



HAL
open science

CRISPR/Cas9 en thérapie génique : étude de cas sur une maladie neurodégénérative de la rétine, autres applications et enjeux de son utilisation

Salomé Giovagnoli

► To cite this version:

Salomé Giovagnoli. CRISPR/Cas9 en thérapie génique : étude de cas sur une maladie neurodégénérative de la rétine, autres applications et enjeux de son utilisation. Sciences pharmaceutiques. 2024. dumas-04954238

HAL Id: dumas-04954238

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04954238v1>

Submitted on 18 Feb 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE D'EXERCICE
Pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 22/11/2024 par
Salomé GIOVAGNOLI

CRISPR/Cas9 en Thérapie Génique : Étude de cas sur
une maladie neurodégénérative de la rétine, autres
applications et enjeux de son utilisation

Directeur de thèse : **M. Éric DEBITON**

Jury

Président :	M. Damien BALESTRINO	Maître de conférences, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
Membres :	M. Éric BEYSSAC	Professeurs des universités, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
	Mme Marie-Ange CIVIALE	Maître de conférences, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
	M. Éric DEBITON	Maître de conférences, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
	Mme Juliette PULMAN	Post-Doctorat, Institut de la Vision Paris

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

UFR DE PHARMACIE

Année 2024

N°



Table des matières

Listes des tableaux et figures	4
Listes des abréviations	5
Introduction	7
1. Historique de la thérapie génique	9
2. CRISPR/Cas9	18
3. Étude de cas sur une maladie neurodégénérative de la rétine	25
3.1 Le terrain d'étude	25
3.1.1 La rétine et les photorécepteurs	25
3.1.2 La rétinite pigmentaire autosomique dominante	27
3.2 Les différents vecteurs pour CRISPR dans la rétine	28
3.2.1 Vecteurs viraux	28
3.2.2 Vecteurs non viraux	28
3.3 Objectif du projet	29
3.4 Résultats	30
3.4.1 Quantification des indels induites par CRISPR/Cas9	30
3.4.2 Analyse de la distribution de la Cas9 dans la rétine au cours du temps	33
3.4.3 Analyse du niveau de l'expression protéique	35
3.5 Conclusion et discussion de l'étude de cas	37
4. Autres applications	41
4.1 Applications en oncologie	42
4.2 Applications pour les maladies neurodégénératives	46
4.3 Applications en virologie	49
5. Enjeux de l'utilisation de CRISPR/Cas9	53
5.1 Cadre réglementaire	53
5.1.1 Définitions et réglementation européenne	53
5.1.2 Exigences techniques et évaluation des risques pour les MTI	54
5.1.3 Disparités et enjeux au niveau international	55
5.2 Enjeux éthiques liés à la modification génétique	59
Conclusion	63
Bibliographie	65
Annexe : Matériels et méthodes	72

Listes des tableaux et figures

Figures :

Figure 1 :	Structure et mécanisme de clivage de la Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> (spCas9)	20
Figure 2 :	Classification traditionnelle des systèmes CRISPR-Cas	21
Figure 3 :	Schéma de coupe transversale de l'œil humain et de l'œil de la souris	26
Figure 4 :	Schéma de la rétine et des différents types cellulaires	27
Figure 5 :	Analyse génomique et quantification du % d'indels	32
Figure 6 :	Imagerie confocale des coupes de rétines de 12µm à 3 et 7 jours post-injection sous-rétinienne chez la souris	34
Figure 7 :	Analyse du niveau d'expression protéique	36
Figure 8 :	Les segments externes de photorécepteurs	38
Figure 9 :	Niveau d'édition dans différentes parties du cerveau de souris par Cas9 RNP	39
Figure 10 :	Niveau d'édition dans le RPE de souris par Cas9 RNP	40
Figure 11 :	Vue d'ensemble d'autres applications de CRISPR/Cas9	41

Tableaux :

Tableau I :	Séquence des différents ARN guides utilisés	72
Tableau II :	Séquences des différentes amorces utilisées pour la PCR	74

Listes des abréviations

AAV : Virus adéno-associé
AD : Maladie d'Alzheimer
ADA : Adénosine désaminase
ADA-SCID : Déficit en adénosine désaminase - déficit immunitaire combiné sévère
ADNc : ADN codant
ADNccc : ADN covalent circulaire fermé
adRP : Rétinite pigmentaire autosomique dominante
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
APOE4 : Allèle E4 de l'apolipoprotéine
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde
ARM : Alliance pour la médecine régénérative
ARNcr : ARN associé à CRISPR
ARNg : ARN guide
ARNtracr : ARN CRISPR trans-activé
BACE-1 : Enzymes de clivage du site β de l'APP 1
BPC : Bonnes pratiques cliniques
BPF : Bonnes pratiques de fabrication
CAR-T : Cellules T à récepteur antigénique chimérique
Cas : Endonucléase associée à CRISPR
CAT : Comité des thérapies innovantes
CEUCO : Comité d'expertise des utilisations confinées d'organismes génétiquement modifiés
CHMP : Comité des médicaments à usage humain
CNP : Carcinome nasopharyngé
CNEPS : Commission nationale de l'expertise des produits de santé
COVID-19 : Maladie à coronavirus 19
CRISPR : Répétitions palindromiques courtes espacées de manière régulière
CTA : Applications d'essais cliniques
EFPIA : Fédération européenne des associations et industries pharmaceutiques
EMA : European medicines agency
ERA : Évaluation des risques environnementaux
EuropaBio : Association européenne des bioindustries
FDA : Food and drug administration
GCL : Couche des cellules ganglionnaires
GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
HAT : Milieu hypoxanthine-aminoptérine-thymidine
HBV : Virus de l'hépatite B
HGPRT : Enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HPV : Papillomavirus humain
HR : Recombinaison homologue
HTT : Huntingtine
IL : Interleukine
ILM : Membrane limitante interne
Indels : Insertions et/ou délétions
INL : Couche nucléaire interne

IPL : Couche plexiforme interne
KO : Knockout (inactivation)
LCTRs : Longues séries de répétitions en tandem
LPL : Lipoprotéine lipase
LTR : Séquences terminales longues répétées
MH : Maladie de Huntington
MHLW : Ministère de la Santé, du Travail et des Affaires sociales (Japon)
MHRA : Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (UK)
mHTT : Huntingtine mutée
MoMLV : Virus de la leucémie murine de Moloney
MTG : Médicaments de thérapie génique
MTI : Médicaments de thérapie innovante
MIT-C : Médicaments combinés de thérapie innovante
NASEM : National academies of sciences, engineering, and medicine (USA)
NC-ATRA : Nanocapsules All-Trans acide rétinoïque
NFL : Couche des fibres nerveuses
NGS : Séquençage de nouvelle génération
NHEJ : Jonction d'extrémités non homologues
NIH : National Institutes of Health (USA)
NLS : Séquences de signalisation nucléaire
NMPA : Administration nationale des produits médicaux (Chine)
OGM : Organisme génétiquement modifié
OLM : Membrane limitante externe
OMS : Organisation mondiale de la santé
ONL : Couche nucléaire externe
OPL : Couche plexiforme externe
OTCD : Déficience en ornithine transcarbamylase
PAM : Motif adjacent au protospacer
PCR : Amplification en chaîne par polymérase
PSEN : Préséniline
RNP : Ribonucléoprotéine
RPE : Épithélium pigmentaire rétinien
SCID-X1 : Déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X
SIV : Virus de l'immunodéficience simienne
SNIF : Format de résumé des renseignements sur la notification
spCas9 : Cas9 de *Streptococcus pyogenes*
SRSRs : Répétitions courtes espacées régulièrement
SV40 : Virus simien 40
TALEN : Nucléases effectrices de type activateur de transcription
TCR : Récepteurs des cellules T
TKOv3 : Toronto KnockOut Library
UE : Union européenne
VEGFA : Facteur de croissance endothélial vasculaire A
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
ZFN : Nucléases à doigt de zinc

