

ARTICLE

Incontournables et pourtant rares : les déterminants de la distribution des systèmes CRISPR-Cas dans les génomes bactériens

Aude Bernheim^{1,2,3,*}

¹ Synthetic Biology Group, Institut Pasteur, 25–28 rue Dr. Roux, 75015 Paris, France

² Microbial Evolutionary Genomics, Institut Pasteur, 25–28 rue Dr Roux, 75015 Paris, France

³ AgroParisTech, 75005 Paris, France

Reçu le 1 mars 2018

Résumé – Les systèmes CRISPR-Cas (*Cluster of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) confèrent aux bactéries une immunité adaptative contre les éléments génétiques mobiles, jouant ainsi un rôle important dans l'évolution bactérienne. Cependant, malgré la protection qu'ils apportent, moins de la moitié des génomes bactériens encodent des systèmes CRISPR-Cas. En comparaison, 90 % des archées ont des systèmes CRISPR-Cas et un génome bactérien code pour en moyenne deux systèmes de restriction-modification. Cette faible prévalence est d'autant plus intrigante que les systèmes CRISPR-Cas sont massivement transférés horizontalement. Cette revue s'attache à décrire la distribution des systèmes CRISPR-Cas dans les génomes bactériens et à explorer les différentes hypothèses pouvant expliquer pourquoi les systèmes CRISPR-Cas sont présents dans un nombre relativement limité de ces génomes. Les mécanismes d'évasion des phages, les facteurs écologiques tels que la diversité et l'abondance des phages ou les coûts intrinsèques liés à la maintenance du système ou aux phénomènes d'auto-immunité seront notamment discutés. Comprendre les inconvénients à encoder des systèmes CRISPR-Cas est essentiel pour appréhender leurs dynamiques évolutives et leurs succès relatifs dans certains environnements ou clades.

Mots clés : CRISPR-Cas, distribution CRISPR-Cas, transfert horizontal, auto-immunité, bactériophages

Abstract – Why so rare if so essential: the determinants of the sparse distribution of CRISPR-Cas systems in bacterial genomes. CRISPR-Cas (Cluster of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) systems confer bacteria and archaea an adaptative immunity against phages and other invading genetic elements playing an important role in bacterial evolution. However, despite the protection they generate and high rate of horizontal transfer, less than 50% of bacterial genomes harbor a CRISPR-Cas system. As a comparison, 90% of archaea encode a CRISPR-Cas system and a bacterial genome codes for two restriction modification systems on average. This review describes CRISPR-Cas systems distribution in bacterial genomes and then details the different hypotheses put forward to explain the relative scarcity of CRISPR-Cas systems. More specifically, phage escape mechanisms, ecological factors such as phage diversity and abundance and intrinsic costs, such as maintenance or autoimmunity, are discussed. Overall, a better understanding of the downsides of encoding CRISPR-Cas systems is essential to explain their evolutionary dynamics and their relative success in different environments and clades.

Keywords: CRISPR-Cas, CRISPR-Cas distribution, horizontal transfer, autoimmunity, bacteriophages

Les systèmes CRISPR-Cas sont des systèmes immunitaires adaptatifs des bactéries

Au cours des dix dernières années, les systèmes CRISPR-Cas ont passionné la communauté scientifique à la fois en raison de leur rôle de système immunitaire adaptatif dans les bactéries et de leur utilisation dans de nombreuses applications biotechnologiques, en particulier

pour éditer le génome. Alors que de nombreux efforts ont été entrepris pour comprendre en détail la biologie complexe et les mécanismes moléculaires de ces systèmes, les questions d'évolution restent multiples.

Les systèmes CRISPR-Cas constituent un processus immunitaire adaptatif des bactéries et des archées ciblant les éléments génétiques mobiles (MGE) tels que les phages ou les plasmides (Barrangou *et al.*, 2007 ; Brouns *et al.*, 2008 ; Marraffini et Sontheimer, 2008). Ils sont composés d'une série de courtes séquences répétées appelées

*Auteur correspondant : aude.bernheim@gmail.com

CRISPR (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées) et d'un groupe de gènes *cas* (CRISPR associated genes). Les CRISPR comprennent deux types de séquences : les répétitions et les *spacers*. Les répétitions sont des séquences courtes (typiquement 20–40 pb) identiques dans un CRISPR donné. Ces systèmes sont entrecoupés par des *spacers*, séquences courtes et diverses (typiquement 20–40 pb), qui correspondent souvent à des séquences d'éléments génétiques mobiles. Le second élément des systèmes CRISPR-Cas consiste en un ensemble de gènes *cas* nécessaires pour réaliser l'immunité (Bolotin *et al.*, 2005 ; Mojica *et al.*, 2005 ; Pourcel *et al.*, 2005 ; Makarova *et al.*, 2006).

L'immunité CRISPR-Cas fonctionne en deux étapes : immunité et immunisation aussi appelée adaptation (Marraffini, 2015) (Figure 1). L'immunité peut être scindée en deux phases : 1) l'expression et la maturation du crRNA, 2) l'interférence. Le CRISPR est transcrit puis scindé en ARN plus petits, composés chacun d'une répétition et d'un seul *spacer* appelé crRNA (CRISPR RNA). Chacun de ces ARN sert alors de guide pour un complexe de protéines Cas. Si la séquence d'un guide est identique à une autre séquence d'ADN dans la cellule, comme par exemple l'ADN d'un phage, le complexe activera une réponse immunitaire, la plupart du temps en coupant l'ADN envahisseur qui sera ensuite dégradé.

Pendant l'adaptation, un complexe de protéines Cas génère puis incorpore un nouveau *spacer* dans le *locus* CRISPR. Un aspect important du système est la capacité à distinguer son propre ADN d'un ADN exogène. Dans de nombreux cas, une courte séquence appelée PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) est essentielle pour ce processus. Présente à proximité d'un *protospacer* (séquence d'un *spacer* sur un élément génétique mobile) mais absente dans le *locus* CRISPR, la PAM est nécessaire pour que l'interférence ait lieu (Briner *et al.*, 2015).

La diversité des systèmes CRISPR-Cas

Les systèmes CRISPR-Cas sont extrêmement divers. Ils sont distingués en deux classes, six types (I à VI) et 21 sous-types (Makarova *et al.*, 2015) (Figure 2). De nouveaux sous-types sont découverts chaque année, menant à une classification évoluant régulièrement (Burstein *et al.*, 2016a, b ; Shmakov *et al.*, 2017). La classification des systèmes CRISPR-Cas est fondée sur l'architecture des *loci* et sur le contenu des *clusters* Cas, plus spécifiquement sur les protéines signatures de chaque type (Makarova *et al.*, 2015) : Cas3 pour le type I, Cas9 pour le type II, Cas10 pour le type III, Csf4 pour le type IV, Cas12 pour le type V et Cas13 pour le type VI. Un aspect clé de l'organisation des systèmes CRISPR-Cas est leur

