

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...

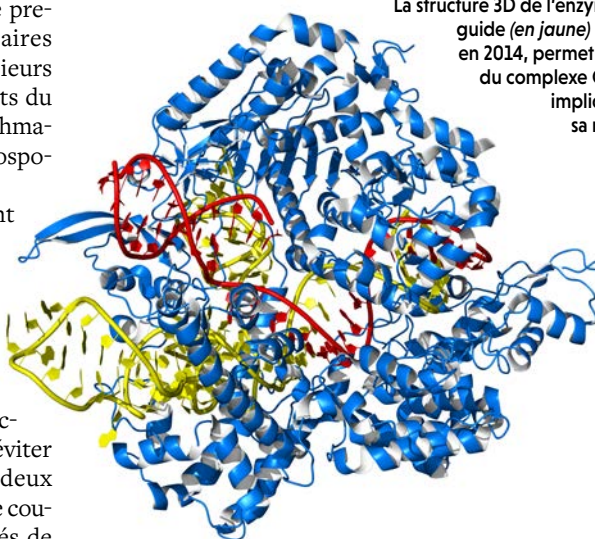
Des biologistes cherchent aussi à perfectionner la technique, notamment pour éviter les erreurs de ciblage. Le recours à deux enzymes Cas9 mutées, chacune capable de couper seulement un des deux brins opposés de l'ADN, a ainsi considérablement réduit le risque d'erreur. La coupure des deux brins n'est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

Cette technique 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 ?

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

Patrick Gaudray : 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 fondamen-

tales, 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.

Dans le cas des embryons humains, il est difficile de ne pas imaginer les applications potentielles, thérapeutiques, mais aussi eugénistes. Faut-il proscrire ces recherches, possibles en Chine et aux États-Unis ?

Patrick Gaudray : Dès le départ, 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 avait certes une part de provocation dans cette publication, mais

l'équipe de Junjiu Huang avait 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 quels cas particuliers serait-il éthiquement acceptable de modifier des embryons humains ?

Patrick Gaudray : 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, 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 ➤

CRISPR-Cas9 est un outil extraordinaire qui doit être utilisé, cela ne fait aucun doute. La vraie question est : dans quel contexte ?

Sur CRISPR-Cas9, il faut des débats publics permanents. Arrêtons de prendre les gens pour des idiots. Ils ont tout le bagage de réflexion nécessaire pour poser de vraies questions

> actuellement utilisée pour produire les plantes génétiquement modifiées, où l'on introduit un ou plusieurs gènes étrangers.

En 2015, des chercheurs ont combiné, chez la mouche drosophile, l'outil CRISPR-Cas9 à une technique 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 ?

Patrick Gaudray : 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.

Quel type de mesures pourrait faire avancer les choses ?

Patrick Gaudray : 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, 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.

Selon vous, comment la situation évolue-t-elle aujourd'hui ?

Patrick Gaudray : Si les défauts de jeunesse de la technique CRISPR-Cas9 semblent s'estomper et que sa fiabilité s'améliore, il n'est pas évident que des modifications non intentionnelles du génome ne demeurent pas un souci majeur pour son utilisation en clinique humaine. Il faut sans doute conserver l'humilité de dire, et de savoir qu'on est encore loin de contrôler tout ce que nous faisons avec des techniques dont l'usage n'est pas stabilisé.



