

Évolution du génie génétique vers la toute puissance de l'homme
sur le génome : Perspectives et dangers

Philippe MIKAELOFF

Nous allons revivre ensemble les étapes du développement du génie génétique qui a permis de modifier la structure du génome des êtres vivants. Depuis 2012 à la suite d'une recherche fondamentale en microbiologie, l'homme a acquis la possibilité de modifier à volonté le génome de tous les organismes vivants y compris des embryons, ce qui soulève des problèmes éthiques.

Pour suivre cet exposé je dois faire un bref rappel sur l'ADN. L'ADN est un acide nucléique. Sa structure en double hélice a été découverte en 1953 par James Watson et Francis Crick, ce qui leur a valu un prix Nobel de médecine. L'ADN comporte une série de nucléotides qui possèdent eux-mêmes un manche constitué par un groupement phosphate et un sucre, le désoxyribose, auquel est rattaché une base azotée. L'ADN est porteur de 4 bases azotées complémentaires 2 à 2, l'adénine, appariée à la thymine et la guanine appariée à la cytosine qui se réunissent par des liaisons hydrogènes. Ces liaisons sont à l'origine de la structure en double hélice de l'ADN dotée d'une grande stabilité. L'alternance des 4 bases azotées en abréviation ATGC explique que l'ADN est le dépositaire de l'information génétique universelle depuis l'origine de la vie sur la terre. Il se condense sous forme de chromosomes dans le noyau de chaque cellule. On désigne sous le nom de génome l'ADN total d'une cellule.

Un gène est un segment d'ADN. Le génome humain comprend 23 000 gènes codant pour des protéines de structure constituants de tous les organes et tissus. Les gènes sont transcrits en acide ribonucléique, qui lui est monobrin, dont le sucre est le ribose. Les ARN messagers servent d'intermédiaires à l'élaboration des protéines grâce au code génétique. On s'est rendu compte que ces 23 000 gènes n'occupent que 2% de la totalité de l'ADN.

Il y a quelques années on pensait que la plus grande partie de l'ADN qu'on surnommait ADN poubelle n'avait pas de fonction. En fait le projet de recherche ENCODE qui a regroupé de nombreux laboratoires a conclu en 2013 que seul environ 20% de l'ADN n'a pas de rôle fonctionnel car il est le résultat de l'évolution, composé de pseudogènes, de transposons ou d'ADN d'origine virale. En fait la plus grande partie de l'ADN dit non codant renferme de nombreux gènes appelés régulateurs qui modifient l'activité des gènes de structure à l'origine de multiples ARN interférents,

de micro ARN et de protéines régulatrices de gènes. Il ne faut pas oublier dans cette régulation complexe la méthylation et l'acétylation de segments d'ADN.

Le projet de recherche génome humain entrepris en 1990 a permis le séquençage complet des 3,3 milliards de bases azotées dans l'ordre après 13 années d'effort. Il s'est achevé en 2003 en utilisant plusieurs techniques de séquençage pour un coût estimé supérieur à 2 milliards de dollars. Par la suite le développement de séquenceurs à haut débit a permis le séquençage de nombreux génomes pour un prix de revient de moins en moins coûteux puisqu'actuellement le séquençage du génome humain revient à moins de 1000 dollars.

Venons-en au génie génétique. Il regroupe les techniques qui modifient la constitution du génome d'un organisme. Ces techniques biologiques se sont développées dans les années 1970 à partir de la découverte de plusieurs outils : les enzymes de restriction ont été fondamentales. Déjà découvertes en 1965, confirmées par le biochimiste américain Paul Berg, elles ont valu le prix Nobel de médecine en 1978 à Hamilton Smith. Ce sont des protéines naturelles fabriquées par des bactéries qui ont la propriété de couper les 2 brins d'ADN au niveau d'un site spécifique. Effectivement les enzymes sont des protéines qui catalysent de multiples réactions chimiques dans les cellules sans être elles-mêmes dégradées. Plusieurs centaines d'enzymes de restriction spécifiques de nucléotides sont actuellement connues.

D'autres enzymes découvertes dans les années 1960, les ADN polymérases ont permis aux biologistes de faire autant de copies que l'on veut de séquences d'ADN isolées. Les ADN ligases découvertes en 1967 sont des enzymes suturantes qui ont la capacité de lier des segments d'ADN.

