

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.

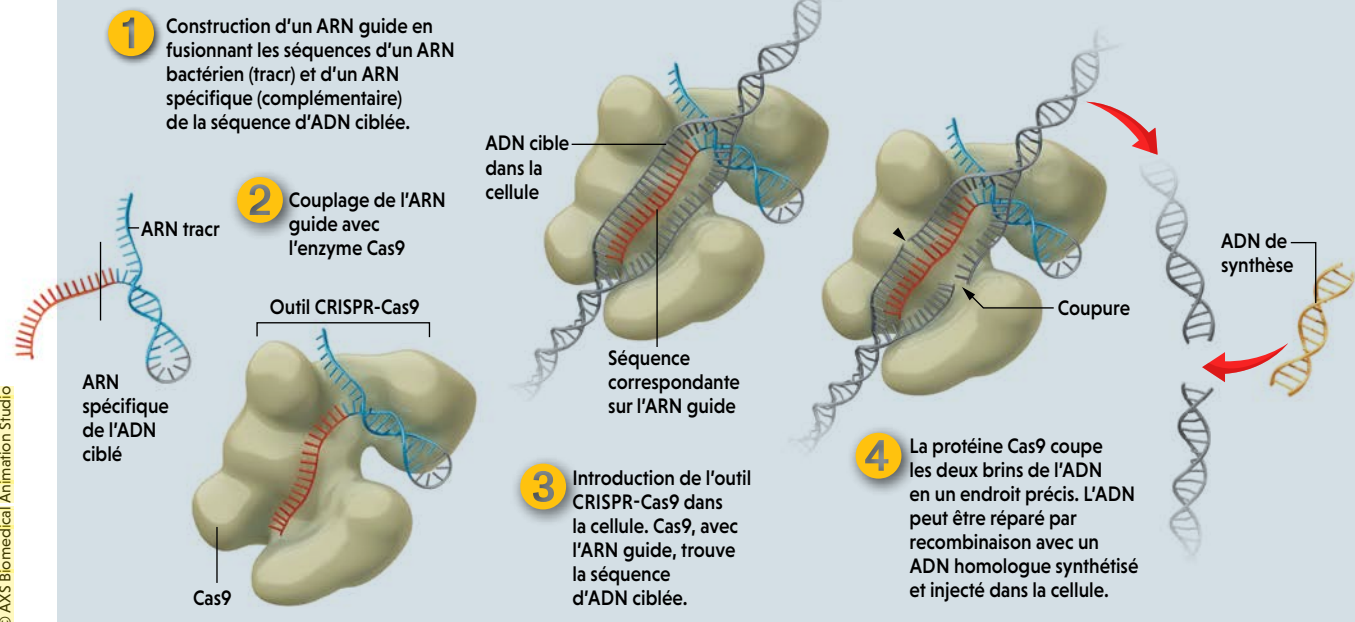
Beaucoup plus souple et fiable, ce nouveau ciseau spécifique est vite adopté dans de nombreux laboratoires. Trois ans plus tard, les génomes modifiés grâce à lui sont multiples :

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.

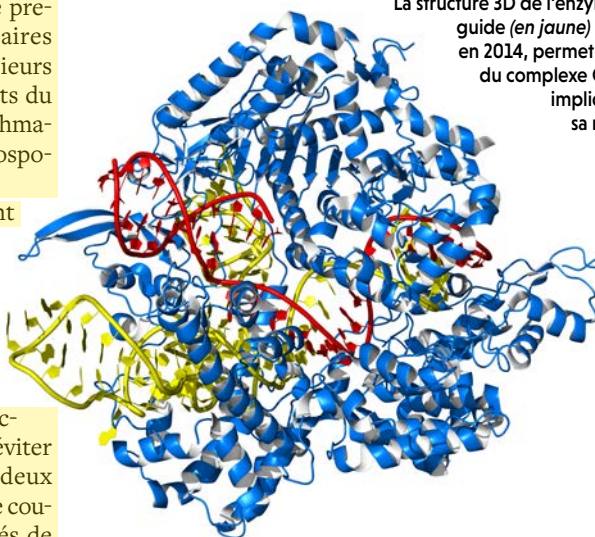
De même, en 2015, Hans Clevers, de l'université d'Utrecht aux Pays-Bas, et ses collègues ont confirmé le rôle clé de quatre mutations sur quatre gènes distincts, impliquées dans l'apparition du cancer du côlon. Ils ont déclenché un cancer du côlon chez des souris en produisant ces mutations dans des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



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.

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

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.