

L'édition du génomome : une révolution en marche

D'après la conférence de Philippe Duchateau

Philippe Duchateau est directeur Scientifique du groupe Collectis¹.

1 Histoire et origine de l'édition génomique

L'édition génomique est une révolution en marche. Elle permet de changer un gène de façon sélective à un endroit voulu. Si cette technologie peut faire peur, elle entrera dans tous les cas de plus en plus dans les laboratoires de biologie.

Telle la voiture Ford T, symbole de la révolution industrielle (*Figure 1*), l'édition du génome en est une aussi importante.

Tout a commencé il y a dix-huit mille ans quand les hommes

ont commencé à se sédentariser. Ils ont dû alors domestiquer l'environnement – les animaux, les plantes – et ont créé l'agriculture (*Figure 2*). Avec l'agriculture, nous avons commencé à améliorer les plantes en les hybridant, en les croisant, en les sélectionnant... Nous faisons ainsi de la modification du génome sans le savoir.

Il y a neuf mille ans, l'épi de maïs d'origine n'était pas aussi grand qu'un petit doigt ; on arrive aujourd'hui à des épis de trente centimètres. C'est aussi le cas pour les bovins, on arrive aujourd'hui, juste par sélections et croisements, à

1. www.collectis.com



Figure 1

Des revues prestigieuses comme Science, « 2015-Breakthrough of the year », ou le National Geographic, « The DNA Revolution », mentionnent sur leurs couvertures une révolution dans la génomique qui serait comparable à la révolution industrielle du XIX^e siècle.



Figure 2

Les processus de sédentarisation des hommes sont aussi synonymes des débuts de l'intérêt des hommes pour l'agriculture.

des vaches qui peuvent produire jusqu'à soixante litres de lait par jour. Toute cette évolution de l'agriculture relevait déjà de la modification du génome.

Ce n'est qu'en 1953 que la structure de l'ADN a été élucidée, avec sa célèbre double

hélice et cette structure en fermeture éclair appariant différentes bases nucléiques, A, G, T, C – A avec T et G avec C (Figure 3).

L'ADN se constitue en chromosomes (vingt-deux chromosomes plus les chromosomes sexuels chez l'homme), qui

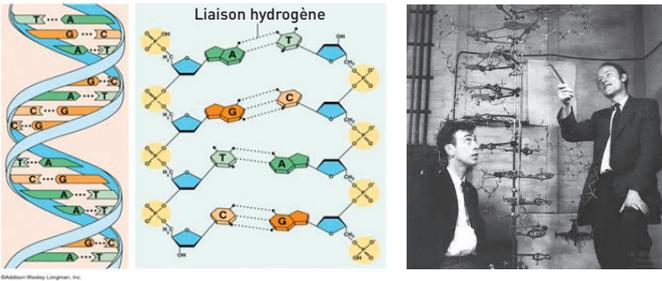


Figure 3

L'ADN, dont la structure a été découverte par James Watson et Fredrick Crick, a une forme hélicoïdale et a pour caractéristique l'emboîtement des paires de bases, A avec T et G avec C. Un génome correspond à 2x3 milliards de paires de bases, soit 20 000 gènes.

sont contenus dans un noyau, lui-même contenu dans une cellule. C'est l'assemblage de cellules, environ 10^{13} dans notre organisme, qui nous constitue (Figure 4).

Les gènes portés par l'ADN définissent tout être vivant (Figure 5) : de la bactérie, du virus, à la forme de notre oreille et à notre taille ; ils peuvent aussi présenter un défaut et être responsables de maladies génétiques.

aléatoires et croisements, aujourd'hui on a développé des outils d'une précision remarquable qui permettent d'aller modifier finement l'ADN, à la base près. On ne fait plus confiance au hasard, on décide exactement de la modification qu'on veut faire dans le génome, avec une meilleure sécurité du résultat, car on sait exactement ce qu'on fait, alors que la plupart des plantes que nous avons aujourd'hui dans nos champs ont été générées aléatoirement par des bombardements de rayons ionisants, suite à quoi on sélectionnait simplement la plante aux propriétés qui nous intéressaient.

Nous n'en sommes plus là aujourd'hui, mais nous sommes entrés dans l'aire de la précision chirurgicale. Cela

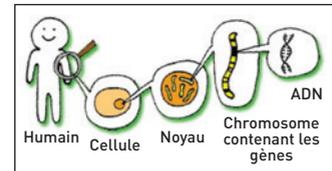


Figure 4

L'ADN dans l'organisme est contenu dans des chromosomes contenus dans des noyaux, qui eux-mêmes appartiennent aux cellules de l'organisme humain.

