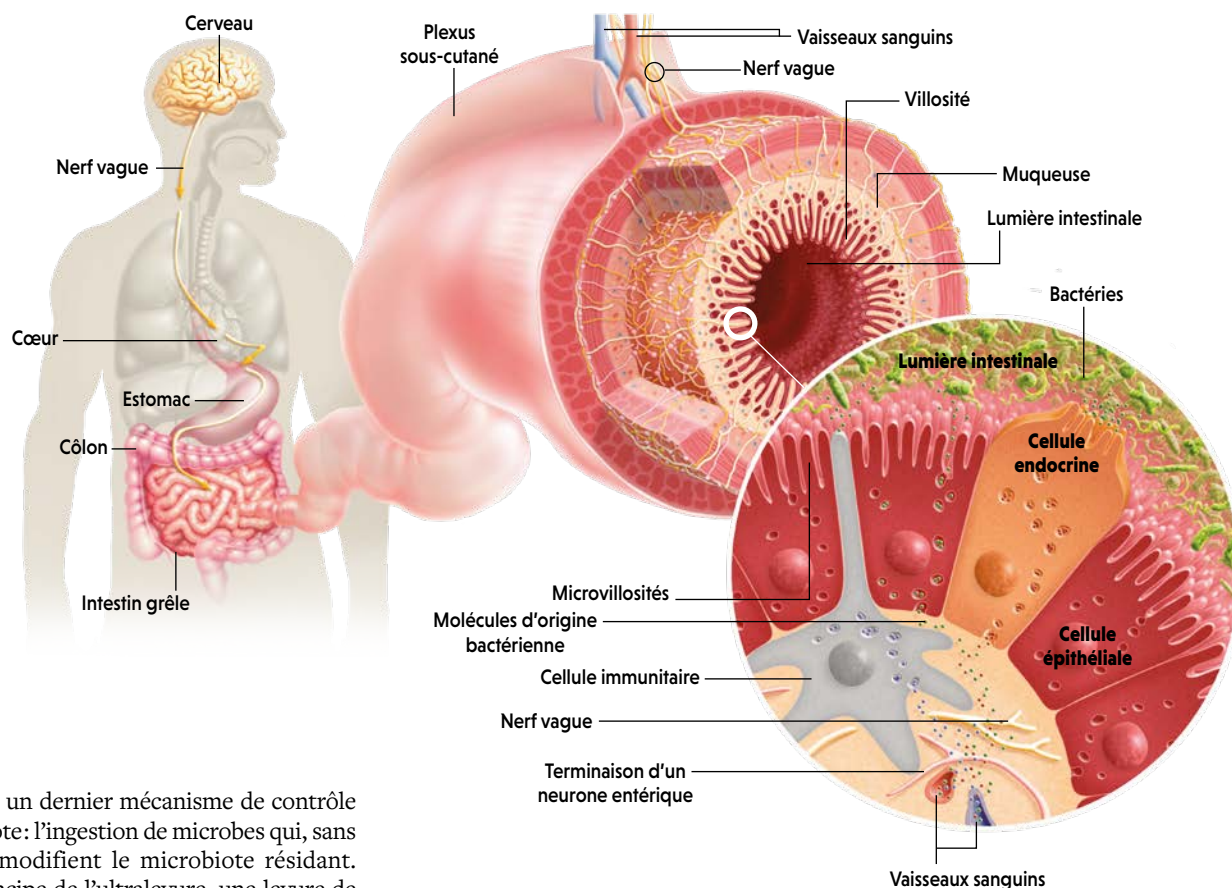




Il existe un dernier mécanisme de contrôle du microbiote: l'ingestion de microbes qui, sans s'installer, modifient le microbiote résidant. C'est le principe de l'ultralevure, une levure de boulanger anti-inflammatoire et régulatrice du microbiote, prescrite après des antibiothérapies. C'est aussi l'effet des yaourts: l'équipe de Dusko Ehrlich, à l'Inra de Jouy-en-Josas, l'a montré pour du lait fermenté avec des bifidobactéries qui, sans s'installer, changent le microbiote. Ces modifications conduisent à une production accrue d'acides gras volatils défavorisant les bactéries associées aux états inflammatoires. Avec des soins de la peau moins agressifs, l'alimentation peut donc soigner notre microbiote. Fibres et yaourts ont déjà fait la preuve de leur efficacité et de l'absence d'effets secondaires!