Le génie génétique a suscité la création de firmes commerciales qui ont proposé ces enzymes et des nucléotides assemblés in vitro par de puissants synthétiseurs. Cette technologie dite de l'ADN recombinant souleva des espoirs à partir de 1990, car elle a permis les premières tentatives de modification du génome chez l'homme. Après avoir identifié le gène défectueux on a essayé d'induire des recombinaisons homologues de l'ADN. On insère de l'ADN modifié dans un vecteur qui est un adénovirus ou un rétrovirus désactivé. Ce nouveau gène introduit dans les cellules est censé élaborer de nouvelles protéines et remplacer le gène défectueux.

En 1996 un numéro de la revue *Médecine science* a fait le bilan des essais cliniques des 5 premières années en thérapie génique. À l'époque 150 essais dans le monde avaient concerné près de 1000 patients. La moitié de ces essais s'adressaient à la cancérologie et 20% aux maladies génétiques, comme la mucoviscidose, la maladie de Gaucher, l'hémophilie B ou la déficience en adénosine désaminase. Sauf exception, les résultats de ces premiers essais furent décevants. En fait le premier succès de la thérapie génique a été obtenu en 2000 sur des enfants atteints d'immunodéficiences sévères qui ne pouvaient pas bénéficier d'une greffe de moelle osseuse compatible. Le protocole d'Alain Fischer fut utilisé à l'hôpital Necker. Après identification du gène défectueux, notamment un gène muté sur le chromosome X, il fut remplacé par un gène sain prélevé sur un membre de la famille. Pour ce faire, on préleva des cellules souches de la moelle de ces enfants malades pour y introduire par l'intermédiaire d'un rétrovirus désactivé ce gène sain au laboratoire, cultivé in vitro avant de le réinjecter aux enfants. Mais on savait que le virus désactivé introduisait le gène au hasard dans le génome des cellules et donc que le caractère aléatoire de l'insertion de nouvelles séquences d'ADN dans le génome pouvait être à l'origine d'effets secondaires néfastes comme des

leucémies. Effectivement sur les 20 enfants traités à l'époque, 5 avaient développé une leucémie. Par ailleurs ces manipulations demandaient beaucoup de temps, car il fallait utiliser plusieurs endonucléases, chacune coupant l'ADN en plusieurs endroits.

Au début des années 2000 les chercheurs mirent au point des cassures ciblées de l'ADN en utilisant de nouvelles enzymes de restriction artificielles, commercialisées. D'abord les nucléases à doigt de zinc. Ce sont des enzymes synthétiques qui permettent des modifications ciblées du génome. Couplés à une enzyme bactérienne, on forme une nucléase qui coupe l'ADN à l'endroit ciblé. En 2002 ce nouvel outil a permis d'obtenir pour la première fois la mutation ciblée d'un gène chez la mouche drosophile aux États-Unis. Mais cette technique oblige à construire une protéine spécifique longue d'une vingtaine de paires de bases pour chaque site ADN à cibler, ce qui est long et coûteux.

En 2010 les biologistes ont utilisé une protéine d'origine bactérienne appelée TALE. Chaque motif reconnaît un nucléotide particulier sur l'ADN. En la couplant à une nucléase bactérienne donc une enzyme, cet ensemble surnommé TALEN coupe l'ADN à l'endroit ciblé.

Cette technique a permis de modifier de nombreux génomes en obtenant par exemple des rats mutés.

Mais ces 2 techniques obligent à construire des protéines spécifiques des séquences ADN ce qui prend beaucoup de temps. En plus, ces 2 techniques peuvent avoir des effets indésirables.

Pendant toutes ces années, jusqu'en 2012 pour obtenir par exemple des souris porteuses d'une mutation responsable d'une maladie génétique humaine, il fallait des mois ou plus d'une année de manipulations au laboratoire.

Nous allons maintenant relater la fascinante histoire d'une recherche fondamentale qui a permis de découvrir le mécanisme d'une immunité acquise par les bactéries contre les bactériophages qui sont des virus. Cette découverte a permis de mettre au point un outil génétique efficace utilisé par de nombreux laboratoires depuis 2012 qui révolutionne la manipulation du génome. On l'a surnommée CRISPR-CAS9 que nous détaillerons.

En 1987 le biologiste Japonais Atsuo Nakata de l'université d'Osaka découvre dans l'ADN des bactéries *Escherichia coli* de curieuses séquences répétitives où les 4 bases azotées ATGC forment des suites immédiatement suivies des mêmes suites en sens inverse formant ainsi ce que l'on appelle des palindromes. Une séquence palindromique d'ADN peut effectivement se lire indifféremment dans un sens ou dans l'autre. On ne leur attribue pas de signification pendant plus de 15 ans.

