

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 GÉNIQUE

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.

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 ou la plante modèle *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 inactivé 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 sur au moins un des deux chromosomes homologues.

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 18 000 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 accumulées 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 clef 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 (voir l'encadré page ci-contre)...

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

Cas9
va décupler les moyens
de mieux connaître
le vivant et ses ressorts
génétiques.