



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

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*.

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