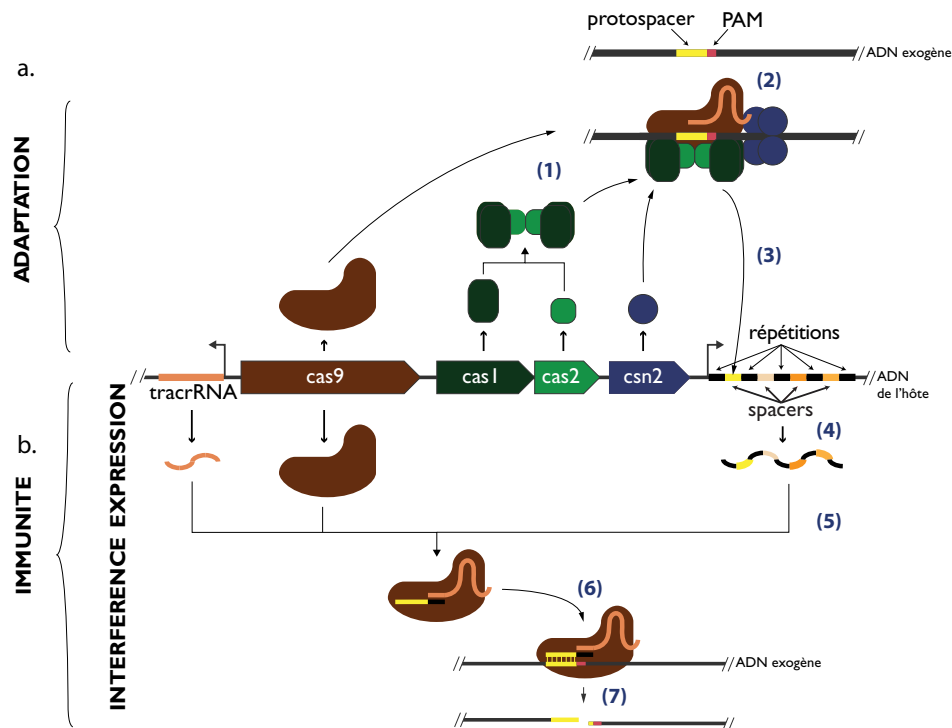
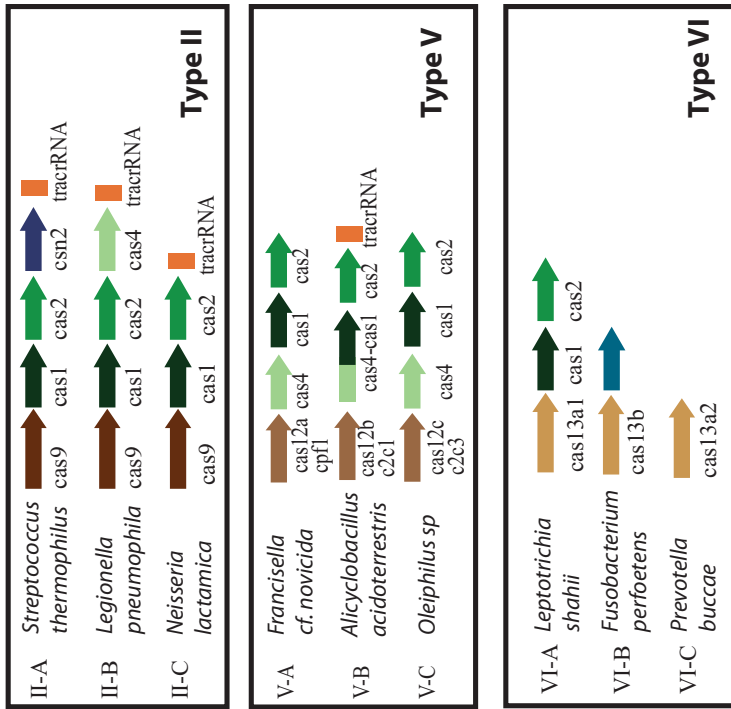


Figure 1. Vue d'ensemble du mécanisme CRISPR-Cas. Un *locus* CRISPR-Cas est organisé autour de deux éléments principaux : un groupe de gènes *cas* et un CRISPR composé de *spacers* et de répétitions (en noir). L'immunité CRISPR-Cas fonctionne en deux phases principales : l'adaptation où le complexe de protéines Cas permet l'acquisition de nouveaux *spacers* et l'immunité ciblée. a. Pendant la phase d'adaptation, les protéines Cas forment un complexe (1) capable de générer un court fragment d'ADN à partir de l'ADN étranger présent dans la cellule (2) qui est ensuite intégré dans le CRISPR comme nouveau *spacer* (3). b. Pendant la phase d'immunité, le CRISPR est transcrit (4) et scindé en petits ARN (5) qui servent de guides pour la reconnaissance de la cible pour les protéines Cas (6), qui dégradent l'ADN (7).

Figure adaptée de Bernheim (2017).

Systèmes CRISPR-Cas de Classe 2



Systèmes CRISPR-Cas de Classe 1

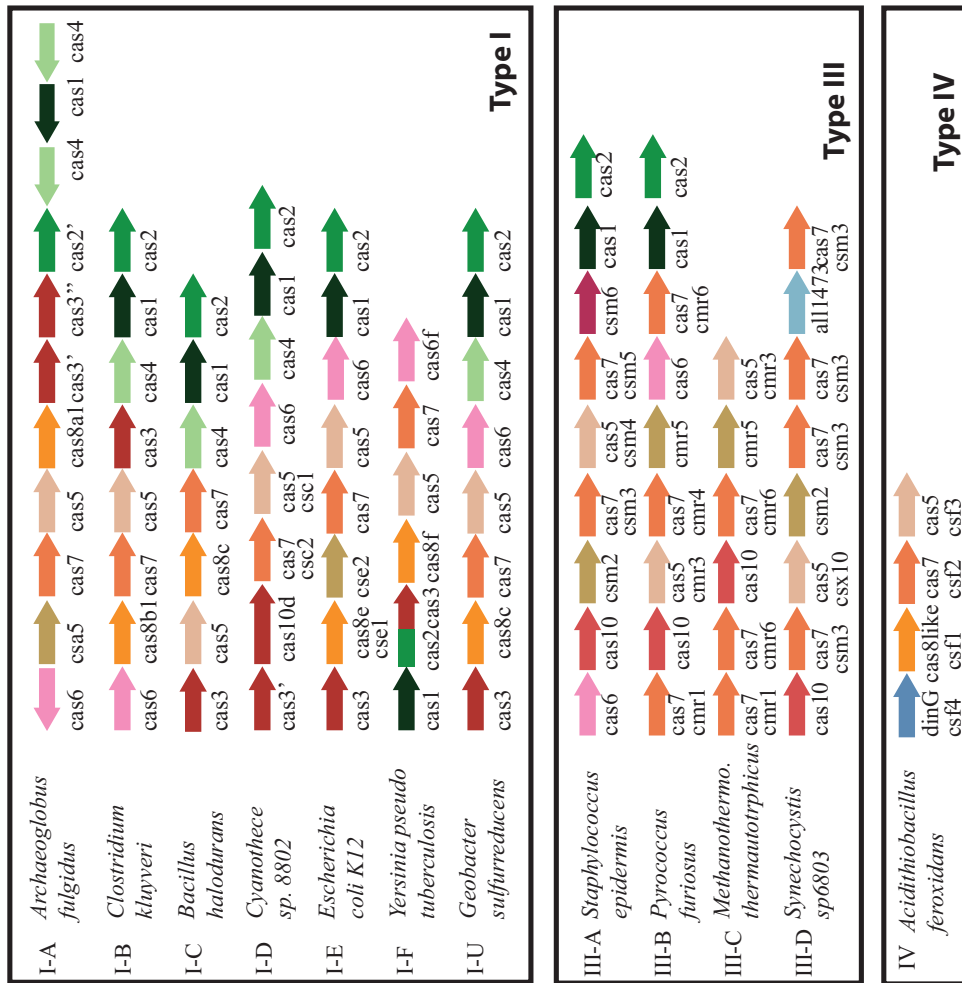


Figure 2. La diversité des systèmes CRISPR-Cas. Classification des systèmes CRISPR-Cas. Les systèmes CRISPR-Cas sont divisés en deux classes, six types (I à VI) et 21 sous-types. La classification est basée sur des protéines signatures et l'architecture des loci. Figure adaptée de [Bernheim \(2017\)](#).

modularité (Mohanraju *et al.*, 2016). Les divers systèmes CRISPR-Cas sont organisés autour de quatre modules : traitement de l'ARNr, reconnaissance de la cible, clivage de la cible et adaptation. Alors que le module d'adaptation est largement similaire dans tous les systèmes CRISPR-Cas et implique Cas1 et Cas2, les autres modules peuvent englober un très petit ou un grand nombre de protéines (Makarova *et al.*, 2015 ; Mohanraju *et al.*, 2016).

