

L'un de ces mécanismes de défense est le système CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated*). À ce jour, six classes (I à VI) de systèmes CRISPR/Cas ont été décrites chez les bactéries (pour revue voir [1]). Le mieux décrit est le système CRISPR/Cas9, un système de classe II. Le locus CRISPR est constitué de séquences nucléiques répétées partiellement palindromiques, séparées par des « cassettes » d'ADN appelées espaceurs, spécifiques de séquences nucléiques étrangères et acquises lors de la rencontre antérieure avec ces séquences, lors d'une phase dite d'adaptation. Lors de la transcription du locus CRISPR, un pré-ARN CRISPR (pré-crARN) est généré et clivé afin de produire des ARN CRISPR (crARN), correspondant chacun à un espaceur (voir Figure 1A, panneau de droite, Nouvelle de A. Friot et al., page 397). Dans le système CRISPR/Cas de type II, la maturation du pré-crARN en crARN nécessite l'intervention d'une RNase III, d'une nucléase appelée Cas9 ainsi que d'un crARN transactivateur (tracrARN). Cette phase est appelée phase d'expression. Les crARN produits sont ensuite pris en charge par des tracrARN associés à des

complexes multiprotéiques composés de protéines Cas. Les crARN servent d'ARN guide pour les enzymes Cas en permettant la reconnaissance spécifique de matériel génétique étranger ayant une séquence complémentaire. L'hybridation de ces crARN à une séquence génétique étrangère induit le clivage de cette séquence par les protéines Cas, aboutissant à sa dégradation, ce qui est appelé phase d'interférence (voir Figure 1A, panneau de droite, Nouvelle de A. Friot et al., page 397). Ainsi, en induisant la dégradation du matériel génétique étranger, le système CRISPR/Cas confère une résistance à la bactérie. L'évolution du locus CRISPR en fonction de l'histoire de vie de la bactérie en fait donc un système assimilable à une forme d'immunité adaptative.

Ce mécanisme de défense a été étudié et exploité en recherche [2]. En effet, il est possible de générer artificiellement de petits transcrits associés à un tracrARN permettant ainsi la synthèse d'un ARN guide. Cet ARN a alors la capacité de cibler le matériel génétique d'intérêt tout en interagissant avec des protéines Cas. Lorsque les protéines Cas clivent le matériel génétique, celui-ci peut être réparé via une

recombinaison homologue. Afin d'effectuer une insertion ou une modification précise, il est possible de fournir un ADN modèle qui sera utilisé pour la réparation (voir Figure 1, Nouvelle de P. Castagné et al., page 400). Cette matrice pourra alors être adaptée selon la question scientifique. De ce fait, le système CRISPR/Cas, naturellement présent chez les bactéries comme mécanisme de défense, peut également être exploité en recherche comme outil d'édition des génomes. Dans les brèves qui suivent, les fonctions naturelles du système CRISPR/Cas dans le contexte de l'acquisition d'une résistance aux antibiotiques sont explorées, et l'exploitation de ce système comme un outil expérimental en bactériologie et en virologie est illustrée par quelques exemples récents. ♦

**From the bacterial CRISPR locus, an adaptive immune system equivalent, to a universal editing tool**

## RÉFÉRENCES

1. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* 2017 ; 37 : 67-78.
2. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012 ; 337 : 816-21.

## NOUVELLE

### CRISPR/Cas et la restriction/modification dans la résistance au transfert conjugatif chez *Enterococcus faecalis*

Adèle Friot<sup>1</sup>, Justine Guguin<sup>1</sup>, Louisa Haniche<sup>1</sup>, Sylvia Vuillier<sup>1</sup>