Introduction

L'édition génique, en particulier avec la technologie CRISPR/Cas9 (Répétitions palindromiques courtes espacées de manière régulière/endonucléase associée à CRISPR 9), a révolutionné la biologie moléculaire et la médecine en ouvrant de nouvelles perspectives pour le traitement de nombreuses pathologies. Depuis les premières avancées de la thérapie génique dans les années 1960, l'idée de corriger des anomalies génétiques a évolué pour devenir un domaine de recherche florissant et prometteur. Parmi les outils émergents, CRISPR/Cas9, grâce à sa précision et sa flexibilité, s'est imposé comme une technologie de choix, offrant des possibilités d'intervention inédites sur le génome.

Dans cette thèse, nous aborderons tout d'abord l'historique de la thérapie génique, un champ en constante évolution, avant de nous concentrer sur CRISPR/Cas9 et son mécanisme.

Nous présenterons ensuite une étude de cas détaillant l'utilisation de cette technologie pour traiter une pathologie héréditaire spécifique, illustrant ainsi son potentiel thérapeutique.

Cette étude de cas est consacrée à l'application concrète de la technologie CRISPR/Cas9 dans le cadre du traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires, en particulier la rétinopathie pigmentaire autosomique dominante. S'appuyant sur des travaux scientifiques auxquels j'ai activement contribué, cette partie explore l'utilisation de CRISPR/Cas9 pour cibler et inactiver les mutations génétiques responsables de la production de protéines toxiques, entraînant la dégénérescence rétinienne.

Grâce à une approche sur des modèles murins, ce travail a permis de démontrer que l'édition du génome pouvait intervenir efficacement sur la rétine, ouvrant ainsi la voie à des stratégies thérapeutiques potentiellement curatives. Cette étude pratique illustre le potentiel de CRISPR/Cas9 dans un contexte thérapeutique spécifique, tout en soulignant les défis techniques à relever, notamment dans l'administration ciblée de cette thérapie génique.

En élargissant ce contexte, nous examinerons également ses autres applications dans des domaines tels que l'oncologie, le traitement des maladies neurodégénératives et la virologie, qui sont des secteurs où CRISPR/Cas9 a également montré des résultats prometteurs.

Enfin, nous explorerons les enjeux liés à cette technologie, en particulier les défis réglementaires et éthiques qu'elle soulève. Alors que la capacité de modifier le génome offre des solutions thérapeutiques révolutionnaires, elle entraîne aussi des questionnements profonds

sur les limites de l'intervention humaine dans la nature, la sécurité des manipulations génétiques et leur impact à long terme.

Ce panorama global nous permettra de mieux comprendre non seulement les potentialités de l'édition génique mais aussi les responsabilités qui en découlent dans le cadre de la médecine moderne.

1. Historique de la thérapie génique

La thérapie génique a beaucoup évolué depuis ses débuts dans les années 1960. Initialement conçue pour traiter les maladies génétiques par la modification de gènes, elle a connu des avancées majeures, souvent marquées par des percées scientifiques, des défis éthiques et des controverses. Son développement est étroitement lié aux progrès en biologie moléculaire et en virologie. Pour saisir son histoire, il faut examiner les événements clés, des premières expériences aux essais cliniques chez l'homme et aux défis du tournant du millénaire.

Premières découvertes et preuves de concept

En 1961, Kraus fut l'un des premiers à démontrer la possibilité d'ajouter de l'ADN étranger dans des cellules humaines. Dans cette expérience pionnière, un gène de l'hémoglobine A, extrait d'un patient drépanocytaire (qui produit de l'hémoglobine S), a été incubé avec des progéniteurs érythrocytaires. Après dix jours, une fraction d'hémoglobine normale a été observée, bien que la maladie n'ait pas été corrigée, car les différentes sous-chaînes d'hémoglobine se sont combinées pour former des hémoglobines anormales. Cette étude a marqué une étape cruciale, bien que limitée, dans la démonstration de la faisabilité de la thérapie génique (1).

L'année suivante, en 1962, Waclaw et Szybalski ont franchi une nouvelle étape en démontrant pour la première fois une modification génétique définitive et transmissible aux générations suivantes dans une lignée de cellules humaines. Inspirés par les découvertes sur la modification génomique des bactéries infectées par des virus (2), ils ont introduit de l'ADN étranger dans des cellules humaines, utilisant du simple ADN nu comme vecteur. Leur expérience portait sur des cellules déficientes en enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT), incapables de survivre dans un milieu hypoxanthine-aminoptérine-thymidine (HAT) sélectif. En introduisant l'ADN isolé de cellules saines dans ces cellules dépourvues d'HPRT, ils ont réussi à restaurer leur capacité à survivre. Cette expérience a non seulement validé la possibilité de transférer un gène, mais elle a également montré que ce gène est transmissible d'une génération à la suivante (3).

Émergence de la thérapie génique virale

Au cours des années 1960, la compréhension des mécanismes de réplication virale progressa grâce aux travaux d'André Lwoff, lauréat du prix Nobel de médecine en 1965 (4) (5). Ces avancées permirent de conceptualiser l'utilisation de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes. Les rétrovirus, les adénovirus et les virus associés aux adénovirus (AAV) émergèrent comme des outils potentiels pour la thérapie génique.

En 1970, la découverte de la transcriptase inverse par Temin et Mizutani, ainsi que par Baltimore, permit une avancée majeure dans le domaine. Cette enzyme, capable de synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN, a non seulement permis de mieux comprendre le mécanisme de réplication des rétrovirus, mais elle a également ouvert de nouvelles perspectives pour la thérapie génique, en particulier pour l'utilisation des rétrovirus comme vecteurs (6) (7). En 1972, l'équipe de Paul Berg a réalisé le premier clonage d'un gène, en insérant le génome viral du virus simien 40 (SV40) chez *Escherichia coli*. Cette expérience a marqué le début de l'ère de l'ADN recombinant, en permettant l'insertion fonctionnelle de nouveaux segments d'ADN dans des cellules procaryotes puis dans les cellules de mammifères. Cette avancée a été suivie en 1973 par les travaux de Stanley Cohen et Herbert Boyer, qui ont perfectionné la technique de clonage en introduisant un gène de résistance aux antibiotiques pour sélectionner les bactéries transformées, tout en utilisant des enzymes de restriction, marquant ainsi le début de la transgénèse (8) (9).

L'année 1974 a vu la création du premier animal transgénique par Rudolf Jaenisch et Beatrice Mintz, qui ont modifié un embryon de souris avec le vecteur SV40, montrant ainsi que les gènes acquis pouvaient être transmis d'une génération à l'autre (10).