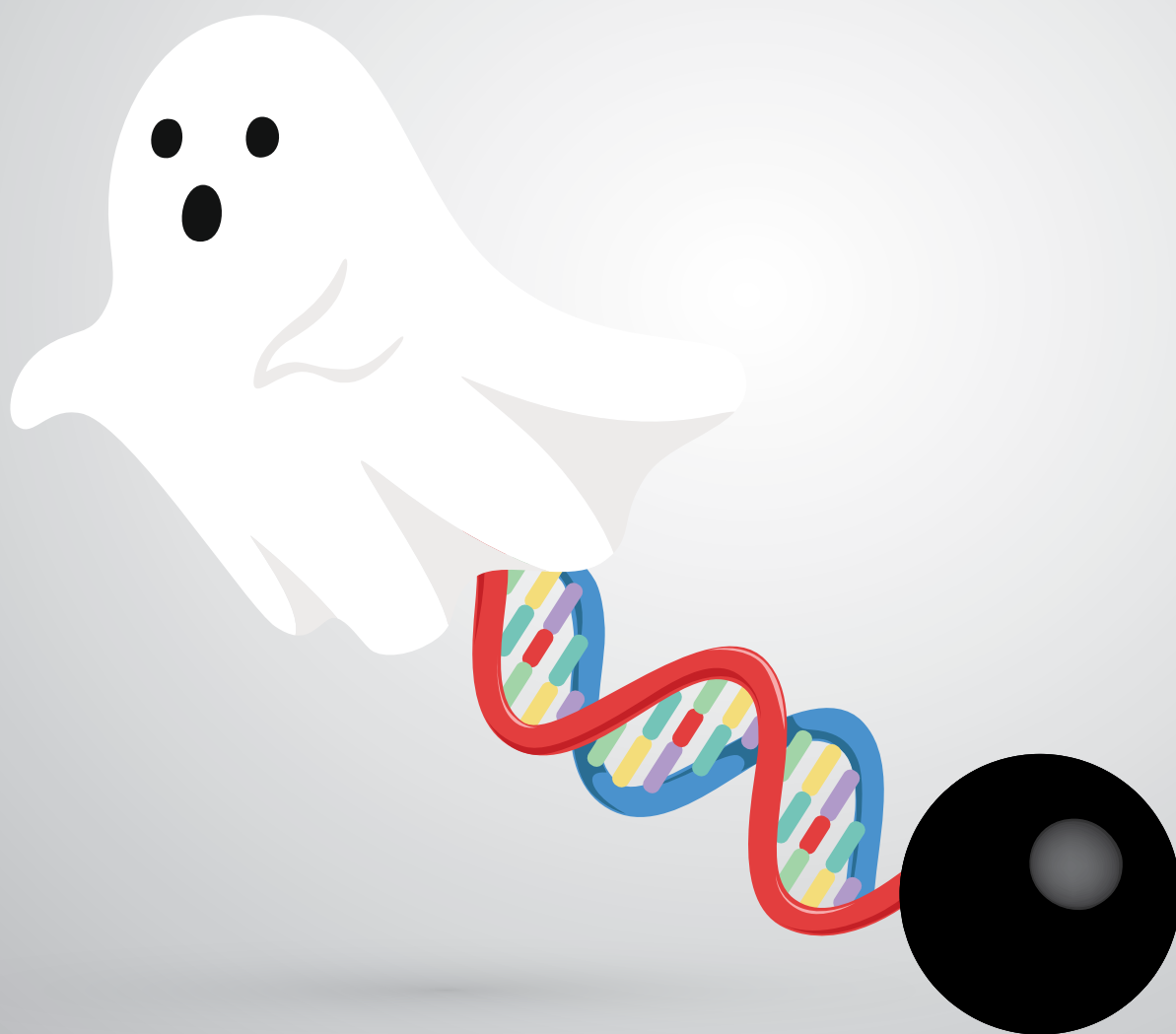
Avec CRISPR-Cas9, il devient possible, pour toute espèce, de modifier l'ADN d'un embryon, y compris ceux d'un humain (ici au stade quatre cellules) et, ce faisant, le patrimoine génétique de l'individu et de sa descendance.

Néanmoins, je ne crois pas que ce soit là la question principale. En effet, ce n'est pas parce que la technique évolue et progresse, à grande vitesse quand il s'agit d'ingénierie génomique et de CRISPR-Cas9, qu'il faut oublier la permanence des questions fondamentales, éthiques en particulier. Ces questions sont des questions de sens.

Une illustration de ceci se trouve résumée dans l'aventure humaine des jumelles « conçues » par He Jiankui. Elles n'ont pas choisi de venir au monde après qu'un technoscientiste chinois a décidé de sa seule autorité de modifier leur génome, soi-disant pour les protéger d'une possible contamination par le VIH. Ce qui était techniquement possible a été réalisé...

Outre le fait que la qualité technique n'était pas au rendez-vous, ainsi que de nombreux scientifiques l'ont pointé du doigt, la justification médicale et la légitimité, sur un simple plan humain, n'ont pas été interrogées avant de commettre l'irréparable. Donc, aujourd'hui, on ne peut que constater : la technique s'est améliorée, ses applications se sont ouvertes et multipliées, mais la réflexion et le débat citoyen n'ont guère progressé... ■

**PROPOS RECUEILLIS
PAR MARIE-NEIGE CORDONNIER**



LES FANTÔMES DU PASSÉ

Notre ADN est une maison hantée ouverte aux quatre vents, une sorte d'auberge espagnole où cohabitent des spectres de diverses natures. Ainsi, dans un lointain passé, des virus ont abandonné leur patrimoine génétique dans celui de notre espèce, et y survivent en mode « zombie ». Ne les craignez pas, nous leur devons étonnamment beaucoup ! Autres spectres, les empreintes des rencontres de nos ancêtres avec des cousins d'autres espèces. Certaines sont connues, comme les Néandertaliens, d'autres, inconnues dans le registre fossile, ne sont révélées que par l'intelligence artificielle. Une chose est sûre, il y a foule dans le noyau de nos cellules.