

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

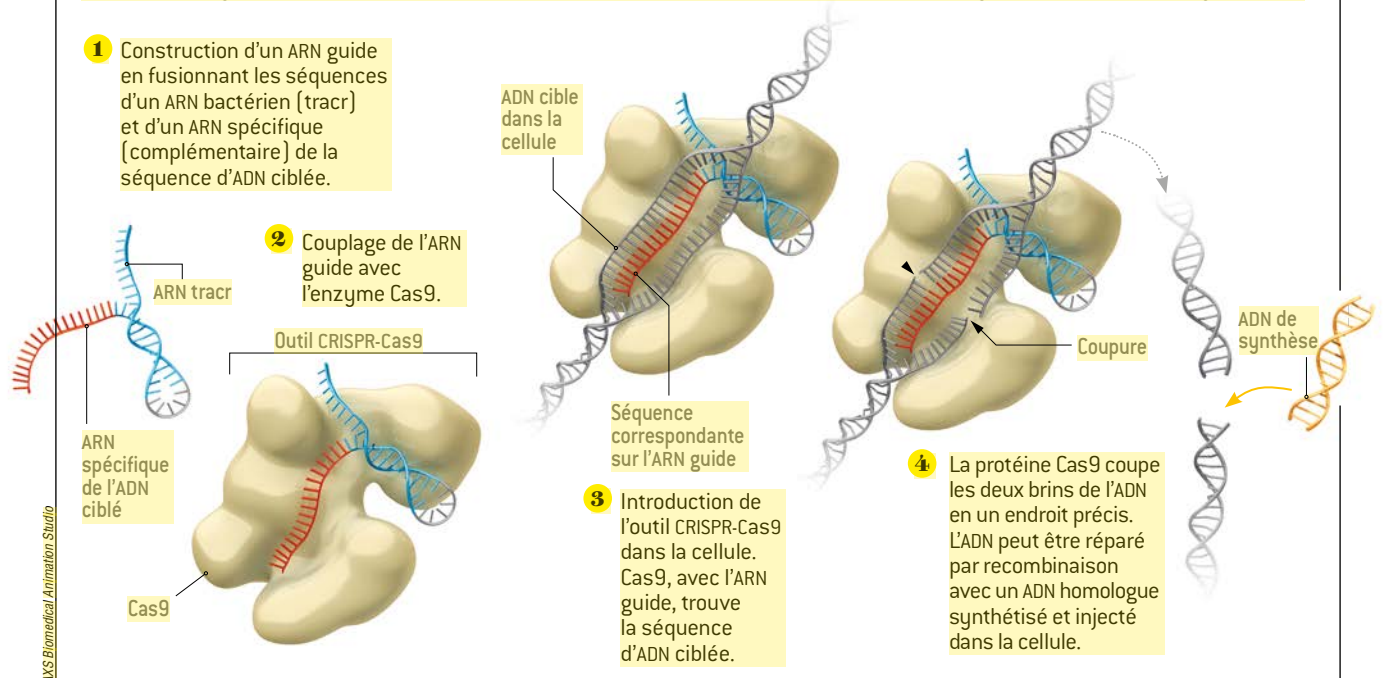
Church, de l'université Harvard, et ses collègues montrent qu'avec deux ARN guides, l'enzyme Cas9 adaptée à des cellules de mammifères répare un gène dans 8 % des cellules, contre 0,5 % avec l'enzyme TALEN.

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...



Les pistes explorées avec Cas9



En permettant de modifier un ou plusieurs gènes en même temps dans tout type cellulaire, le système CRISPR-Cas9 ouvre d'innombrables possibilités que les biologistes commencent à explorer dans des domaines très variés : agriculture, recherche fondamentale, thérapie génique, synthèse de biocarburants ou de médicaments... Voici quelques exemples de travaux pionniers déjà réalisés avec l'enzyme Cas9.