L'EXTINCTION DES MICROBIOTES?

L'heure où nous concevons l'importance de nos microbiotes est aussi, paradoxalement, celle des menaces qui pèsent sur eux. Hygiène excessive, aliments trop stérilisés... le mode de vie occidental réduit notre diversité microbienne (voir l'encadré page 62): en 2015, une équipe menée par Gloria Dominguez-Bello, de l'université médicale de New York, a montré que le microbiote de tribus sud-américaines non occidentalisées était 1,5 fois plus diversifié que celui des Nord-Américains.

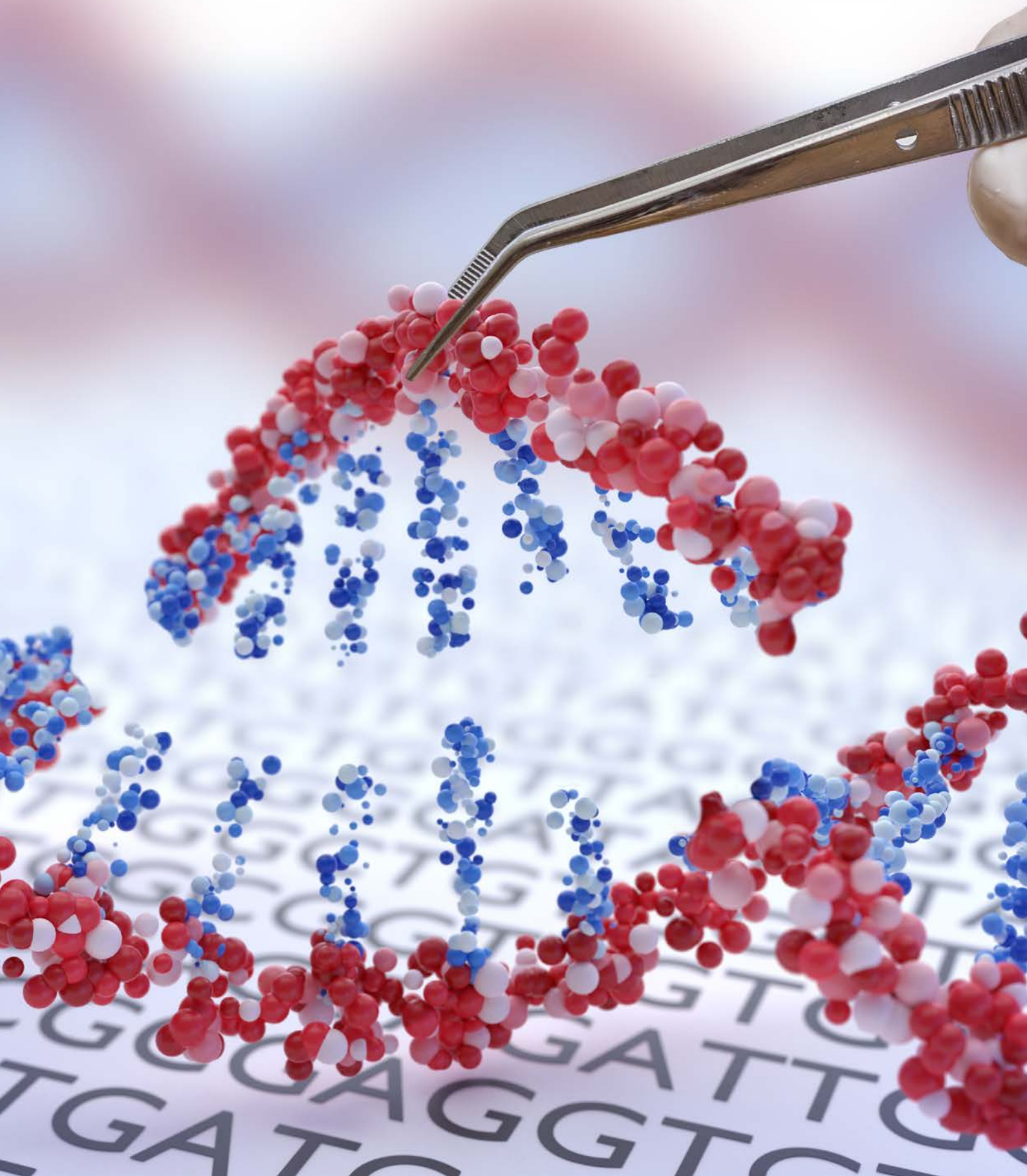
Cette chute de la diversité microbienne intérieure, comme toute perte de biodiversité, entraîne la perte de fonctions dans les écosystèmes où elle se produit. Sauf qu'ici... l'écosystème, c'est nous, et son fonctionnement, notre

