

CRISPR-Cas9

l'outil qui révolutionne la génétique

Emmanuelle Charpentier et Pierre Kaldy

Un système de défense immunitaire bactérien, CRISPR-Cas9, est devenu un outil précis, simple et universel pour modifier les gènes de n'importe quelle cellule à volonté. Un frein majeur de la génétique est levé.

Depuis 2012, un rêve des généticiens s'accomplit. Un mécanisme a été découvert chez les bactéries, qui permet de modifier à volonté le patrimoine génétique des organismes vivants. Jusqu'à présent, les chercheurs restaient assez démunis pour agir directement sur la séquence d'ADN, cette longue molécule qui code le développement et le fonctionnement des cellules et des organismes. C'était d'autant plus frustrant que, grâce aux progrès fulgurants des techniques de séquençage des génomes, le patrimoine génétique de dizaines d'espèces animales et végétales avait été décrypté. Pour obtenir une souris portant une mutation responsable d'une maladie génétique humaine, par exemple, il fallait des mois, voire des années. Avec le mécanisme bactérien CRISPR-Cas9, ce délai se trouve raccourci à quelques semaines. Pour la première fois, un accès direct, facile et précis à l'ADN contenu dans les cellules vivantes devient possible à un grand nombre de laboratoires. Pour découvrir ce nouvel outil, il suffisait de se pencher sur les bactéries, expertes en manipulation de l'ADN depuis des milliards d'années.

Les bactéries peuvent-elles être vaccinées? Cette question peut paraître futile, mais elle a une grande importance pour l'industrie alimentaire, celle qui utilise des quantités massives de bactéries pour faire du fromage ou du yaourt. Les virus de bactéries – les bactériophages – sont nombreux, et beaucoup peuvent compromettre la production d'une usine en infectant

L'ESSENTIEL

En s'inspirant d'un mécanisme de défense bactérien, des biologistes ont mis au point un outil pour modifier avec précision l'ADN de n'importe quelle cellule.

Seuls deux ingrédients sont nécessaires pour couper l'ADN à l'endroit voulu : une enzyme, Cas9, et un petit ARN spécifique de la séquence à modifier.

Recherche fondamentale, thérapie génique, agriculture : cette technique ouvre des horizons dans de nombreux domaines.

Ben Votman

■ LES AUTEURS



Emmanuelle CHARPENTIER, professeure à l'université d'Umeå, en Suède, et à l'école de médecine de Hanovre, en Allemagne, dirige le département Régulation en biologie de l'infection au centre de recherche sur l'infection Helmholtz, à Braunschweig en Allemagne.

Pierre KALDY est journaliste scientifique.

et tuant les souches bactériennes utilisées. En 2007, deux biologistes français de la société Danisco, au Danemark, Rodolphe Barrangou et Philippe Horvath, et l'équipe canadienne de Sylvain Moineau de l'université de Laval, à Québec, annoncent qu'ils ont réussi à immuniser une bactérie alimentaire, *Streptococcus thermophilus*, contre un virus. De plus, ils prouvent que les rares bactéries qui ont résisté à l'attaque virale se défendent en conservant dans leur génome une partie de l'ADN du virus qui les a pénétrées. Ce « souvenir » du passage viral lui permet de parer à toute nouvelle intrusion du virus. Mieux, la bactérie dispose d'une « bibliothèque » de souvenirs des infections passées sur son chromosome, qui lui permet de reconnaître tout nouvel ADN étranger déjà rencontré, qu'il provienne d'un bactériophage ou de molécules circulaires nommées plasmides.

La mémoire des bactéries

Cette bibliothèque, dont le rôle intriguait les microbiologistes depuis des années, avait été nommée CRISPR (acronyme anglais pour « courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement inter espacées »). Il s'agissait, en fait, de la mémoire des récentes agressions virales subies par la bactérie et ses ancêtres au cours de leur vie. Insérer un fragment d'ADN d'un nouveau virus dans ces séquences, comme l'ont fait Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, Sylvain Moineau et leurs collègues, donnait à la bactérie la capacité de résister à ce virus. En héritant des séquences CRISPR ou en se les transmettant, les bactéries acquéraient une mémoire des agressions virales subies, et même une immunité contre elles. Les bactéries étaient donc elles aussi dotées d'un système immunitaire adaptatif.

Les recherches bio-informatiques sur le système CRISPR ont révélé qu'il est présent dans environ 50 % des bactéries et 90 % des archées connues. Sa séquence contient non seulement des échantillons d'ADN étranger, mais aussi les gènes de plusieurs enzymes nommées Cas (pour « CRISPR associées »). Celles-ci assurent le stockage de ces fragments dans le chromosome bactérien et leur utilisation, sous forme de copies d'ARN complémentaire (voir l'encadré page ci-contre), pour reconnaître et détruire le nouvel ADN viral introduit. Trois types de système CRISPR avaient été mis au jour parmi les bactéries,

chaque espèce étant dotée de l'un d'eux (aujourd'hui, on en connaît cinq types). Il restait à comprendre comment il fonctionne.

Comment les bactéries ou les archées éliminaient-elles les virus en utilisant les échantillons d'ADN viral archivés dans leur système CRISPR ? En 2010, la même équipe franco-canadienne montre que le système CRISPR de type II agit en coupant l'ADN étranger en un point précis de sa séquence, et que celle-ci doit comporter un signal reconnu spécifiquement par l'enzyme – une courte séquence nommée PAM. Les séquences CRISPR de la bactérie sont dépourvues de la séquence PAM, ce qui évite leur coupure sur le chromosome, alors qu'elle est très fréquente dans l'ADN des bactériophages.

En 2011, les chercheurs français découvrent avec des collègues lituaniens que, dans le système CRISPR de type II, une enzyme, Cas9, peut à elle seule reconnaître et couper spécifiquement un ADN étranger quand la bactérie dispose d'une copie de cette séquence dans son site CRISPR. La même année, l'un de nous (Emmanuelle Charpentier), alors à l'université d'Umeå, en Suède, montre qu'un petit ARN spécifique – nommé tracr – est nécessaire à l'enzyme Cas9.

Lors d'une infection, la séquence CRISPR est transcrite en une copie sous forme d'un long ARN contenant tous les ARN complémentaires des ADN viraux engrangés. L'ARN tracr s'hybride avec ce long ARN, entre les ARN viraux. Il forme ainsi des sortes de repères qui permettent à une autre enzyme, en présence de Cas9, de débiter le long ARN de CRISPR en ses séquences d'ARN d'origine virale et d'associer chacune à une enzyme Cas9.

