



**Dr Patricia FRANÇON
(Institut des Biothérapies, AFM-Téléthon, Evry)**

Depuis quelques années, le monde scientifique est bousculé par une nouvelle méthode révolutionnaire qui permet de modifier de manière ciblée l'ADN de tout être vivant avec une facilité déconcertante. Son nom? CRISPR-Cas9.

Qu'est-ce que CRISPR/Cas9 ?

C'est un mécanisme naturel de défense des bactéries lorsqu'elles sont infectées par un virus.

Il se déroule en plusieurs étapes :

1. La bactérie intègre une partie de l'ADN du virus dans son génome au niveau de séquences appelées « **CRISPR** ».
2. La bactérie produit ensuite une copie identique de la séquence d'ADN virale intrusive, copie appelée « **ARN guide** ».
3. Cet ARN guide s'associe à une enzyme particulière « **Cas9** » que possède la bactérie et qui est capable de couper n'importe quelle séquence d'ADN, agissant comme des « **ciseaux à ADN** ».
4. Lorsqu'un « ARN guide » s'associe à la « Cas9 », il l'entraîne vers la séquence d'ADN qui lui est identique. L'« ARN guide » indique ainsi à l'enzyme Cas9 là où précisément il faut couper. En coupant l'ADN du virus envahisseur ce système permet à la bactérie de le détruire (Voir Figure).

CRISPR/Cas9 permet de couper et de réparer de manière ciblée le génome

En 2012, deux chercheuses française et américaine, Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, ont compris qu'elles pouvaient **utiliser ce mécanisme pour aller couper des endroits précis dans n'importe quelle molécule d'ADN** de quelque espèce que ce soit, **en créant des ARN guides spécifiques d'une séquence d'ADN.**

Lorsqu'une coupure se produit dans la molécule d'ADN, une machinerie dite de réparation va prendre en charge les deux extrémités coupées pour les recoller. Cependant ce système de réparation ajoute ou enlève des petits morceaux d'ADN au niveau de la coupure pour pouvoir recoller les deux

extrémités. Ces insertions ou délétions de petits morceaux de séquence entraînent **l'inactivation du gène coupé**.

Quelles applications pour la recherche en génétique ?

Aujourd'hui ce système est utilisé dans la majorité des laboratoires de recherche car facile à mettre en place *in vitro* (dans les cellules en culture) avec une très bonne efficacité. Des logiciels en libre accès permettent aux chercheurs de fabriquer facilement des « ARN guide » pour cibler le gène de leur choix.

Ce système efficace pour inactiver un gène permet ainsi :

1. **d'étudier la fonction du gène ciblé.**
2. **de créer des modèles de maladies génétiques.**

Quelles applications thérapeutiques pour les malades ?

▶ Corriger la séquence défectueuse du gène ?

Ce système est aujourd'hui utilisé pour le développement de certain produit à visée thérapeutique en oncologie pour lesquels on souhaite inactiver certains gènes.

Il pourrait être utilisé dans le cadre de certaines maladies génétiques, où l'élimination d'une partie du gène permettrait de corriger la pathologie. Cependant ce dernier cas ne concerne actuellement qu'une minorité de maladies génétiques. Pour la majorité d'entre elles, c'est une correction de la séquence défectueuse du gène, c'est-à-dire correspondant à la mutation, qui est nécessaire, comme dans le cas des paraplégies spastiques héréditaires. En corrigeant l'erreur de séquence le gène en cause pourrait retrouver sa fonction.

▶ Remplacer le gène défectueux par le « bon » gène ?

Lorsqu'en plus du système CRISPR/Cas9, une séquence d'ADN, fabriquée de manière synthétique, est également apportée, alors le mécanisme de réparation va intégrer cette séquence au moment du recollage de la molécule d'ADN. Ainsi ce mécanisme permet de corriger la séquence du gène ciblé si on apporte comme ADN synthétique la séquence d'ADN correcte de ce gène.

Dans le cas des paraplégies spastiques, on pourrait envisager un système CRISPR/Cas9 avec un ARN guide qui va couper l'ADN au niveau de la mutation du gène SPG propre au patient, et un ADN synthétique qui apporte la séquence correcte en remplacement.

