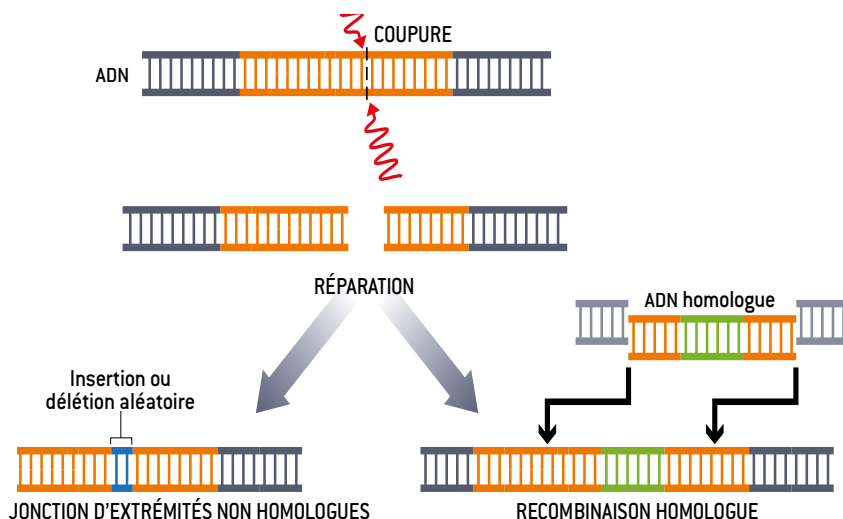




DANS LES CELLULES, L'ADN SE RÉPARE selon deux procédés lorsqu'il est coupé sur ses deux brins (par un rayonnement ionisant, des radicaux libres, une enzyme...). Si aucune séquence homologue (similaire) n'est disponible, une jonction a lieu avec insertion ou délétion aléatoire de quelques nucléotides (*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 inactive 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.