

ARTICLE

Les systèmes CRISPR-Cas comme arme contre les bactéries pathogènes

David Bikard^{1,*} et Rodolphe Barrangou²

¹ Groupe de Biologie de Synthèse, Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris 75015, France

² Department of Food, Processing and Nutritional Sciences, North Carolina State University, NC, USA

Reçu le 6 mars 2018

Résumé— Les systèmes CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) servent de système immunitaire adaptatif aux bactéries et aux archées, en ciblant les éléments génétiques étrangers grâce à de petits ARN guidant des nucléases Cas pour les détruire. Ces nucléases peuvent être reprogrammées pour cibler des séquences chromosomiques plutôt que des éléments génétiques invasifs. Alors que cibler le génome des cellules eucaryotes permet d'y introduire des mutations de manière efficace, les cassures provoquées par les nucléases Cas dans le chromosome bactérien sont délétères et létales. Cette propriété peut être utilisée pour développer une nouvelle stratégie antimicrobienne, à la fois spécifique et programmable. Le système CRISPR-Cas peut être délivré aux bactéries cibles en utilisant des capsides de bactériophages afin d'éliminer spécifiquement les bactéries portant des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes de virulence. Ces technologies ouvrent de nouvelles voies pour le développement d'outils basés sur les systèmes CRISPR-Cas pour l'élimination sélective des pathogènes et l'altération précise de la composition de microbiomes variés.

Mots clés : CRISPR-Cas, antibiotiques, nucléases

Abstract - CRISPR-Cas systems as weapons against pathogenic bacteria. CRISPR-Cas systems (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) are the adaptive immune system of bacteria and archaea. They target foreign genetic elements thanks to small RNAs able to guide Cas nucleases to destroy them. These nucleases can be reprogrammed to target chromosomal sequences rather than invasive genetic elements. Whereas targeting the genome of eukaryotic cells enables the efficient genesis of mutations, DNA breaks induced by Cas nucleases are lethal in bacteria. This property can be used in the development of novel antimicrobial strategies. CRISPR-Cas systems can be delivered to target bacteria using bacteriophage capsids in order to specifically eliminate bacteria carrying antibiotic resistance genes or virulence factors. These technologies enable the development of novel tools based on CRISPR-Cas systems to specifically eliminate pathogenic bacteria and precisely modify the composition of various microbiomes.

Keywords: CRISPR-Cas, antibiotics, nucleases

Les séquences CRISPR et les protéines associées (Cas) constituent le système immunitaire adaptatif des procaryotes (Barrangou *et al.*, 2007). Leur découverte a conduit au développement de nombreux outils technologiques reposant pour la plupart sur la découverte, parmi les protéines Cas, de nucléases programmables guidées par de petits ARN (Jinek *et al.*, 2012 ; Hsu *et al.*, 2014). En modifiant la séquence de ces ARN guides, les scientifiques sont capables de diriger ces nucléases de manière extrêmement précise vers pratiquement n'importe quel locus génomique d'intérêt. Il existe une diversité très importante de systèmes CRISPR-Cas, aussi bien au niveau

de leur composition génétique que de leurs mécanismes d'action moléculaire (Makarova *et al.*, 2015). Ici, nous nous concentrerons principalement sur les systèmes CRISPR-Cas de type I et II qui ont été utilisés pour tuer sélectivement les bactéries. Dans la nature, les systèmes de type I sont les plus répandus et dépendent d'un complexe effecteur multi-protéines (Brouns *et al.*, 2008) qui utilise l'exonucléase Cas3 pour dégrader l'ADN cible (Sinkunas *et al.*, 2013). Les systèmes de type II utilisent, eux, l'endonucléase Cas9 pour générer des cassures d'ADN double brin (Garneau *et al.*, 2010 ; Gasiunas *et al.*, 2012 ; Jinek *et al.*, 2012). Ces systèmes CRISPR-Cas9 forment un complexe nucléoprotéique avec deux petits ARN, l'ARN guide ou crRNA (CRISPR RNA) et un tracrRNA

