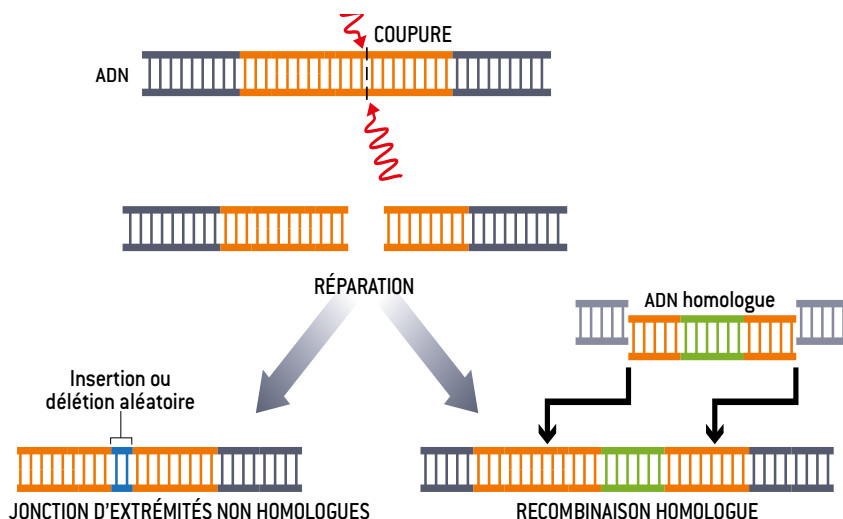




DANS LES CELLULES, L'ADN SE RÉPARE selon deux procédés lorsqu'il est coupé sur ses deux brins (par un rayonnement ionisant, des radicaux libres, une enzyme...). Si aucune séquence homologue (similaire) n'est disponible, une jonction a lieu avec insertion ou délétion aléatoire de quelques nucléotides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

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 à motifs 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, ce qui est radicalement nouveau. L'introduction de plusieurs ARN guides différents dans la cellule permet de modifier simultanément plusieurs gènes ou d'améliorer encore le ciblage.

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, Cas9 s'adapte à tout

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

COMMENT L'OUTIL CRISPR-CAS9 FONCTIONNE

Les bactéries ont développé une arme précise et efficace, CRISPR-Cas9, contre les invasions virales. Des biologistes l'ont détournée 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 à chaque situation, 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...