2 Mise en pratique de l'édition du génome

2.1. Principe

L'édition du génome consiste à aller directement d'un génome A à un génome modifié. Alors qu'auparavant tout se faisait par sélection, mutations



Figure 5

La diversification du vivant s'illustre par la forme des oreilles, les différentes races de chiens, ainsi que par les maladies génétiques comme le gigantisme et le gonflement de certaines parties du corps telles que le visage (enfant bulge²).

2. *Bulge* en anglais signifie renflement, bombement : l'enfant est donc ici atteint d'une maladie qui fait gonfler son épiderme.

s'obtient évidemment grâce à des outils : on veut aller adresser le point où l'on veut effectuer une modification et couper dans le génome à ce point précis. Pour cela, on utilise des enzymes, qu'on appelle des nucléases³ (Figure 6). La Figure 7 représente la structure tridimensionnelle d'une nucléase.

L'ADN est constitué de briques, les nucléotides A, T,

G et C. Une succession de six briques (Figure 7A) correspond à 4 096 combinaisons possibles (Figure 7B). Si on les compare à un génome composé de trois milliards de bases paires, les chances d'avoir des coupures dans le génome sont innombrables. Avec des enzymes qui reconnaissent six nucléotides, leur spécificité est faible, et ce sont approximativement plus d'un million de coupures dans le génome qui vont intervenir. Autant dire que la cellule est morte.

Si l'on considère douze nucléotides, on a seize millions de

3. Nucléase : enzyme capable de couper des liaisons d'acide nucléique, par exemple qui relie deux bases de l'ADN.

Figure 6

Coupeure d'un brin hélicoïdal d'ADN pour y remplacer un gène.

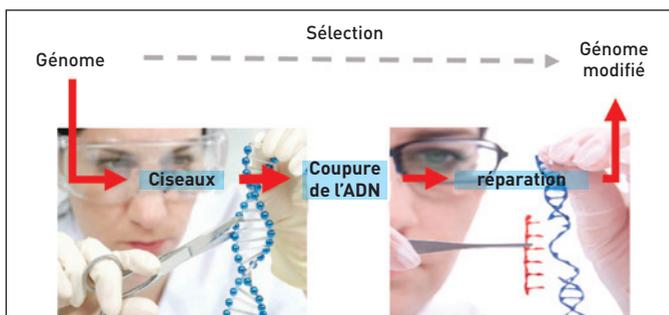


Figure 7

L'ADN est constitué par deux brins hélicoïdaux emboîtés, sur lesquels s'entortillent des nucléases qui reconnaissent des séquences d'ADN qu'ils vont couper.

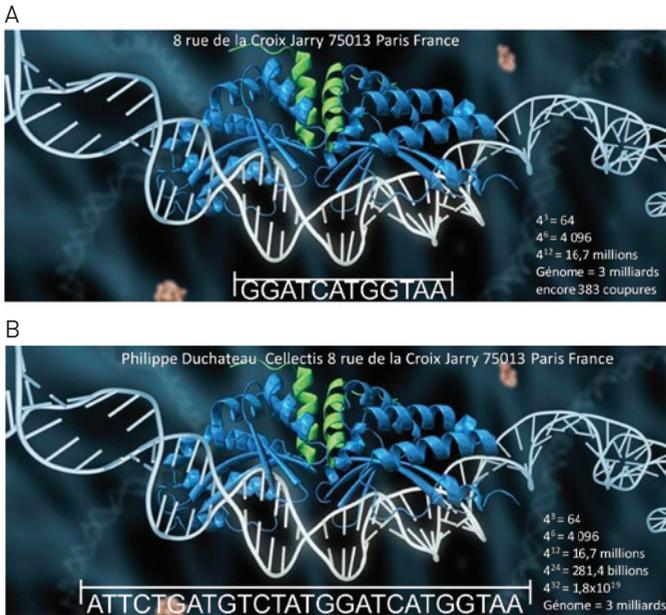


Figure 8

Plus les nucléases reconnaissent des séquences d'ADN longues, plus le ciblage sera sélectif.

combinaisons possibles (Figure 8A). Il reste encore environ quatre cents coupures possibles aléatoires dans le génome ; c'est encore très imprécis. Au laboratoire, on utilise des nucléases qui reconnaissent trente-deux paires de bases ; donc cela donne des combinaisons de l'ordre de deux cent quarante-deux milliards de possibilités (Figure 8B).