Ces travaux ont ouvert la voie à l'utilisation des virus comme vecteurs pour le transfert de gènes dans les cellules humaines et animales. Par la suite, d'autres virus, tels que les adénovirus (11), et les AAV (12) ont été identifiés comme des candidats prometteurs pour la thérapie génique en raison de leur efficacité et de leur sécurité d'utilisation, dues à leur faible immunogénicité et à leur incapacité de réplication. Ces découvertes ont jeté les bases de nombreuses avancées dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Émergence de l'édition de gène

L'idée d'éditer les gènes a émergé dans les années 1970 avec la découverte des enzymes de restriction. Ces enzymes, d'origine bactérienne, permettent pour la première fois de couper de façon précise des séquences d'ADN à des sites spécifiques. Cette nouvelle technique facilite l'assemblage de plusieurs segments d'ADN sectionnés, mais elle est limitée par la taille des séquences pouvant être ciblées et par le manque de spécificité des sites de reconnaissance à l'échelle du génome (13).

Entre la fin des années 1990 et 2010, des méthodes plus avancées ont émergé tel que les nucléases à doigt de zinc (ZFN) et les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN).

Les ZFN sont des outils de modification génétique qui combinent deux composants principaux pour introduire des changements spécifiques dans l'ADN. Elles comprennent un domaine de liaison à l'ADN constitué de motifs protéiques appelés « doigts de zinc » et un domaine nucléase dérivé de l'enzyme de restriction FokI. Les doigts de zinc sont des unités répétitives capables de reconnaître des séquences d'ADN spécifiques, dont la longueur est généralement comprise entre 9 et 18 paires de bases. Chaque doigt de zinc se lie de manière spécifique à une partie de la séquence cible, permettant une reconnaissance précise. Le domaine nucléase, quant à lui, est responsable de la coupure de l'ADN ; il est dérivé de FokI, une enzyme qui crée des coupures double brin lorsqu'elle est dimérisée.

Les TALEN sont un autre type d'outil de modification génétique qui, comme les ZFN, utilisent le domaine nucléase FokI pour induire des coupures double brin dans l'ADN. Cependant, le domaine de liaison à l'ADN des TALEN est basé sur des effecteurs TALE dérivés de la bactérie *Xanthomonas*. Ces effecteurs TALE possèdent des répétitions de 33 à 35 acides aminés qui interagissent spécifiquement avec les paires de bases d'ADN grâce à des résidus variables dans chaque répétition. Cette structure répétitive permet une reconnaissance ciblée de séquences d'ADN particulières (14).

Le potentiel de l'édition génétique a connu un tournant révolutionnaire en 2012 avec la découverte par le Dr Emmanuelle Charpentier et le Dr Jennifer Doudna de la technologie CRISPR et de son ARN guide (ARNg) programmable. Cette avancée sera examinée en détail dans la section dédiée suivante (15).

Progrès dans les essais cliniques et premières controverses

En 1979, Cline et ses collègues modifièrent des cellules de moelle osseuse de souris en y injectant un gène de résistance au méthotrexate, montrant ainsi la faisabilité du transfert de gènes *ex vivo* (16). Cette expérience inspira Cline à tenter de corriger le gène de la bêta-globine chez des patients atteints de bêta-thalassémie en 1980. Cependant, ses essais furent menés sans autorisation et n'ont pas montré d'amélioration clinique. Cette expérience illégale mis en lumière la nécessité de la mise en place de régulations strictes par le NIH (National Intitute of Health, USA) concernant la thérapie génique. (17) (18)

Enfin, le début des années 1980 a été marqué par la reconnaissance du potentiel des virus comme vecteurs en thérapie génique. Les études pionnières de Temin, Scolnick et Weinberg démontrèrent la capacité des rétrovirus à intégrer des gènes thérapeutiques dans les cellules cibles, établissant ainsi les bases des premiers essais cliniques (19) (20) (21).

Essais cliniques chez l'Homme et premiers succès

Au cours des années 1990, la communauté scientifique a commencé à percevoir le potentiel immense de la thérapie génique pour traiter diverses maladies, bien que les résultats ne soient pas toujours à la hauteur des attentes initiales. Des études et essais ont été envisagés pour des maladies comme le cancer, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, et même le VIH. Cette période a été marquée par un enthousiasme croissant (4).

En 1990, Blaese conduisit le premier essai clinique de thérapie génique approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) sur deux enfants souffrant de déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID), une maladie génétique rare entraînant une immunodéficience sévère, et cette étude, publiée en 1995, demeure une référence importante pour les premières étapes de la thérapie génique humaine. L'ADA-SCID, caractérisée par une perte de fonction des lymphocytes T et B, expose les patients à des infections récurrentes et à des pathologies opportunistes, rendant la vie quotidienne extrêmement difficile pour les personnes atteintes. Le traitement consistait en une modification génétique *ex vivo* des lymphocytes T des patients pour introduire le gène fonctionnel de l'ADA (Adénosine désaminase), en utilisant un rétrovirus MoMLV (Virus de la leucémie murine de Moloney) comme vecteur. Bien que les résultats aient varié entre les patients, avec une efficacité de la réponse immunitaire différente, l'un des deux enfants a montré une amélioration temporaire notable de son état de santé, confirmée quatre ans

après le début de l'étude, soit deux ans après la dernière injection de cellules modifiées (22) (23).

Difficultés et controverses dans les années 1990 et 2000

En 1999, l'enthousiasme pour la thérapie génique a subi un arrêt brutal avec le décès tragique de Jesse Gelsinger, un jeune homme participant à un essai clinique de phase I dirigé par le Dr James Wilson. Cet essai visait à traiter des patients souffrant d'une déficience en ornithine transcarbamylase (OTCD), une maladie génétique liée à l'X qui entraîne une détérioration progressive des fonctions cognitives. Cet essai clinique visait à corriger l'OTCD par l'injection d'un adénovirus modifié.

Jesse Gelsinger a développé une réponse inflammatoire systémique aiguë, suivie d'une défaillance multiviscérale, entraînant son décès 98 heures après l'injection. Ce décès, le premier directement lié à un traitement de thérapie génique, a mis en lumière les dangers potentiels de l'utilisation de vecteurs viraux, même lorsque les études précliniques semblaient prometteuses. Les analyses post-mortem ont révélé des taux élevés d'interleukine 6 (IL-6) et IL-10, indiquant une réponse immunitaire innée exacerbée probablement due à une sensibilisation antérieure au type d'adénovirus utilisé (24) (25).

L'année 2000 a été marquée par un autre incident majeur dans le domaine de la thérapie génique, lorsque des cas de leucémie ont été observés chez des patients atteints de SCID-X1 (déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X), traités à l'Hôpital Necker-Enfants Malades à Paris. Cet essai avait initialement montré des résultats prometteurs en restaurant les fonctions immunitaires des patients. Cependant, il a entraîné des effets indésirables très graves causés par des intégrations du vecteur rétroviral près de proto-oncogènes, entraînant leur activation et le développement de leucémies (26) (27).

Premiers succès et reconnaissance mondiale

En octobre 2003, la Chine franchit une étape importante dans l'histoire de la thérapie génique et devint le premier pays à approuver la commercialisation de ce type de traitement par la NMPA (Administration Nationale des Produits Médicaux, Chine) (28).

