

Chroniques génomiques

CRISPR-Cas9, une nouvelle donne pour la thérapie génique

Bertrand Jordan



Les différents usages du système CRISPR

Nous avons récemment évoqué la technique CRISPR-Cas9 et la crainte que cette méthode révolutionnaire de modification de l'ADN [1, 2] ouvre la voie à la modification de la lignée germinale humaine [3]. Une première tentative, pratiquée sur des embryons humains non viables, a effectivement été publiée au printemps 2015 [4]. Mais le système CRISPR peut aussi être employé pour la thérapie génique somatique, une application qui, elle, ne prête guère à la controverse. La technique présente en effet de sérieux avantages, qui pourraient rendre plus généralement applicable cette approche thérapeutique sur laquelle on avait fondé beaucoup d'espoirs il y a une vingtaine d'années mais qui - malgré quelques succès récents - est restée relativement marginale en raison de ses difficultés de mise en œuvre [5]. On trouvera dans ce numéro de *médecine/sciences* une synthèse présentant de manière détaillée CRISPR-Cas9 et ses différents usages [6] (→), je traiterai ici uniquement les applications envisagées en thérapie génique et les développements commerciaux déjà engagés.

(→) Voir la Synthèse de J.P. Tremblay, page 1014 de ce numéro

Rappelons d'abord en quelques lignes comment fonctionne le procédé [1, 6, 7]. Il repose sur deux éléments, la nucléase Cas9 (pour *CRISPR-associated 9*) et un ARN appelé sgRNA (pour *single guide RNA*) ou, en bon français, ARNg (pour ARN guide) [6]. En fait, l'acronyme CRISPR (*clustered, regularly interspersed palindromic repeats*) désigne les zones d'ADN auxquelles est associée cette protéine chez les bactéries, mais c'est bien la nucléase Cas9 qui est mise en œuvre. Quant à l'ARN, il condense en une seule molécule deux régions distinctes à l'origine dans le système bactérien, l'une responsable de l'association avec Cas9, l'autre longue de 20 nucléotides et reconnaissant la cible sur l'ADN à modifier par complémentarité Watson-Crick - d'où le double qualificatif de *single* et *guide*. En pratique, les séquences codant pour ces deux éléments (Cas9 et sgRNA) sont clonées dans un vecteur (plasmide,



ou vecteur de type AAV, *adeno-associated virus*) portant les promoteurs appropriés, qui est ensuite

introduit dans la cellule dont on veut modifier l'ADN. Le complexe Cas9-sgRNA se fixe alors sur sa cible et la nucléase y pratique une coupure double brin¹. Si l'on a pris la précaution d'introduire en même temps un long oligonucléotide (100 à 200 bases) correspondant à la région à modifier et portant la séquence que l'on veut y introduire, la réparation de la coupure pourra se faire par recombinaison homologue et remplacera la séquence d'origine par celle que l'on a introduite (par exemple, corrigera une mutation ponctuelle présente dans l'ADN de la cellule). On voit immédiatement les avantages : on peut cibler n'importe quelle région du génome en changeant simplement la séquence du sgARN (qui doit bien sûr être choisie de manière à assurer une bonne spécificité pour éviter des modifications parasites (les *off-target effects*)), et on réalise tout naturellement ce qui jusque-là n'était qu'un rêve en thérapie génique, la *correction* d'un gène. Jusqu'ici en effet, la thérapie génique aboutissait à *ajouter* au génome un exemplaire fonctionnel du gène concerné,

UMR 7268 ADÉS, Aix-Marseille,
Université/EFS/CNRS,
Espace éthique méditerranéen,
hôpital d'adultes la Timone,
264, rue Saint-Pierre,
13385 Marseille Cedex 05,
France ;
CoReBio PACA, case 901,
parc scientifique de Luminy,
13288 Marseille Cedex 09,
France.
bertrand.jordan@univ-amu.fr
brjordan@orange.fr

¹ Il faut en plus que l'ADN comporte une séquence 5'-NGG-3' (appelée séquence PAM pour *protospacer adjacent motif*) au voisinage de la cible, ce qui complique un peu le choix de cette dernière - voir [6]. On trouve un guide pratique de la technique à <https://www.addgene.org/CRISPR/guide/#PAM>. Les indications données ici concernent le système CRISPR dérivé de *Streptococcus pyogenes*, le plus employé actuellement.