Si on compare ce chiffre au chiffre de trois milliards de paires de bases dans le génome, on voit que les chances de trouver cette séquence aléatoirement dans le génome sont virtuellement de zéro. Ce qui veut dire que quand on crée une enzyme pour cibler une séquence précise dans le génome, la probabilité pour qu'elle aille couper ailleurs est pratiquement nulle. On arrive ainsi à des outils assez spécifiques pour qu'on se permette de

faire de l'édition de génome dans des grands génomes tels que le génome humain.

2.2. Les outils

Aujourd'hui quatre grands outils sont à notre disposition pour cibler des séquences longues sur un ADN. Dans les années 1980, on a mis au point des *méganucléases* (Figure 9A), des enzymes qui viennent de la levure et reconnaissent entre douze et quarante nucléotides, ce qui est assez spécifique. Malheureusement, l'ingénierie des protéines nécessaire pour créer les séquences artificielles était difficile et demandait plusieurs mois de travail.

Ensuite sont arrivées les *protéines à doigts de zinc* (Figure 9B), un peu plus simples, puisque c'était un assemblage d'unités dont chacune reconnaît trois paires de bases. On pouvait assembler

ces unités pour aller cibler une séquence spécifique dans l'ADN. Malheureusement, les spécificités de ces unités sont interdépendantes, donc pas complètement prédictibles : la spécificité globale de la nucléase à doigts de zinc en pâtit donc.

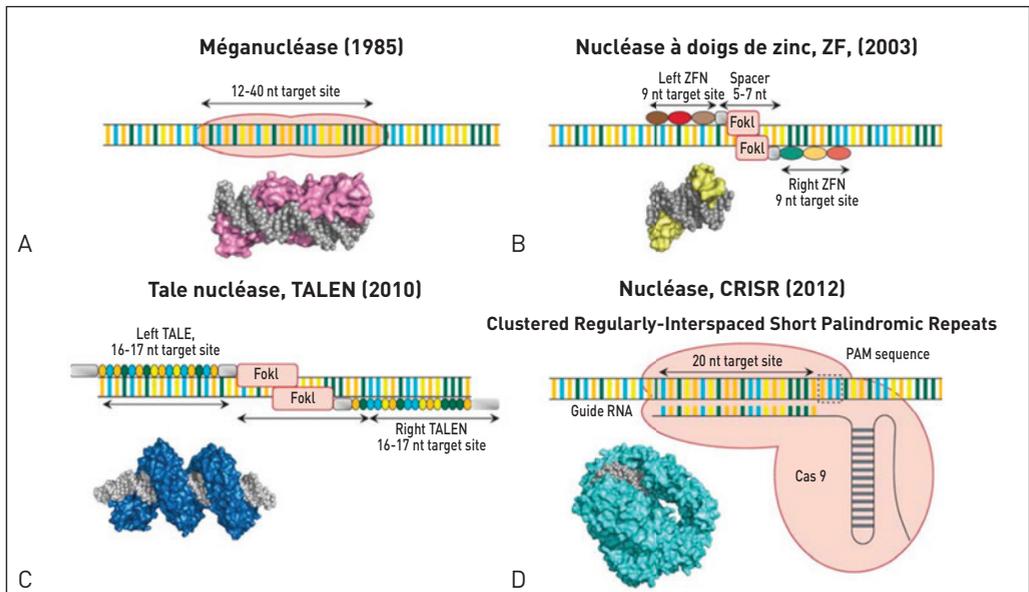
Dans les années 2010, sont arrivées les *TALEN* (Figure 9C), comme les *protéines à doigts de zinc*, ce sont des enzymes chimériques dans le sens où l'on associe une protéine qui va se lier à l'ADN avec un site catalytique⁴ qui, lui, a la propriété de couper l'ADN. Cette protéine qui se fixe à l'ADN est constituée d'une série de répétitions absolument identiques, à l'exception de deux acides aminés responsables de l'interaction avec un seul nucléotide. On définit alors un code où l'un de ces domaines