Ce traitement, connu sous le nom de Gendicine, a été développé par la société Shenzhen SiBiono GenTech. Gendicine est conçu pour traiter le carcinome de la tête et du cou, une forme agressive de cancer, en utilisant un vecteur adénoviral recombinant portant le gène codant pour la protéine p53. Cette protéine, aussi connue sous le nom de « gardien du génome », joue un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire, notamment en induisant l'apoptose chez les cellules endommagées pour empêcher leur prolifération. Elle est mutée dans de nombreux cancers, permettant une croissance incontrôlée (29).

Après cinq ans d'essais cliniques, le seul effet secondaire observé fut une fièvre transitoire. Combiné avec la radiothérapie, ce traitement a permis de réduire de 64 % les tumeurs de stade avancé.

Ce succès marqua une étape importante, démontrant la viabilité commerciale de la thérapie génique et son potentiel à transformer la médecine.

En 2010, une avancée significative fut réalisée avec la guérison de la bêta-thalassémie par thérapie génique, marquant l'un des premiers succès de guérison d'une maladie génétique grâce à cette technologie. Cavazzana et al., dans son étude publiée dans Nature, a utilisé un lentivirus modifié pour introduire une version fonctionnelle du gène codant pour la bêta-globine dans les cellules souches hématopoïétiques des patients (30).

La bêta-thalassémie est une maladie génétique causée par des mutations dans le gène de la bêta-globine, entraînant une production insuffisante de globine et des besoins en transfusions sanguines fréquents. La thérapie génique a permis d'atteindre une rémission durable chez les patients, avec une amélioration notable chez ceux souffrant des formes les plus graves de la maladie. Après une ablation chimique de la moelle osseuse et la réinjection des cellules modifiées, tous les patients porteurs de la forme la plus commune ($\beta E/\beta 0$) ont cessé leurs transfusions, et trois des neuf patients atteints de la forme la plus grave ($\beta 0/\beta 0$) ont également pu arrêter les transfusions (31).

En 2011, une autre avancée importante a été réalisée avec l'approbation d'un essai de thérapie génique pour l'hémophilie B, dirigé par Nathwani et al. Ce traitement utilisait un vecteur AAV pour délivrer le gène du facteur IX, essentiel à la coagulation sanguine, dans le foie des patients (32).

L'étude a montré qu'une injection unique de ce vecteur AAV était efficace pour restaurer les niveaux d'expression du facteur IX et réduire les épisodes hémorragiques chez les patients atteints d'hémophilie B sévère. Les résultats ont révélé une augmentation stable des taux de

facteur IX et une diminution significative des saignements, permettant à quatre patients de cesser définitivement les injections et à deux autres de réduire considérablement leur fréquence d'injection, même des années après le traitement. Les effets secondaires étaient principalement une élévation transitoire des enzymes hépatiques, gérée avec des corticoïdes sans compromettre le traitement (33).

Première thérapie génique approuvée en Europe

En 2012, la thérapie génique a fait son entrée sur le marché européen avec l'approbation de Glybera® (alipogène tiparvovec) pour le traitement de la déficience en lipoprotéine lipase (LPL), aussi appelée hyperchylomicronémie familiale. Ce déficit en LPL est un trouble métabolique autosomique récessif rare qui se caractérise par la production d'une LPL non fonctionnelle, entraînant une accumulation de lipoprotéines riches en triglycérides dans le plasma. Cette hypertriglycéridémie sévère peut provoquer des pancréatites aiguës, se manifestant par des douleurs abdominales intenses (34). Développée par Amsterdam Molecular Therapeutics et Unique, cette thérapie utilise un vecteur AAV pour introduire le gène codant pour la lipoprotéine lipase dans les cellules musculaires, améliorant ainsi le métabolisme des triglycérides (35).

Malgré l'approbation par l'Agence européenne des médicaments (EMA) en juillet 2012, Glybera® a été retirée du marché en avril 2017 en raison du coût élevé du traitement et des difficultés à démontrer une persistance clinique significative de l'effet chez un nombre restreint de patients. La thérapie a montré une correction rapide des niveaux de triglycérides plasmatiques et une diminution des épisodes de pancréatite, mais les défis éthiques et réglementaires liés aux traitements pour maladies extrêmement rares ont limité son adoption.

En 2015, la thérapie génique a franchi une nouvelle étape avec l'approbation de la première thérapie génique oncologique, Imlygic® (talimogène laherparepvec), pour le traitement du mélanome avancé et métastatique non résecable. Développée par Amgen, cette thérapie utilise un herpes virus modifié pour cibler et détruire les cellules tumorales tout en stimulant la réponse immunitaire contre les tumeurs (36).

Imlygic® est un virus oncolytique qui se réplique spécifiquement dans les cellules tumorales, provoquant leur destruction et libérant le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et

de macrophages (GM-CSF) pour recruter des cellules immunitaires et améliorer la réponse anti-tumorale. Les résultats des essais cliniques de phase 3 ont montré une réduction des lésions tumorales dans 64 % des lésions traitées, avec une rémission complète dans 47 % des lésions traitées, tout en étant bien toléré.

Premier essai clinique avec CRISPR-Cas9

En 2016, un tournant majeur a été atteint avec le premier essai clinique utilisant la technologie CRISPR-Cas9 pour modifier, *ex vivo*, des cellules T chez des patients atteints de cancer. Ce projet, dirigé par le Dr Edward Stadtmauer à l'Université de Pennsylvanie, a été approuvé par le NIH en juin 2016. L'essai visait surtout à évaluer la sécurité et la faisabilité de la modification génétique des cellules T pour traiter des cancers avancés et réfractaires, comme le myélome multiple.

L'étude, publiée dans Science, a impliqué trois patients qui ont reçu des cellules T modifiées *ex vivo* avec CRISPR-Cas9 pour supprimer les gènes codant les récepteurs des cellules T (TCR) endogènes, tout en introduisant un TCR transgène spécifique de la reconnaissance des cellules tumorales (nommé NY-ESO-1) (37) (38).

En parallèle, le gène PD-1 a été supprimé pour améliorer la réponse immunitaire contre la tumeur. Les cellules modifiées ont été réinjectées aux patients qui ont montré une persistance des cellules T modifiées jusqu'à neuf mois et une réponse immunitaire minimale aux cellules modifiées. Bien que l'un des patients soit décédé en 2019 en raison de la progression de son myélome, les résultats ont démontré la faisabilité de l'édition génomique avec CRISPR appliquée en oncologie, avec une stabilisation de la maladie et une réduction des tumeurs chez les autres patients.

En 2020, un essai clinique révolutionnaire a été mené avec l'injection directe de CRISPR-Cas9 dans les yeux de patients atteints d'amaurose congénitale de Leber, une maladie dégénérative rétinienne causée par une mutation du gène CEP290. L'étude, dirigée par Pierce et al., a été publiée dans The New England Journal of Medicine (39).

L'essai a impliqué l'injection d'une seule dose de CRISPR-Cas9 directement dans l'œil le plus malade de douze patients adultes et deux enfants. L'objectif était de corriger une mutation spécifique dans l'intron 26 du gène CEP290. Les résultats principaux ont mis en évidence une sécurité du traitement, sans effets indésirables liés à la thérapie ou à la procédure. Parmi les

résultats notables, six patients ont montré une amélioration significative de leur qualité de vie en relation avec leur vision. Ce premier essai d'injection directe de CRISPR chez des patients a ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement des maladies génétiques avec des interventions directes et ciblées dans le génome.