*Auteur correspondant : david.bikard@pasteur.fr

(*trans-acting* CRISPR RNA) (Deltcheva *et al.*, 2011). Ce système peut être simplifié en un système à deux composants, comprenant la protéine Cas9 et un seul ARN guide chimérique sgRNA (*single guide* RNA), imitant le complexe crRNA:tracrRNA natif (Jinek *et al.*, 2012). Les cassures d'ADN générées par Cas9 peuvent être réparées, permettant des modifications précises de l'ADN à l'endroit exact de la coupure générée. En plus des applications de ce système à l'introduction de modifications génétiques, d'autres technologies basées sur Cas9 ont été récemment développées pour contrôler précisément l'expression des gènes, modifier l'état épigénétique d'une séquence, marquer des positions génomiques par fluorescence, ou encore effectuer des criblages génétiques à haut débit (Hsu *et al.*, 2014; Barrangou & Doudna, 2016). Bien que la plupart des efforts en cours se concentrent sur les applications des technologies CRISPR aux cellules eucaryotes, les systèmes CRISPR-Cas offrent d'énormes opportunités chez les bactéries, où les systèmes CRISPR-Cas endogènes ou hétérologues peuvent être facilement réutilisés pour diverses applications, y compris l'édition du génome et le contrôle de l'expression génique (Bikard *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2015). Nous discuterons ici de l'utilisation des systèmes CRISPR-Cas comme antibactérien. Ces systèmes peuvent en effet être facilement reprogrammés pour cibler des séquences indésirables telles que les gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence, présents dans le chromosome bactérien, dans le but d'éradiquer les bactéries pathogènes, ou comme un moyen de détruire les plasmides indésirables qu'ils transportent occasionnellement (Marraffini & Sontheimer, 2008; Garneau *et al.*, 2010; Bikard *et al.*, 2014; Citorik *et al.*, 2014; Goren *et al.*, 2017).

Le principal résultat de l'auto-ciblage chez la bactérie est la mort cellulaire

La première étude décrivant l'effet létal d'un système CRISPR-Cas, ciblant une séquence portée par le chromosome d'une bactérie, a été publiée par l'équipe d'Udi Qimron (Edgar & Qimron, 2010). Dans cette étude, le système CRISPR-Cas natif de type I-E d'*Escherichia coli* a été reprogrammé pour cibler le bactériophage lambda intégré sous forme de prophage dans le chromosome. Dans ces conditions, l'induction du système CRISPR-Cas entraîne la mort de 98% des cellules de la population bactérienne. Il a été montré par la suite que l'auto-ciblage par les systèmes de Type I tue efficacement les bactéries quel que soit l'emplacement de la cible (Gomaa *et al.*, 2013) et peut conduire à la suppression de gros fragments d'ADN dans la région cible (Vercoe *et al.*, 2013). Dans les systèmes de type I, le complexe CASCADE (*CRISPR associated complex for antiviral defense*) s'attache à la cible et recrute l'exonucléase Cas3, ce qui entraîne une dégradation rapide de l'ADN (Westra *et al.*, 2012; Caliando & Voigt, 2015). Ce mécanisme est différent de celui des systèmes de type II où Cas9 ne possède qu'une activité endonucléase introduisant une cassure double brin exactement à 3 nt de l'extrémité 3' de la cible (Jinek *et al.*,

2012). Les deux types principaux de systèmes CRISPR-Cas peuvent néanmoins être reprogrammés pour cibler des plasmides et les éliminer, ou cibler le chromosome et tuer les bactéries (Bikard *et al.*, 2012). Le système de type II de *S. pyogenes* a été utilisé pour sélectionner l'introduction de mutations dans une population de bactéries en tuant les bactéries non mutées (Jiang *et al.*, 2013). Les systèmes de type I de *E. coli* et *Salmonella*, ainsi que le système de type II de *S. thermophilus* ont également été utilisés pour éliminer sélectivement des organismes étroitement apparentés (99% d'identité génomique) en ciblant des séquences uniques dans une population microbienne complexe (Gomaa *et al.*, 2013).