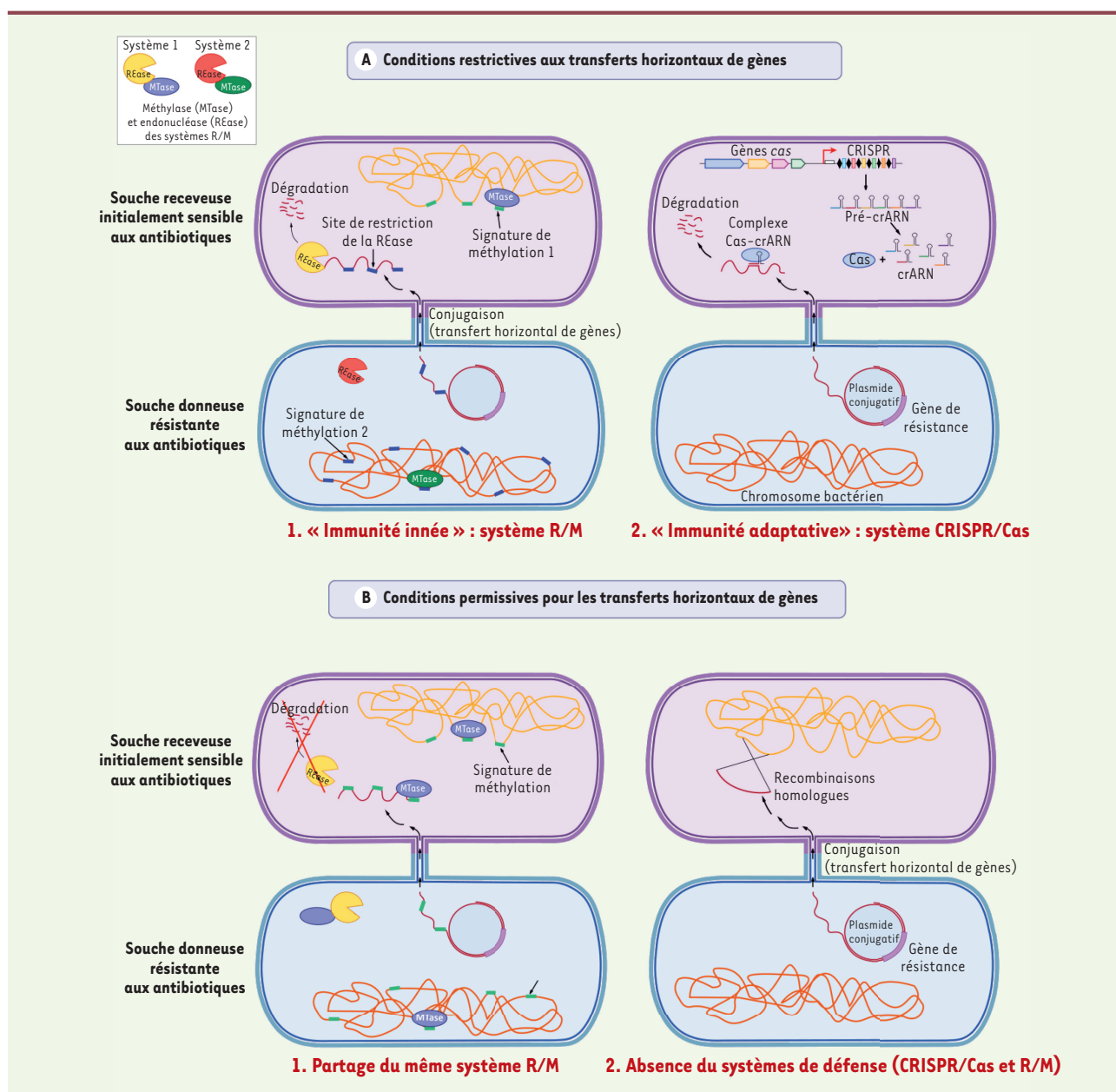
<sup>1</sup> École normale supérieure de Lyon, département de biologie, Master biologie, Lyon, France.

> *Enterococcus faecalis* est une bactérie naturellement présente dans le microbiote gastro-intestinal chez l'homme [1], qui peut être à l'origine d'infections nosocomiales opportunistes lorsqu'elle colonise des plaies ou le système sanguin [2]. Les souches d'*E. faecalis* les plus pathogènes sont celles qui ont acquis une multirésistance aux antibiotiques (à la vancomycine, au linézolide, etc.) [3], rendant le

traitement de ces infections particulièrement difficile. Cette multi-résistance est acquise par transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (MGE, *mobile genetic elements*) portant des gènes de résistance [4, 5].