L'intestin est relié au cerveau par trois axes: le système nerveux, dont le nerf vague, la circulation sanguine et les cellules immunitaires.

santé! Voilà comment les maladies du métabolisme, de l'immunité ou du comportement évoquées se multiplient. En 2025, 25% des Occidentaux seront atteints de ces maladies de la modernité. Bien sûr, elles trouvent d'autres causes dans nos modes de vie, mais nous nous sommes trop éloignés des microbes sans distinguer les nocifs de nos alliés.

On peut s'étonner que notre organisme ait recours à des microbes là où il pourrait développer ou réguler lui-même ses fonctions. Avec Alain Bessis, de l'École normale supérieure, à Paris, et Maria Pozo, du Conseil supérieur de la recherche scientifique, à Grenade, nous avons proposé que notre évolution a incorporé des microbes dans nos fonctions vitales simplement... parce qu'ils étaient toujours là, dès la naissance. Ils sont de fait, sauf hygiène excessive, des appuis aussi fiables que nos propres gènes!

Nous touchons ici aux limites des notions d'individu et d'organisme. Vous pensez peut-être que nous sommes fabriqués par notre génome, mais vos milliards de microbes crient le contraire. L'individu, par étymologie *unité indivisible*, est en fait l'assemblage de microbiotes complexes au sein d'un hôte. L'organisme, souvent conçu comme unité autonome et régulée par elle-même, est en fait influencé par ses passagers microbiens... Je suis, et vous êtes, un écosystème microbien! ■





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.

LES AUTEURS



EMMANUELLE CHARPENTIER est professeure à l'université d'Umeå, en Suède, et à l'école de médecine de Hanovre, en Allemagne, et 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.

Des gènes sur mesure

Depuis 2012, un rêve des généticiens s'est accompli : grâce à CRISPR-Cas9, un système de défense bactérien, ils peuvent modifier à volonté, et *in vivo*, le patrimoine génétique des organismes vivants.

D

es bactéries peuvent-elles être vaccinées?

Cette question étonnante est importante pour l'industrie agroalimentaire, grande consommatrice de bactéries (pour faire du fromage, du yaourt...). Or les virus de bactéries – les bactériophages – sont nombreux, et beaucoup peuvent compromettre la production d'une usine en infectant et tuant les souches bactériennes utilisées. Le problème est donc

sérieux. Et plus encore depuis que sa résolution a conduit à la mise au point d'un outil qui a changé la face de la génétique. Son nom ? CRISPR-Cas9.