La plupart des organismes, y compris les bactéries, sont régulièrement soumis à des cassures double brin et à d'autres types de dommages à l'ADN. Par conséquent, ils ont développé des voies complexes de réparation de l'ADN qui permettent de maintenir l'intégrité génomique. On peut donc se demander pourquoi les systèmes CRISPR-Cas sont si efficaces pour tuer les bactéries. Dans le cas des systèmes de type I, Cas3 possède à la fois une activité hélicase et une activité exonucléase (Beloglazova *et al.*, 2011; Sinkunas *et al.*, 2011). Ces systèmes sont capables de dégrader efficacement l'ADN jusqu'à 100 kb de la position cible en quelques heures, conduisant à la mort rapide des bactéries (Caliando & Voigt, 2015). Chez les systèmes de type II, Cas9 n'introduit qu'une cassure double brin. Cette cassure est ensuite reconnue par des exonucléases bactériennes telles que recBCD ou addAB, qui dégradent les extrémités cassées tout en produisant de l'ADN simple brin pouvant servir de substrat pour la réparation par recombinaison homologue (Wigley, 2013). Les conséquences du clivage de Cas9 dans le chromosome de *E. coli* ont été récemment étudiées en détail (Cui & Bikard, 2016). Chez les bactéries, le chromosome est le plus souvent présent en plusieurs copies et les cassures double brin sont réparées par recombinaison homologue avec une copie intacte du chromosome. Certains ARN guides tuent les bactéries de manière efficace en permettant à Cas9 de couper toutes les copies du chromosome simultanément, ce qui rend la réparation par recombinaison homologue impossible. Cependant, d'autres ARN guides conduisent à un ciblage moins efficace, entraînant la survie des bactéries grâce à une boucle continue de clivage et de réparation. Il est possible de bloquer ce phénomène en exprimant la protéine Gam du bactériophage Mu. Cette protéine se lie aux extrémités d'ADN double brin et bloque la recombinaison homologue, conduisant à la mort cellulaire indépendamment du choix de la cible (Cui & Bikard, 2016) (Figure 1).

Délivrer les systèmes CRISPR-Cas dans des populations bactériennes

Les systèmes CRISPR-Cas permettent de tuer les bactéries de manière efficace en ciblant leur chromosome. Le principal défi pour la mise en place de telles stratégies comme antimicrobiens reste cependant le développement de méthodes permettant de délivrer un système CRISPR-Cas