(en jaune), va reconnaître le G, le bleu va reconnaître le A, le vert va reconnaître le T. Il suffit d'assembler ces petites répétitions pour former une protéine qui va reconnaître la séquence ADN choisie. Il est relativement simple de créer ce genre de protéines et en une semaine on obtient une nucléase qui va couper exactement la séquence souhaitée. Très récemment est apparue la technique *CRISPR* (Figure 9D) (voir aussi *Chimie et biologie de synthèse, les applications*, EDP Sciences, 2019). Le principe est le même, la seule différence est que la fixation à l'ADN est commandée par un brin d'ARN. C'est l'enzyme Cas9, un complexe protéine-ARN, qui va se fixer à l'ADN génomique en fonction de la séquence d'ARN, ce qui est très pratique et rapide. Tous les laboratoires peuvent maintenant se dispenser de faire de l'ingénierie de protéines : on commande un brin d'ARN

Figure 9

De nombreuses expériences utilisant différentes nucléases ont été réalisées de 1985 à 2012.

4. Site catalytique : site particulier d'une enzyme où ont lieu les différentes interactions.



choisi, on le reçoit le lendemain, et l'on peut réaliser les expériences.

Tous ces outils, qui ne servent qu'à couper les brins d'ADN, constituent en fait seulement la toute première étape de l'édition de génome. Ensuite, c'est la cellule qui fait le reste.

2.3. Méthode

L'édition de génome du gène A peut être effectuée de plusieurs façons (Figure 10). On fait d'abord agir une nucléase pour couper le gène. La cellule met ensuite en jeu son système de réparation de son ADN pour pouvoir survivre et continuer à se multiplier. Éventuellement cette opération peut reconstituer la cible de la nucléase et celle-ci va continuer à couper. Une succession de coupures/religation⁵ s'installe.

Les procédés de réparation de l'ADN ne sont pas infaillibles,

5. Ligation : signifie, en biochimie, la fixation d'une enzyme coupée. Ici, on va donc avoir une ligation après une coupure induite dans l'ADN.

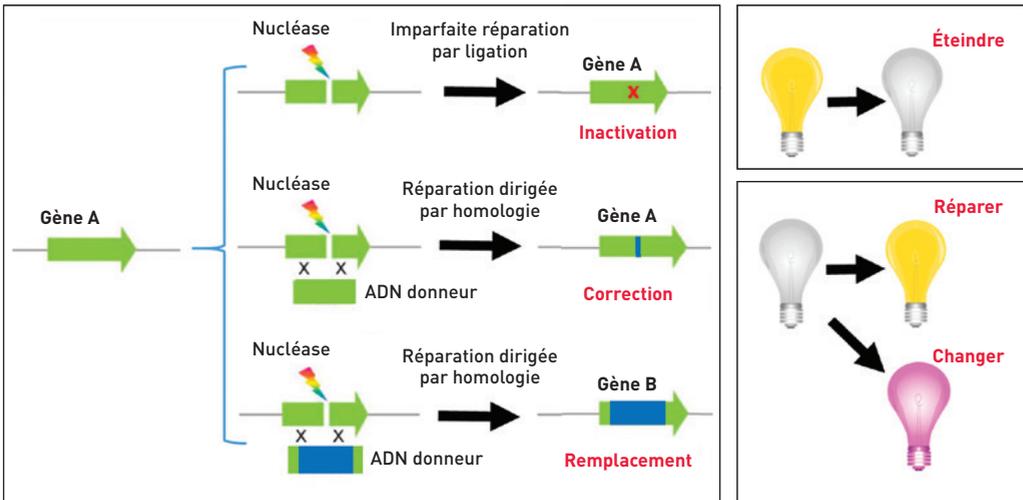
ils vont faire des erreurs. Au bout d'un certain temps on va avoir une petite délétion d'ADN ou une petite insertion d'ADN (des erreurs dans sa séquence), qui aboutissent à l'inactivation de ce gène. C'est ce que schématise la Figure 10 (à droite) avec l'image d'une ampoule : l'ampoule brille (jaune) et les nucléases viennent l'éteindre définitivement.

Maintenant, si en plus de la nucléase on amène un morceau d'ADN complémentaire à chaque côté de la coupure, des mécanismes de réparation de l'ADN vont faire que la cellule va utiliser cet ADN pour recopier et intégrer tout ce qu'il y a dans ce morceau d'ADN complémentaire. C'est grâce à ce mécanisme qu'on arrive maintenant à corriger des mutations. Une maladie génétique avec une mutation peut être corrigée avec ce genre d'approche.