Figure 1. Page d'accueil du site de la firme Editas (avec George Church, un de ses fondateurs).

lequel s'intégrait essentiellement au hasard, et ne bénéficiait donc pas d'un environnement assurant une régulation correcte de son expression ; de plus, le gène muté restait en place. Avec CRISPR-Cas9, c'est bien le gène muté qui est rectifié : on peut donc espérer que sa régulation sera correcte puisqu'il est par définition dans son environnement normal. On peut même envisager de corriger des mutations dominantes dans lesquelles la forme altérée de la protéine est pathogène (comme dans l'ostéogenèse imparfaite) : le seul ajout d'un gène fonctionnel n'est pas curatif, mais la correction de la mutation devrait rétablir une fonction normale.

CRISPR en thérapie génique humaine, les cas favorables et les améliorations nécessaires

Tout cela n'est pas théorique : dès 2014, la correction d'une affection héréditaire (la tyrosinémie de type I) chez la souris adulte a été rapportée [8]. En bref, les animaux portent à l'état homozygote une mutation ponctuelle qui entraîne la synthèse d'une enzyme FAH (fumarylacétoacétate hydrolase)² instable et non fonctionnelle. La mutation a été corrigée par injection simultanée dans la veine caudale d'un plasmide exprimant Cas9 et un sgARN ciblé sur le gène, et d'un oligonucléotide long de 199 bases, centré sur la région de la mutation et portant la séquence normale. La fréquence des hépatocytes « réparés » (évaluée par leur expression de l'enzyme FAH) est de l'ordre de 1 % peu après l'injection, elle monte à plus de 30 % au bout d'un mois ; à cette date, les souris ont retrouvé un phénotype normal. Le modèle utilisé dans ce cas est certes favorable, dans la mesure où les cellules corrigées (des hépatocytes) ont un avantage sélectif sur les cellules mutantes³ ; mais les souris ont bel et bien été guéries de leur maladie génétique par une

² Dernière enzyme dans la voie du catabolisme de la tyrosine.

³ D'où l'augmentation de leur fréquence dans les semaines suivant l'injection.

seule injection dans la veine caudale... Il semble donc que le système CRISPR soit promis à un bel avenir en thérapie génique ; un article récent esquisse un premier panorama des applications envisagées [9]. On en est actuellement au stade des modèles animaux. Plusieurs publications [9] font état de la correction d'anomalies génétiques grâce à une intervention sur la lignée germinale. Au contraire de l'étude citée plus haut, ces travaux ne sont pas transposables chez l'homme, mais on peut s'attendre à voir bientôt une floraison de travaux montrant, comme Yin *et al.* [8], la correction d'une mutation chez l'animal adulte, prémices à des essais cliniques. Chez l'homme, c'est bien sûr pour les affections

monogéniques que la méthode va s'avérer la plus utile, et singulièrement pour celles qui sont susceptibles d'une approche *ex vivo* dans laquelle des cellules sont prélevées, corrigées *in vitro* puis réintroduites chez le malade. L'avantage du système CRISPR sera l'élimination du gène muté et son remplacement par la séquence normale, ainsi que l'adaptation facile à tout type de mutation grâce à un simple changement de la séquence du sgARN. On pense notamment à l'amaurose congénitale de Leber, à l'anémie falciforme ou à la bêta-thalassémie. Des applications en cancérologie sont également envisagées (inactivation d'un oncogène, par exemple), même si l'hétérogénéité des tumeurs complique sérieusement l'approche. Bien entendu, il faudra améliorer le système [6] : augmenter l'efficacité de transfert, réduire la taille des ADN à transférer afin qu'ils soient compatibles avec les meilleurs vecteurs (vecteurs AAV), éviter les effets *off target* (notamment par un bon choix de la séquence du sgARN)... La mise au point de cette méthode pour des cellules de mammifère a tout juste deux ans, gageons que la marge d'amélioration reste importante et que les progrès seront rapides, faisant réellement décoller cette thérapie génique restée jusqu'ici marginale dans ses applications sinon dans son écho médiatique [5].