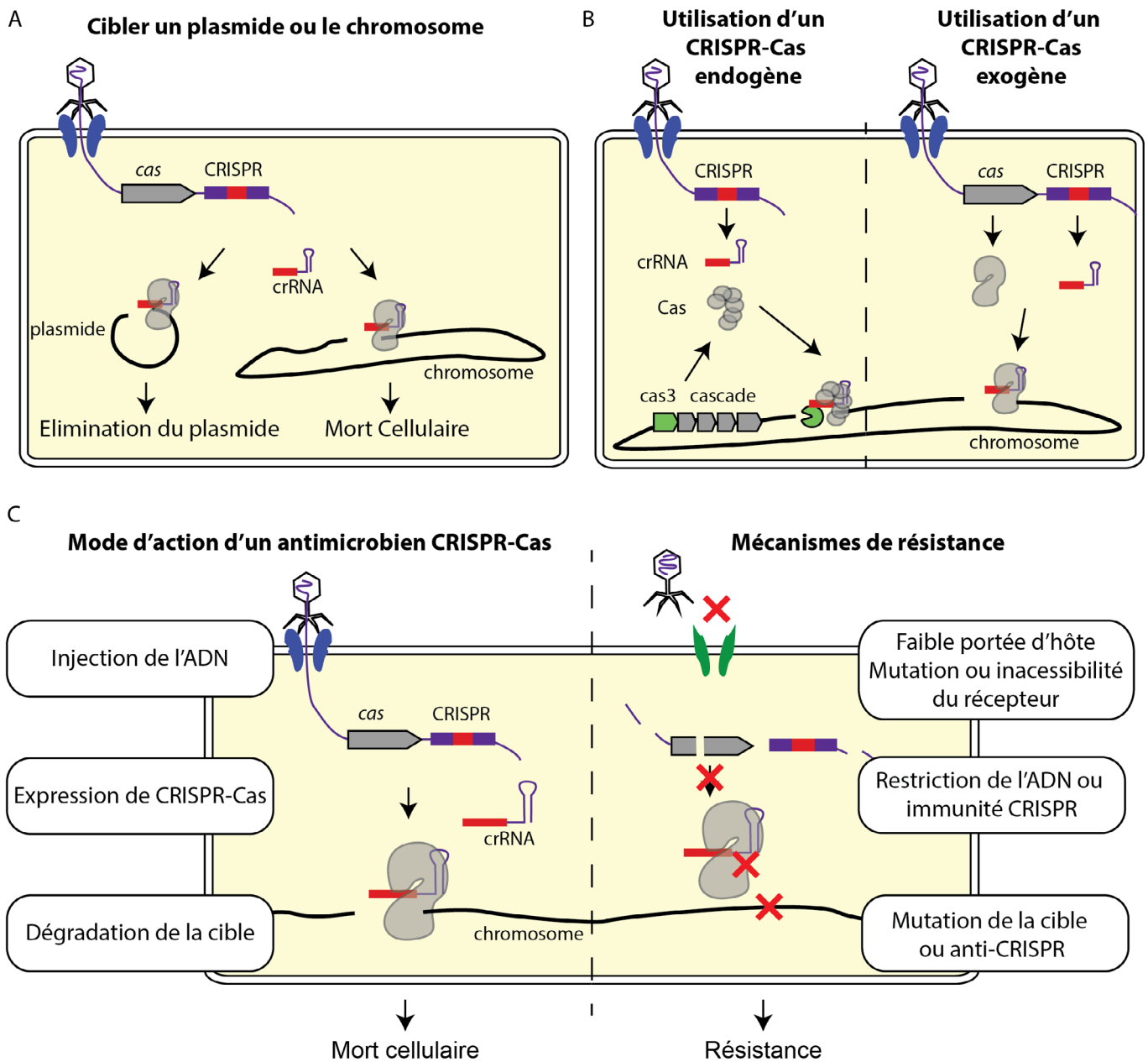


Figure 1. Antimicrobiens CRISPR-Cas. A) Cibler un plasmide avec un système CRISPR-Cas conduit à son élimination tandis que cibler le chromosome conduit à la mort cellulaire. B) Lorsque la bactérie ciblée porte un système CRISPR-Cas endogène, il est possible de délivrer un CRISPR seul, afin de rediriger les protéines Cas endogènes pour tuer la bactérie. Une autre stratégie consiste à délivrer un système CRISPR-Cas exogène complet. C) Représentation du mode d'action d'un antimicrobien CRISPR. La résistance peut survenir à toutes les étapes : adsorption du vecteur, injection de l'ADN, action du système CRISPR-Cas (d'après [Bikard et Barrangou, 2017](#)).

de manière ciblée, spécifique et efficace au sein d'une population hétérogène de bactéries. Plusieurs études ont montré comment des bactériophages peuvent être vectorisés afin d'injecter chez les bactéries de l'ADN codant pour des protéines bactéricides autres que les nucléases Cas. Le phagème M13 a été utilisé pour administrer diverses toxines ou enzymes de restriction à *E. coli* ([Hagens & Bläsi, 2003](#); [Westwater et al., 2003](#); [Moradpour et al., 2009](#)). Le phage Pf3 a également été utilisé pour administrer une enzyme de restriction et traiter avec succès une infection à *P. aeruginosa* chez la souris ([Hagens et al., 2004](#)).

