

CRISPR-CAS9, la modification de l'ADN à la portée de tous

D'après la Recherche janvier 2015

CRISPR-Cas9 tire son origine d'études très fondamentales du génome bactérien. En 1987, Atsuo Nakata et son équipe de l'université d'Osaka, au Japon, découvrent de curieuses séquences d'ADN répétitives et palindromiques (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) dans le génome de bactéries *Escherichia coli*.

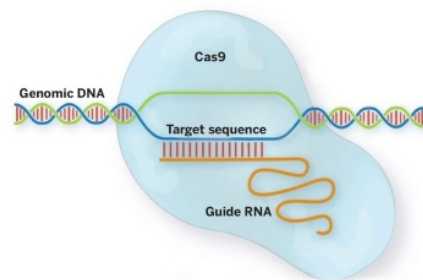
Des bio-informaticiens découvrent en 2005 que les morceaux d'ADN intercalés entre ces palindromes sont souvent des séquences d'ADN de virus.

En 2007, des chercheurs découvrent que lorsque les bactéries qu'ils utilisent pour fabriquer des yaourts et des fromages ont des séquences CRISPR, elles survivent mieux aux infections virales. « *Il s'agit d'une sorte de système immunitaire capable de garder la mémoire d'une agression par un virus ou une séquence d'ADN étrangère, afin de combattre ce même agresseur lorsqu'il envahit à nouveau la bactérie* », résume Christine Pourcel, de l'Institut de génétique et microbiologie d'Orsay, qui a participé à cette découverte.

Restait à comprendre comment. Plusieurs microbiologistes à travers le monde vont s'y atteler. Parmi eux : la Française Emmanuelle Charpentier qui travaille alors à l'université suédoise d'Umeå. Avec son équipe, elle va contribuer au décryptage d'un des principaux mécanismes mis en jeu.

Technique de routine

Comme pour n'importe quel gène, chaque séquence CRISPR, qui contient donc de l'ADN viral, est transcrite ARN. Ces ARN vont ensuite se lier à une enzyme découpeuse d'ADN nommée Cas9. Si cette structure rencontre l'ADN correspondant d'un virus dans la cellule, l'ARN s'y apparie et la Cas9 le coupe en deux. Le système constitue un redoutable attelage pour détecter facilement une séquence d'ADN donnée, puis la découper avec précision.



Ces caractéristiques en feraient un outil rêvé de génie génétique : on pourrait l'utiliser pour supprimer un gène et ainsi découvrir sa fonction ; on pourrait aussi éliminer un gène néfaste ou déficient. Il suffirait de fabriquer en laboratoire un « ARN guide » correspondant au gène que l'on souhaite cibler, puis de l'arrimer à une enzyme Cas9. Cette dernière découperait alors le gène. C'est précisément ce qu'Emmanuelle Charpentier réussit à faire *in vitro* en 2012, en s'alliant avec sa consœur Jennifer Doudna, de l'université de Berkeley, aux États-Unis.

Multiplés applications

« *En théorie, cette technique ne permet ni de cibler plus de zones du génome ni de le faire plus précisément*, tempère Ignacio Anegón, également au CRTI de Nantes, où il utilise CRISPR-Cas9 pour créer des rats génétiquement modifiés. *Mais en pratique, en simplifiant le génie génétique et en le rendant accessible à n'importe quel laboratoire, la technique a fait exploser le nombre d'études. Cette démocratisation s'est en effet vite concrétisée par une déferlante de publications confirmant son efficacité sur un très grand nombre de génomes de bactéries, mais aussi d'animaux et de végétaux. CRISPR-Cas9 fonctionne avec la même facilité sur les génomes plus complexes des cellules eucaryotes, où l'ADN est recroquevillé dans un noyau.* » Les scientifiques commencent tout juste à entrevoir les mécanismes très complexes mis en jeu par CRISPR-Cas9 pour y parvenir, mais en tout cas, ça marche !

Ainsi, en janvier 2013, quatre équipes annoncent avoir réussi à détruire des gènes cibles dans des cellules humaines. Les applications vont alors s'enchaîner à un rythme effréné et avec succès pour modifier des gènes d'organismes variés : bactéries, levures, riz, mouches, nématodes, poissons-zèbres, rongeurs, etc. Et certains chercheurs modifient légèrement la technique pour que la Cas9 ne coupe pas le gène cible, mais stimule son expression, l'inhibe ou le remplace par un autre... transformant l'outil en une sorte de couteau suisse génétique....