En 2023, la thérapie génique utilisant la technologie CRISPR-Cas9 a franchi une nouvelle étape décisive avec l'obtention d'approbations réglementaires majeures. En novembre 2023, la MHRA (Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency) du Royaume-Uni a donné son feu vert, suivie en décembre par les autorités américaines (FDA) et européennes (EMA). Cette approbation a permis le lancement clinique de la thérapie génique CRISPR-Cas9 pour traiter la bêta-thalassémie, une maladie génétique grave (40).

Le traitement approuvé, Casgevy® (ou exagamglogène autotemcel), utilise CRISPR-Cas9 pour l'édition génomique *ex vivo* des cellules souches hématopoïétiques autologues. Ce procédé permet de corriger les anomalies génétiques directement dans les cellules du patient, offrant ainsi une alternative viable pour les patients atteints de ces maladies.

Casgevy® s'adresse aux patients de 12 ans et plus souffrant de bêta-thalassémie, une condition qui nécessite, dans les cas les plus graves, des transfusions sanguines régulières et pour laquelle la greffe de cellules souches est souvent compliquée en raison de l'absence de donneur HLA-compatible. En corrigeant les mutations génétiques responsables de la bêta-thalassémie, Casgevy® offre une solution thérapeutique prometteuse.

Les essais cliniques ont confirmé que Casgevy® est non seulement efficace, mais aussi sûr. Les résultats ont montré que ce traitement pouvait corriger les anomalies génétiques sans induire de cas de rejet de greffe, un enjeu crucial pour les traitements basés sur des cellules souches modifiées. Ces approbations et résultats marquent un tournant important dans la thérapie génique, offrant de nouvelles perspectives pour le traitement de maladies génétiques graves jusqu'alors difficiles à traiter par d'autres moyens.

L'histoire de la thérapie génique est marquée par des avancées scientifiques spectaculaires, des défis éthiques et des controverses, mais aussi par des succès qui ont transformé la médecine moderne. Malgré les obstacles, les progrès réalisés depuis les premières preuves de concept des années 1960 jusqu'aux approbations récentes montrent que la thérapie génique est devenue une réalité tangible, offrant de nouvelles perspectives pour le traitement des maladies génétiques et au-delà.

2. CRISPR/Cas9

La thérapie génique représente une avancée majeure en médecine moderne. Elle offre l'espoir de traiter des maladies jusque-là incurables en intervenant directement sur le matériel génétique. En insérant, supprimant ou modifiant des gènes dans les cellules, cette méthode cherche à corriger les anomalies à leur source, offrant ainsi des solutions potentielles pour de nombreuses maladies génétiques et même certaines pathologies acquises.

Une avancée très marquante dans ce domaine a été l'introduction de CRISPR-Cas9, un outil révolutionnaire d'édition du génome qui offre une précision, une rapidité et une efficacité inégalées. Contrairement aux techniques antérieures, CRISPR-Cas9 permet de cibler avec une grande précision des séquences d'ADN spécifiques, d'introduire des coupures et de corriger des mutations génétiques avec une exactitude jamais atteinte auparavant. Grâce à sa capacité à modifier des gènes avec une relative facilité, CRISPR-Cas9 ouvre la voie à un éventail d'applications thérapeutiques potentiellement illimitées. Ces applications s'étendent de la correction de mutations responsables de maladies génétiques rares à la modification de cellules immunitaires pour combattre des cancers récalcitrants, et même à l'éradication de réservoirs viraux dans le cadre d'infections chroniques.

CRISPR/Cas9 est un système qui permet de modifier précisément le code génétique, dérivé d'un mécanisme présent naturellement chez les bactéries et les archées, agissant comme un système immunitaire adaptatif.

La première apparition de CRISPR dans la littérature remonte à 1987.

Ishino et al. décrivent cet élément génomique, caractérisé par un motif répété séparé par des fragments d'ADN étranger chez *Escherichia coli*, sans en prédire la fonction biologique (41). En 1993 cet élément génomique est décrit chez les Archées avec une haute conservation de séquences (42). À ce jour, il n'a été observé chez aucun eucaryote (43).

En 2005 l'hypothèse finale de son rôle chez les bactéries et les archées est émise. Ces structures joueraient le rôle de système immunitaire par réponse immunitaire adaptative (44).

Au fil des ans ces séquences prennent différentes dénominations selon les chercheurs qui les étudient. En 1993 on les retrouve sous le nom de SRSRs pour répétitions courtes espacées régulièrement, puis en 2001 sous le nom LCTRs pour longues séries de répétitions en tandem (45).

C'est en 2002 qu'un nom unique est proposé par le Dr Jansen et son équipe : CRISPR pour « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » ou Répétitions palindromiques courtes espacées de manière régulière en français, un nom générique aujourd'hui accepté par la communauté de scientifiques travaillant dessus (46).

Cette dénomination regroupe toutes ses caractéristiques structurales.

Ces éléments génomiques sont composés de séquences rassemblées en groupement dans des régions intergéniques au sein d'une même région. Les éléments espacés, appelés « spacers », sont des courts fragments d'ADN d'origine virale ou plasmidique. Les spacers sont divisés par des petites répétitions palindromiques non conservées d'environ 30-40 paires de bases (47).

La découverte de son rôle émerge au milieu des années 2000. En 2007, une première expérience sur son mécanisme d'action est menée par le Dr Barrangou et son équipe sur *Streptococcus thermophilus* (48). L'acquisition de nouvelles séquences spacers dans le loci CRISPR a été mise en évidence après l'infection par un bactériophage. Cette expérience démontre le rôle de CRISPR comme système immunitaire à réponse adaptative. La bactérie utilise ce mécanisme pour insérer une séquence du phage dans les régions spacers de son génome et ainsi garder une trace de son infection et l'utiliser comme mémoire immunitaire.

La description de son mécanisme d'action et sa structure détaillée résulte de l'addition d'années de travaux par des équipes de recherche du monde entier dans les années 2000 et 2010. La compréhension des différents éléments la constituant est la clé permettant d'apprécier sa dynamique ainsi que les différentes applications possibles.

Le mécanisme d'action de CRISPR repose sur la transcription du loci CRISPR, qui donne d'une part la protéine Cas, qui porte l'activité enzymatique, et des séquences d'ARN régulatrices d'autre part.

Ces molécules se complexent pour former un ensemble fonctionnel capable de cibler une séquence d'ADN, par complémentarité, avec une très grande précision et de l'éditer en effectuant une coupure du double brin ciblé. Ce complexe est nommé ribonucléoprotéine.

La protéine Cas est une endonucléase, une enzyme capable de couper les liaisons phosphodiester au sein d'une molécule d'acide nucléique. Elle peut intervenir sur des

séquences ADN et ARN. La plus couramment utilisée pour l'édition de gène est la Cas de *Streptococcus pyogenes*, la spCas9, dû à son efficacité et spécificité (49).