On peut même aller beaucoup plus loin, et faire en sorte que cette portion d'ADN que l'on amène avec la nucléase soit un nouveau gène, ou même

Figure 10

Une nucléase, en agissant sur un gène, peut induire différents types de réparation : si la réparation est imparfaite (si elle se fait par ligation), cela mènera à l'inactivation du gène. Si la réparation se fait par homologie, le gène sera soit corrigé, soit remplacé. L'édition de génome est donc analogue à une ampoule qui s'éteint (en haut, synonyme de l'inactivation du gène) ou qui change de couleur (en bas, synonyme de la réparation ou de la correction du gène).



une série de gènes. Grâce à ce mécanisme où la cellule va recopier le morceau d'ADN ajouté, on arrive même à remplacer un gène A par un gène B.

C'est ce qui est schématisé avec notre ampoule qui ne marche plus : on peut la réparer – c'est la correction de mutation – ou on peut carrément lui faire changer de couleur – c'est le remplacement de gène.

3 Une révolution en devenir

3.1. Une multitude d'applications

Ces possibilités d'édition du génome ouvrent des perspectives d'applications phénoménales. Citons quelques exemples dans le domaine thérapeutique (**Figure 11**) :

- on peut créer des moustiques qui propagent les nucléases et rendent stérile leur population ;

ce contrôle de la population d'insectes est à l'étude pour la suppression du paludisme ;

- on peut aller couper des virus ou des voies d'entrée des virus dans les cellules ;

- on peut créer des modèles pour étudier les maladies comme le cancer ;

- on peut étudier finement, à la base près, la fonction d'un gène ;

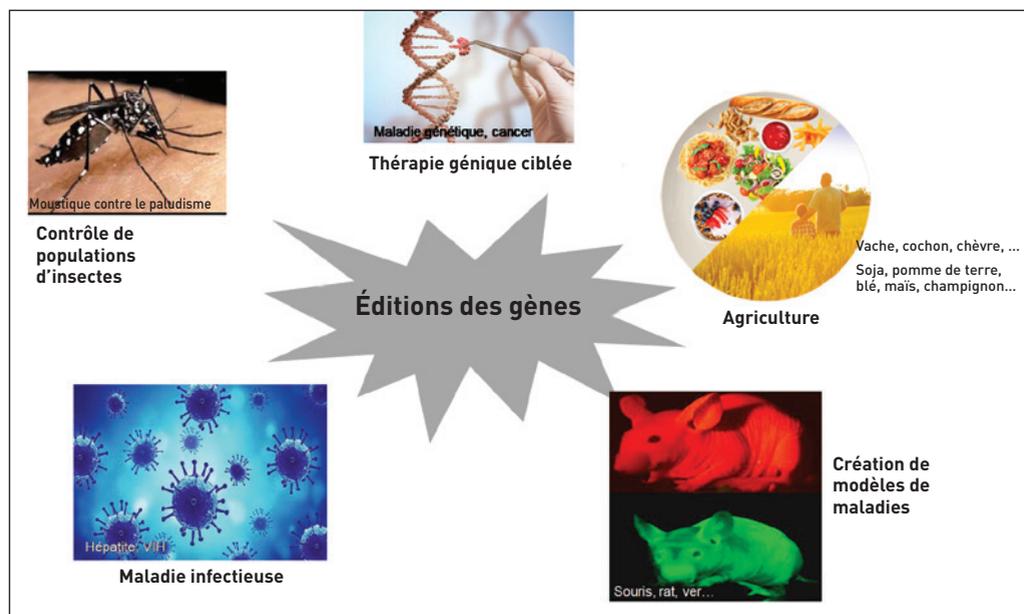
- ces techniques ont également des possibilités phénoménales en agriculture. On a aujourd'hui des sojas par exemple, qui produisent une huile très proche des caractéristiques de l'huile d'olive ;

- on sait faire des pommes de terre qui ne produisent pas d'acrylamide⁶ lorsqu'elles sont

6. Acrylamide : 2-propénamide (amide acrylique), un composé organique qui se forme lors de la cuisson à haute température de certains composés (notamment les aliments riches en glucides et en protéines).

Figure 11

L'édition de gènes est déjà une réalité : des applications sont possibles en élevage d'insectes, agriculture, maladies infectieuses, création de modèles de maladies sur des souris, des vers...



au froid et qui donc vont se conserver.