En 2002, 3 équipes de biologistes démontrent que ces séquences répétées ressemblent à des segments d'ADN viral incorporés dans le génome des bactéries. Ces séquences sont alors baptisées CRISPR, abréviation de clustered regularly interspaced palindromic repeats, soit en français courtes répétitions palindromiques groupées régulièrement espacées. Ce sont celles qu'avait trouvées le biologiste Japonais en 1987.

Or, de nombreux bactériophages qui sont des virus s'attaquent aux bactéries compromettant la production industrielle des yaourts et des fromages. Afin de protéger cette fabrication 2 biologistes

français, l'un au Danemark Philippe Horvath, l'autre à l'université Laval au Québec Sylvain Moineau démontrent en 2007 que les bactéries streptococcus thermophilus qui ont résisté à une agression virale ont incorporé dans leur génome des portions de l'ADN viral qui les avait pénétré. On savait déjà que les bactéries possèdent un système de défense innée qui n'implique pas de reconnaissance de l'ADN viral. Mais pour la première fois on démontrait leur capacité à développer une immunité acquise.

En 2010 ces 2 chercheurs démontrent que les bactéries immunisées ont stocké dans leur génome des séquences de l'ADN viral qu'elles conservent en mémoire. Ils montrent que leur génome possède un complexe CRISPR avec des gènes à l'origine de protéines surnommées CAS qui sont des enzymes capables de reconnaître et de couper un ADN étranger.

Ensuite des bio informaticiens démontrent que ce système CRISPR est présent chez 50% des bactéries et 90% des archéobactéries, lesquelles s'individualisent par leurs ribosomes. Je rappelle que les premiers êtres vivants il y a 3 milliards et demi d'années sur terre ont été des cellules sans noyau appelées procaryotes comprenant les bactéries qui sont innombrables et les archéobactéries adaptées aux conditions extrêmes. Ces cellules renferment dans leur cytoplasme un ADN sous forme d'un chromosome unique. À partir de la transcription de leurs gènes en ARN messenger elles fabriquent des protéines car elles possèdent des ribosomes. Dès le début de l'apparition de la vie sur terre elles ont été la proie de virus appelés bactériophages qui, eux, sont incapables de synthétiser des protéines car ils n'ont pas de ribosomes et donc parasitent les bactéries pour répliquer leur ADN.

En 2012, 2 chercheuses ont publié dans la revue *Science* les résultats de leurs travaux sur le mécanisme qui permet aux bactéries de se protéger contre les bactériophages et l'application de leur découverte au génie génétique. Leurs laboratoires ont travaillé en collaboration. La première Emmanuelle Charpentier, française, biochimiste, microbiologiste et généticienne a consacré toute sa vie à la recherche dans divers laboratoires. À partir de 2002 elle est à Vienne, en Autriche, en 2007 elle prend la direction du laboratoire de bactériologie à l'université d'Umeå en Suède. Actuellement elle dirige un laboratoire de microbiologie à l'institut Max Planck de Berlin. La seconde Jennifer Doudna américaine, généticienne et biochimiste est aussi entièrement consacrée à la recherche, spécialiste de l'ARN, elle dirige un laboratoire à l'université de Berkeley. Ces 2 chercheuses ont acquis une notoriété internationale récompensée par de nombreux prix. Elles ont été invitées à l'académie des sciences de Paris en mars 2016. Leurs laboratoires ont travaillé sur les bactéries streptococcus pyogènes dont le génome est porteur du complexe CRISPR-CAS9. On a identifié en fait 6 systèmes de CRISPR-CAS selon les bactéries. On peut voir sur ce tableau que les types I, III et IV ont plusieurs gènes CAS dans leur génome. Le type II est celui de la bactérie streptococcus pyogenes choisi par Emmanuelle Charpentier car il contient le gène CAS9 : il code pour l'enzyme CAS9 qui a permis, nous le verrons, de bouleverser les possibilités du génie génétique.