Inspirées par ces résultats, deux études, l'une chez *E. coli* et l'autre chez *S. aureus*, ont fourni une preuve de concept pour introduire des systèmes CRISPR-Cas dans des bactéries pathogènes en utilisant des capsides de phages comme vecteur ([Bikard et al., 2014](#); [Citorik et al., 2014](#)). Dans la première étude, le système phagème M13 a été utilisé pour injecter une construction génétique contenant Cas9 et des ARN guides ciblant divers gènes de résistance aux antibiotiques. Comme prévu, l'introduction d'un système ciblant le chromosome conduit à la mort d'*E. coli*. De manière intéressante, cibler un plasmide peut

également conduire à la mort cellulaire lorsque le plasmide porte un système toxine-antitoxine, mais engendre en son absence la perte du plasmide. Dans la seconde étude, les auteurs ont construit un phagémide basé sur le phage phiNM1 permettant de cibler *S. aureus*. Ce phagémide a été utilisé pour cibler divers gènes de résistance aux antibiotiques, ainsi que des facteurs de virulence portés, soit sur des plasmides, soit sur le chromosome. Les deux études ont démontré la possibilité d'utiliser des systèmes CRISPR-Cas pour éliminer spécifiquement un génotype bactérien cible dans une population mixte, *in vitro* et *in vivo*, en utilisant un modèle d'infection du ver *Galleria mellonella* dans le premier cas et un modèle de colonisation de la peau de la souris dans l'autre.

Un défi majeur pour la mise en œuvre de cette stratégie est de réussir à injecter le système CRISPR-Cas dans la majorité d'une population de bactéries cibles dans un environnement complexe, où l'agent pathogène n'est parfois présent qu'en petit nombre relatif. Une stratégie élégante a été proposée afin de conférer un avantage de *fitness* aux bactéries qui reçoivent le système CRISPR-Cas et ainsi favoriser sa propagation dans la population (Yosef *et al.*, 2015). Dans un premier temps, un système CRISPR-Cas ciblant des gènes de résistance au bêta-lactame est délivré. Dans une seconde étape, les bactéries portant ce système CRISPR sont sélectionnées en utilisant un phage lytique T7 modifié pour porter des séquences cibles correspondant aux espaceurs du CRISPR. Seules les cellules qui portent un système CRISPR-Cas actif avec les espaceurs anti-bêta-lactame peuvent résister à l'infection par le phage T7 modifié. Cette stratégie permet de resensibiliser de manière efficace une population bactérienne à l'utilisation de bêta-lactame.

Une autre considération importante pour la mise en place d'antibactériens CRISPR-Cas est le choix du type de système CRISPR-Cas le plus efficace pour éliminer la bactérie cible. Il peut être préférable dans certains cas de coopter des systèmes endogènes et de fournir uniquement des ARN guides ciblant les gènes d'intérêt. Cette stratégie présente l'avantage de nécessiter une construction plus minimaliste et plus simple, mais a l'inconvénient de s'appuyer sur des protéines endogènes qui pourraient ne pas être exprimées ni même fonctionnelles dans certaines conditions (Westra *et al.*, 2010). Finalement, de nombreux efforts restent à fournir afin d'identifier la meilleure manière de formuler ces préparations de phagémides en fonction de la voie d'administration et du site infectieux ciblé.

Résistance

Une contrainte importante liée à l'utilisation de phages comme vecteurs est leur capacité limitée à injecter leur ADN dans des bactéries variées. La plupart des phages ne peuvent infecter qu'un nombre restreint de souches dans une espèce donnée. Cette gamme d'hôtes peut être réduite par de nombreux facteurs (Labrie *et al.*, 2010). Les récepteurs de surface peuvent ne pas être présents ou peuvent être cachés; les systèmes d'exclusion peuvent

bloquer l'injection de l'ADN phagique dans la cellule, et les systèmes de restriction-modification, tout comme des systèmes CRISPR-Cas endogènes, peuvent dégrader l'ADN du phage. Toutes ces voies de défense présentent des obstacles à la réussite de l'injection de systèmes CRISPR-Cas exogènes dans les bactéries en utilisant des phagémides. Des cocktails de phages ont traditionnellement été utilisés pour surmonter ces obstacles afin de s'assurer qu'au moins un phage soit capable d'infecter les bactéries cibles, mais ces cocktails peuvent être complexes à produire à l'échelle industrielle et présentent des défis réglementaires supplémentaires (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Une autre stratégie consiste à obtenir des phages avec des gammes d'hôtes étendues par des méthodes d'ingénierie ou de sélection (Ando *et al.*, 2015; Mapes *et al.*, 2016; Yosef *et al.*, 2017).