Un intérêt soutenu de l'industrie et naturellement, des procès

Nombreux sont en tous cas ceux qui, dans le monde de la biotechnologie, parient sur CRISPR. Je prendrai deux exemples parmi les entreprises qui se lancent



actuellement sur ce marché⁴. La première, appelée Editas (<http://editasmedicine.com>) (Figure 1), créée fin 2013 à Cambridge (Massachusetts, États-Unis) compte parmi ses fondateurs le « génomiste » George Church ainsi que deux des découvreurs du système CRISPR, Jennifer Doudna et Feng Zhang. Son objectif annoncé est la mise au point de traitements pour corriger les gènes dans différentes affections génétiques⁵. Editas travaille sur l'amaurose congénitale de Leber, sur l'anémie falciforme, et a établi une collaboration avec l'entreprise Juno (<http://junotherapeutics.com>), spécialisée dans les immunothérapies pour le cancer, afin de modifier de manière ciblée des cellules T du patient avant réintroduction. Fondée avec une mise de 43 millions de dollars (US), Editas a réussi à l'été 2015 une nouvelle levée de fonds de 120 millions de dollars. Une autre firme, d'origine suisse (Bâle), s'appelle tout simplement CRISPR Therapeutics (<http://crisprtx.com/>) ; créée début 2014 avec une mise de fonds initiale de 25 millions de dollars, portée un an plus tard à 89 millions, elle compte parmi ses fondateurs Emmanuelle Charpentier (pionnière du système CRISPR) et Craig Mello, prix Nobel pour la découverte de l'ARN interférent (ARNi). La firme, comme l'indique son nom, a pour but les applications thérapeutiques du système ; elle ne donne pas de détails sur son programme et annonce simplement qu'elle va débiter sur des programmes *ex vivo* pour passer plus tard à l'*in vivo*. Plus près de nous, l'entreprise parisienne Cellectis, qui travaillait depuis la fin des années 1990 sur les applications thérapeutiques des techniques de modification ciblée de l'ADN alors existantes (nucléases à doigt de zinc et TALEN), a récemment scellé une collaboration en immuno-oncologie avec le prestigieux MD Anderson Cancer Center à Houston (États-Unis) – et ne se privera sûrement pas des atouts du système CRISPR. Gageons aussi que le nouveau centre de production de thérapies géniques et cellulaires dont l'AFM a annoncé la création pour 2019 ne restera pas à l'écart de ce mouvement⁶.

Ce ne sont là que quelques exemples, il existe de nombreux autres acteurs dans ce domaine très à la mode : citons encore Intellia Therapeutics, Caribou Biosciences, ERS Genomics, Horizon Discovery... Et naturellement les controverses sur la propriété intellectuelle de la technique font rage : il y a des millions,

peut-être des milliards de dollars en jeu ! Les principaux responsables de la découverte du système et de sa mise au point pour des cellules de mammifères, Jennifer Doudna, Feng Zhang et Emmanuelle Charpentier, ont chacun déposé et parfois obtenu des brevets dont les mérites respectifs sont âprement discutés. Jennifer Doudna a quitté Editas pour vendre ses droits à Intellia tandis qu'Emmanuelle Charpentier a cédé les siens à CRISPR Therapeutics ; Feng Zhang reste à Editas avec son propre brevet. Seuls les avocats sont certains de gagner à ce petit jeu ; espérons simplement que ces disputes n'handicaperont pas le développement de la technique et n'augmenteront pas trop le coût des thérapeutiques qui vont en découler.

Encore une révolution technique

Une fois de plus, des travaux apparemment ésotériques sur les bactéries débouchent sur un outil révolutionnaire, bouleversant la donne en recherche comme en thérapeutique. Cela me rappelle ma rencontre à Genève, en 1965, avec un chercheur obscur travaillant sur des enzymes bactériens bizarres qui n'intéressaient pas grand monde : il s'agissait de Werner Arber et des enzymes de restriction qui ont rendu possible le Génie Génétique (et lui ont valu un Nobel treize ans plus tard). Cela illustre aussi l'imprévisibilité de la recherche et la nécessité de soutenir des travaux fondamentaux sans application perceptible...

Le système CRISPR est maintenant très largement utilisé en recherche, pour toute une gamme d'organismes [6, 7], et l'on peut s'attendre à ce qu'il continue à se perfectionner grâce aux efforts d'innombrables laboratoires : optimisation, augmentation de l'efficacité de correction, meilleur contrôle des effets *off target*... [10] (→).