Sa structure spéciale est composée de deux lobes ayant des propriétés fonctionnelles distinctes : un lobe de reconnaissance de la cible nommé REC, permettant de localiser précisément la séquence cible dans le génome ; et un lobe portant l'activité nucléase NUC qui contient les domaines enzymatiques capables de couper l'ADN. Il comprend deux domaines distincts HNH et RuvC, qui agissent ensemble pour créer la cassure double brins. HNH se lie au brin complémentaire de l'ARN guide (ARNg) et le coupe. RuvC est catalysé par HNH et est responsable de la coupure de l'autre brin (50) (49).

En 2008, une première séquence d'ARN est décrite : l'ARN associé à CRISPR (ARNcr). Il s'agit d'une petite molécule d'ARN, transcrite du loci CRISPR, responsable d'orienter la ribonucléoprotéine vers la cible (51). Elle est indispensable à l'activité endonucléase (52) car elle contient la séquence complémentaire de la séquence cible, indispensable pour reconnaître la séquence d'intérêt et de s'y lier. La séquence cible est reconnue de façon très spécifique, notamment par la présence du motif PAM (motif de reconnaissance du protospacer). Ce dernier est composé des trois premiers nucléotides de la séquence cible et est indispensable à la reconnaissance et à la coupure par la Cas (53) (Figure 1a).

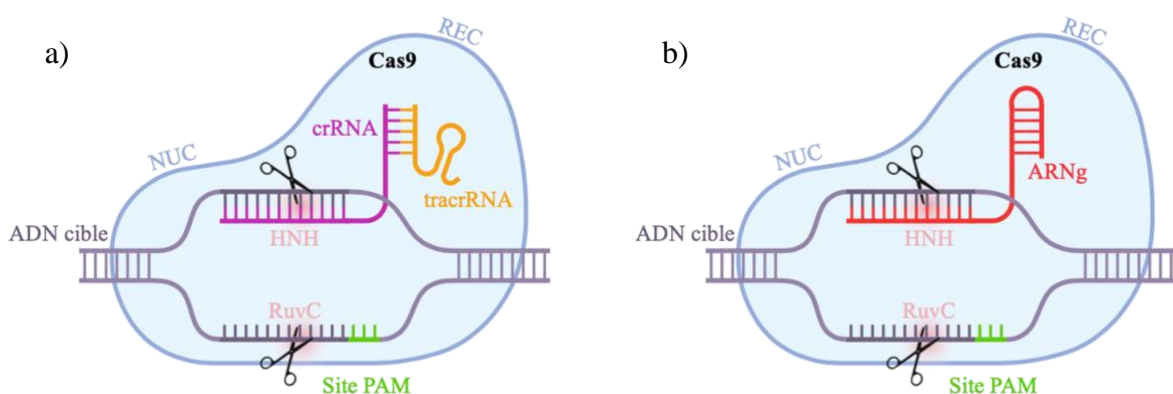


Figure 1 : Structure et mécanisme de clivage de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (spCas9).

a) Sa structure se divise en deux lobes fonctionnels distincts : le lobe de reconnaissance de la cible (REC), localise précisément la séquence cible dans le génome, et le lobe nucléase (NUC) contenant les domaines enzymatiques HNH et RuvC. Le domaine HNH coupe le brin

complémentaire à l'ARNcr, tandis que le domaine RuvC, assisté par HNH, se charge de couper l'autre brin, générant ainsi une cassure double brin dans l'ADN. Le motif PAM est indispensable au ciblage de la Cas sur la cible. b) L'ARNg remplace l'ARNcr et l'ARN CRISPR trans-activé (ARNtracr), pour la reconnaissance et la stabilisation de la Cas sur la cible.

Une abondance de Cas est retrouvée dans différentes espèces de bactéries et d'archées, et sont classées en plusieurs catégories selon leurs caractéristiques.

Elles sont réparties en deux classes, la classe 1 et 2 ; la classe 1 regroupe les sous types I, III et IV, eux-mêmes divisés en plusieurs sous types ; la classe 2 regroupe les sous types II, V et VI (47).

La différence majeure entre la classe 1 et 2 est la structure de la Cas. Les Cas de classe 1 sont un complexe de plusieurs protéines, contrairement à celles de classe 2 où les Cas sont des protéines uniques à multi-domaine. Les différentes Cas sont classées en sous-type selon leur molécule cible, ADN, ARN ou ADN et ARN. Cette propriété des Cas de classe 2, les rend les plus simples d'utilisation pour l'édition de gènes (43) (Figure 2).

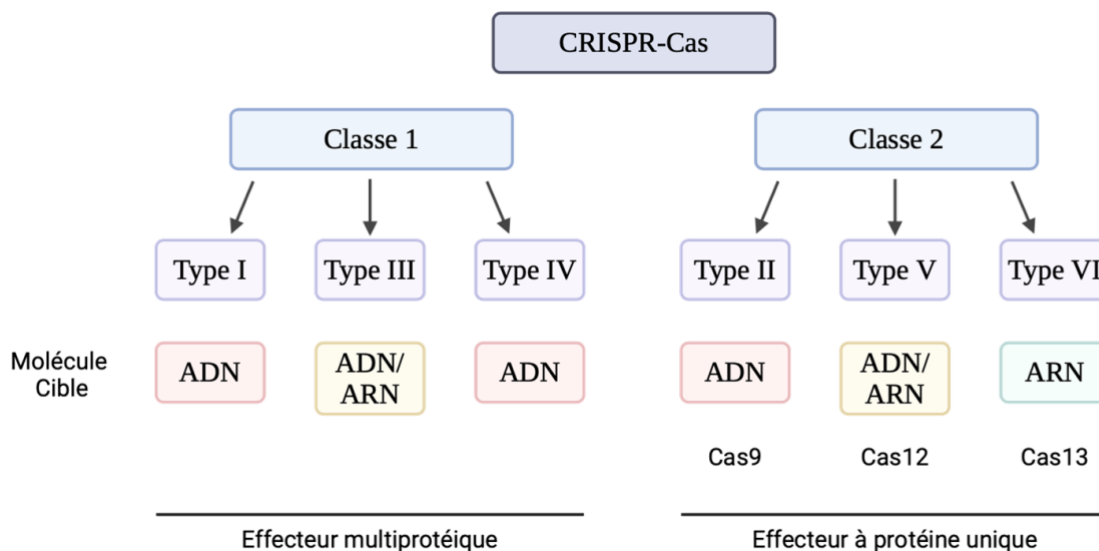


Figure 2 : Classification traditionnelle des systèmes CRISPR-Cas. *Adapté de (43)*

La dernière pièce du puzzle, l'ARNtracr, a été décrite quelques années plus tard : c'est une petite molécule d'ARN nécessaire à l'interaction entre l'ARNcr et la protéine Cas et stabilise le complexe (15).

Ces ARN et la séquence d'ADN ou ARN cible occupent l'espace chargé positivement à l'interface avec les deux lobes.

En 2012 les équipes d'Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna ont mis au point, *in vitro*, la combinaison de l'ARNcr et de l'ARNtracr formant une molécule d'ARN chimérique, l'ARNg (54) (*Figure 1b*).

La capacité de concevoir *in vitro* un seul ARNg simplifie l'application de CRISPR pour l'édition génétique dans les bactéries et les eucaryotes. Cette innovation révolutionne l'édition génétique en rendant cette technologie plus facile à utiliser. Leurs recherches seront récompensées par le prix Nobel de chimie en 2020 (15).