En plus des mécanismes de résistance qui bloquent l'injection et l'expression du système CRISPR-Cas, le système lui-même peut échouer de plusieurs façons. Des mutations dans le système CRISPR-Cas ou dans la cible peuvent permettre aux bactéries de survivre. Dans le premier cas, les bactéries sont toujours sensibles à un système CRISPR-Cas fonctionnel, mais dans le second cas, elles s'échappent de manière durable. Plusieurs études ont montré comment de grandes délétions peuvent se produire dans la région cible, permettant aux bactéries de survivre (Vercoe *et al.*, 2013; Selle *et al.*, 2015; Cui & Bikard, 2016). De tels résultats peuvent être considérés comme positifs, car ces délétions entraînent la perte des gènes cibles. Néanmoins, des mutations ponctuelles pourraient permettre aux bactéries d'échapper à la reconnaissance par les nucléases Cas tout en préservant la fonction du gène. Afin d'éviter ce problème, le système CRISPR-Cas peut être programmé pour cibler simultanément plusieurs positions du gène indésirable. La probabilité que toutes les positions ciblées mutent simultanément tout en préservant la fonction du gène est alors très faible. Enfin, des protéines anti-CRISPR ont été récemment caractérisées chez certains phages (Pawluk *et al.*, 2016). Il est envisageable que, face à une utilisation importante de systèmes CRISPR-Cas comme antimicrobiens, ces anti-CRISPR puissent être cooptés par des bactéries pour échapper aux traitements.

Perspectives

Les systèmes CRISPR-Cas ont été utilisés avec succès pour cibler les facteurs de virulence et les gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries, ouvrant ainsi la voie au développement d'antimicrobiens programmables et spécifiques. Ces systèmes peuvent éliminer efficacement une population cible lorsqu'ils sont délivrés par des capsides de phages *in vitro* et peuvent également réduire la colonisation d'une population cible *in vivo*. Ils sont également capables d'éliminer les plasmides portés par les bactéries qui sont souvent une source de résistance aux antibiotiques, permettant ainsi de restaurer l'efficacité des antibiotiques. Des indications spécifiques et des approches thérapeutiques doivent maintenant être

établies afin d'amener ces stratégies jusqu'à la clinique et de répondre aux grands défis rencontrés par les antibiotiques actuellement disponibles. À l'avenir, les technologies basées sur CRISPR permettront peut-être également de contrôler la composition des communautés microbiennes de manière fine, autorisant le traitement de nombreuses pathologies liées aux déséquilibres du microbiome.