CRISPR renferme donc plusieurs gènes CAS, regroupés en opéron, transcrits par un promoteur localisé en amont. L'opéron découvert dans les années 1960 par Jacob et Monod est un segment d'ADN qui regroupe des gènes adjacents. Cet opéron code pour les protéines CAS par l'intermédiaire d'ARN messenger. À proximité de l'opéron se trouve CRISPR-array, série de courtes répétitions d'ADN identiques, comportant 20 à 50 paires de bases. Ce sont celles que les biologistes

japonais avaient découvert en 1987 sans en connaître la signification. Ces répétitions sont séparées par des séquences ADN qui sont des éléments génétiques mobiles comme des plasmides ou des fragments d'ADN de bactériophages. Ils sont appelés spacers ou espaceurs.

Au cours d'une première infection de la bactérie, l'ADN du virus est reconnu par des protéines CAS codées par l'opéron. Ces protéines enzymatiques découpent l'ADN du bactériophage dont des fragments sont insérés dans le génome bactérien au niveau des spacers de CRISP-array. La bactérie, si elle survit, garde en mémoire des séquences de l'ADN viral dans son génome. Au cours d'une deuxième infection ces courtes séquences virales stockées sont transcrites en une longue molécule d'ARN qui se lie avec un ARN guide nommé tracr : l'ensemble est reconnu par une enzyme CAS codée par l'opéron. Elle clive ce long ARN en chacune des petites séquences d'origine virale qui s'associent à l'ARN guide et à la protéine CAS9 : cet ensemble avec son ARN guide se fixe sur l'ADN viral par complémentarité de leurs bases azotées. L'enzyme CAS9 coupe alors les 2 brins de l'ADN du bactériophage.

Des biochimistes du laboratoire de Jennifer Doudna ont reconstitué en 3 dimensions l'enzyme CAS9, son ARN guide qui est l'association de 2 ARN, l'ARN viral et l'ARN tracr. Leur vidéo démontre la coupure des 2 brins de l'ADN du bactériophage.

Récemment des biologistes japonais de l'université de Tokyo ont réussi à filmer in vivo la façon dont le complexe CAS9 coupe l'ADN. Ils ont utilisé un microscope à force atomique à haute vitesse : il ne faut au complexe CRISPR-CAS9 que quelques secondes pour couper l'ADN viral.

À la suite de ces découvertes, Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna ont eu l'idée de fabriquer au laboratoire un ARN guide correspondant à un gène précis, de le coupler au petit ARN tracr et d'arrimer cet ARN à une enzyme CAS9 pour que ce complexe découpe l'ADN à un endroit précis du gène, ce qu'elles publient avec succès en 2012. De nombreux laboratoires ont alors utilisé ce système car il est pratique, rapide et peu coûteux. Il a donc révolutionné les techniques du génie génétique. Actuellement on produit des ARN guides commercialisés correspondant à de nombreux gènes, qui, couplés à la protéine CAS9, permettent de couper les 2 brins d'ADN à un endroit précis.

Ces 2 chercheuses, conscientes des enjeux économiques de leur découverte, ont fondé 2 sociétés, *Crisptherapeutics* par Emmanuelle Charpentier et *Editas* par Jennifer Doudna qui ont attiré plusieurs dizaines de millions de dollars d'investisseurs. D'autres ont voulu déposer des brevets et monter des start-up à l'origine de plusieurs procès en cours.

On a reproché à cette technique de provoquer des effets indésirables hors cible sur l'ADN. Les biologistes pour éviter ces erreurs de ciblage ont eu recours à 2 protéines CAS différentes chacune capable de couper seulement 1 des 2 brins de l'ADN ce qui a réduit ce risque d'erreur de ciblage, toutefois sans le supprimer.

Cette technique permet donc d'étudier la fonction d'un gène, de le supprimer, de le remplacer ou de le modifier. Une fois l'ADN coupé par le système CRISPR CAS9 la cellule doit procéder à la réparation de son génome, ce qui conduit à une mutation du gène ciblé. Pour bloquer la fonction

d'un gène on utilise une protéine CAS exempte d'activité enzymatique surnommée CAS9. Cet outil est couplé à un ARN guide spécifique du gène visé.

Le système CRISPR CAS9 pourrait permettre de couper des gènes de résistance aux antibiotiques et donc de diminuer leur résistance aux antibiotiques acquise par les bactéries.

Cette technique permet aussi en utilisant plusieurs ARN guides d'agir in vivo sur plusieurs gènes en même temps. Elle va bouleverser la modification génétique des plantes, la thérapie génique, la cancérologie et les possibilités de modifier le génome des embryons.