Jusqu'à récemment, les chercheurs étaient 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 du séquençage des génomes, le patrimoine génétique de dizaines d'espèces animales et végétales avait été décrypté. Mais pour obtenir une souris portant une mutation responsable d'une maladie génétique humaine, par exemple, il fallait des mois, voire des années.

La situation a radicalement changé avec CRISPR-Cas9 : le délai est désormais de seulement quelques semaines. Et les manipulations nécessaires, beaucoup moins fastidieuses. Pour la première fois, un accès direct, facile et précis à l'ADN contenu dans les cellules vivantes devenait accessible 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, et sur leur système de défense.

En 2007, deux biologistes français de la société Danisco, au Danemark, Rodolphe Barrangou et Philippe Horvath, et l'équipe 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 infectées. Ce «souvenir» du passage viral leur permet de parer à toute nouvelle intrusion du virus. Mieux, ces bactéries disposent d'une «bibliothèque» de souvenirs des infections passées dans leur chromosome, qui leur permet de reconnaître tout nouvel ADN étranger déjà rencontré, qu'il provienne d'un bactériophage ou de plasmides, c'est-à-dire des molécules d'ADN circulaires.

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 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.

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'une 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, 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, Emmanuelle Charpentier et son équipe ont 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 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

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* deviennent possibles pour la plupart des ADN trouvés dans la nature (prix Nobel 1993).

1989

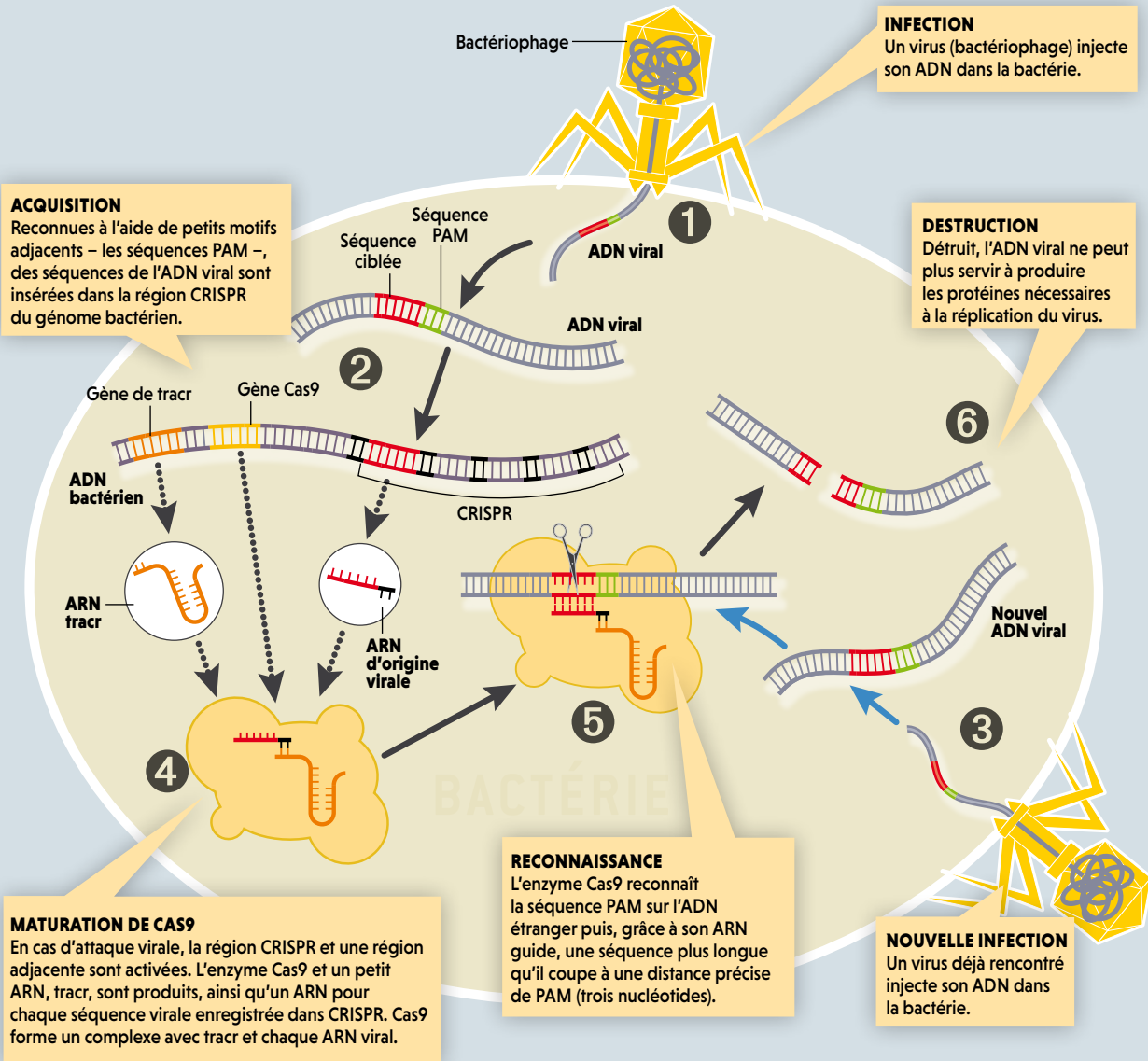
Première modification ciblée du génome d'un animal, la souris (prix Nobel 2007).