Les possibilités sont vastes : il n'y a pas une journée sans que cent publications n'apparaissent sur des applications de l'édition du génome en biologie.

Sans aller plus loin, donnons en revanche deux exemples de traitement par la thérapie génique : sur le sida et sur le lymphome.

Le xx^e siècle a été le siècle de la chimie, mais le xxi^e siècle verra l'avènement de tout ce qui est produit biologique, de ce qu'on appelle les « cellules-médicaments », mot qui implique la combinaison du « *genome editing* » et de la thérapie cellulaire (Figure 12). Pour les réaliser, on prend par exemple les cellules d'un patient d'une maladie génétique, on les met en culture, on réalise une édition de génome pour supprimer l'origine de la maladie (correction ou insertion de matériel génétique) ; on lui réinjecte ensuite les cellules modifiées (Figure 13).

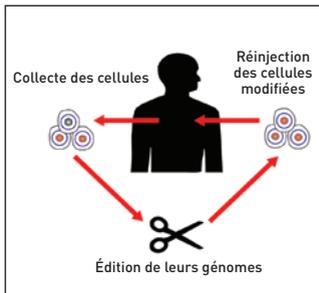


Figure 13

On suit un processus cyclique d'extraction des cellules, d'édition de leur génome et de réinjection des cellules modifiées dans l'organisme.

3.1. Exemple du sida

Un des premiers essais de thérapie génique a porté sur des applications antisida. Timothy Brown (Figure 14A, à gauche) avait le sida et aussi la malchance d'avoir une leucémie, pour laquelle il a été traité par une greffe de moelle. À leur grande surprise, les médecins se sont aperçus que le patient était également guéri de son sida.

Ils se sont aperçus que le donneur de moelle en fait avait une mutation dans un gène, le gène CCR5. La protéine codée par ce gène est la porte d'entrée du virus dans les lymphocytes T (cellules du système immunitaire). Cette mutation inhibait l'entrée du virus et le développement du sida. Leur démarche a été de généraliser : « *alors on va reproduire cela avec l'édition des génomes !* ». Matt Sharp (Figure 14B à droite) est le

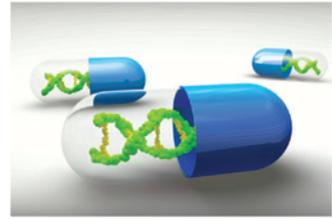


Figure 12

La médecine du xxi^e siècle va s'appuyer sur les connaissances acquises en édition de génome au xx^e siècle, et combiner l'édition de génome et la thérapie cellulaire, en créant des cellules-médicaments.

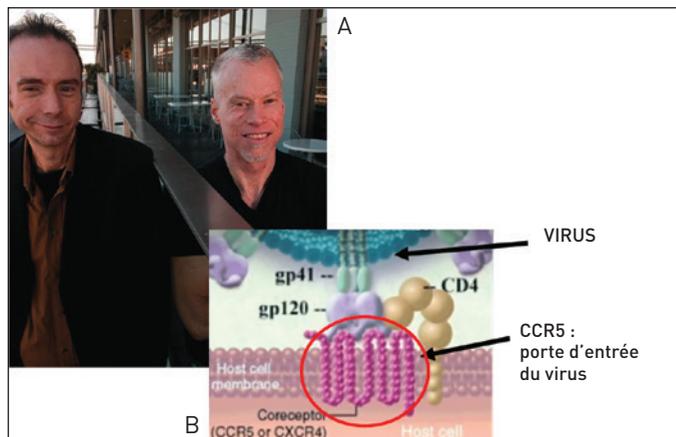
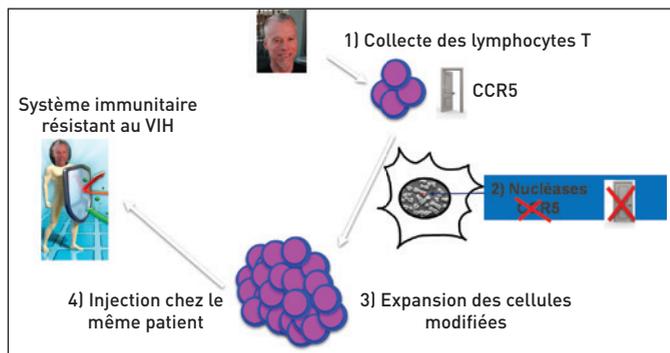


Figure 14

A) Timothy Brown (à gauche) a été la première personne guérie du sida ; Matt Sharp (à droite) est la personne ayant bénéficié du premier essai de thérapie génique anti-VIH. B) Le virus du sida entre dans l'organisme et le contamine via le gène CCR5, qui, pour Timothy Brown, avait subi une mutation.