AGRICULTURE

Plantes résistantes

En 2014, l'équipe de Caixia Gao et Jin-Long Qiu, de l'Académie des sciences de Pékin, a produit un blé tendre mutant qui résiste à un champignon parasite, l'oïdium du blé. Elle a inactivé les six exemplaires d'un gène de susceptibilité à ce champignon. La plante ainsi modifiée résiste au parasite. L'outil utilisé n'était pas Cas9, mais un autre ciseau moléculaire, TALEN. Néanmoins, les biologistes précisent avoir obtenu des résultats préliminaires comparables avec Cas9. La méthode serait applicable à d'autres plantes présentant plus de deux copies de leurs chromosomes (plantes polyploïdes), telles que la pomme de terre, le colza, l'avoine ou la canne à sucre. Dans ces plantes, on ne savait pas, jusqu'à présent, produire de mutations multiples.



RECHERCHE FONDAMENTALE

Modèle animal de maladie

En 2015, pour mieux étudier la myopathie de Duchenne, une équipe de l'Académie des sciences de Pékin a obtenu des singes portant des mutations responsables de la maladie sur le gène de la dystrophine, une protéine des fibres musculaires. Les primates ont développé la maladie.

Étude fonctionnelle

En 2015, à l'aide de milliers de virus portant des ARN guides différents, Aviv Regev de l'institut Broad du MIT et de Harvard, dans le Massachusetts, et ses collègues ont muté plus de 21 000 gènes séparément dans des cellules immunitaires de souris qui expriment l'enzyme Cas9. L'étude de la réponse de ces cellules de l'animal à un signal bactérien a permis d'identifier de nombreuses protéines nécessaires à la sécrétion de TNF, un puissant messager soluble de l'inflammation.

Biologie du développement

En mutant un seul gène chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans*, des chercheurs suisses de l'institut Friedrich Miescher à Bâle ont pu confirmer qu'il était le seul à déterminer la formation de la vulve chez les femelles.



THÉRAPIE GÉNÉRIQUE

Soigner un organe défectueux

En 2014, l'équipe de Daniel Anderson, au MIT à Boston, a corrigé chez la souris une tyrosinémie, maladie fatale du foie due à une mutation ponctuelle dans le génome. L'équipe a remplacé la partie mutée du gène par une partie saine en injectant dans le sang de l'animal l'enzyme Cas9, trois ARN guides ciblant le gène, et le fragment d'ADN portant la séquence saine. Seules 0,4 % des cellules du foie ont été modifiées, mais cela a suffi à guérir les animaux, les cellules corrigées pouvant à nouveau proliférer et régénérer le foie.

Baisser le taux de cholestérol

L'équipe de Feng Zhang, au MIT, a fait chuter de moitié en une semaine le taux de cholestérol sanguin chez des souris. Les animaux ont reçu un vecteur viral qui a transporté le gène de l'enzyme Cas9 et son ARN guide pour inactiver, dans les cellules du foie, un gène régulateur de la synthèse du cholestérol. Plus de 40 % du tissu a été correctement modifié.

Réparer des cellules souches ex vivo

L'anémie falciforme est une maladie du sang due à une seule mutation sur le gène de la chaîne β de l'hémoglobine. En 2015, avec Cas9, Linzhao Cheng et son équipe de l'université Johns Hopkins à Baltimore ont corrigé cette mutation dans des cellules souches du sang de patients et rétabli la production d'une chaîne β normale. La réintroduction chez les patients de telles cellules est la prochaine étape. Cette approche est envisageable pour d'autres maladies du sang telles que l'hémophilie, et pourrait remplacer les thérapies géniques actuelles par insertion de gène.

Bloquer l'infection par le virus du sida

Les rares personnes porteuses de mutations inactivant le gène de la protéine CCR5, un récepteur du virus du sida, ne sont pas infectées par le virus. En 2014, à l'aide de Cas9, l'équipe de Chad Cowan, de l'université Harvard, a inactivé ce gène dans les cellules souches du système immunitaire. Une autre équipe, de l'université de Pennsylvanie, a fait de même avec une nucléase à doigts de zinc. En 2014, une première étude sur des patients séropositifs ayant reçu leurs cellules souches ainsi modifiées a montré une baisse importante du nombre de cellules infectées chez ces patients, même en l'absence de traitement antiviral.