Une enzyme et un ARN guide

Désormais, l'un de nous (Emmanuelle Charpentier) connaissait le cocktail pour programmer *in vitro* une coupure de l'ADN à un endroit précis. Il devait comporter l'enzyme Cas9, une copie de l'ADN ciblé sous forme d'un petit ARN complémentaire, et un autre petit ARN – tracr – propre à l'enzyme. En 2012, avec l'équipe de Jennifer Doudna, de l'université de Californie, à Berkeley, nous (Emmanuelle Charpentier et son équipe) avons montré qu'il était possible de réunir les deux petits ARN en un seul ARN guide pour l'enzyme Cas9. Et que l'ARN ainsi construit était à lui seul

5 découvertes clés

1953 La structure de l'ADN et son rôle dans le transfert de l'information génétique (prix Nobel 1962).

1970 Des enzymes bactériennes, dites de restriction, coupent des séquences spécifiques de l'ADN. Premiers outils de caractérisation et de manipulation spécifique de l'ADN *in vitro* (prix Nobel 1978).

1983 La réaction en chaîne par polymérase (PCR) permet de multiplier les séquences d'ADN *in vitro*. La caractérisation et la manipulation de séquences d'ADN *in vitro* devient possible pour la plupart des ADN trouvés dans la nature (prix Nobel 1993).

1989 Première modification ciblée du génome d'un animal, la souris (prix Nobel 2007).

2012 Mise au point de l'outil CRISPR-Cas9, permettant des modifications multiples ciblées de tout ADN *in vivo*.

suffisant pour guider l'enzyme Cas9 jusqu'à n'importe quelle séquence d'ADN visée *in vitro*. De plus, l'enzyme s'est ensuite révélée plus efficace dans les cellules eucaryotes avec l'ARN guide unique plutôt qu'avec la combinaison des deux ARN du système CRISPR bactérien d'origine. Une chirurgie précise et universelle des génomes pouvait commencer. Cela faisait suite à une longue histoire pour modifier d'une manière de plus en plus contrôlée le génome des organismes.

Modifier l'ADN est le seul moyen de changer durablement une cellule ou un

organisme. Bien avant que le rôle de l'ADN en tant que support de l'information génétique n'ait été établi en 1944, l'homme a fait des croisements au sein d'espèces animales et végétales pour sélectionner les traits héréditaires qui l'intéressaient, et donc les génomes qui en étaient responsables. Cette sélection reposait sur l'apparition aléatoire, au fil des générations, de rares mutations dans l'ADN.

Mais à partir des années 1920, on a découvert des moyens de produire des mutations. Le généticien américain

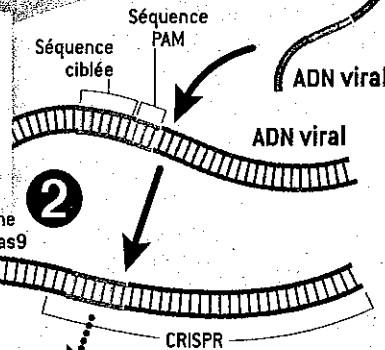
Hermann Muller a montré que l'exposition aux rayons X accélère l'apparition de mutations chez la mouche, ce qui lui vaudra le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1946. Puis des produits chimiques s'attaquant à l'ADN se sont révélés eux aussi mutagènes. Plus récemment, on utilise aussi des virus capables de s'intégrer dans le génome de manière aléatoire. Actuellement, toutes les plantes agricoles sélectionnées par les semenciers sont encore issues d'une mutagenèse chimique. Les mutants obtenus demeurent aléatoires, et leur tri

COMMENT LE SYSTÈME CRISPR-CAS9 PROTÈGE LA BACTÉRIE

Grâce au système CRISPR-Cas9, de nombreuses bactéries sont capables de reconnaître un virus qui les a déjà infectées et de contrer son attaque. Sorte de bibliothèque, CRISPR est une région du génome bactérien où, lors d'une attaque virale, la bactérie engrange des séquences de l'ADN viral. Quand une nouvelle attaque a lieu, l'enzyme Cas9, guidée par deux ARN, reconnaît le nouvel ADN viral introduit et le rend inopérant en le coupant.

Acquisition

Reconnues à l'aide de petits motifs adjacents – les séquences PAM –, des séquences de l'ADN viral sont insérées dans la région CRISPR du génome bactérien.



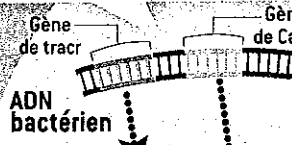
Bactériophage

Infection

Un virus [bactériophage] injecte son ADN dans la bactérie.

Destruction

Détruit, l'ADN viral ne peut plus servir à produire les protéines nécessaires à la réplication du virus.



4

Cas 9

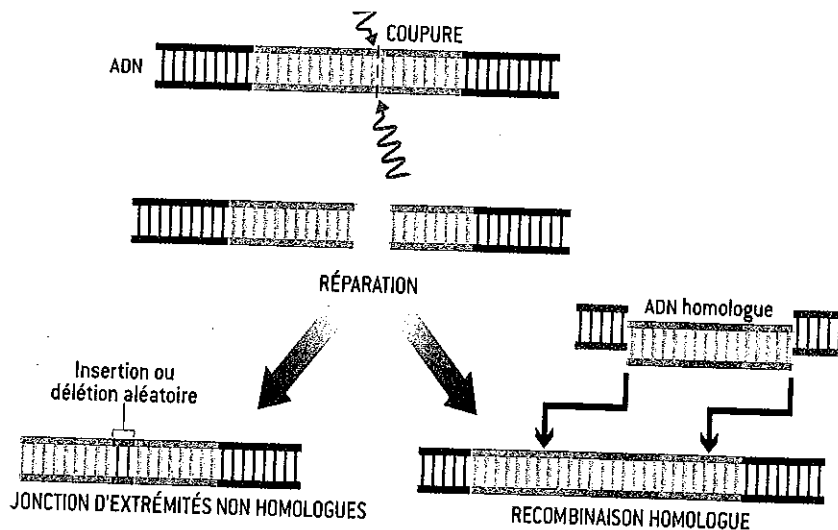
BACTÉRIE

Reconnaissance

L'enzyme Cas9 reconnaît la séquence PAM sur l'ADN étranger puis, grâce à ses deux ARN guides, une séquence plus longue qu'il coupe à une distance précise de PAM (trois nucléotides).