Pour terminer nous avons choisi quelques exemples d'application dans ces 4 domaines : dans le domaine des plantes les modifications génétiques par le système ARN guide CAS9 se font sans insertion d'ADN étranger. Donc ces nouvelles plantes sont différentes des OGM puisqu'elles ne comportent pas dans leurs génomes d'ADN étranger. CRISPR-CAS9 permet de couper le génome d'une plante en un site prédéterminé grâce à un ARN guide. Cela suppose que préalablement on a localisé le ou les gènes à modifier ou à supprimer. La modification de l'ADN se fait lors de la réparation de la cassure par la cellule végétale. Cette technique a permis d'obtenir des champignons, génétiquement modifiés actuellement mis sur le marché ainsi que des fleurs, des légumes, des fruits plus résistants aux intempéries, avec une meilleure durée de conservation ou résistants aux virus.

Aux États-Unis le ministère de l'agriculture a autorisé la culture de plantes modifiées par CRISPR. Par contre la cour européenne de justice a considéré en janvier 2018 ces plantes ainsi génétiquement modifiées comme des OGM.

CRISPR-CAS9 a donné de nouveaux espoirs en matière de thérapie génique dont les essais jusqu'à présent étaient décevants. Plusieurs essais sont en projet, s'adressant à des maladies génétiques d'origine monogénique. La méthode consiste à prélever des cellules dont le gène muté responsable de la maladie sera éliminé, pour le remplacer in vitro par un gène sain grâce à la technique CRISPR-CAS9 comme le montre cette illustration. Les cellules corrigées après leur multiplication in vitro seront réinjectées au patient.

En 2014 au Massachussets Institute, cette technologie CAS9 a été utilisée avec succès sur des souris en remplaçant le gène muté responsable de la tyrosinémie, maladie génétique incurable du foie.

La même année à l'université du Texas les biologistes réussissent, avec CRISPR-CAS9, à remplacer le gène déficient, responsable de la myopathie de Duchène.

Des essais cliniques sont prévus intéressant une forme rare de cécité l'amaurose congénitale de Leber, l'anémie falciforme ou drépanocytose, la bétathalassémie, la mucoviscidose et d'autres maladies génétiques.

Les projets d'essais cliniques utilisant CRISPR-CAS9 sont pour l'instant plus nombreux en cancérologie. La plupart consistent à prélever des lymphocytes T aux patients, cellules immunitaires, ensuite à modifier leur génome à l'aide de CRISPR-CAS9 pour les rendre plus agressifs contre les cellules tumorales en les programmant à reconnaître un marqueur tumoral. On les multiplie au laboratoire avant de les réinjecter. Parmi les essais cliniques prévus, certains concernent le mélanome malin, le myélome multiple, le cancer du poumon....

Enfin la modification du génome des cellules germinales ou de l'embryon pour corriger une maladie génétique avec la technique CAS9 est étudiée au laboratoire, ce qui pose des problèmes éthiques. En 2014 à l'université chinoise de Nanjing des ARN guides ciblant 3 gènes couplés à la protéine CAS9 sont injectés dans des embryons de macaque au stade unicellulaire comme le montre cette photo. Chez 8 embryons traités, la technique CRISPR-CAS9 a agi sur 2 des 3 gènes. Transférés sur une femelle porteuse, ces embryons ont donné naissance à des jumeaux génétiquement modifiés que l'on voit ici. En avril 2015 une équipe chinoise de l'université Sun yat Sen de Canton a utilisé CRISPR-CAS9 pour modifier le génome d'un embryon humain. À la suite de cet essai les chercheurs ont rappelé que les règles internationales adoptées, appuyées par le congrès américain, interdisaient de modifier les cellules germinales humaines et les embryons humains. L'évolution du génie génétique s'est donc accélérée pour parvenir à une toute puissance de l'homme sur le génome. Or en novembre 2018, il a été révélé la naissance de 2 jumelles génétiquement modifiées en Chine. Le généticien He Jankui de l'université de Shenzhen dans le sud de la Chine s'est adressé à un couple dont le mari avait le sida. Il s'est appuyé sur les données suivantes : le gène CCR5 situé sur le chromosome 3 est à l'origine d'une chimiokine de type 5, protéine de la surface des leucocytes impliquée dans l'immunité. Quelques individus possèdent une mutation de ce gène qui les protège contre une infection par le virus du sida. Il a donc réalisé une fécondation in vitro après avoir inséré une protéine CRISPR CAS9 spécifique du gène CCR5 suivie d'une implantation dans l'utérus maternel, dans le but de protéger ces enfants contre le sida. Cette révélation a déclenché une condamnation unanime de la communauté scientifique.