Néanmoins, les bactéries possèdent des systèmes de défense contre les éléments génétiques mobiles : le système restriction/modification (R/M) et le système CRISPR/

Cas, qui sont souvent présentés comme des mécanismes bactériens d'« immunité innée » et d'« immunité adaptative », respectivement. Le système R/M repose sur le clivage non spécifique du matériel génétique entrant par une endonucléase (fonction R, restriction, du système R/M), et sur la protection du génome bactérien par méthylation (action de la méthylase M associée). La signature de méthylation



**Figure 1. Les limites des mécanismes de défense bactériens face aux transferts horizontaux de gènes.** Les bactéries, dont *E. faecalis*, disposent de systèmes de défense endogènes leur permettant de lutter contre les transferts horizontaux de gènes et ainsi protéger leur propre génome. Elles possèdent ainsi un système de restriction-modification (R/M) (A.1.) reposant sur la protection du génome endogène par méthylation spécifique de site via la méthylase MTase (modification) et sur la dégradation des éléments génétiques exogènes par des endonucléases RÉase (restriction). Le second système, nommé CRISPR/Cas (A.2.), repose sur la reconnaissance spécifique de séquence d'un matériel génétique étranger entrant, par des endonucléases Cas associées à des ARN guides, les crARN, codés par les séquences espaces du locus CRISPR. Dans ces deux cas - A.1. et A.2. -, la bactérie receveuse n'acquiert pas de résistance aux antibiotiques, même après le processus de conjugaison, car les gènes de résistance transmis par la souche donneuse sont dégradés. Cependant, des déficiences de ces systèmes de défense peuvent conduire à la facilitation des transferts horizontaux de gènes. Le premier cas de figure est le partage d'un même système R/M entre la bactérie donneuse et receveuse, associé à l'absence de reconnaissance du matériel génétique conjuguatif par le système CRISPR/Cas de la bactérie receveuse (B.1.). L'élément génétique transmis sera alors reconnu comme du « soi » par la bactérie receveuse, d'après la signature de méthylation qu'il porte, et ne sera dégradé ni par le système CRISPR/Cas, ni par le système R/M. Le second cas correspond à l'absence de systèmes de défense (R/M et CRISPR/Cas) fonctionnels (B.2.), ce qui entraîne l'acceptation de l'élément génétique étranger entrant par la bactérie receveuse et sa conservation. Dans ces deux conditions - B.1. et B.2. -, la bactérie receveuse, initialement sensible aux antibiotiques, acquiert un gène de résistance par ce transfert horizontal de gènes et devient elle-même résistante aux antibiotiques au même titre que la bactérie donneuse.

étant propre à chaque système R/M, ce système permet donc la distinction du soi et du non-soi. Les systèmes CRISPR/Cas sont, quant à eux, fondés sur une reconnaissance spécifique de séquences génétiques étrangères à l'aide d'ARN guides (transcrits à partir des séquences espaceurs du CRISPR) associés à des endonucléases Cas. À la différence des systèmes R/M, ils possèdent une « mémoire » des précédentes rencontres avec des éléments génétiques étrangers (Figure 1).

Ces deux systèmes sont naturellement présents chez *E. faecalis*, limitant ainsi les transferts horizontaux de gènes. Ainsi, il est intéressant d'étudier les mécanismes ayant permis l'acquisition de résistances aux antibiotiques chez *E. faecalis*. De précédentes études génomiques ont révélé une perte des systèmes de défense contre les éléments génétiques étrangers chez les souches *E. faecalis* pathogènes résistantes aux antibiotiques [6], avec néanmoins la conservation du segment CRISPR2 dit « orphelin » car non associé à des gènes cas. L'hypothèse de Price *et al.* [7] est que l'absence ou la non-fonctionnalité de ces systèmes de défense chez une souche d'*E. faecalis* la rendraient « immunodéprimée » et donc incapable de se défendre contre les transferts horizontaux, ce qui permettrait alors l'acquisition des multirésistances.