Les systèmes CRISPR-Cas de Classe 1 sont divisés en trois types et 12 sous-types (Makarova *et al.*, 2015). Les systèmes de Classe 1 sont définis par l'utilisation d'effecteurs multi-protéiques, c'est-à-dire que la phase d'interférence est réalisée par un complexe de protéines multiples. Ils sont de loin les plus abondants car ils représentent 90 % des systèmes CRISPR-Cas (Makarova *et al.*, 2015). D'autre part, les systèmes CRISPR-Cas de Classe 2 ne représentent que 10 % des systèmes CRISPR-Cas et sont presque complètement absents chez les archées (Makarova *et al.*, 2015). Leur effecteur est constitué d'une seule protéine multi-domaines. Les technologies CRISPR-Cas sont dérivées de sous-types appartenant à cette classe. La diversité des protéines Cas reflète la diversité des mécanismes moléculaires par lesquels les systèmes CRISPR-Cas mettent en œuvre l'immunité adaptative.

Selon une hypothèse actuelle, les systèmes CRISPR-Cas auraient émergé à la suite de l'insertion d'un casposon à proximité d'une protéine analogue à Cas10 (Koonin et Krupovic, 2014). Les casposons constituent une classe de transposons auto-synthétisants qui codent pour un homologue de Cas1 (Krupovic *et al.*, 2014). Les systèmes de classe 1 étant les plus répandus (Makarova *et al.*, 2013), les effecteurs de classe 1 sont considérés comme la forme ancestrale. Les variants de classe 2 auraient évolué par le remplacement du *locus* effecteur par des protéines uniques provenant de différents éléments génétiques mobiles. Les systèmes de type II dériveraient des protéines des transposons IscB (Kapitonov *et al.*, 2015), tandis que les systèmes de type V seraient liés aux transposons TnpB (Shmakov *et al.*, 2017). Enfin, les ancêtres du type VI n'ont pas encore été déterminés avec précision, mais dériveraient des protéines Cas contenant des domaines HEPN (Koonin et Makarova, 2017).

Une distribution éclatée des systèmes CRISPR-Cas malgré des transferts horizontaux constants

Les systèmes CRISPR-Cas sont présents dans plus de 90 % des archées et dans environ 50 % des bactéries (Makarova *et al.*, 2015). De nombreuses études de métagénomique ont révélé la présence de systèmes CRISPR-Cas dans des environnements aussi divers que l'intestin, le rumen, la neige en Antarctique ou des sources chaudes (Heidelberg *et al.*, 2009 ; Stern *et al.*, 2012 ; Rho *et al.*, 2012 ; Lopatina *et al.*, 2016).

Cette large distribution peut en partie s'expliquer par l'observation selon laquelle les systèmes CRISPR-Cas sont massivement transférés horizontalement. Plusieurs études

phylogénétiques ont par exemple signalé l'incongruence entre l'arbre phylogénétique des gènes *cas* et celui des espèces (Godde et Bickerton, 2006 ; Chakraborty *et al.*, 2010). De plus, des systèmes CRISPR-Cas ont été détectés sur divers éléments génétiques mobiles. Ainsi, on trouve des systèmes CRISPR-Cas sur des mégaplasmides dans diverses bactéries dont *Treponema denticola*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia pestis* (Godde et Bickerton, 2006). Des systèmes CRISPR-Cas portés par des plasmides ont aussi été caractérisés expérimentalement (Guo *et al.*, 2011 ; Millen *et al.*, 2012 ; Scholz *et al.*, 2013). Les phages codent également pour des systèmes CRISPR-Cas. Par exemple, des CRISPR ont été détectés dans des prophages de *Clostridium* (Soutourina *et al.*, 2013). Expérimentalement, l'exemple du phage ICP1 de *Vibrio cholera* qui code pour un système fonctionnel CRISPR-Cas de Type I-F a permis de montrer un mécanisme de piratage de ce système de défense pour le retourner contre la bactérie (Seed *et al.*, 2013). Enfin, il a été récemment démontré que les transposons de type Tn7 encodent des systèmes CRISPR-Cas minimaux de type I-F et de type I-B (Peters *et al.*, 2017).

Cependant, la présence des systèmes CRISPR-Cas est potentiellement surestimée. Une récente étude sur les filtrats d'eaux souterraines a révélé que dans cet environnement seulement 10 % des bactéries codent pour des systèmes CRISPR-Cas (Burstein *et al.*, 2016a, b). Plus étonnant, certains phylums étaient complètement dépourvus de systèmes CRISPR-Cas (Burstein *et al.*, 2016a, b). L'étude de ces phylums dans d'autres environnements a confirmé que l'absence de systèmes CRISPR-Cas n'était pas limitée à un environnement spécifique (Burstein *et al.*, 2016a, b). L'écart entre ces détections peut s'expliquer par les génomes étudiés. L'abondance de certains clades dans les filtrats d'eau souterraine diffère de l'abondance dans la base de données de génomes entièrement séquencés et pourrait suggérer que les systèmes CRISPR-Cas sont moins avantageux dans cet environnement spécifique. Au total, leur prévalence semble assez faible par rapport à d'autres systèmes de défense tels que la modification de restriction, dont on trouve en moyenne deux copies par génome (Oliveira *et al.*, 2016). Même à l'intérieur d'une espèce, les souches diffèrent en termes de présence de systèmes CRISPR-Cas (Westra *et al.*, 2016). Cette relative rareté soulève des questions relatives aux coûts potentiels des systèmes CRISPR-Cas.

Plusieurs études ont également signalé que les systèmes CRISPR-Cas ne sont pas répartis uniformément dans différents environnements. Plus spécifiquement, les environnements à haute température englobent plus d'organismes codant pour des systèmes CRISPR-Cas (Makarova *et al.*, 2006 ; Anderson *et al.*, 2011 ; Weinberger *et al.*, 2012). Un enrichissement en systèmes CRISPR-Cas a également été rapporté dans les métagénomiques microbiens associés aux éponges marines (Horn *et al.*, 2016) alors que les filtrats des eaux souterraines ont montré une prévalence réduite des systèmes CRISPR-Cas (Burstein *et al.*, 2016a, b). Cette distribution dispersée souligne l'impact des facteurs écologiques sur la distribution des systèmes CRISPR-Cas.