1989 - 2012

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

LES «VACCINS» DE LA BACTÉRIE

Grâce au système CRISPR, de nombreuses bactéries sont capables de reconnaître un virus qui les a déjà infectées et de contrer son attaque : elles sont «vaccinées». 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 une copie ARN de l'ADN viral stocké, reconnaît le nouvel ADN viral introduit et le rend inopérant en le coupant.



s'intégrer dans le génome de manière aléatoire. Actuellement, beaucoup de plantes agricoles sélectionnées par les semenciers sont encore issues d'une mutagenèse chimique ou par rayonnement ionisants. L'obtention de mutants reste aléatoire, et leur tri 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

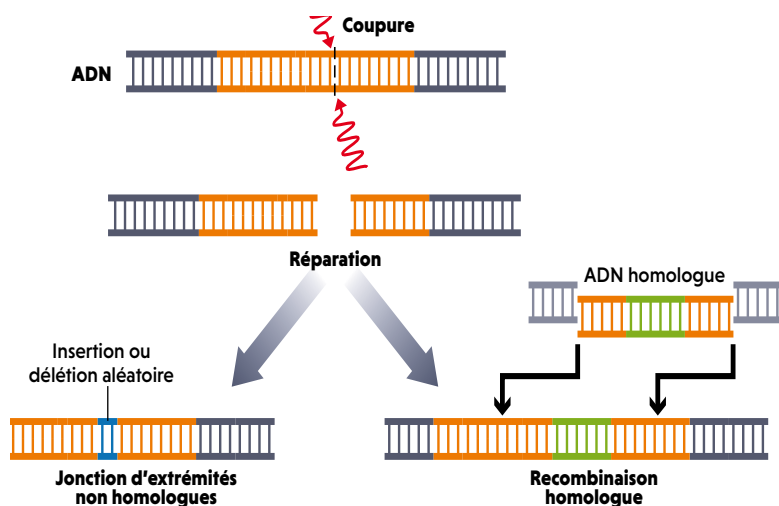
collègues produisent la première modification ciblée du génome d'une cellule animale. Les biologistes montrent que deux séquences d'ADN homologues (c'est-à-dire très proches) codant un gène, l'une portée par le chromosome, l'autre introduite dans la cellule, peuvent être échangées dans des cellules de 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 des séquences. ➤

> 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 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

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).



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

échange, le site sectionné par l'enzyme est comblé ou dégradé via un processus de jonction d'extrémités non homologues beaucoup plus fréquent, cette réparation de fortune inactivant souvent 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 SUR MESURE

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» (un triplet de 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.