Dans ce contexte, les auteurs ont cherché à comprendre l'impact de ces mécanismes de défense sur les transferts horizontaux de type conjugatif. En effet, la présence de plasmides conjugatifs à spectre d'hôtes étroit (plasmides PRP, *pheromone-responsive plasmids*), associés à une dissémination rapide de l'antibiorésistance, est décrite chez *E. faecalis*. Les auteurs ont ainsi testé le transfert horizontal d'un plasmide conjugatif de type PRP entre des souches d'*E. faecalis* donneuses et receveuses. La souche receveuse utilisée, nommée T11, est très proche génétiquement d'une souche pathogène multirésistante mais, contrairement à cette dernière, elle possède un système

R/M (EfaRF1) et un système CRISPR3/Cas fonctionnels et n'est pas multirésistante aux antibiotiques. La souche donneuse, nommée OG1RF, possède un système R/M identique à celui de T11. Dans le cas de la souche receveuse T11, le plasmide conjugatif est reconnu à la fois par le système R/M et par CRISPR/Cas. Dans le cas de la souche receveuse T11  $\Delta cas9$  (ne possédant pas de système CRISPR/Cas fonctionnel), le plasmide peut être reconnu par le système R/M commun aux deux souches mais n'est pas reconnu par le système CRISPR3/Cas. Par cette méthode, les auteurs ont démontré que les systèmes CRISPR/Cas et R/M agissent en synergie pour limiter les transferts horizontaux de gènes. Ainsi, l'absence de systèmes de défense fonctionnels (délétion des gènes codant la R/M ou Cas9), ou le partage du même système R/M entre la bactérie donneuse et la bactérie receveuse, permettent ces transferts horizontaux.

De plus, une limite du système R/M réside dans le fait qu'il peut être très rapidement débordé lors de l'entrée massive d'éléments génétiques étrangers dans la bactérie. En effet, une partie du matériel génétique entrant n'est pas dégradé par les endonucléases du système R/M et est au contraire méthylé de la même façon que le génome bactérien endogène. Cet élément génétique est alors protégé de toute dégradation et conservé par la bactérie comme étant du soi. Cet échappement au système R/M, confirmé dans cette étude, participe donc à la facilitation des transferts horizontaux de gènes en permettant l'acceptation d'éléments génétiques mobiles étrangers par un petit nombre de bactéries (débordement), puis leur transmission ultérieure lors des conjugaisons entre bactéries partageant le même système R/M.

Enfin, cette étude a également permis de démontrer que le segment CRISPR2 seul ne suffit pas à assurer une défense contre les transferts horizontaux de gènes, mais qu'il peut être fonctionnel en présence de l'endonucléase Cas9 associée au segment CRISPR1 (issue du système CRISPR1/

Cas présent naturellement chez d'autres souches d'*E. faecalis*) du fait d'une origine évolutive commune.

Cette étude confirme bien que les transferts horizontaux de gènes sont facilités dans le cadre d'une déficience des systèmes de défense des bactéries. De ce fait, les bactéries « immunodéprimées » sont plus à même d'acquérir des multirésistances aux antibiotiques, ce qui est en accord avec les données génomiques des souches d'*E. faecalis* multirésistantes. Ces nouvelles connaissances pourraient permettre le développement de thérapies spécifiques à *E. faecalis* et ciblant les bactéries multirésistantes. Il est en effet possible d'envisager le recours à la phagothérapie, c'est-à-dire l'utilisation de bactériophages ciblant les souches pathogènes, comme démontré par Yosef *et al.* [8]. Le principe serait alors de profiter de l'absence, chez les souches pathogènes, de défense contre les transferts horizontaux de gènes pour permettre l'introduction, *via* la transduction virale, d'un système CRISPR/Cas fonctionnel dans ces bactéries et ciblant spécifiquement les gènes de résistances aux antibiotiques ou des gènes essentiels de leur génome. La phagothérapie se profile donc comme une stratégie possible contre les maladies nosocomiales provoquées par des bactéries pathogènes multirésistantes. ♦

### Resistance to conjugative transfer via CRISPR/Cas and restriction/modification in *Enterococcus faecalis*

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

1. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. In : Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, eds. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston : Massachusetts eye and ear Infirmary, 2014.
2. George RC, Uttley AH. Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infection in the 1980s. *Epidemiol Infect* 1989 ; 103 : 403-13.
3. Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000 ; 13 : 513-22.



## RÉFÉRENCES

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

## NOUVELLE

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

Paul Castagné<sup>1</sup>, Armelle Guingand<sup>1</sup>, Alexandra Moderc<sup>1</sup>, Sarah Monard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> École normale supérieure de Lyon, département de biologie, Master biologie, Lyon, France.

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

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

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

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

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

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