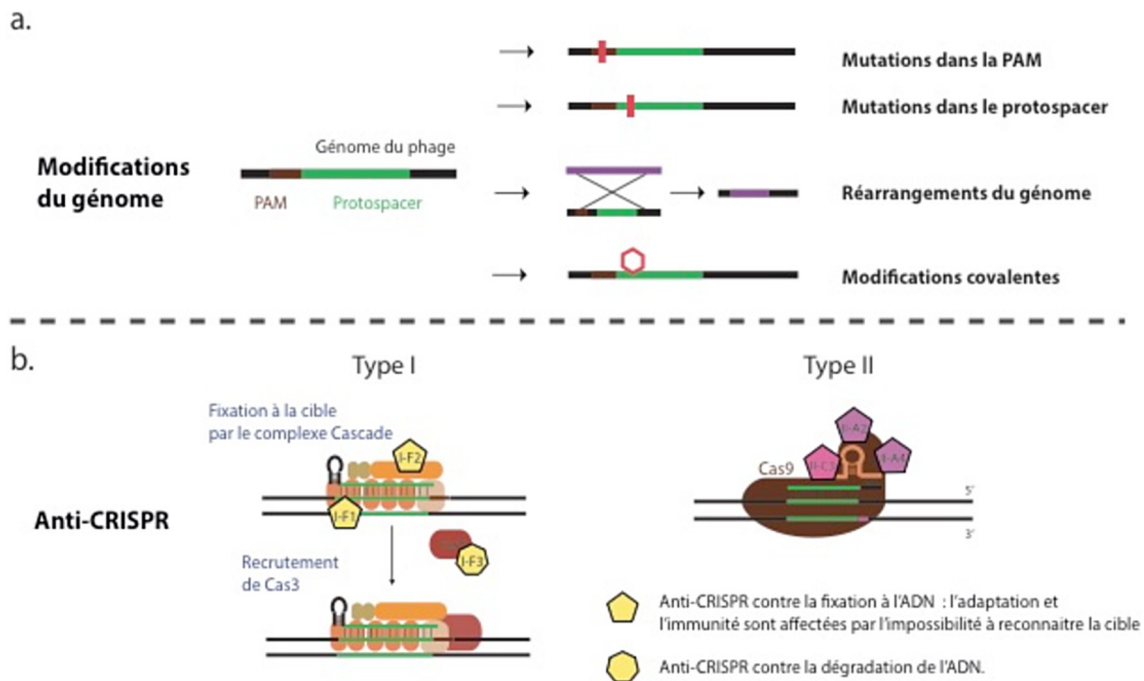


Figure 3. Les mécanismes de résistance des phages à l'immunité CRISPR-Cas. a. Des modifications du génome telles que des mutations dans la séquence PAM, ou dans les séquences cibles, des réarrangements de génomes ou des modifications covalentes de l'ADN permettent aux phages d'échapper à l'immunité CRISPR-Cas. b. Les protéines anti-CRISPR ou Acr (polygones jaunes ou roses) inhibent les systèmes CRISPR-Cas de manière dépendante du type et même du sous-type, en se liant à différents domaines des protéines Cas impliquées dans la reconnaissance de la cible ou le clivage de l'ADN. Figure adaptée de [Bernheim \(2017\)](#).

Pour expliquer la variation de présence, du nombre et de la fonction des *loci* CRISPR-Cas dans et entre les espèces bactériennes, plusieurs études plaident pour une dynamique de perte fréquente des systèmes CRISPR-Cas qui sont ensuite regagnés par transfert horizontal de gènes ([Takeuchi et al., 2012](#); [Jiang et al., 2013](#); [Berezovskaya et al., 2014](#)). Les gènes *cas* évoluent dans le cadre d'une sélection négative qui est généralement beaucoup plus faible que la force médiane de la sélection négative, ce qui suggère qu'ils peuvent être facilement perdus ([Takeuchi et al., 2012](#)). Différentes études expérimentales chez *Staphylococcus epidermidis*, *Thermoanaerobacter* et *Mycoplasma gallisepticum* ont rapporté des pertes fréquentes des systèmes CRISPR-Cas ([Delaney et al., 2012](#); [Jiang et al., 2013](#); [Mai et al., 2016](#)). Chez *Staphylococcus epidermidis*, la perte de systèmes CRISPR-Cas, même par de grandes suppressions, a un coût faible voire inexistant ([Jiang et al., 2013](#)). Les preuves d'un transfert fréquent et de pertes répétées ont conduit à supposer que les systèmes CRISPR-Cas sont en état continu de flux, étant perdus quand ils supportent un coût ou lorsqu'ils sont neutres, puis réacquis par transfert horizontal ([Jiang et al., 2013](#)).

Une efficacité limitée par des mécanismes d'évasion des bactériophages

Les bactéries et les phages sont engagés dans une course aux armements constante. Comme avec n'importe quel système de défense, les phages ont trouvé des moyens

d'échapper à l'immunité CRISPR-Cas en utilisant une variété de mécanismes qui impliquent la modification du génome ou des protéines spécifiques anti-CRISPR ([Figure 3](#)).

Les phages ont un taux de mutation élevé qui leur permet de s'adapter rapidement ([Drake, 1991](#)). L'hypothèse a été émise puis confirmée, selon laquelle les phages pouvaient échapper aux systèmes CRISPR-Cas par des mutations simples. Plusieurs expériences de co-évolution entre des bactéries encodant un système CRISPR-Cas fonctionnel et un phage ont été menées chez *Streptococcus thermophilus* ([Deveau et al., 2008](#); [Sun et al., 2013](#); [Paez-Espino et al., 2015](#)) et chez *Synechococcus* ([Heidelberg et al., 2009](#)). Les études rapportent l'accumulation de mutations uniques chez les phages dans les régions ciblées par CRISPR. Plus spécifiquement, la séquence PAM est plus fréquemment mutée que le reste du *protospacer*. Pour certains sous-types CRISPR-Cas, il existe une tolérance pour la spécificité de séquence, les mutations dans la PAM assurent l'abolition complète de l'immunité CRISPR-Cas.

Des expériences de co-évolution ont également conduit à l'observation de réarrangements génomiques ([Paez-Espino et al., 2015](#)). Il a été rapporté que la présence de phages divers augmentait leur persistance. L'analyse des génomes a révélé que les événements de recombinaison se produisaient entre les phages, générant ainsi des phages chimériques qui ne contenaient pas de régions ciblées par CRISPR ([Paez-Espino et al., 2015](#)). Des observations

similaires ont été faites lors de l'étude d'écosystèmes naturels (Andersson et Banfield, 2008).

Les phages peuvent également modifier leurs génomes par l'attachement de groupes chimiques à leur ADN (Bryson *et al.*, 2015). Ces formes de modifications de l'ADN sont utilisées pour échapper à d'autres systèmes immunitaires bactériens comme les systèmes de restriction-modification (Warren, 1980). Ainsi, un phage T4 contenant une modification covalente de l'ADN où la cytosine est remplacée par la glucosyl-hydroxyméthylcytosine est résistant à l'interférence CRISPR-Cas9 (Bryson *et al.*, 2015). Cependant, les modifications du génome ne sont pas le seul moyen par lequel la course aux armements opère.