Nouvelle infection

Un virus déjà rencontré injecte son ADN dans la bactérie.



DANS LES CELLULES, L'ADN SE RÉPARE selon deux procédés lorsqu'il est coupé sur ses deux brins (par un rayonnement ionisant, des radicaux libres, une enzyme...). Si aucune séquence homologue (similaire) n'est disponible, une jonction a lieu avec insertion ou délétion aléatoire de quelques nucléotides (à gauche), ce qui permet d'inactiver le gène sectionné. Si un ADN homologue est présent, un échange se produit avec cette séquence (à droite). Avec l'outil CRISPR-Cas9, c'est cette recombinaison dite homologue que les biologistes favorisent en des endroits précis du génome pour modifier une séquence ou la remplacer par une autre (en vert).

pour sélectionner les traits recherchés peut prendre des années, de même qu'isoler ensuite dans le génome la mutation responsable d'un caractère intéressant.

En 1985, enfin, Oliver Smithies, de l'université de Madison dans le Wisconsin, et ses collègues produisent la première modification ciblée du génome d'une cellule animale. Les biologistes montrent que deux séquences d'ADN homologues (c'est-à-dire très proches) codant un gène, l'une portée par le chromosome, l'autre introduite dans la cellule, peuvent être échangées dans des cellules de mammifères. Cette « recombinaison homologue » reste cependant un événement rare, ce qui exige de tester un très grand nombre de cellules pour sélectionner celles ayant effectué l'échange.

En 1988, Mario Capecchi et son équipe à l'université de l'Utah présentent une méthode pour cibler et inactiver par recombinaison homologue n'importe quel gène dans des cellules embryonnaires de souris cultivées *in vitro*. Incorporées à des embryons précoces de souris, ces cellules produisent de nouveaux individus grâce à une technique mise au point par l'équipe britannique de Martin Evans, à l'université de Cambridge.

Pour la première fois, il devenait possible de cibler et de modifier un gène déterminé dans une cellule de mammifère, et

de fabriquer des souris portant cette modification dans leur génome. L'ensemble de ces découvertes valut en 2007 le prix Nobel de physiologie ou médecine à Mario Capecchi, Martin Evans et Oliver Smithies. Depuis, plus de 18 000 gènes sur les 20 000 du génome de la souris ont été mutés dans

Le ciblage de l'ADN ne repose plus sur une protéine, mais sur un petit ARN que les laboratoires de biologie fabriquent aisément.

des cellules souches embryonnaires et plus de 1 700 souris mutées sur un gène ont été produites, leur étude étant désormais gérée par un consortium international. Cependant, cette technique n'a pu être reproduite facilement chez d'autres animaux que la souris, en raison notamment de la difficulté à cultiver des cellules souches embryonnaires *in vitro* issues d'autres espèces animales.

Toutefois, en 1994, une découverte change la donne. Des biologistes de l'institut Pasteur et de l'institut Sloan-Kettering à New York montrent indépendamment que la réparation d'un gène par recombinaison homologue est fortement amplifiée dans les cellules de mammifères quand on introduit dans ce gène une cassure avec une enzyme de levure. Si aucune séquence homologue n'est présente pour donner lieu

à un échange, le site sectionné par l'enzyme est comblé ou dégradé *via* un processus de jonction d'extrémités non homologues beaucoup plus fréquent, ce qui inactive le gène visé (voir la figure ci-contre).

Dès lors, il devenait possible d'activer la recombinaison homologue dans un nombre beaucoup plus grand de cellules. Restait à trouver les bonnes enzymes qui pénétreraient dans le noyau cellulaire et y couperaient l'ADN de manière ciblée. Nombre de biologistes se sont lancés dans cette quête.

Des nucléases faites sur mesure pour cibler et couper l'ADN

Une première approche consiste à fabriquer une protéine reconnaissant une séquence précise d'ADN à l'aide de « doigts de zinc ». Présents dans des protéines qui régulent l'expression des gènes, ces motifs reconnaissent chacun un groupe de trois « lettres » (nucléotides) de la séquence d'ADN. On peut ainsi aligner de tels doigts de zinc de façon à former une protéine qui reconnaît une séquence donnée d'ADN. Et couplée à une enzyme bactérienne qui coupe l'ADN – une nucléase –, elle forme une « nucléase à doigts de zinc », un ciseau spécifique de la séquence choisie.

En 2002, ce nouvel outil permet à l'équipe américaine de Dana Carroll, de l'université de l'Utah, d'obtenir pour la première fois une mutation ciblée d'un gène chez un être pluricellulaire, la mouche. L'année suivante, le même outil sert aux chercheurs à corriger le gène par recombinaison homologue. Menée sur des cellules embryonnaires de la mouche, l'opération leur permet aussi de modifier le génome de l'insecte et de rendre la mutation héréditaire.

L'utilisation des nucléases à doigts de zinc se répand pour introduire ou corriger des mutations dans des cellules humaines, d'animaux et de diverses plantes. En 2008, le génome d'un poisson est modifié, puis en 2009 celui du rat, du tabac et du maïs. Grâce aux nucléases à doigts de zinc, l'homme modifie *in vivo* le génome d'organismes pluricellulaires. Les nucléases à doigts de zinc doivent cependant être fabriquées sur mesure pour chaque séquence choisie, ce qui est complexe et coûteux, et elles ont une efficacité très variable selon la séquence visée.

En 2010, un nouveau type d'enzyme spécifique de séquence est mis au point par Daniel Voytas, de l'université du Minnesota aux États-Unis, et son équipe. Les biologistes ont utilisé les motifs d'une protéine bactérienne, TALE. Chaque motif reconnaît un nucléotide particulier sur l'ADN. En alignant plusieurs motifs, ils ont fabriqué une protéine spécifique d'une séquence ADN choisie. Et en couplant cette protéine à la même nucléase bactérienne que celle des nucléases à doigts de zinc, ils ont montré que leur nucléase à motifs TALE – nommée TALEN – coupe l'ADN sur la séquence ciblée.

Beaucoup plus souple et fiable, ce nouveau ciseau spécifique est vite adopté dans de nombreux laboratoires. Trois ans plus tard, les génomes modifiés grâce à lui sont multiples : levure, mouche, poisson, riz ou ver à soie, cellules humaines... Comme les nucléases à doigts de zinc, cependant, les TALEN sont des protéines conçues en fonction de chaque séquence visée. Leur efficacité reste variable *in vivo* et très réduite si l'ADN a été modifié chimiquement (par des méthylations par exemple), ce qui est fréquent dans les cellules.