L'édition de gène et ses différentes applications reposent sur les deux types de mécanisme de réparation de l'ADN après la cassure double brin.

Pour la Cas9, on observe initialement la phase d'expression. Le locus CRISPR est transcrit, ce qui donne l'ARN messager codant pour la Cas, le pré-ARNcr et l'ARNtracr.

Le pré-ARNcr est traité par la Cas pour donner l'ARNcr mature. L'ARNcr et l'ARNtracr s'assemblent. Ce complexe se lie à la Cas pour former la ribonucléoprotéine, prête à cibler la séquence cible et la cliver en une cassure double brin (55).

À la suite de cette cassure double-brin, la cellule va réparer la séquence par différents mécanismes d'action afin de préserver l'intégrité de son génome. La réparation peut se faire par recombinaison homologue (HR) ou par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).

La réparation par HR, répare sans erreur la séquence en utilisant le chromosome homologue comme matrice. Ce mécanisme peut être en thérapie génique en introduisant une séquence choisie comme modèle, on va pouvoir cibler une séquence spécifique et la remplacer par une séquence choisie. Cette technique permet, par exemple, de corriger un gène mutant en le remplaçant par une version normale.

La réparation par NEHJ répare la séquence coupée sans modèle. La réparation se fait en ligaturant directement les extrémités coupées. Elle n'est pas précise et introduit des erreurs de différentes sortes comme un décalage du cadre de lecture ou un codon stop. Ces modifications

de la séquence sont regroupées sous le terme d'insertions et/ou délétions, ou « indels ». Ce mécanisme peut être utilisé volontairement pour inactiver un gène par exemple.

Ces deux mécanismes peuvent donc être utilisés de différentes façon en thérapie génique ; par exemple la HR peut être utilisée pour corriger une séquence et la NHEJ peut être utilisée pour inactiver un gène (56). Leur utilisation va dépendre de plusieurs facteurs tels que le type cellulaire et la phase du cycle cellulaire. La NHEJ est possible tout au long du cycle cellulaire sauf lors des phases G2 et S où la HR est plus observée (57).

Le système CRISPR/Cas se distingue des TALEN et des ZFN par sa simplicité et sa polyvalence. Contrairement aux TALEN et ZFN, qui exigent la création complexe de protéines spécifiques pour chaque cible, CRISPR utilise un seul ARNg pour cibler des séquences d'ADN précises, ce qui simplifie sa conception et sa modification. En termes d'efficacité de ciblage, CRISPR est généralement plus performant, offrant des coupures précises grâce à la spécificité de l'ARNg, tandis que les TALEN et ZFN peuvent être moins efficaces en raison des défis associés à leur conception complexe.

Le coût de CRISPR est également inférieur, car le processus de conception et de mise en œuvre est plus simple, contrairement aux TALEN et ZFN dont les frais élevés résultent de la création et de la production complexes des protéines. La flexibilité de CRISPR permet des modifications génétiques multiples simultanées, alors que les TALEN et ZFN sont moins adaptables à ces changements en raison des difficultés liées à la création de protéines spécifiques. Enfin, CRISPR permet une mise en œuvre rapide en laboratoire grâce à la simplicité de l'ARNg, tandis que les TALEN et ZFN nécessitent plus de temps en raison des nombreuses étapes de production des protéines (58).

Bien que CRISPR-Cas9 se distingue par sa grande spécificité ainsi que sa facilité de conception et d'utilisation, en faisant une technologie de pointe dans l'édition du génome, il est rare mais possible que des mésappariements surviennent, entraînant des cassures double brins dans d'autres séquences que la séquence cible. On parle d'effets hors cible ou off-target.

Les effets off-target de CRISPR-Cas9 se réfèrent aux clivages involontaires de l'ADN à des sites autres que celui visé par l'édition génomique. Ces effets surviennent lorsque le complexe Cas9, guidé par un ARNg, se lie à des séquences d'ADN qui ressemblent, mais ne correspondent pas exactement, à la séquence cible. Cela est dû à la capacité du système CRISPR-Cas9 à tolérer jusqu'à plusieurs mésappariements entre l'ARNg et l'ADN cible, en particulier dans les régions éloignées de la séquence adjacente au motif PAM. En général, des mésappariements de 1 à 6

paires de bases dans une séquence de 20 paires de bases peuvent suffire pour que Cas9 effectue un clivage hors cible (59) (60).

Les effets off-target peuvent entraîner des conséquences indésirables, telles que des réarrangements chromosomiques et des mutations involontaires, compromettant ainsi la stabilité génomique et la fonction des gènes. Ces événements sont particulièrement préoccupants dans le contexte des applications thérapeutiques, où de telles altérations peuvent mener à des effets secondaires graves ou à une perte d'efficacité du traitement.

Pour évaluer ces effets hors cible, diverses méthodes ont été développées. Tout d'abord la prédiction *in silico* dont la première étape consiste à utiliser des algorithmes bio-informatiques pour prédire les sites potentiels hors cible. Ces prédictions reposent sur l'identification de séquences génomiques qui sont similaires, mais non identiques, à la séquence cible. Ces sites prédits sont ensuite validés par des techniques expérimentales comme la PCR (Amplification en chaîne par polymérase) et le séquençage des produits PCR pour détecter les clivages hors cible.

Différentes méthodes *in vitro*, utilisant le séquençage du génome après l'application de CRISPR, sont couramment employées pour détecter les cassures double brin. Parmi celles-ci, on retrouve par exemple le GUIDE-Seq, le CIRCLE-Seq et le SITE-Seq. Ces méthodes peuvent être réalisées soit en traitant directement les cellules en culture avec CRISPR puis en séquençant leur ADN, soit en extrayant d'abord l'ADN, en le traitant avec CRISPR, puis en le séquençant. L'identification précise et la quantification des effets off-target sont essentielles pour comprendre les risques associés à l'utilisation de CRISPR/Cas9, notamment pour développer des versions du système ayant une spécificité accrue, minimisant ainsi les clivages hors cible et leurs conséquences potentiellement délétères (61).

3. Étude de cas sur une maladie neurodégénérative de la rétine

Sur la base du mécanisme et des avancées de la technologie CRISPR/Cas9, il est crucial de se tourner vers ses applications cliniques concrètes pour apprécier pleinement son potentiel thérapeutique. En tant qu'outil d'édition du génome, CRISPR/Cas9 permet une manipulation précise des séquences d'ADN, ouvrant la voie à des traitements innovants pour un large éventail de maladies génétiques.

L'une des utilisations émergentes de CRISPR/Cas9 est le « gene silencing », ou inactivation de gènes ; cette technique offre un vaste champ d'implications thérapeutiques, allant de l'étude des fonctions génétiques à l'élaboration de traitements innovants pour diverses maladies. En désactivant sélectivement des gènes responsables de dysfonctionnements ou de pathologies, le « gene silencing » ouvre la voie à des interventions précises pour des maladies causées par des mutations toxiques ou des expressions géniques incontrôlées. Mon étude de cas s'inscrit précisément dans ce cadre, en explorant l'utilisation de CRISPR/Cas9 pour inactiver un gène défectueux impliqué dans la rétinite pigmentaire, une dégénérescence rétinienne héréditaire, illustrant ainsi l'une des nombreuses applications potentielles de cette technologie.

