

CRISPR : une défense antiphage qui devient ciseau moléculaire

Face à l'infection par des phages, une bactérie a plusieurs moyens de se défendre. L'un de ces mécanismes de résistance a permis de développer des techniques de manipulation génétique exceptionnelles.

Le moyen le plus simple de résister à des phages repose sur les mutations spontanées du génome de la bactérie. Si une telle mutation entraîne la modification du récepteur reconnu par le phage, ce dernier ne repère plus sa cible et ne l'infectera pas.

D'autres mécanismes requièrent des machineries moléculaires spécialisées. Parmi ces mécanismes, les systèmes de restriction-modification ont été découverts en 1970. Il en existe diverses versions. Dans le cas le plus simple, la bactérie synthétise deux protéines : l'enzyme dite de restriction est capable de reconnaître une séquence d'ADN du

bactériophage et de la couper, ce qui met fin à l'infection. Si cette séquence existe aussi dans l'ADN de la bactérie, l'enzyme pourrait la couper. Pour éviter cela, l'enzyme de modification altère le site de la séquence dans l'ADN bactérien et le protège ainsi de l'enzyme de restriction. Ces enzymes ont permis de développer les techniques de clonage de gènes employées en biologie moléculaire.

Une autre machinerie moléculaire spécialisée dans la défense contre les phages a été découverte plus récemment. Elle consiste à utiliser un système que l'on peut comparer au

système immunitaire de l'homme, car elle est fondée sur une mémoire d'événements passés. Le système CRISPR (acronyme anglais pour « courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées ») est une sorte de banque qui contient plusieurs coffres. Chacun d'eux correspond à des séquences d'ADN étranger, de quelques dizaines de nucléotides, préalablement rencontrées par la bactérie. Plusieurs enzymes, les protéines Cas, jouent un rôle de gardien des coffres. Lorsqu'un ADN étranger entre dans la bactérie, soit il présente une information identique à celle contenue dans un coffre existant, soit un nouveau coffre est créé. Lorsque l'information est déjà présente dans un coffre, les protéines Cas dégradent l'ADN étranger.

En 2012, les équipes de Jennifer Doudna, de l'université de Californie à Berkeley, et d'Emmanuelle Charpentier, alors à l'université d'Umeå en Suède, ont identifié le mécanisme moléculaire d'une protéine Cas, la protéine Cas9, et ont ainsi ouvert la voie à son exploitation pour effectuer des modifications génétiques. L'outil CRISPR-Cas9 est aujourd'hui un véritable ciseau moléculaire utilisé pour effectuer des délétions, ou des substitutions, à des endroits précis dans le génome.

Cette technique peut être utilisée avec de nombreuses espèces, non seulement bactériennes, mais aussi eucaryotes, d'où de nombreuses perspectives d'application en génie génétique aussi bien pour la recherche fondamentale que pour la thérapie génique.

de brûlures infectées par *P. aeruginosa* et *Escherichia coli* (dont l'antibiorésistance a fortement augmenté ces dernières années). Cette étude dénommée *Phagoburn* devrait s'achever l'année prochaine et, espérons-le, démontrer clairement le potentiel clinique des bactériophages.

À l'institut Pasteur, mon équipe s'intéresse à une piste thérapeutique pour le traitement d'infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose et aussi chez des patients en réanimation développant des pneumonies acquises sous assistance respiratoire.

La première cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose est en effet une infection causée par la bactérie *P. aeruginosa*. On estime à 80 % la part de la population adulte atteinte de mucoviscidose infectée par cette bactérie. Cet agent pathogène est difficile à éradiquer, de par ses résistances multiples aux antibiotiques communément utilisés et le caractère chronique de l'infection qui perdure des années, notamment parce que les poumons des malades, encombrés de mucus, lui sont un terrain favorable.

Après une caractérisation poussée en laboratoire de plusieurs bactériophages

ciblant *P. aeruginosa* afin de s'assurer de leur innocuité pour l'organisme, nous avons effectué des essais sur des animaux. La réduction de la population bactérienne pulmonaire et l'évolution de l'état infectieux des animaux ont montré que les bactériophages étaient efficaces. Puis nous avons voulu savoir si les bactériophages pouvaient agir à travers l'épais mucus du système respiratoire de patients atteints de mucoviscidose. Nous avons défini un cocktail de dix bactériophages capables de lyser les souches cliniques de *P. aeruginosa* et démontré que ceux-ci étaient en effet capables de pénétrer au sein du mucus pour y détruire les bactéries.

Nous avons aussi comparé l'efficacité d'un traitement antibiotique avec celui d'un bactériophage ciblant la bactérie *E. coli*, de plus en plus responsable de pneumonies chez des patients en réanimation. Le traitement antibiotique requiert plusieurs administrations, là où le bactériophage n'en nécessite qu'une seule, car il se multiplie là où se situe la cible. Récemment, avec une équipe des Hôpitaux de Paris, nous avons isolé un bactériophage capable de produire 300 nouveaux virus en dix minutes et qui cible une souche particulièrement

résistante d'*E. coli*. La prochaine étape consiste à mettre en place un essai clinique.