Les phages codent pour de petites protéines qui inhibent les systèmes CRISPR-Cas et sont nommées anti-CRISPR (Borges *et al.*, 2017; Sontheimer et Davidson 2017). La découverte des anti-CRISPR provient de l'observation inattendue selon laquelle des souches lysogènes de *P. aeruginosa* encodant certains prophages spécifiques étaient sensibles à certains phages lytiques alors que les non lysogènes étaient résistantes (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). Ce phénotype s'explique par la présence de protéines codées par les prophages inhibant les systèmes CRISPR-Cas de Type I-F, autrement actifs et conférant une résistance aux phages lytiques. Depuis, des anti-CRISPR ont été découverts contre les systèmes CRISPR-Cas de type I-E, I-F, II-A et II-C (Pawluk *et al.*, 2014, Pawluk *et al.*, 2016; Rauch *et al.*, 2016; Hynes *et al.*, 2017). Ils sont encodés par des phages tempérés et lytiques (Borges *et al.*, 2017; Hynes *et al.*, 2017). Leurs mécanismes d'actions varient. Ils peuvent empêcher la reconnaissance de la cible en se liant au complexe effecteur ou à la nucléase dans les systèmes de type I (Wang J. *et al.*, 2016; Wang X. *et al.*, 2016; Chowdhury *et al.*, 2017). Dans les systèmes de type II, ils peuvent entraver la liaison à l'ADN guidé (Dong *et al.*, 2017; Yang & Patel, 2017; Shin *et al.*, 2017). Les anti-CRISPR sont répandus; 64 % des 449 CRISPR-Cas type I-F de *P. aeruginosa*, 53 % de 81 CRISPR-Cas type I-F de *P. aeruginosa*, et 50 % CRISPR-Cas type II-A de *L. monocytogenes* sont sensibles à des anti-CRISPR (Bondy-Denomy *et al.*, 2015; Rauch *et al.*, 2016). Les anti-CRISPR ont suscité beaucoup d'intérêt pour leur potentielle utilisation biotechnologique. Ils pourraient en effet être utilisés pour réguler des protéines telles que Cas9, ce qui est essentiel pour certaines applications spécifiques.

Des facteurs écologiques viennent expliquer cette distribution clairsemée

Les bactéries possèdent un arsenal de divers systèmes immunitaires pour contrer les phages. Étant donné la faible abondance des systèmes CRISPR-Cas par rapport à certains mécanismes de défense, il est essentiel de comprendre comment ces différents systèmes de défense interagissent et dans quelles conditions certains systèmes spécifiques seront favorisés par rapport aux autres. Une étude dans *S. thermophilus* a démontré que les systèmes

CRISPR-Cas et de restriction-modification pouvaient être compatibles et même fonctionner de manière synergique, augmentant ainsi la résistance aux phages (Dupuis *et al.*, 2013). Au contraire, un autre système expérimental permet à une souche de *P. aeruginosa* de développer une résistance face au phage DMS3 soit par CRISPR-Cas, soit par une modification de surface, montrant que les systèmes de défense ne fonctionnent pas toujours en synergie (Westra *et al.*, 2015).

Un facteur clé pour l'émergence des systèmes CRISPR-Cas est la faible diversité de phages (Weinberger *et al.*, 2012; Iranzo *et al.*, 2013). Deux modèles différents ont prédit que les avantages des systèmes CRISPR-Cas diminueraient avec l'augmentation de la diversité génétique des virus (Weinberger *et al.*, 2012; Iranzo *et al.*, 2013). Au-dessus d'une valeur seuil de diversité virale, le système CRISPR-Cas deviendrait inefficace car il ne serait pas capable de coder suffisamment de *spacers* pour cibler la population de phages et serait donc à terme perdu. Comme la diversité génétique dépend entre autres déterminants des taux de mutation et de la taille de la population, ces deux facteurs auront un impact sur le maintien des systèmes CRISPR-Cas dans une population. L'importante prévalence des systèmes CRISPR-Cas chez les thermophiles pourrait s'expliquer par des taux de mutation plus faibles chez les thermophiles que chez les mésophiles (Weinberger *et al.*, 2012). La taille de la population pourrait aussi expliquer cette prévalence élevée (Iranzo *et al.*, 2013). Comme les populations de mésophiles sont plus importantes que celle des thermophiles, une plus grande diversité de phages émergerait dans une population large. Les systèmes CRISPR-Cas deviendraient inefficaces dans ce contexte (Iranzo *et al.*, 2013). Enfin, la diversité virale peut également permettre l'émergence de nouveaux mécanismes d'échappement tels que la recombinaison entre les phages sensibles à un *spacer* spécifique limitant encore plus l'immunité CRISPR-Cas (Paez-Espino *et al.*, 2015).

Un deuxième facteur clé pour l'émergence des systèmes CRISPR-Cas est la faible abondance des phages. Les principales conclusions sur l'importance de la force d'infection, c'est-à-dire l'abondance de phages, proviennent d'une étude expérimentale chez *P. aeruginosa* (Westra *et al.*, 2015). Dans cette étude, *P. aeruginosa* peut développer soit une résistance due à une modification de surface, soit un système CRISPR-Cas pour échapper au phage DMS3. Lorsque l'expérience de co-évolution est réalisée dans un milieu à ressources élevées tel que le LB (*Lysogeny Broth*, milieu de culture riche), elle conduit à l'émergence de modifications presque exclusivement de surface alors que dans un milieu à ressources faibles, le contraire est observé avec une résistance presque exclusivement CRISPR-Cas. Ces observations s'expliquent par un paramètre: l'abondance des phages. Face à des infections rares, un système inductible comme CRISPR-Cas sera favorisé, tandis que des infections constantes favoriseront un type de défense constitutive.

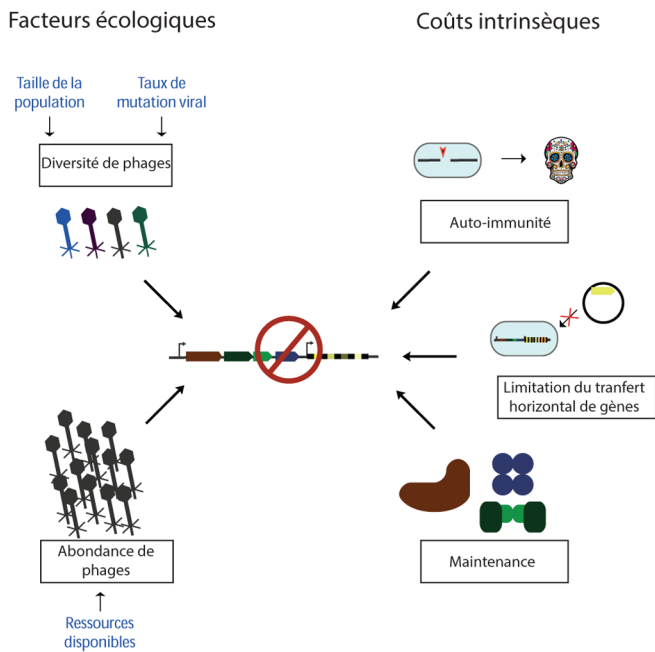


Figure 4. les inconvénients à coder pour des systèmes CRISPR-Cas. La relativement faible abondance des systèmes CRISPR-Cas peut s'expliquer à la fois par des facteurs écologiques, notamment la diversité et l'abondance des phages, et par des coûts intrinsèques, y compris le coût d'expression, la limitation du transfert horizontal de gènes et les phénomènes d'auto-immunité.

Figure adaptée de Bernheim (2017).

Coûts intrinsèques à coder pour un système CRISPR-Cas

Au-delà des facteurs écologiques, la rareté relative et la perte fréquente des systèmes CRISPR-Cas suggèrent qu'il existe des coûts intrinsèques à encoder des systèmes CRISPR-Cas, tels que les coûts de maintenance et d'expression du système, ceux liés aux phénomènes d'auto-immunité et ceux de limitation du transfert horizontal de gènes (Figure 4).