En 2012, l'outil Cas9 permet de s'affranchir de toutes ces contraintes. Le ciblage de l'ADN ne repose plus sur une protéine, mais sur un petit ARN guide que les laboratoires de biologie fabriquent aisément (voir l'encadré ci-dessous). L'utilisation de Cas9 pour muter l'ADN de cellules ou d'organismes se répand alors comme une traînée de poudre parmi les chercheurs, sur les traces des premiers succès avec les enzymes TALEN. La mutualisation des moyens accélère encore sa diffusion : des logiciels en libre accès déterminent les meilleures séquences d'ARN guide pour les gènes et les génomes ciblés, et des laboratoires américains mettent à disposition des constructions génétiques permettant de produire rapidement ces ARN et l'enzyme Cas9, ce qui est radicalement nouveau. L'introduction de plusieurs ARN guides différents dans la cellule permet de modifier simultanément plusieurs gènes ou d'améliorer encore le ciblage.

Début 2013, quatre équipes, aux États-Unis et en Corée du Sud, décrivent l'inactivation de gènes dans des cellules humaines avec une efficacité inédite. Ainsi, George

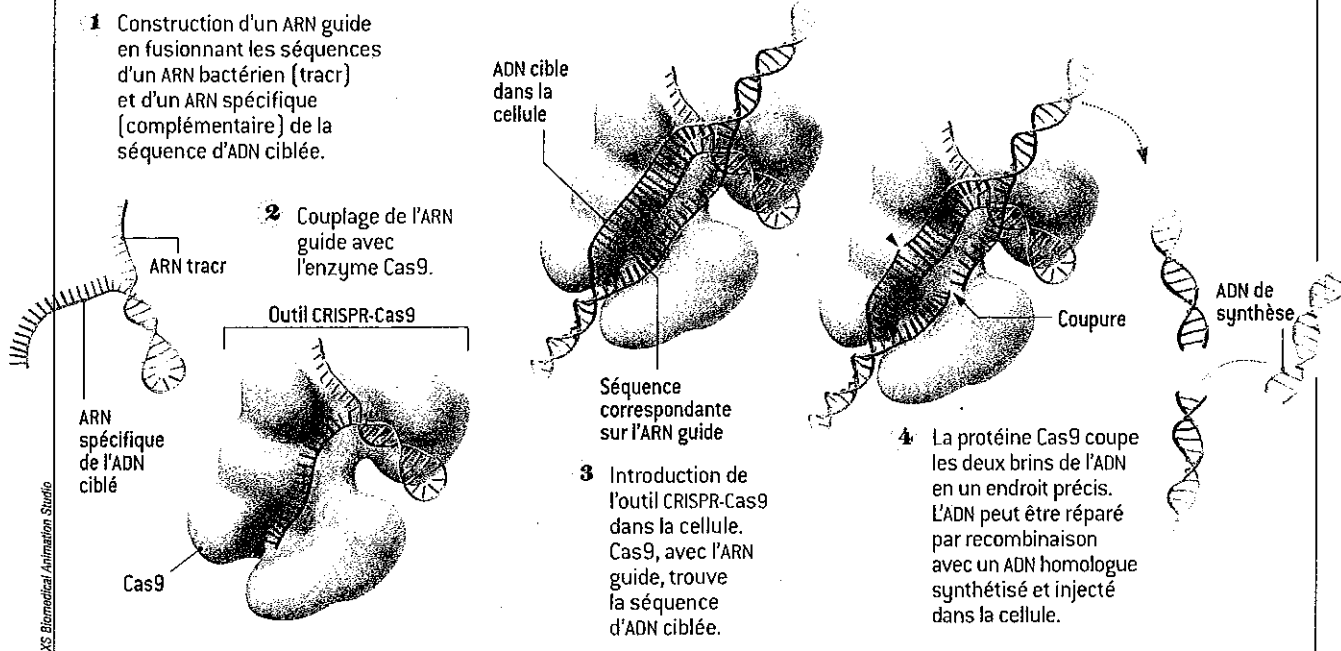
Church, de l'université Harvard, et ses collègues montrent qu'avec deux ARN guides, l'enzyme Cas9 adaptée à des cellules de mammifères répare un gène dans 8 % des cellules, contre 0,5 % avec l'enzyme TALEN.

Riz, souris, singe, Cas9 s'adapte à tout

Feng Zhang, de l'institut Broad du MIT et de Harvard, et ses collègues présentent des résultats similaires. Quelques mois plus tard, l'équipe du pionnier des souris transgéniques Rudolf Jaenisch s'associe à Feng Zhang et annonce avoir muté simultanément cinq gènes dans des cellules souches embryonnaires de souris. Les biologistes ont aussi produit en une étape des souris portant des mutations sur deux gènes distincts : en injectant l'enzyme Cas9 et ses ARN guides dans des cellules œufs de souris (la cellule œuf est la première cellule issue de la fécondation), ils ont inactivé les deux gènes à la fois dans 80 % des souris obtenues. Auparavant, il fallait introduire les mutations de façon séquentielle, soit par recombinaison des cellules souches embryonnaires présentant

COMMENT L'OUTIL CRISPR-CAS9 FONCTIONNE

Les bactéries ont développé une arme précise et efficace, CRISPR-Cas9, contre les invasions virales. Des biologistes l'ont détournée pour en faire des ciseaux moléculaires coupant, dans les cellules, l'ADN à un endroit ciblé. Contrairement aux méthodes antérieures pour modifier le génome, qui nécessitent des enzymes spécifiques à chaque situation, l'outil CRISPR-Cas9 utilise une même protéine, l'enzyme Cas9, pour toutes les situations. Le seul élément spécifique à construire est un ARN qui guide l'enzyme Cas9 à l'endroit du génome à couper. Et les ARN sont bien plus simples à synthétiser que des enzymes...





En permettant de modifier un ou plusieurs gènes en même temps dans tout type cellulaire, le système CRISPR-Cas9 ouvre d'innombrables possibilités que les biologistes commencent à explorer dans des domaines très variés : agriculture, recherche fondamentale, thérapie génique, synthèse de biocarburants ou de médicaments... Voici quelques exemples de travaux pionniers déjà réalisés avec l'enzyme Cas9.