(→) Voir la Nouvelle de R. Gaudin, page 959 de ce numéro

Tout ceci facilitera son introduction en thérapie, avec des premières applications dans les affections susceptibles d'une approche *ex vivo* mais un passage probablement rapide à l'*in vivo* – notons que l'exemple cité chez la souris [8] correspond bel et bien à une thérapie *in vivo*, sans ciblage particulier sur les cellules à corriger. On peut donc prédire un bel avenir à la thérapie génique somatique par CRISPR-Cas9, tout en sachant que ces succès nous rapprocheront de la faisabilité technique pour une éventuelle thérapie (ou amélioration) *germinale* dont nous avons vu qu'elle soulève de très sérieuses questions [3]. ♦

SUMMARY

CRISPR-Cas9, a new chance for somatic gene therapy

Targeted modification of genes ("gene editing") is made much easier by the recently developed CRISPR-Cas9 system. This has raised alarm about possible uses of this technology for germline modification of the human genome; however this technology has less controversial applications, notably for somatic gene therapy with already some striking demonstrations in animal systems. Because of its precision and relative ease of use, CRISPR can be expected to drive a revolution in gene therapy and to turn it into a more mainstream approach. ♦

⁴ Les informations sur les entreprises proviennent du site GenomeWeb (<https://www.genomeweb.com/>), contenu accessible par abonnement, ou des sites des entreprises concernées.

⁵ The company's mission is to translate its genome editing technology into a novel class of human therapeutics that enable precise and corrective molecular modification to treat the underlying cause of a broad range of diseases at the genetic level (extrait du site d'Editas).

⁶ Le Monde, 9 septembre 2015.

RÉFÉRENCES

1. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1066-9.
2. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014 ; 157 : 1262-78.
3. Jordan B. Thérapie génique germinale, le retour ? *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 690-3.
4. Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015 ; 6 : 363-72.
5. Jordan B. Un chapeau pour mon repas ? *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 923-5.
6. Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1014-22.
7. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014 ; 346 : 1258096.
8. Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 2014 ; 32 : 551-3.
9. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, et al. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet* 2015 ; 52 : 289-96.
10. Gaudin R. Améliorons notre expérience de la molécule unique grâce à CRISPR. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 959-61.

TIRÉS À PART

B. Jordan



Questions de santé publique

Un nouveau
bulletin

pour une meilleure
visibilité des résultats
de la recherche
en santé publique

Les résultats de la recherche en santé publique souffrent en France d'un réel manque de visibilité. Ceci concerne aussi bien le monde académique (hors santé publique) que le grand public et les décideurs. Pour pallier ce déficit, l'IReSP a créé un bulletin à large diffusion intitulé « *Questions de santé publique* », largement inspiré du bulletin mensuel d'information de l'INED « *Populations et sociétés* ». L'objectif éditorial est de porter à la connaissance d'un large public (enseignants, étudiants, journalistes, décideurs, milieux de la recherche, asso-

ciations, public concerné) les informations les plus récentes concernant des questions importantes de santé publique, rédigées de façon facilement lisible et compréhensible pour des non spécialistes, en garantissant que les informations publiées sont validées scientifiquement. La publication concerne des faits et non des positions. Au-delà de la présentation de résultats, les qualités pédagogiques de *Questions de santé publique* permettent au lecteur de mieux comprendre comment sont formulées et abordées les questions de santé publique et quelles sont les limites de ces études.



Nom

Prénom

Institution Fonction

Spécialité Service

Adresse

Ville

Code postal

Pays

Adresse électronique

à nous retourner par la poste ou par fax au 01 49 85 03 45

Questions de santé publique
Les Éditions EDK EDP Sciences
109, avenue Aristide Briand
92541 Montrouge Cedex
France

Réservé aux abonnés de M/S
Recevez gratuitement et régulièrement
Questions de santé publique
en renvoyant ce document soigneusement rempli.

Questions de santé publique est une publication de l'Institut de Recherche en Santé Publique. ■ **Directeur de la publication** : Geneviève Chêne.

■ **Rédacteur en chef** : Claire-Isabelle Coquin. ■ Une réalisation des Éditions EDK.