Il est assez difficile de déterminer le coût d'expression d'un système CRISPR-Cas car les systèmes sont très diversifiés aussi bien en termes de protéines que de régulation. Le coût de l'expression des protéines Cas du type II-A et de l'acquisition de nouveaux *spacers* a été mesuré chez *S. thermophilus*. Le coût principal provenait de l'expression des protéines Cas, tandis que l'ajout de *spacers* supplémentaires n'étaient associés à aucun coût, ce qui a conduit les auteurs à conclure que le coût était principalement dû au maintien du CRISPR-Cas (Vale *et al.*, 2015). Dans une seconde étude sur *P. aeruginosa*, les systèmes CRISPR-Cas de type I-F se sont avérés avoir un coût dépendant de l'infection mais pas de la maintenance (Westra *et al.*, 2015). Les deux études aboutissant à des conclusions différentes, d'autres travaux sur différentes espèces et types de systèmes CRISPR-Cas pourraient aider à clarifier ce problème.

Un deuxième coût potentiel généré par les systèmes CRISPR-Cas est lié à l'auto-immunité. Des *spacers* ciblant le propre chromosome de la bactérie ont été détectés dès les premières études postulant la fonction immunitaire des systèmes CRISPR-Cas (Pourcel *et al.*, 2005). Chez *Yersinia pestis*, sur 36 *spacers* analysés, 8 *spacers* correspondaient aux séquences du chromosome *Yersinia* (Pourcel *et al.*, 2005). Une étude plus générale des CRISPR provenant de 330 organismes a montré qu'un *spacer* sur 250 cible le chromosome bactérien et que cette auto-immunité se produit dans 18 % de tous les organismes porteurs de CRISPR (Stern *et al.*, 2010). Chez *E. coli*, une étude a démontré expérimentalement que dans ce contexte, le taux d'incorporation de *spacers* ciblant le chromosome est de l'ordre de 1 à 1000 (Díez-Villaseñor *et al.*, 2013 ; Levy *et al.*, 2015).

Le résultat le plus commun de ce phénomène d'auto-immunité est la mort cellulaire. Même si la mortalité due à l'auto-immunité est élevée, les bactéries peuvent survivre par plusieurs moyens. La pression de ces phénomènes peut mener au remodelage du génome. Chez *Pectobacterium atrosepticum*, le système CRISPR-Cas de type I-F possède un *spacer* ciblant son propre chromosome, plus précisément un îlot de pathogénicité des plantes. La forte toxicité générée par le ciblage du chromosome impose une forte pression de sélection qui peut entraîner des altérations génomiques à grande échelle, y compris le remodelage ou la suppression de l'ensemble des îlots de pathogénicité préexistants (Vercoe *et al.*, 2013). Des résultats similaires ont été rapportés pour le système CRISPR-Cas de type II-A de *S. thermophilus*. Confrontées à des *spacers* ciblant le chromosome, 99 % des bactéries sont mortes, mais les survivantes présentaient de grandes délétions des régions ciblées qui étaient le résultat de la recombinaison entre les éléments de séquence d'insertion (IS) (Selle *et al.*, 2015).

Fournir une résistance aux éléments génétiques étrangers, par exemple par l'immunité CRISPR-Cas, peut dans certains cas être délétère. En effet, les bactéries s'adaptent par transfert de gènes horizontal, et la limitation du flux de ce transfert de gènes pourrait empêcher les bactéries d'acquies des caractères souhaitables. Deux études ont apporté des indices pour soutenir cette affirmation. Premièrement, une étude a examiné l'avantage relatif de coder un système CRISPR-Cas ou d'acquies un gène de résistance aux antibiotiques par transfert de plasmide chez *S. epidermis* (Jiang *et al.*, 2013). Les auteurs ont programmé le système CRISPR-Cas pour cibler un plasmide portant une cassette de résistance aux antibiotiques. Après exposition aux antibiotiques, des mutants CRISPR-Cas apparaissaient rapidement dans cette population, favorisant ainsi l'acquisition du plasmide portant la cassette de résistance aux antibiotiques plutôt que le maintien du système CRISPR-Cas (Jiang *et al.*, 2013). Une autre étude a répété l'expérience qui a conduit à la découverte du transfert horizontal de gènes : des souches de *S. pneumoniae* sans gènes de capsule ont été utilisés pour infecter des souris (Bikard *et al.*, 2012). Sans capsules, l'infection échoue. Cependant, lorsque ces souches sont utilisées pour infecter

des souris en présence de *Pneumocoques* encapsulés et tués par la chaleur, l'infection réussit grâce au transfert de gènes de capsules des *Pneumocoques* vers les *S. pneumoniae*. En répétant l'expérience avec des souches codant pour des systèmes CRISPR-Cas ciblant des gènes de capsules, seuls les mutants ayant inactivé le système CRISPR-Cas ont survécu au système immunitaire des souris et ont réussi à générer une infection. Cela suggère que la perte du système CRISPR-Cas était adaptative dans ces conditions (Bikard *et al.*, 2012). Enfin, une analyse de génomes de *C. jejuni* a montré que certaines souches encodant des systèmes CRISPR-Cas défectueux portaient un prophage ou un plasmide qui conférait de la virulence à la souche. Ces éléments génétiques mobiles étaient absents du génome de deux souches étroitement apparentées avec des systèmes CRISPR-Cas fonctionnels (Louwen *et al.*, 2013). Ces observations soulignent que les avantages liés aux transferts horizontaux de gènes peuvent générer une sélection contre les systèmes CRISPR-Cas.

Certains mécanismes limitent les coûts différents des systèmes CRISPR-Cas décrits ci-dessus. D'abord, la régulation et plus spécifiquement la répression ou l'expression inductible des systèmes CRISPR-Cas peuvent réduire les coûts intrinsèques. Les systèmes CRISPR-Cas sont régulés par divers mécanismes (Patterson *et al.*, 2017). La régulation la plus célèbre des systèmes CRISPR-Cas provient de *E. coli*, car son système CRISPR-Cas endogène de type I-E n'est pas exprimé dans des conditions de laboratoire (Westra *et al.*, 2010). Le système CRISPR-Cas de type I-E est réprimé par la structuration nucléoïde de type histone (H-NS). Cette inhibition peut être relâchée par l'activateur de transcription LeuO (Westra *et al.*, 2010). Ce type de répression n'est pas spécifique à *E. coli* mais partagé par *Salmonella enterica* sérotype Typhi et *Klebsiella pneumoniae* (Medina-Aparicio *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2016).

D'autre part, une adaptation dite « primed » a été proposée comme mécanisme de limitation des effets de l'auto-immunité. Dans certains types de systèmes CRISPR-Cas comme les I-E et les I-F, l'acquisition de nouveaux *spacers* est beaucoup plus efficace, lorsqu'un *spacer* cible déjà l'élément. Ce mécanisme permettrait de promouvoir l'acquisition de *spacers* contre des éléments génétiques mobiles spécifiques et de limiter l'auto-acquisition (Fineran *et al.*, 2014).

À court terme, ces mécanismes limitent les coûts et pourraient favoriser la maintenance des systèmes CRISPR-Cas. Dans les organismes où les systèmes CRISPR-Cas sont régulés, leur perte pourrait donc s'expliquer par une longue période d'absence de sélection plus que par les coûts constitutifs.

En conclusion, les systèmes CRISPR-Cas restent relativement rares pour un système immunitaire. Alors que les facteurs écologiques semblent jouer un rôle majeur dans leur présence inégale dans divers environnements, ils ne suffisent pas à expliquer leur distribution dispersée dans les génomes bactériens. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les pertes fréquentes observées : les coûts de maintenance, d'auto-immunité et de limita-

tion du transfert horizontal de gènes. Cependant, aucune de ces explications ne résout entièrement cette question. Premièrement, il n'y a pas de raison claire pour laquelle le coût de l'auto-immunité devrait varier entre les clades. Deuxièmement, le coût du maintien des systèmes de défense et de la prévention du transfert horizontal de gènes est général pour tous les systèmes de défense. Cette question reste donc ouverte et de nouvelles hypothèses sont nécessaires pour mieux comprendre la distribution des systèmes CRISPR chez les bactéries.

