., Deng, H., & Chen, H. (2019). CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*.

Xu, T. Li, Y. Shi, Z. Hemme, C. L. Li, Y. Zhu, Y.... & Zhou, J. (2015). Efficient genome editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 nickase. *Applied and environmental microbiology*. 81(13). 4423-4431.

Xue, C. Greene, E. (2021). DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Trends Gene*. 37(7). 639–656.

## Références bibliographiques

### Y

---

Yin, H. Kauffman, K. Anderson, D. (2017). Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*, 16 (6), 387-399.

### Z

---

Zhang, S., Wang, Y., Mao, D., Wang, Y., Zhang, H., Pan, Y., Wang, Y., Teng, S., & Huang, P. (2023). Current trends of clinical trials involving CRISPR/Cas systems. *Leukemia*.

Zhao, L. Thompson, P. Garcia, E. Patel, S. (2023). Clinical progress and challenges in CRISPR-Cas9 therapy. *The Lancet Oncology*. 24(5). 521-533.

Zheng, B., Liu, R., Zhang, X., Fu, B., Xu, Y., Shi, J., Feng, X., Wang, L., Wang, C., Liang, R., Tan, L., Wang, F., Li, D., Wu, Y., Liu, M., & Lai, Y. (2023). Efficacy and safety of Brl-101, CRISPR-Cas9-mediated gene editing of the BCL11A enhancer in transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *Blood*, 142(Suppl 1), 4995–4996.

Zu, H. Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal* (2021) 23: 78.

## Résumé :

Le système CRISPR/Cas9, mécanisme de défense bactérien contre les virus, utilise un ARN guide pour diriger l'enzyme Cas9 vers une séquence ADN spécifique à couper. Adapté en outil d'édition génétique, il révolutionne la recherche biomédicale et ouvre de nouvelles perspectives en génie génétique. Ses applications prometteuses incluent le traitement des maladies génétiques (drépanocytose), des infections virales (VIH) et de certains cancers. Bien que des défis techniques et éthiques persistent, CRISPR/Cas9 représente une avancée majeure en thérapie génique.

**Mots-clés :** CRISPR-Cas9, ARN guide, Édition génétique, Génie génétique, Thérapie génique.

## المخلص :

نظام CRISPR-Cas9 هو آلية دفاع بكتيرية ضد الفيروسات تعتمد على RNA موجه لتحديد تسلسل جيني معين حيث يقوم إنزيم Cas9 بقطعه. كأداة لتعديل الجينات، أحدث ثورة في الأبحاث الطبية وفتح آفاقاً واسعة في مجال الهندسة الوراثية. تشمل تطبيقاته العلاجية الأمراض الوراثية (مثل الأنيميا المنجلية)، والأمراض الفيروسية (كالإيدز)، وبعض أنواع السرطان. رغم التحديات التقنية والأخلاقية القائمة، يظل هذا النظام نقلة نوعية في العلاج الجيني.

**الكلمات المفتاحية :** CRISPR-Cas9، RNA موجه، تعديل الجينات، الهندسة الوراثية، العلاج الجيني.

## Abstract:

The CRISPR-Cas9 system, a bacterial defense mechanism against viruses, employs guide RNA to direct Cas9 enzyme to cut specific DNA sequences. As a gene-editing tool, it has transformed biomedical research and significantly advanced the field of genetic engineering. Its therapeutic applications include treating genetic disorders (sickle cell anemia), viral infections (HIV), and certain cancers. While technical and ethical challenges remain, CRISPR-Cas9 represents a major breakthrough in gene therapy.

**Keywords:** CRISPR-Cas9, Guide RNA, Gene editing, Genetic engineering, Gene therapy.