Figure 15

Des lymphocytes T (cellules immunitaires) ont été collectés chez le patient, sur lesquelles on a fait agir une nucléase, empêchant l'atteinte par le VIH. Ces cellules ont été cultivées pendant quelques jours pour être réinfusées chez le patient, se retrouvant ainsi avec des lymphocytes T résistants à l'infection du virus HIV.



premier malade à avoir été traité de cette façon.

On a donc collecté des lymphocytes T de Matt Sharp, avec la porte grande ouverte pour l'entrée du virus du sida à l'intérieur (Figure 15). On a ensuite fait agir une nucléase sur ces cellules, de sorte à condamner l'entrée, on a cultivé pendant quelques jours les cellules, que l'on a ré-infusé chez le patient. Les lymphocytes T de ce patient étaient devenus résistants à l'infection du virus VIH.

3.2. Exemple du lymphome

Un autre exemple sur lequel nous travaillons au laboratoire concerne l'immunothérapie. Nous nous intéressons à l'aspect de l'immunothérapie qui consiste à travailler sur les lymphocytes T. Notre système immunitaire est une police qui surveille notre organisme pour savoir si tout va bien : pas d'infections, de virus, de bactéries ni de cellules hors contrôle. Ce sont les lymphocytes T qui effectuent ce travail de reconnaissance et destruction des cellules cancéreuses. Mais celles-ci ont développé des moyens pour paralyser ces lymphocytes T censés les attaquer.



Figure 16

Les cellules cancéreuses développent des mécanismes d'induction de tolérance face à l'organisme. L'immunothérapie consiste à abolir peu à peu cette tolérance : elle permet par exemple de faire disparaître, après douze jours, un gonflement de la peau.

Le patient représenté sur la Figure 16 était atteint d'un lymphome⁷ ; on lui a prélevé de ses lymphocytes T, on les a modifiés et réinjectés ; quelques temps après on voit que son lymphome a complètement disparu. L'immunothérapie ici consiste ainsi à rééduquer le système immunitaire, qui a été dérégulé par les cellules tumorales, et lui permettre de passer outre les signaux négatifs qu'elles lui envoient.

Pour mettre en œuvre cela, on part de cellules de donneurs sains. On isole les lymphocytes T et on y introduit un récepteur artificiel spécifique d'un antigène exprimé sur les tumeurs (Figure 17) afin que le lymphocyte T puisse s'y fixer et détruire la tumeur.

Le schéma de la Figure 17 ne fonctionne cependant pas car le lymphocyte T venant d'un donneur sain, en plus d'agir sur la tumeur, reconnaît l'ensemble des molécules de l'organisme du patient comme cellules étrangères et va les détruire, entraînant sa mort !