QUEL TALEN !

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 avec TALE – nommée TALEN – coupe l'ADN sur la séquence ciblée.

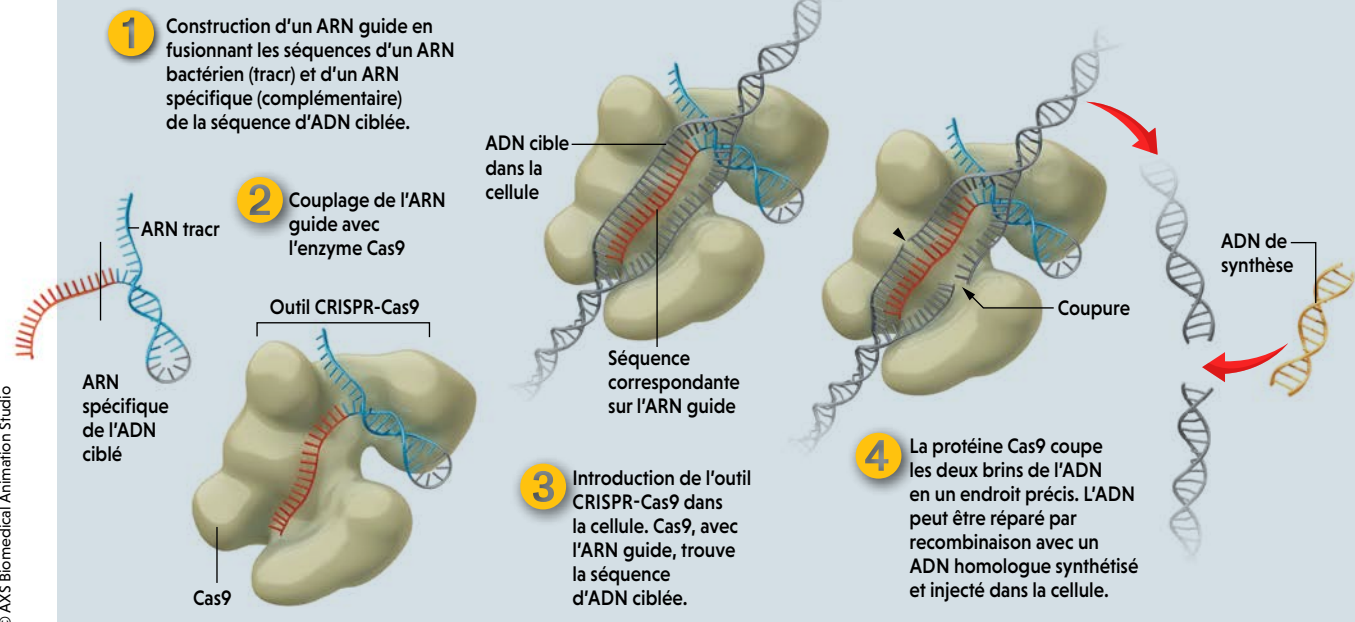
Beaucoup plus souple et fiable, ce nouveau ciseau spécifique est vite adopté dans de nombreux laboratoires. Trois ans plus tard, les génomes modifiés grâce à lui sont multiples :

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 cibles, et des laboratoires américains mettent à disposition des constructions génétiques permettant de produire rapidement ces ARN et l'enzyme Cas9. De plus, l'introduction de plusieurs ARN guides différents dans la cellule permet de modifier simultanément plusieurs gènes, ce qui est radicalement nouveau, ou d'améliorer encore le ciblage. ➤

COMMENT L'OUTIL CRISPR-CAS9 FONCTIONNE

Des biologistes ont détourné CRISPR-Cas9, l'arme de certaines bactéries contre les invasions virales, 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 de chaque séquence, 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...



> 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...