CAS9



AGRICULTURE

Plantes résistantes

En 2014, l'équipe de Caixia Gao et Jin-Long Qiu, de l'Académie des sciences de Pékin, a produit un blé tendre mutant qui résiste à un champignon parasite, l'oïdium du blé. Elle a inactivé les six exemplaires d'un gène de susceptibilité à ce champignon. La plante ainsi modifiée résiste au parasite. L'outil utilisé n'était pas Cas9, mais un autre ciseau moléculaire, TALEN. Néanmoins, les biologistes précisent avoir obtenu des résultats préliminaires comparables avec Cas9. La méthode serait applicable à d'autres plantes présentant plus de deux copies de leurs chromosomes (plantes polyploïdes), telles que la pomme de terre, le maïs, l'avoine ou la canne à sucre. Dans ces plantes, on ne savait pas, jusqu'à présent, produire de mutations multiples.



RECHERCHE FONDAMENTALE

Modèle animal de maladie

En 2015, pour mieux étudier la myopathie de Duchenne, une équipe de l'Académie des sciences de Pékin a obtenu des singes portant des mutations responsables de la maladie sur le gène de la dystrophine, une protéine des fibres musculaires. Les primates ont développé la maladie.

Étude fonctionnelle

En 2015, à l'aide de milliers de virus portant des ARN guides différents, Aviv Regev de l'institut Broad du MIT et de Harvard, dans le Massachusetts, et ses collègues ont muté plus de 21 000 gènes séparément dans des cellules immunitaires de souris qui expriment l'enzyme Cas9. L'étude de la réponse de ces cellules de l'animal à un signal bactérien a permis d'identifier de nombreuses protéines nécessaires à la sécrétion de TNF, un puissant messager soluble de l'inflammation.

Biologie du développement

En mutant un seul gène chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans*, des chercheurs suisses de l'institut Friedrich Miescher à Bale ont pu confirmer qu'il était le seul à déterminer la formation de la vulve chez les femelles.

Soigner un organe défectueux

En 2014, l'équipe de Daniel Anderson, au MIT à Boston, a corrigé chez la souris une tyrosinémie, maladie fatale du foie due à une mutation ponctuelle dans le génome. L'équipe a remplacé la partie mutée du gène par une partie saine en injectant dans le sang de l'animal l'enzyme Cas9, trois ARN guides ciblant le gène, et le fragment d'ADN portant la séquence saine. Seules 0,4 % des cellules du foie ont été modifiées, mais cela a suffi à guérir les animaux, les cellules corrigées pouvant à nouveau proliférer et régénérer le foie.

Baisser le taux de cholestérol

L'équipe de Feng Zhang, au MIT, a fait chuter de moitié en une semaine le taux de cholestérol sanguin chez des souris. Les animaux ont reçu un vecteur viral qui a transporté le gène de l'enzyme Cas9 et son ARN guide pour inactiver, dans les cellules du foie, un gène régulateur de la synthèse du cholestérol. Plus de 40 % du tissu a été correctement modifié.



THÉRAPIE GÉNÉRIQUE

Réparer des cellules souches ex vivo

L'anémie falciforme est une maladie du sang due à une seule mutation sur le gène de la chaîne β de l'hémoglobine. En 2015, avec Cas9, Linzhao Cheng et son équipe de l'université Johns Hopkins à Baltimore ont corrigé cette mutation dans des cellules souches du sang de patients et rétabli la production d'une chaîne β normale. La réintroduction chez les patients de telles cellules est la prochaine étape. Cette approche est envisageable pour d'autres maladies du sang telles que l'hémophilie, et pourrait remplacer les thérapies géniques actuelles par insertion de gène.

Bloquer l'infection par le virus du sida

Les rares personnes porteuses de mutations inactivant le gène de la protéine CD4, un récepteur du virus du sida, ne sont pas infectées par le virus. En 2014, à l'aide de Cas9, l'équipe de Chad Cowan, de l'université Harvard, a inactivé ce gène dans les cellules souches du système immunitaire. Une autre équipe, de l'université de Pennsylvanie, a fait de même avec une nucléase à doigts de zinc. En 2014, une première étude sur des patients séropositifs ayant reçu leurs cellules souches ainsi modifiées a montré une baisse importante du nombre de cellules infectées chez ces patients, même en l'absence de traitement antiviral.

chacune une mutation, soit par croisement de deux souris porteuses chacune d'une mutation. Le procédé demandait souvent plus d'un an, alors que quatre semaines ont suffi à Feng Zhang et ses collègues. En effet, ils ont évité l'étape de sélection des cellules souches embryonnaires mutées (et les risques de mutations liés à leur culture *in vitro*), de même que la sélection, dans la descendance, des souris ayant hérité de chaque mutation.

La même année, plusieurs groupes rapportent la correction ou la mutation de gènes chez le poisson et diverses plantes telles que le riz, le tabac, le sorgho ou la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Et en 2014, pour la première fois, des primates génétiquement modifiés de manière ciblée sont obtenus. Des biologistes de l'université médicale de Nankin, en Chine, ont inactivé simultanément deux gènes chez le macaque crabier en injectant dans une cellule œuf l'ARN codant l'enzyme Cas9 et ses ARN guides. La cellule a ensuite été implantée chez une femelle, comme pour une fécondation *in vitro*, et deux singes ont pu naître avec les deux gènes ciblés inactivés sur au moins un des deux chromosomes homologues.

Après les tests de faisabilité viennent vite les premières applications. Dès 2013, Jinsong Li, de l'Académie des sciences chinoise à Shanghai, et ses collègues corrigent chez la souris une mutation causant une cataracte héréditaire. Les animaux sont guéris. En 2014, passant à une autre échelle, Feng Zhang et ses collègues produisent des cellules humaines mutées sur plus de 18000 gènes en utilisant trois à quatre ARN guides par gène inactivé. Plus de 90% des cellules portaient les mutations. Cet outil de mutagenèse massive, mais ciblée, leur a permis d'identifier six gènes de résistance à un médicament utilisé contre le mélanome (un cancer de la peau), dont deux étaient déjà connus.