7. Lymphome : cancer du système lymphatique, qui est le principal élément du système immunitaire de l'organisme.

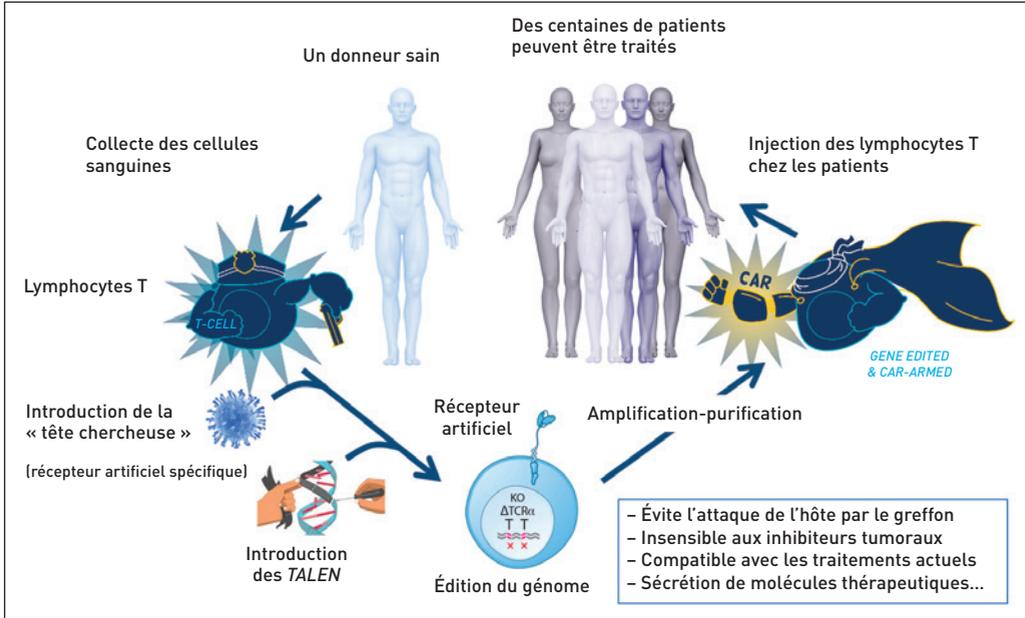


Figure 17

L'immunothérapie se met en pratique en collectant des cellules sanguines, ici des lymphocytes T, extraites d'un organisme sain, en introduisant des têtes chercheuses (ici TALEN), puis en les injectant à des patients malades après un processus d'amplification et de purification.

L'édition de génome permet de contourner cette difficulté fondamentale. Nous introduisons des *TALEN* pour inhiber par édition de génome les gènes responsables de cette attaque de l'autre par les lymphocytes T exogènes. On peut d'ailleurs en outre amener d'autres fonctionnalités à ces lymphocytes T.

L'édition de gène peut être utilisée pour modifier des récepteurs inhibiteurs ou pour rendre les cellules compatibles avec les traitements actuels. On peut même faire mieux ; on peut insérer des gènes, qui ne seront actifs que quand les lymphocytes T seront au contact de la tumeur, et commenceront à ce moment-là à sécréter des molécules à intérêt thérapeutique, qui

aideront les lymphocytes T à éradiquer la tumeur.

3.3. Exemple de la leucémie

Finissons par l'exemple du traitement de la leucémie, dont la preuve de principe a été établie en 2016. Deux jeunes enfants étaient atteints de leucémie ; tous les traitements avaient été tentés mais à chaque fois le cancer récidivait. Les parents, par l'intermédiaire de leur médecin, ont contacté Cellectis pour demander accès à cette nouvelle technologie qui n'avait jamais été testée chez un patient. En une seule dose, ces leucémies ont été vaincues.

Le traitement n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît car l'immunothérapie par les lymphocytes T peut induire des



Figure 18

Il est maintenant possible de traiter et guérir des patients de leucémie, même de jeunes enfants.

effets secondaires graves : au contact de la tumeur, le lymphocyte T non seulement va commencer à tuer la tumeur, mais aussi il va se multiplier, envoyant des signaux d'inflammation à tout l'organisme.

Chez cette petite patiente, nous n'avons pas utilisé ses propres lymphocytes T, mais des cellules provenant d'un donneur sain modifiées pour exprimer un récepteur spécifique de sa leucémie (Figure 18).

On a également retiré un récepteur situé à la surface des lymphocytes T pour éviter

l'attaque de tout son organisme, et pour que ces lymphocytes T soient vraiment spécifiques de la tumeur. Par ailleurs, on a retiré un autre gène, CD52, qui était cible d'un anticorps utilisé pour le traitement de ces leucémies. Une seule injection, en 2006, a suffi. Aujourd'hui cette petite fille est complètement guérie, sans aucun traitement en cours contre son cancer.

Ce n'est encore que le début de ces techniques, l'enfance de l'immunothérapie, l'enfance de l'édition du génome.

L'édition du génome : un avenir prometteur

Nous pouvons rêver sur les possibilités que l'édition du génome ouvre dans le domaine de la thérapie. Pour penser « biologie moderne » aujourd'hui, il faut intégrer la génomique, la métabolique, l'édition de gènes, la synthèse d'ADN.

Aujourd'hui on peut synthétiser des chromosomes entiers. Dans le futur, il est sûr que l'on pourra synthétiser des micro-organismes complètement *de novo*⁸, sans support.

Et on commence déjà à penser à faire revivre des espèces éteintes...

8. *De novo* : terme utilisé en biologie pour caractériser quelque chose de nouvellement synthétisé.