D'autres utilisations thérapeutiques des phages sont à l'étude, notamment pour améliorer l'efficacité des antibiotiques (voir l'encadré page ci-contre). Par exemple, les bactéries forment souvent des biofilms où les antibiotiques ne diffusent pas. Or certains phages ont des enzymes qui dégradent ces biofilms et, par conséquent, facilitent la diffusion des molécules thérapeutiques. Les phages peuvent aussi servir de vecteurs afin d'introduire dans la bactérie un principe actif létal ou capable de rétablir la sensibilité de la bactérie à un antibiotique.

L'union fera la force

L'étude de la phagothérapie avec des outils modernes ne fait que commencer et les premiers résultats sont encourageants. Cela démontre que la piste des bactériophages n'est pas à négliger à l'heure où la résistance aux antibiotiques devient de plus en plus préoccupante. Et pour traiter les infections bactériennes les plus coriaces, une stratégie consistant à combiner les deux approches thérapeutiques sera probablement la plus efficace. ■

Les microbes à notre

Hélène Gélot et Marine Bollard

Dans notre inconscient collectif, les virus, bactéries et autres microorganismes ont mauvaise réputation. Pourtant, nous les utilisons de plus en plus. De l'agroalimentaire à la médecine, voici leurs principales applications.

ALIMENTS PROBIOTIQUES

Nos intestins nous préoccupent. En témoignent les millions de ventes du livre *Le Charme discret de l'intestin*, paru en 2015. Et pour cause : cet organe abrite quelque 100 000 milliards de bactéries qui accompagnent la digestion, font obstacle aux bactéries pathogènes et stimulent notre système immunitaire. Mais un déséquilibre de ce microbiote intestinal est vite arrivé. Pour préserver ou maintenir cet écosystème, les probiotiques font figure de candidats idéaux. Définis comme des bactéries ou levures bénéfiques pour la santé lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, on les trouve sous forme de médicaments, de compléments alimentaires ou ajoutés à des aliments tels que les yaourts. Actuellement, les probiotiques sont plutôt destinés aux personnes globalement en bonne santé, afin de régler les désagréments qui peuvent accompagner un déséquilibre du microbiote intestinal, tels que la constipation, les maux de ventre et les diarrhées induites par les antibiotiques. Mais les recherches en cours visent à produire des probiotiques pour traiter spécifiquement une maladie. Grâce à l'analyse de l'ADN d'un échantillon de fèces d'un individu, il est possible de déterminer le profil de son microbiote intestinal. Et d'établir une corrélation entre une quantité insuffisante de certaines espèces bactériennes et des pathologies. Des chercheurs ont par exemple mis en évidence une relation proportionnelle entre l'abondance de la bactérie intestinale *Akkermansia muciniphila* et une meilleure réponse à un régime chez des personnes obèses ou atteintes de diabète de type 2. Des tests cliniques sont en cours pour tester les effets de la prise d'*Akkermansia* comme probiotiques chez ces patients.



© Creativ Stall/Shutterstock.com

PRODUIRE DES MÉDICAMENTS

Du pain, du vin, de la bière... et de la morphine ? Les levures ont plus d'un tour dans leur sac ! En 2015, une équipe menée par Vincent Martin, de l'université Concordia à Montréal, en collaboration avec des chercheurs de l'université de Californie à Berkeley, a réussi à faire produire de la morphine à partir de sucre à des levures génétiquement modifiées. Le principe ? Introduire dans la levure les gènes codant pour les différents intermédiaires dans la voie de production de cette molécule, utilisée dans le traitement de la douleur et habituellement synthétisée à partir du pavot. Des microorganismes génétiquement modifiés sont ainsi utilisés comme des usines à médicaments depuis 1982 avec la mise sur le marché de l'insuline, destinée aux diabétiques. Mais beaucoup de médicaments sont aussi produits par des bactéries sans qu'on ait besoin de manipuler leurs gènes. Les microbes produisent naturellement ces molécules soit pour freiner la croissance d'autres microorganismes et donc accéder à plus de ressources, soit pour envoyer des signaux. Depuis le tout premier antibiotique, la pénicilline, produit en 1940, pas moins de 23 000 composés actifs, dont des hormones, des antitumoraux et des immunosuppresseurs, ont été produits par des microorganismes. Parmi eux, 42 % sont issus de champignons et 32 % de bactéries filamenteuses, les actinomycètes. L'exploration de ce monde microscopique se poursuit dans l'objectif de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques. Et la marge est immense : on estime que les techniques actuelles permettent de cultiver en laboratoire seulement 1 à 15 % des bactéries existantes.



© Tashal/Shutterstock.com