L'inverse—élucider le rôle d'un gène en le mutant, ou génétique inverse—devient aussi possible dans tous les organismes (hormis l'homme pour des questions éthiques) et pour plusieurs gènes à la fois. Toutes les connaissances accumulées depuis des années sur les génomes et leurs mutations peuvent

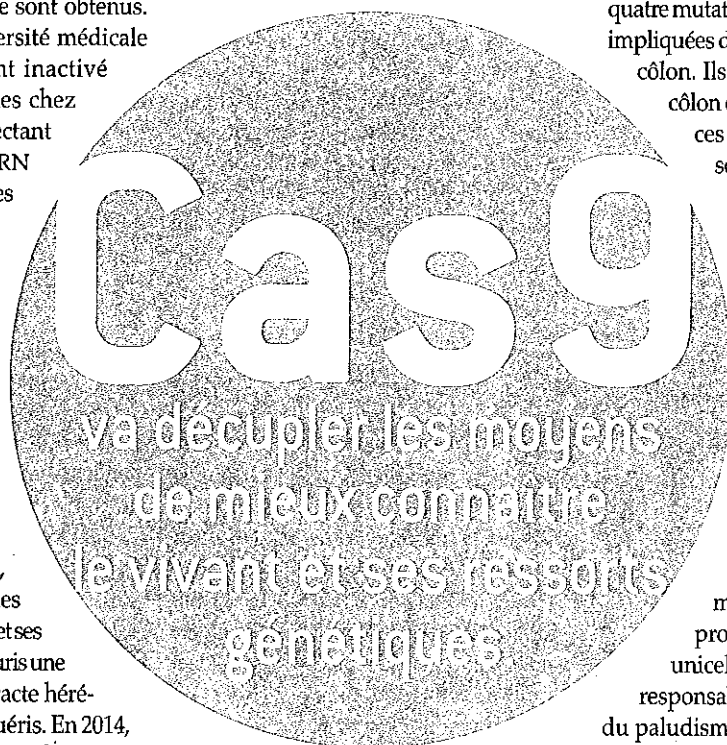
désormais être testées du point de vue fonctionnel. Notamment, Feng Zhang et ses collègues ont produit des souris dans le génome desquelles ils ont inséré le gène de l'enzyme Cas9. Ils peuvent ainsi déclencher l'expression de Cas9 dans le tissu choisi et, en introduisant des ARN guides, y produire les mutations génétiques souhaitées. Cela leur a permis de tester l'effet, chez la souris, de trois mutations responsables du cancer du poumon chez l'homme. Induites dans les cellules pulmonaires de souris, les trois mutations ont produit un cancer du poumon chez tous les animaux testés.

De même, en 2015, Hans Clevers, de l'université d'Utrecht aux Pays-Bas, et ses collègues ont confirmé le rôle clef de quatre mutations sur quatre gènes distincts, impliquées dans l'apparition du cancer du côlon. Ils ont déclenché un cancer du côlon chez des souris en produisant ces mutations dans des cellules souches de l'intestin.

Ainsi, grâce à Cas9, il devient possible de changer avec précision n'importe quelle séquence du génome, et cela dans n'importe quelle cellule, y compris la cellule œuf d'une espèce. Diverses équipes l'ont vérifié dans la plupart des organismes modèles étudiés en recherche. Dans certains cas, c'était une première, comme dans celui des protozoaires—des organismes unicellulaires dont plusieurs sont responsables de maladies. Les agents du paludisme, de la toxoplasmose, de la leishmaniose, de la trypanosomiase et de la cryptosporidiose ont ainsi été modifiés.

Les pistes de recherche offertes sont multiples: étudier le rôle de gènes dans le développement ou le fonctionnement des organismes, corriger ou reproduire des maladies chez l'animal, introduire de nouvelles propriétés chez les plantes (voir l'encadré page ci-contre)...

Des biologistes cherchent aussi à perfectionner la technique, notamment pour éviter les erreurs de ciblage. Le recours à deux enzymes Cas9 mutées, chacune capable de couper seulement un des deux brins opposés de l'ADN, a ainsi considérablement réduit le risque d'erreur. La coupure des deux brins n'est obtenue que lorsque les





LA STRUCTURE 3D de l'enzyme Cas9 (en bleu) couplée à son ARN guide (en jaune) et son ADN cible (en rouge), établie en 2014, permet de positionner, dans la conformation du complexe CRISPR-Cas9, les régions de l'enzyme impliquées dans son activité, ce qui facilite sa modification en vue de perfectionner l'outil sans perturber son fonctionnement de base.

■ BIBLIOGRAPHIE

D. B. T. Cox *et al.*, Therapeutic genome editing: prospects and challenges, *Nature medicine*, vol. 21, pp. 121-131, 2015.

K. Belhaj *et al.*, Editing plant genomes with CRISPR/Cas9, *Curr. Opin. Biotech.*, vol. 32, pp. 76-84, 2015.

J. Doudna et E. Charpentier, The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, *Science*, vol. 346, 1258096, 2014.

P. Hsu *et al.*, Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, vol. 157, pp. 1262-1278, 2014.

R. Barrangou et P. Horvath, CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 3, pp. 143-162, 2012.

deux enzymes agissent de façon conjointe sur le même site. Quant aux coupures faites séparément par ces enzymes sur un seul brin, la cellule les répare spontanément. Des moyens informatiques ont aussi été développés pour déterminer les séquences cibles les plus spécifiques dans le génome et limiter ainsi le risque de coupures indésirables.

Coupler Cas9 à d'autres molécules

D'autres chercheurs explorent les possibilités de cibler de nouvelles activités sur l'ADN avec l'enzyme Cas9. En 2014, une équipe a cristallisé le complexe formé par l'enzyme Cas9, son ARN guide et son ADN cible. L'étude de ce cristal a révélé la structure tridimensionnelle de l'enzyme (voir la figure ci-dessus), apportant des précisions qui aident à modifier l'enzyme sans perturber son activité de reconnaissance. Les biologistes peuvent en effet fixer des protéines sur Cas9 pour moduler son activité, par exemple pour l'activer en présence de lumière ou d'une substance chimique.

Même inactivée en tant que nucléase, l'enzyme Cas9 peut encore servir à diriger précisément d'autres protéines vers des séquences spécifiques du génome. Par exemple, fixée à un marqueur fluorescent, elle a permis de visualiser des séquences précises dans le noyau cellulaire. Et en la couplant à des protéines qui activent ou répriment la transcription de l'ADN, on est capable de contrôler l'activité de gènes précis *in vivo*.

Les possibilités d'utilisation de l'enzyme Cas9 paraissent illimitées et font

déjà l'objet d'un intense développement commercial. En mars 2013, l'un d'entre nous (E. Charpentier) a déposé le premier brevet pour l'utilisation de l'enzyme avec ARN guide et, depuis, plusieurs brevets ont été publiés pour diverses utilisations du système CRISPR-Cas9. Des start-up, souvent soutenues par de gros laboratoires pharmaceutiques, se sont déjà créées afin d'exploiter les multiples possibilités qu'offre ce système pour cibler des interventions sur l'ADN des animaux et des plantes.