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 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, *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 tenté d'inactiver 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 dans la plupart de leurs cellules.

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 accumu-

**On peut
changer
n'importe
quelle séquence
du génome,
même dans
une cellule œuf**

lées 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 clé 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...

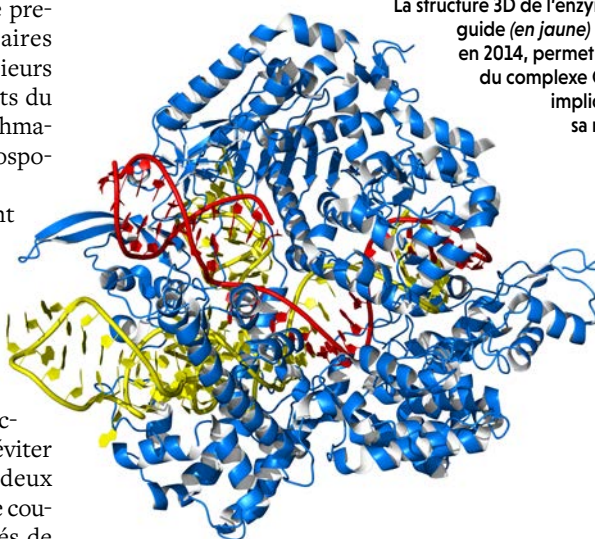
Des biologistes cherchent aussi à perfectionner la technique, notamment pour éviter les erreurs de ciblage. Le recours à deux enzymes Cas9 mutées, chacune capable de couper seulement un des deux brins opposés de l'ADN, a ainsi considérablement réduit le risque d'erreur. La coupure des deux brins n'est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

LE COUPLAGE DE CAS9

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 guider 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, Emmanuelle Charpentier a obtenu 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



La structure 3D de l'enzyme Cas9 (en bleu) associée à son ARN guide (en jaune) et à 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.

créées afin d'exploiter les multiples possibilités qu'offre ce système pour cibler 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 ou radiologiques, 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 10000 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 doit s'accompagner d'un cadre législatif simple et clair pour éviter toute dérive qui pourrait porter préjudice aux individus, aux êtres vivants dans la nature ou aux sociétés. ■

BIBLIOGRAPHIE

R. BARRANGOU ET P. HORVATH, A decade of discovery: CRISPR functions and applications, *Nature Microbiology*, vol. 2, 17092, 2017.

D. 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.

PATRICK GAUDRAY



« La fiabilité de CRISPR-Cas9 s'améliore, mais la réflexion et le débat n'ont guère progressé »

En quelques mots, comment définiriez-vous le système CRISPR-Cas9 ?

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 (voir *Des gènes sur mesure*, par E. Charpentier, page 66). Partout dans le monde, des équipes s'emparent de ce nouvel outil et explorent ses possibilités sur des plantes et des animaux toujours plus nombreux.

BIO EXPRESS

1951
Naissance, à Rouen.

1990
Directeur de recherche au CNRS.

2007
Membre du Comité consultatif national d'éthique.

JUILLET 2019
Publie *Quand la santé fait parler l'ADN... Les promesses et les enjeux éthiques d'une nouvelle révolution médicale*, Symbiose.

Récemment, cette technique a défrayé la chronique, et suscité un tollé mondial, lorsque He Jiankui, généticien à l'université des sciences de Shenzhen, en Chine, a prétendu avoir contribué à la naissance des premiers bébés au monde (des jumeaux) dont le génome a été modifié grâce à CRISPR-Cas9. Il aurait fécondé une femme avec des embryons génétiquement modifiés de façon à ce que la voie moléculaire utilisée par le virus du sida pour infecter les cellules soit désactivée.

Le pionnier dans ce domaine était déjà chinois. En 2015, Junjiu Huang, de l'université Sun Yat-Sen, à Guangzhou, avait le premier utilisé CRISPR-Cas9 sur des embryons humains.