Références

- Andersson, A.F., Banfield J.F. (2008). Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science*, 320, 1047-1050.
- Anderson, R.E., Brazelton, W.J., Baross J.A. (2011). Using CRISPRs as a metagenomic tool to identify microbial hosts of a diffuse flow hydrothermal vent viral assemblage. *FEMS Microbiol Ecol*, 77, 120-133.
- 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.
- Berezovskaya, F.S., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Karev, G.P. (2014). Pseudo-chaotic oscillations in CRISPR-virus coevolution predicted by bifurcation analysis. *Biology Direct*, 9(1), 13.
- Bernheim, A., The distribution of CRISPR-Cas systems is affected by interactions with DNA repair pathways, PhD Thesis, Université Paris-Descartes, 2017.
- 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.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151, 2551-2561.
- Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K.L., Davidson, A.R. (2013). Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 493, 429-432.
- Bondy-Denomy, J., Maxwell, K.L., Garcia, B., Rollins, M. (2015). Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature*, 526, 136-139.
- Borges, A.L., Davidson, A.R., Bondy-Denomy, J. (2017). The discovery, mechanisms, and evolutionary impact of anti-CRISPRs. *Ann Rev Virol*, 4. doi: [10.1146/annurev-virology-101416-041616](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041616).
- Briner, A.E., Lugli, G.A., Milani, C., Duranti, S, Turrone, F., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., Ventura, M., Barrangou, R. (2015). Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *Bifidobacterium*. *Plos One*, 10, e0133661.
- Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., 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.
- Bryson, A., Hwang, Y., Sherrill-Mix, S., Wu, G.D., Lewis, J.D., Black, L., Clark, T.A., Bushman, F.D. (2015). Covalent modification of bacteriophage T4 DNA inhibits CRISPR-Cas9. *mBio* 6(32), 1-9.
- Burstein, D., Sun, L.C., Brown, C.T., Sharon, I., Anantharaman, K., Probst, A.J., Thomas, B.C., Banfield J.B. (2016a). Major

- bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defense systems. *Nat Commun*, 7, 10613.
- Burstein, D., Harrington, L.B., Strutt, S.C., Probst, A.J. (2016b). New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*, 542, 237-241.
- Chakraborty, S., Snijders, A.P., Chakravorty, R., Ahmed, M., Tarek, A.M., Hossain, M.A. (2010). Comparative network clustering of Direct Repeats (DRs) and Cas Genes confirms the possibility of the horizontal transfer of CRISPR Locus among Bacteria. *Mol Phylogenet Evol*, 56, 878-887.
- Chowdhury, S., Carter, J., Rollins, M.F., Golden S.M., Jackson, N.R., Hoffmann, C., Nosaka, L., Bondy-Denomy, J., Maxwell, K.L., Davidson, A.R., Fischer, E.R., Lander, G. C., Wiedenheft, B. (2017). Structure reveals mechanisms of viral suppressors that intercept a CRISPR RNA-guided surveillance complex. *Cell*, 169, 47-57, e11.
- Delaney, N.F., Balenger, S., Bonneaud, C., Marx, C.J., Hill, G. E., Ferguson-Noel, N., Tsai, P., Rodrigo, A., Edwards, S.V. (2012). Ultrafast evolution and loss of CRISPRs following a host shift in a novel wildlife pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS Genet*, 8, e1002511.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonté, J., Frémaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P., Moineau, S. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 190, 1390-1400.
- Díez-Villaseñor, C., Guzmán, N.M., Almendros, C., García-Martínez J., Mojica, F.J.M. (2013). CRISPR-spacer integration reporter plasmids reveal distinct genuine acquisition specificities among CRISPR-Cas I-E variants of *Escherichia coli*. *RNA Biol*, 10, 792-802.
- Dong, D., Guo, M., Wang, S., Zhu, Y., Wang, S., Xiong, Z., Yang, J., Xu, Z., Huang, Z. (2017). Structural basis of CRISPR SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature*, 546, 436-439.
- Drake, J.W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 7160-7164.
- Dupuis, M.E., Villion, M., Magadán, A.H., Moineau, S. (2013). CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nat Commun*, 4, 2087.
- Fineran, P.C., Gerritzen, M.J.H., Suárez-Díez, M., Künne, T., Boekhorst, J., van Hijum, S.A., Staals, R.H., Brouns S.J. (2014). Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, E1629-1638.
- Godde, J.S., Bickerton, A. (2006). The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: Evidence of horizontal transfer among Prokaryotes. *J Mol Evol*, 62, 718-729.
- Guo, P., Cheng, Q., Xie, P., Fan, Y., Jiang, W., Qin, Z. (2011). Characterization of the multiple CRISPR loci on *Streptomyces* linear plasmid pSHK1. *Acta Biochim Biophys Sin*, 43, 630-639.
- Heidelberg, J.F., Nelson, W.C., Schoenfeld, T., Bhaya, D. (2009). Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS One* 4, e4169.
- Horn, H., Slaby, B., Jahn, M., Bayer, K., Moitinho-Silva, L., Förster, F., Abdelmohsen, U.R., Hentschel, U. (2016). An enrichment of CRISPR and other defense-related features in marine sponge-associated microbial metagenomes. *Front Microbiol*, 7, 1751.
- Hynes, A.P., Rousseau, G.M., Lemay, M.L., Horvath, P., Romero, D.A., Frémaux, C., Moineau, S. (2017). An anti-CRISPR from a virulent streptococcal phage inhibits *Streptococcus Pyogenes* Cas9. *Nat Microbiol*, 2, 1374-1380.
- Iranzo, J., Lobkovsky, A.E., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2013). Evolutionary dynamics of the prokaryotic adaptive immunity system CRISPR-Cas in an explicit ecological context. *J Bacteriol*, 195, 3834-3844.
- Jiang, W., Maniv, I., Arain, F., Wang, Y., Levin, B.R., Marraffini, L.A. (2013). Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: Bacteria and beneficial plasmids. *PLoS Genet*, 9, e1003844.
- Kapitonov, V.V., Makarova, K.S., Koonin, E.V. (2015). ISC, a novel group of bacterial and archaeal DNA transposons that encode Cas9 homologs. *J Bacteriol*, 198, 797-807.
- Koonin, E.V., Krupovic, M. (2014). Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. *Nat Rev Genet*, 16, 184-192.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S. (2017). Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: All the way there and back. *Genome Biol Evol*, 9, 28-25.
- Krupovic, M., Makarova, K.S., Forterre, P., Prangishvili, D., Koonin, E.V. (2014). Casposons: A new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. *BMC Biol*, 12, 36.
- Levy, A., Goren, M.G., Yosef, I., Auster, O., Manor, M., Amitai, G., Edgar, R., Qimron, U., Sorek, R. (2015). CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature*, 520, 505-510.
- Lin, T.L., Pan Y.J., Hsieh, P.F., Hsu, C.R., Wu, M.C., Wang, J. T. (2016). Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*, 6, 31644.
- Lopatina, A., Medvedeva, S., Shmakov, S., Logacheva, M.D., Krylenkov, V., Severinov, K. (2016). Metagenomic analysis of bacterial communities of antarctic surface snow. *Front Microbiol*, 7, 1-13.
- Louwen, R., Horst-Kreft, D., De Boer, A.G., Van Der Graaf, L., De Knecht, G., Hamersma, M., Heikema, A.P., Timms, A.R., Jacobs, B.C., Wagenaar, J.A., Endtz, H.P., van der Oost, J., Wells J.M., Nieuwenhuis E.E., van Vliet A.H., Willemsen P.T., van Baaren P., van Belkum, A. (2013). A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32, 207-226.
- Mai, G., Ge, R., Sun, G., Meng, Q., Zhou, F. (2016). A comprehensive curation shows the dynamic evolutionary patterns of prokaryotic CRISPRs. *BioMed Res Int*. doi: 10.1155/2016/7237053.
- 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: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 16, 1-7.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2013). The basic building blocks and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biochem Soc Trans*, 41, 1392-1400.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.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.
- Marraffini, L.A. (2015). CRISPR-Cas immunity in Prokaryotes. *Nature*, 526, 55-61.
- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in Staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322, 1843-1845.
- Medina-Aparicio, L., Rebollar-Flores J.E., Gallego-Hernández, A.L., Vázquez, A., Olvera, L., Gutiérrez-Ríos, R.M., Calva, E., Hernández-Lucas, I. (2011). The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol*, 193, 2396-2407.