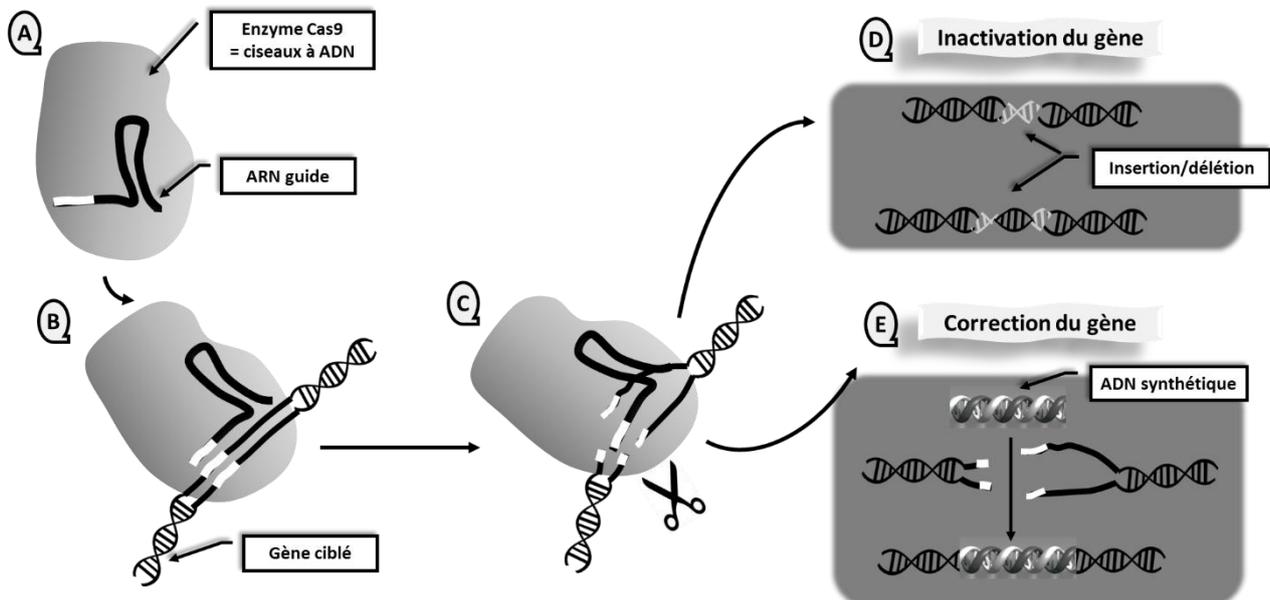
Mais, ce mécanisme d'élimination/remplacement est plus compliqué à mettre en place et beaucoup moins efficace que l'utilisation simple du système CRISPR/Cas9. Il est étudié en laboratoire, mais reste peu utilisé. Bien qu'étant le seul moyen aujourd'hui qui pourrait permettre d'aller corriger une séquence mutée pour retrouver la fonction correcte du gène, son application à des fins de thérapies des maladies génétiques est encore lointaine.

En effet, si l'outil paraît facile à utiliser, il se heurte aux mêmes écueils que la thérapie génique classique, à savoir son efficacité chez le patient, et son rejet immunitaire potentiel.

En conclusion : beaucoup de limites encore...

CRISPR-Cas9 reste une approche prometteuse pour la thérapie génique, mais comme pour toutes les approches qui modifient le génome des êtres vivants, **les limites éthiques de leurs applications (la tentation du bébé « parfait ») restent aussi à définir.** De plus, s'agissant de « ciseaux à ADN », on imagine aisément que, **pour être dénués de tout risque, leur spécificité de coupure doit être complètement garantie ; de nombreux chercheurs travaillent aujourd'hui à l'amélioration de ces outils pour assurer cette spécificité.**

Comment fonctionne le système CRISPR/Cas9 ?



A. L'enzyme Cas9 est associée à un ARN guide. **B.** L'enzyme s'associe à l'ADN au niveau d'une séquence du gène identique à la séquence banche de son ARN guide. **C.** L'enzyme Cas9 coupe l'ADN au niveau de la séquence blanche identique à son ARN guide. **D.** La machinerie de réparation de la cellule recolle les deux extrémités de l'ADN en insérant ou éliminant des petites séquences, ce qui aboutit à une séquence incorrecte et donc l'inactivation du gène. **E.** Si un ADN synthétique est apporté en plus du système CRISPR/Cas9, il va être intégré au moment du recollage de l'ADN. Cette séquence peut être définie de façon très spécifique pour aller justement corriger le gène ciblé par la coupure et ainsi restaurer la fonction du gène.

Une vidéo expliquant ce mécanisme est également accessible sur le site de l'INSERM.
<http://www.inserm.fr/tout-en-images/crispr-cas9-une-methode-revolutionnaire>

