

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

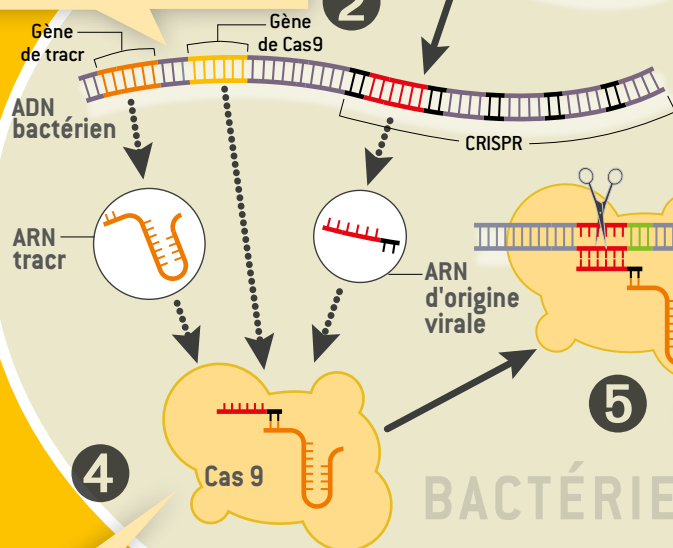
Hermann Muller a montré que l'exposition aux rayons X accélère l'apparition de mutations chez la mouche, ce qui lui vaudra le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1946. Puis des produits chimiques s'attaquant à l'ADN se sont révélés eux aussi mutagènes. Plus récemment, on utilise aussi des virus 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.



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.

Maturation de Cas9

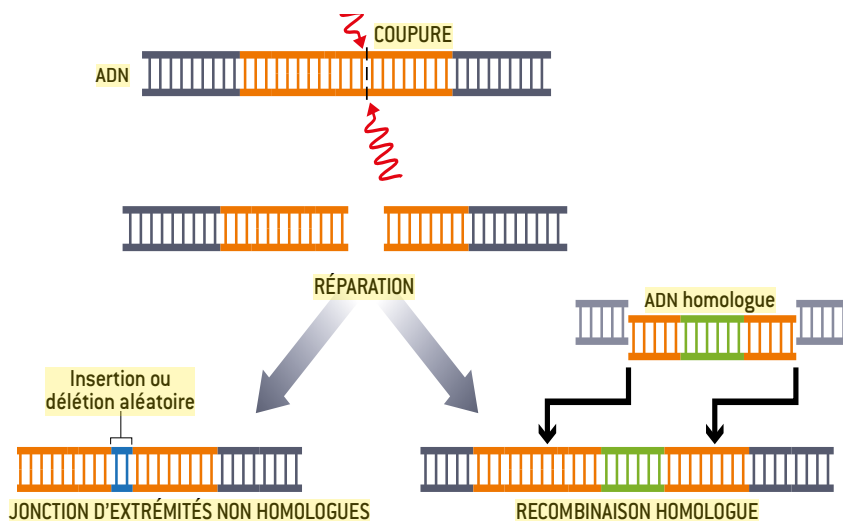
En cas d'attaque virale, la région CRISPR et une région adjacente sont activées. L'enzyme Cas9 et un petit ARN, tracr, sont produits, ainsi qu'un ARN pour chaque séquence virale enregistrée dans CRISPR. Cas9 forme un complexe avec tracr et chaque ARN viral.

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 inactiverait 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.