- Millen, A.M., Horvath, P., Boyaval, P., Romero, D.A. (2012). Mobile CRISPR/Cas-mediated bacteriophage resistance in *Lactococcus lactis*. *PLoS One*, 7, e51663.
- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., van der Oost J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353, ead5147.
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 60, 174-182.
- Oliveira, P.H., Touchon, M., Rocha E.P.C. (2016). Regulation of genetic flux between bacteria by restriction modification systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 5658-5663.
- Paez-Espino, D., Sharon, I., Morovic, W., Stahl, B., Thomas, B. C., Barrangou, R., Banfield, F. (2015). CRISPR immunity drives rapid phage genome evolution in *Streptococcus thermophilus*. *mBio*, 6(2), 1-9.
- Patterson, A.G., Yevstigneyeva, M.S., Peter, C. (2017). Regulation of CRISPR-Cas adaptive immune Systems. *Curr Opin Microbiol*, 37, 1-7.
- Pawluk, A., Bondy-Denomy, J., Cheung, Cheung, V.H.W, Maxwell, K.L., Davidson, A.R. (2014). A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 5(2): 1-7.
- Pawluk, A., Amrani, N., Zhang, Y., Garcia, B., Hidalgo-Reyes, Y., Lee, J., Edraki, A., Shah, M., Sontheimer, E.J., Maxwell, K.L., Davidson, A.R. (2016). Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. *Cell*, 167, 1829-1838.
- Peters, J.E., Makarova, K.S., Shmakov, S., Koonin, E.V. (2017). Recruitment of CRISPR-Cas systems 73by Tn7-like transposons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114, E7358-E7366.
- Pourcel, C., Salvignol, G., Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151, 653-663.
- Rauch, B.J., Silvis, M.R., Hultquist, J.F., Waters, C., McGregor, M.J., Krogan, N.J., Bondy-Denomy, J. (2016). Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. *Cell*, 168, 150-158.
- Rho, M., Wu, Y.W., Tang, H., Doak, T.G., Ye, Y. (2012). Diverse CRISPRs evolving in human microbiomes. *PLoS Genet*, 8, e1002441.
- Scholz, I., Lange, S.J., Hein, S., Hess, W.R., Backofen, R. (2013). CRISPR-Cas systems in the *Cyanobacterium synechocystis* Sp. *PCC6803* exhibit distinct processing pathways involving at least two Cas6 and a Cmr2 protein. *PLoS One* 8, e56470.
- Seed, K.D., Lazinski, D.W., Calderwood, S.B., Camilli, A. (2013). A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature*, 494, 489-491.
- 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.
- Shin, J., Jiang, F., Liu, J.J., Bray, N.L., Rauch, B.J., Baik, S.H., Nogales, E., Bondy-Denomy, J., Corn, J.E., Doudna, J.A. (2017). Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic. *Sci Adv*, 3, e1701620.
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Severinov, K., Zhang, F., Koonin, E.V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. doi: [10.1038/nrmicro.2016.184](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184).
- Sontheimer, E.J., Davidson A.R. (2017). Inhibition of CRISPR-Cas systems by mobile genetic elements. *Curr Opin Microbiol*, 37, 120-127.
- Soutourina, O.A., Monot, M., Boudry, P., Saujet, L., Pichon, C., Sismeiro, O. Semenova, E., Severinov, K., Le Bouguenec, C., Coppée, J.Y., Dupuy, B., Martin-Verstraete, I. (2013). Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genet*, 9(5), e1003493.
- Stern, A., Keren, L., Wurtzel, O., Amitai, G., Sorek, R. (2010). Self-targeting by CRISPR: Gene regulation or autoimmunity? *Trends Genet*, 26, 335-340.
- Stern, A., Mick, E., Tirosh, I., Sagy, O., Sorek, R. (2012). CRISPR targeting reveals a reservoir of common phages associated with the human gut microbiome. *Genome Res*, 22, 1985-1994.
- Sun, C.L., Barrangou, R., Thomas, B.C., Horvath, P., Frémaux, C., Banfield, J.F. (2013). Phage mutations in response to CRISPR diversification in a bacterial population. *Environ Microbiol*, 15, 463-470.
- Takeuchi, N., Wolf Y.I., Makarova, K.S., Koonin, E.V. (2012). Nature and intensity of selection pressure on CRISPR-associated genes. *J Bacteriol*, 194, 1216-1225.
- Vale, P.F., Lafforgue, G., Gatchitch, F., Gardan, R., Moineau, S., Gandon, S. (2015). Costs of CRISPR-Cas-mediated resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Proc Biol Sci*, 282, 1812.
- Veroce, 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(4): e1003454.
- Wang, J., Ma, J, Zhi, C., Xu, M., Lilan, Y., Min, W., Xinzheng, Z., Yanli, W. (2016). A CRISPR evolutionary arms race: structural insights into viral Anti-CRISPR/Cas responses. *Cell Res*, 26, 1165-1168.
- Wang, X., Yao D., Xu, J.G., Li, A.R., Xu, J., Fu, P., Zhou, Y., Zhu, Y. (2016). Structural basis of Cas3 inhibition by the bacteriophage protein AcrF3. *Nat Struct Mol Biol*, 23, 868-871.
- Warren, R.A.J. (1980). Modified bases in bacteriophage DNAs. *Ann Rev Microbiol*, 34, 137-158.
- Weinberger, A.D., Wolf, Y.I., Lobkovsky, A.E., Gilmore, M.S., Koonin E.V. (2012). Viral diversity threshold for adaptive immunity in Prokaryotes. *mBio* 3(6): 1-10.
- Westra, E.R., Pul, U., 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 Houte, S., Oyesiku-Blakemore, S., Makin, B., Broniewski, J.M., Best, A., Bondy-Denomy, J., Davidson, A., Boots, M., Buckling, A. (2015). Parasite exposure drives selective evolution of constitutive *versus* inducible defense. *Curr Biol*, 25, 1043-1049.
- Westra, E.R., Dowling, A.J., Broniewski, J.M., van Houte, S. (2016). Evolution and ecology of CRISPR. *Ann Rev Ecol Evol Syst*, 47, 307-331.
- Yang, H., Patel, D.J. (2017). Inhibition mechanism of an anti-CRISPR suppressor AcrIIA4 targeting SpyCas9. *Mol Cell*, 67, 117-127.