Avec le système CRISPR-Cas9, un moyen de transformation efficace, multiple et accessible de l'ADN *in vivo* est apparu. Il arrive à un moment où le séquençage et le décryptage des génomes apportent une foule d'informations génétiques à analyser. Leur étude, directement possible sur les cellules et les organismes avec l'enzyme Cas9, va décupler les moyens de mieux connaître le vivant et ses ressorts génétiques. Les retombées pratiques de ce nouvel outil ne devraient pas tarder; elles suscitent déjà les questions éthiques liées à l'introduction de toute nouvelle technologie.

Dans le domaine des plantes, notamment, les modifications génétiques ciblées par l'enzyme Cas9 pourront bientôt se faire sans insertion d'ADN étranger autre que la séquence désirée dans les génomes, l'enzyme et ses ARN guides étant introduits dans la cellule puis éliminés par elle. Ces nouvelles plantes ne seront donc plus forcément des plantes transgéniques, c'est-à-dire porteuses dans leur génome d'une séquence d'ADN étrangère à leur espèce. Et elles n'auront plus que des modifications limitées et connues de leur génome, bien plus sûres que celles, chimiques, obtenues jusqu'à présent par les semenciers.

Dans le domaine animal, des maladies génétiques pourraient être corrigées. À plus long terme, toute cellule et tout organisme seront susceptibles d'être modifiés en utilisant Cas9, ultime étape de la domestication du vivant engagée par notre espèce il y a plus de 10 000 ans. La puissance et l'accessibilité de ce nouvel outil de manipulation génétique sont déjà en train de changer les pratiques de la recherche et ouvrent un champ d'expérimentation illimité. Une telle révolution devra s'accompagner d'un cadre législatif simple et clair pour éviter toute dérive qui pourrait porter préjudice aux individus, aux êtres vivants ou aux sociétés. ■

CRISPR-Cas9 : « Une réflexion éthique s'impose »

Depuis sa mise au point en 2012, l'outil de génétique CRISPR-Cas9 se répand à une telle vitesse et dans des domaines si variés qu'il soulève de nombreuses inquiétudes.



Patrick GAUDRAY, généticien, directeur de recherche au CNRS, est membre du Comité consultatif national d'éthique.

Entretien avec Patrick Gaudray

Mis en évidence chez la bactérie et adapté pour qu'il soit transposable à toute espèce, le système CRISPR-Cas9 permet de modifier une ou plusieurs régions précises du génome de n'importe quelle cellule. Partout dans le monde, des équipes s'emparent de ce nouvel outil et explorent ses possibilités sur des plantes et animaux toujours plus nombreux. Récemment, une équipe de l'université Sun Yat-sen, à Guangzhou en Chine, l'a même testé dans des embryons humains non viables. Comment éviter les dérives ? Toutes les recherches sont-elles acceptables d'un point de vue éthique ? L'éclairage de Patrick Gaudray, généticien du CNRS à l'université François-Rabelais, à Tours, spécialiste de l'instabilité génomique dans les cancers et membre du Comité consultatif national d'éthique.

POUR LA SCIENCE

La technique CRISPR-Cas9 est-elle sûre ?

PATRICK GAUDRAY : En biologie, rien n'est sûr à 100%. Cette technique présente des risques, comme toute technique. Même si les chercheurs perfectionnent leurs protocoles pour limiter les erreurs, il y aura toujours un risque de créer des mutations dans d'autres endroits

du génome, de perturber les interactions du génome avec l'environnement ou d'altérer involontairement des fonctions biologiques. Mais si on se limite à la question « Y a-t-il un risque ? Est-il équilibré par un bénéfice attendu plus important ? », on ne va pas bien loin dans la réflexion éthique. Lorsque Alain Fisher a lancé en 2000 la thérapie génique sur les enfants-bulles à l'hôpital Necker, il savait qu'il y avait un risque. Ce risque a été évalué par de nombreuses personnes qui ont donné des autorisations pour que les expérimentations puissent être faites, et puis il y a eu des problèmes. Sur neuf enfants traités, quatre ont eu une leucémie. Mais les problèmes ont été identifiés, et l'approche a été améliorée et étendue à d'autres maladies. Quelle est la bonne réponse dans ce cas-là ? Fallait-il ne rien tenter à cause du risque ?

PS

Au-delà du débat bénéfices-risques, où commence vraiment la réflexion éthique sur CRISPR-Cas9 ?

P.G. : CRISPR-Cas9 est un outil extraordinaire qui doit être utilisé, cela ne fait aucun doute. La vraie question est : dans quel contexte ? Il en est un sur lequel nous pouvons nous

mettre d'accord : il faut profiter de cette technique dans la recherche fondamentale, qui permet l'acquisition de connaissances nouvelles et qui nous enrichit intellectuellement. Contrairement à certains, je ne pense pas qu'il y ait de tabous dans la connaissance. La technologie CRISPR-Cas9 permet d'accélérer et d'améliorer notre connaissance des mécanismes vivants. Les risques de la technique eux-mêmes peuvent être étudiés pour améliorer la connaissance, notamment sur son fonctionnement. Ensuite, dans certains cas, on peut envisager des applications, notamment sur l'homme. Mais là commencent les problèmes.

PS

Dans le cas des embryons humains, il est difficile de ne pas imaginer les applications potentielles, thérapeutiques (correction d'une anomalie génétique responsable d'une maladie), mais aussi eugénistes. Faut-il proscrire ces recherches, possibles dans des pays tels la Chine et les États-Unis ?

P.G. : On a fait des procès d'intention à l'équipe de Junjiu Huang, qui a testé CRISPR-Cas9 sur des embryons humains. Son article, pourtant, n'engage pas à grand-chose. Les