Références

- Ando, H., Lemire, S., Pires, D.P., Lu, T.K. (2015). Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell Syst*, 1, 187-196.
- Barrangou, R., Doudna, J.A. (2016). Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol*, 34, 933-941.
- Barrangou, R., Frémaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709-1712.
- Beloglazova, N., Petit, P., Flick, R., Brown, G., Savchenko, A., Yakunin, A.F. (2011). Structure and activity of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference. *EMBO J*, 30, 4616-4627.
- Bikard, D., Barrangou, R. (2017). Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Curr Opin Microbiol*, 37, 155-160.
- 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, 177-186.
- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., Marraffini, L.A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, 41, 7429-7437.
- Bikard, D., Euler, C.W., Jiang, W., Nussenzweig, P.M., Goldberg, G.W., Duportet, X., Fischetti, V.A., Marraffini, L.A. (2014). Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*, 32, 1146-1150.
- Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuys, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., van der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321, 960-964.
- Caliando, B.J., Voigt, C.A. (2015). Targeted DNA degradation using a CRISPR device stably carried in the host genome. *Nat Commun*, 6, 6989.
- Citorik, R.J., Mimee, M., Lu, T.K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol*, 32, 1141-1145.
- Cui, L., Bikard, D. (2016). Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 44, 4243-4251.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471, 602-607.
- Edgar, R., Qimron, U. (2010). The *Escherichia coli* CRISPR system protects from lambda lysogenization, lysogens, and prophage induction. *J Bacteriol*, 192, 6291-6294.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.E., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Frémaux, C., Horvath, P., Magadan, A.H., Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468, 67-71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 15539-15540.
- Gomaa, A.A., Klumpe, H.E., Luo, M.L., Selle, K., Barrangou, R., Beisel, C.L. (2013). Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *MBio*, 5, e00928-13.
- Goren, M., Yosef, I., Qimron, U. (2017). Sensitizing pathogens to antibiotics using the CRISPR-Cas system. *Drug Resist Updat*, 30, 1-6.
- Hagens, S., Bläsi, U. (2003). Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Lett Appl Microbiol*, 37, 318-323.
- Hagens, S., Habel, A., von Ahsen, U., von Gabain, A., Bläsi, U. (2004). Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3817-3822.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157, 1262-1278.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., Marraffini, L.A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 31, 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, 816-821.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*, 8, 317-327.
- Luo, M.L., Mullis, A.S., Leenay, R.T., Beisel, C.L. (2015). Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression. *Nucleic Acids Res*, 43, 674-681.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., van der Oost, J., Backofen, R., Koonin, E.V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 13, 722-736.
- Mapes, A.C., Trautner, B.W., Liao, K.S., Ramig, R.F. (2016). Development of expanded host range phage active on biofilms of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacteriophage*, 6, e1096995.
- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322, 1843-1845.
- Moradpour, Z., Sepehrizadeh, Z., Rahbarizadeh, F., Ghasemian, A., Yazdi, M.T., Shahverdi, A.R. (2009). Genetically engineered phage harbouring the lethal catabolite gene activator protein gene with an inducer-independent promoter for biocontrol of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 296, 67-71.
- Pawluk, A., Staals, R.H.J., Taylor, C., Watson, B.N.J., Saha, S., Fineran, P.C., Maxwell, K.L., Davidson, A.R. (2016). Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. *Nat Microbiol*, 1, 16085.
- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., Lim, W.A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152, 1173-1183.
- Selle, K., Klaenhammer, T.R., Barrangou, R. (2015). CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, 8076-8081.

- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Frémaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2011). Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J*, 30, 1335-1342.
- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Waghmare, S.P., Dickman, M.J., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2013). *In vitro* reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*. *EMBO J*, 32, 385-394.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 649-659.
- Vercoe, R.B., Chang, J.T., Dy, R.L., Taylor, C., Gristwood, T., Clulow, J.S., Richter, C., Przybilski, R., Pitman, A.R., Fineran, P.C. (2013). Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands. *PLoS Genet*, 9, e1003454.
- Westra, E.R., Pul, Ü., Heidrich, N., Jore, M.M., Lundgren, M., Stratmann, T., Wurm, R., Raine, A., Mescher, M., van Heereveld, L., Mastop, M., Wagner, E.G., Schnetz, K., van Der Oost, J., Wagner, R., Brouns, S.J. (2010). H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol Microbiol*, 77, 1380-1393.
- Westra, E.R., van Erp, P.B., Kunne, T., Wong, S.P., Staals, R. H., Seegers, C.L., Bollen, S., Jore, M.M., Semenova, E., Severinov, K., de Vos W.M., Dame R.T., de Vries R., Brouns S.J., van der Oost J. (2012). CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Mol Cell*, 46, 595-605.
- Westwater, C., Kasman, L.M., Schofield, D.A., Werner, P.A., Dolan, J.W., Schmidt, M.G., Norris, J.S. (2003). Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 1301-1307.
- Wigley, D.B. (2013). Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nat Rev Microbiol*, 11, 9-13.
- Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., Qimron, U. (2015). Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, 7267-7272.
- Yosef, I., Goren, M.G., Globus, R., Molshanski-Mor, S., Qimron, U. (2017). Extending the host range of bacteriophage particles for DNA transduction. *Mol Cell*, 66, 721-728.e3.

Citation de l'article : Bikard, D. et Barrangou, R. (2017). Les systèmes CRISPR-Cas comme arme contre les bactéries pathogènes. *Biologie Aujourd'hui*, 211, 265-270