Copier-coller de l'ADN

En 2014, l'outil a franchi deux caps importants : son premier succès sur des primates, et sa capacité à corriger des maladies génétiques sur des souris. Le premier résultat a été présenté en février par Jiahao Sha, de l'université médicale de Nanjing, en Chine.

Dans des embryons de macaques asiatiques encore constitués d'une seule cellule, son équipe a injecté cinq ARN guides conçus pour cibler simultanément cinq zones réparties sur trois gènes particuliers, ainsi que le matériel génétique nécessaire à la synthèse de Cas9. Ils ont observé que chez huit embryons ainsi traités, CRISPR-Cas9 avait réussi à agir sur deux des trois gènes cibles. Puis les biologistes ont recommencé l'opération sur 86 autres embryons qu'ils ont transférés dans 29 femelles porteuses. À la publication de l'étude, une seule femelle était arrivée à terme. Elle avait donné naissance à des jumeaux chez lesquels CRISPR-Cas9 avait aussi agi simultanément sur deux des trois gènes.

« Ce résultat montre que CRISPR-Cas9 pourrait être utilisé pour générer des primates modèles de maladies humaines, ce qui constituerait une avancée importante », commente Tuan Huy Nguyen. Enfin, les chercheurs n'ont détecté aucune mutation sur le reste du génome.

Mais c'est surtout fin mars 2014 qu'une équipe de l'Institut de technologie du Massachussets, aux États-Unis, a concrétisé le potentiel médical de CRISPR-Cas9. Ces biologistes l'ont utilisé sur la souris pour corriger une maladie génétique incurable du foie, liée à une mauvaise dégradation de la tyrosine, un acide aminé, la tyrosinémie. À des souris malades adultes, l'équipe a injecté trois ARN guides ciblant trois séquences d'ADN liées à la mutation, le gène de la Cas9 et le gène sain.

Résultat : environ 0,5 % des cellules du foie, les hépatocytes, ont correctement incorporé le gène sain à la place du gène déficient. Trente jours plus tard, ces cellules redevenues saines ont commencé à proliférer et à remplacer les cellules malades, pour finalement représenter environ un tiers de tous les hépatocytes. Une proportion suffisante pour que les souris survivent malgré l'arrêt du médicament de référence qui réduit la production de tyrosine.

Myopathie de Duchenne

En août 2014, c'est une autre maladie génétique incurable qui a subi la loi de CRISPR-Cas9 : la myopathie de Duchenne. Cette dégénérescence des muscles est due à des mutations sur le gène codant la dystrophine, protéine indispensable au bon fonctionnement des fibres musculaires. Menée à l'université du Texas, aux États-Unis, une étude a porté sur de jeunes embryons de souris juste après fusion de l'ovule et du spermatozoïde, chez lesquels le gène de la dystrophine avait été muté pour mimer la maladie.

L'équipe leur a injecté un ARN guide ciblant le gène muté, la Cas9, et un gène destiné à corriger la mutation. Puis les embryons ont été implantés dans des mères porteuses. Ils ont donné naissance à des souris que les chercheurs ont élevées pendant neuf mois. Chez celles dont le taux de cellules correctement corrigées par CRISPR-Cas9 atteignait au moins 40 %, les muscles étaient normaux. « Ces études sur des souris constituent les premières preuves in vivo que CRISPR-Cas9 est capable de corriger des maladies génétiques », commente Tuan Huy Nguyen.

Les dernières avancées

Le 7 janvier 2016, des chercheurs ont réussi à améliorer la vision de rats touchés par une maladie héréditaire source de cécité. En utilisant les fameux ciseaux à ADN, ils ont coupé le gène défectueux, source de la maladie, et l'ont remplacé.

Cette technique est également testée sur les végétaux comme un substitut aux classiques et polémiques OGM. A l'inverse de la modification génétique (où l'on intègre un gène d'une autre espèce) utilisée depuis des années, le couper/coller possible grâce à CRISPR-Cas9 ne va pas utiliser de gène étranger, mais simplement modifier l'ADN.

D'autres équipes travaillent sur une autre application possible : "Si l'on injecte CRISPR-Cas9 dans une bactérie, en utilisant par exemple un bactériophage, un virus destiné aux bactéries, la bactérie meurt". Cette méthode pourrait ainsi remplacer les traitements antibiotiques. Surtout, Cas9 élimine une bactérie bien précise et ne touche pas aux autres, essentielles pour l'organisme, alors que les antibiotiques sont "des sortes d'armes de destruction massive".