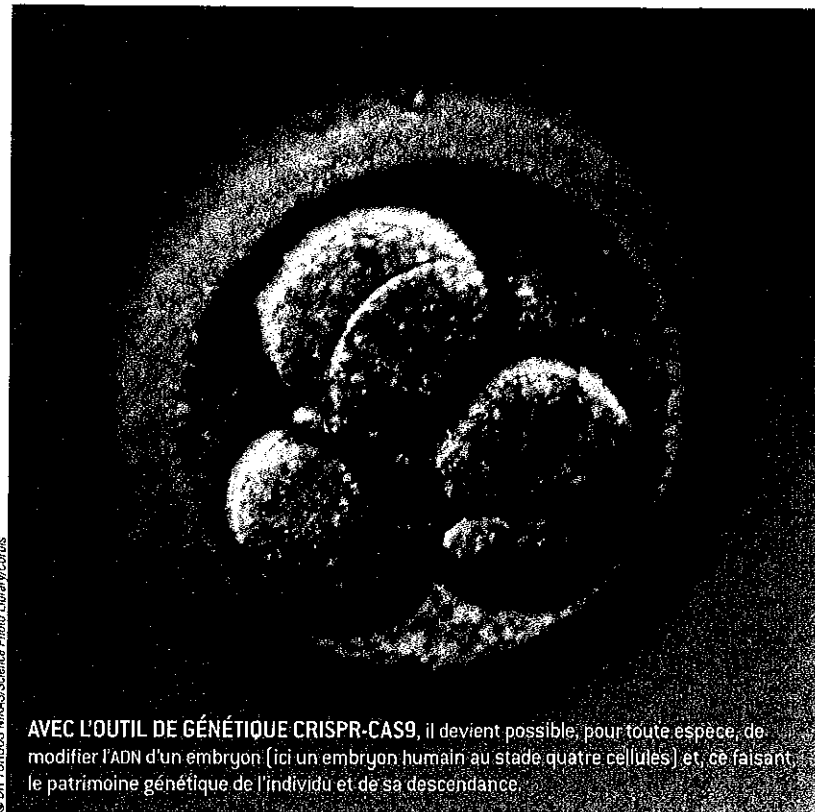
expériences ont été faites *in vitro*, sur des embryons non viables. Elles ont d'ailleurs montré que l'outil CRISPR-Cas9 est, dans l'utilisation faite ici, beaucoup moins performant qu'on ne le pensait. Le ciblage et la modification du gène ciblé n'ont pas été aussi efficaces qu'espéré. Le protocole était loin d'être idéal, mais en l'améliorant, on pourrait mieux comprendre ce qui se passe quand on modifie un embryon humain.

Il y a certes une part de provocation dans cette publication, mais l'équipe chinoise a le mérite de vouloir faire de la recherche fondamentale. Ce n'est pas avec un procès d'intention qu'on fera avancer ni la réflexion éthique ni la science. Les barrières ne sont d'ailleurs pas forcément mises au bon endroit. En France, l'expérimentation sur les embryons humains est interdite, mais il sera bientôt possible de transformer des cellules somatiques (non reproductrices) en cellules germinales (reproductrices) en les reprogrammant. Peut-on donc tout faire avec des cellules parce qu'elles ne sont pas, au départ, reproductrices ? La réflexion éthique doit être vigilante et pertinente, sans être un frein aux avancées scientifiques, une réflexion de valeur, utile et fondée afin que les développements technologiques ne soient pas mis en application dans n'importe quelles conditions.



Dans quel cas serait-il éthiquement acceptable de modifier des embryons humains ?

P.G. : La réponse ne peut être que le fruit d'un débat. Est-il éthiquement admissible de modifier des embryons ? Certains, tel le comité d'éthique britannique – l'Autorité britannique sur la fécondation humaine et l'embryologie (HFEA) –, soutiennent que non. Pourtant, l'organisme a quand même émis un avis, aujourd'hui décliné dans la loi anglaise, qui permet, pour résoudre des problèmes médicaux correspondant à des maladies mitochondriales, de faire un transfert de mitochondries. Les mitochondries sont des petites structures cellulaires contenant de l'ADN. L'ADN mitochondrial de l'embryon provient intégralement de l'ovule, donc de la mère. Pour la HFEA,



AVEC L'OUTIL DE GÉNÉTIQUE CRISPR-CAS9, il devient possible, pour toute espèce, de modifier l'ADN d'un embryon (ici un embryon humain au stade quatre cellules) et, ce faisant, le patrimoine génétique de l'individu et de sa descendance.

© DR YORRIS NIKUS/Science Photo Library/Corbis

quand on change l'ADN mitochondrial, on ne modifie pas génétiquement l'embryon ni le patrimoine génétique des générations futures, alors qu'objectivement c'est ce qui est fait. On ignore encore tellement de choses sur les relations fonctionnelles entre l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire ! La HFEA a considéré que le problème médical à résoudre était le plus important, mais on peut ne pas être d'accord.

En fait, dès qu'on commence à vouloir toucher au patrimoine génétique d'espèces vivantes, la question se pose. Et peut-être plus encore avec CRISPR-Cas9 qui, par exemple, permet de modifier les plantes en laissant peu ou pas de traces, contrairement à la transgénèse actuellement utilisée pour produire les plantes génétiquement modifiées, où l'on introduit un ou plusieurs gènes étrangers.



En avril dernier, Valentino Gantz et Ethan Bier, de l'université de Californie à San Diego, ont montré qu'il est possible de combiner, chez la mouche drosophile, l'outil CRISPR-Cas9 à une technique (*gene-drive*) qui accélère la propagation, dans la descendance, de la mutation produite. Même si les modifications restaient traçables, leur accélération ne risque-t-elle pas d'altérer les écosystèmes, si elles se répandent dans la nature ?

P.G. : Altérer, je ne sais pas, mais modifier, c'est certain. Nous le faisons depuis que nous « domestiquons » la nature. Cela interroge notre réflexion sur notre responsabilité

dans l'utilisation que nous en faisons et sur les conditions dans lesquelles elle se fait.



Qu'est-ce qui pourrait faire avancer les choses ?

P.G. : Il faut des débats publics permanents qui ne soient pas confisqués par des scientifiques, technologues, économistes ou financiers, ni même par ceux qui se prétendent éthiciens. Arrêtons de prendre les gens pour des idiots. Ils ont tout le bagage de réflexion nécessaire pour poser de vraies questions. Le débat public devrait d'ailleurs être appris dès l'école.

Je ne pense pas que des instances de régulation extérieures au monde scientifique ou, pire encore, internes, puissent prendre en compte l'intégralité de la réflexion nécessaire sur la place à donner à telle technologie. Lors du sommet international de bioéthique BEINGS 2015, en mai dernier, il y a eu un consensus des scientifiques sur CRISPR-Cas9 pour dire que c'est un outil formidable avec lequel on ne va faire que des bonnes choses tant qu'on ne touche pas à la lignée germinale humaine. Pourtant, la situation n'est pas aussi simple. Même si on s'interdit de modifier cette lignée, rien ne certifie que des expériences ne la changeront pas quand même. Et on ne peut faire l'impasse sur les nombreux enjeux financiers et économiques de cette nouvelle technologie. ■

Propos recueillis par Marie-Neige CORDONNIER