3.1 Le terrain d'étude

3.1.1 La rétine et les photorécepteurs

La rétine est l'un des tissus essentiels dans le mécanisme de la vision. Située dans la partie postérieure de l'œil, elle est le lieu de la transformation de l'information lumineuse en information électrique transmise au cerveau (*Figure 3*).

La rétine est organisée en couches de différents types cellulaires ; de l'intérieur à l'extérieure, elle est composée des cellules ganglionnaires, cellules amacrines, cellules horizontales et photorécepteurs (*Figure 4*). Ces différentes couches de cellules représentent la rétine neurale. Cette dernière repose sur un épithélium pigmentaire (RPE), qui forme la rétine pigmentaire. L'ensemble formé par la rétine neurale et pigmentaire forme la rétine. Les photorécepteurs, quant à eux, sont situés dans la couche la plus postérieure de la rétine.

La lumière traverse les différentes couches de la rétine pour atteindre les segments externes des photorécepteurs, c'est à ce niveau que le signal lumineux va être traduit en signal électrique. Ce signal va ensuite être transmis à travers les différentes cellules de la rétine de l'extérieur vers l'intérieur, avant d'être acheminé au cortex cérébral par le nerf optique. Il existe deux

types de photorécepteurs : les cônes et les bâtonnets. Leur répartition et fonction spécifique leur permettent d'être complémentaires et d'assurer la qualité et la précision de la vision.

Les bâtonnets, présents en plus grande quantité en périphérie, sont responsables de la vision périphérique et de la vision de nuit. Les cônes sont présents en plus grande quantité au centre de la rétine et sont responsables de la vision centrale et de la vision plus précise des détails.

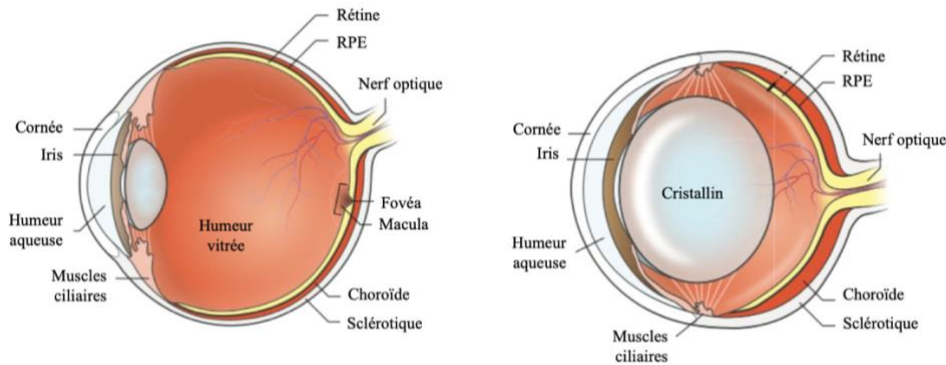


Figure 3 : Schéma de coupe transversale de l'œil humain et de l'œil de la souris.

La lumière traverse la cornée puis est focalisée par le cristallin sur la rétine dans la partie postérieure de l'œil. La partie centrale de la rétine humaine, appelée macula, a une densité plus élevée en cônes que le reste de la rétine avec une concentration maximale au niveau de la fovéa. Cette région permet une vision de haute résolution. La partie périphérique est plus dense en bâtonnets. La rétine de souris ne possède pas de fovéa ni de macula distincte. L'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) sépare la circulation sanguine choroïdienne des photorécepteurs et joue un rôle important dans la fonction visuelle. Le cristallin est proportionnellement plus grand chez la souris que chez l'homme en fonction de la taille de l'œil. *Adapté de (62)*

dégénérescence des photorécepteurs. C'est ce gène que nous ciblons dans le cadre de notre étude de cas.

3.2 Les différents vecteurs pour CRISPR dans la rétine

3.2.1 Vecteurs viraux

L'utilisation de CRISPR/Cas9 dans la rétine a pour enjeu majeur sa vectorisation ; en effet, la rétine est un tissu très dense. Les vecteurs les plus communément utilisés pour la rétine sont les AAV, ils vont amener CRISPR/Cas9 aux photorécepteurs sous la forme de son ADN codant (ADNc). Ce vecteur est celui qui a montré, à ce jour, la meilleure efficacité dans la rétine mais ne reste pas sans limites et sans risques. La limite principale est la faible capacité d'encapsulation de l'AAV, qui est de 4,7kb. L'ADNc de la Cas9 du *Streptococcus pyogenes* est de 4,2kb. Cette faible marge laissée pour les éléments régulateurs, rend difficile son empaquetage (66). Le choix d'un promoteur tissu spécifique aux photorécepteurs est donc d'autant plus restreint.

D'autres compromis sont à faire, par exemple, concernant le choix de la queue polyA en fonction de la taille restante. Les risques liés à l'utilisation d'AAV sont la conséquence de l'expression au long terme de CRISPR/Cas9 dans les cellules transduites. Elle peut entraîner potentiellement plus d'effets hors cible et d'immunogénicité (67) (68). Les effets hors cible sont des cassures double-brin sur des sites différents de la séquence ciblée, qui peuvent représenter un danger selon leur localisation. De plus, l'insertion du génome viral dans le génome de l'hôte peut être notamment facilité par la cassure double-brin (69) (70).

Le choix d'autres vecteurs viraux, tels que les adénovirus et lentivirus, n'est pas possible pour cibler la rétine neurale du fait de leur plus grande taille et de la densité cellulaire de la rétine qui rend mauvais le niveau de transduction (71). Ils présentent également d'autres inconvénients, comme une plus forte immunogénicité pour les adénovirus et une insertion plus importante pour les lentivirus.

3.2.2 Vecteurs non viraux

Dans le but de prévenir les risques liés à une expression au long terme de la Cas9, il est préférable d'exposer la Cas9 de façon transitoire par son utilisation sous forme protéique directement complexée à son ARNg. La protéine Cas9 liée à son ARNg est appelée « Cas9 RNP » (pour ribonucléoprotéine).

L'utilisation de vecteur lipidique pour délivrer la Cas9 RNP a déjà été décrite dans la littérature pour cibler le RPE (72) (73). Cependant, pour cibler la rétine neurale, cette méthode de vectorisation a déjà été testée dans de précédents travaux de notre équipe mais n'a montré qu'une faible efficacité.

Enfin, dans l'étude menée par Staahl et al. de 2017, il a été montré que l'utilisation de Cas9 RNP sans aucun vecteur était possible dans le tissu cérébral. Ils ont démontré qu'une activité d'édition est possible sans vecteur, en ajoutant des séquences de signalisation nucléaire (NLS) (74). C'est cette méthode que nous testons dans notre étude, du fait d'une similarité relative entre le tissu cérébral et la rétine neurale.

3.3 Objectif du projet

L'adRP est une maladie génétique provoquant la perte progressive de la vision et est actuellement incurable. Dans les cas où une mutation de RHO est responsable, cela entraîne la production d'une rhodopsine toxique, responsable de la dégénérescence des photorécepteurs. Avec plus de 150 mutations décrites, l'inactivation mutation-indépendante de RHO par un outil d'édition de gène tel que CRISPR/Cas9, associé à une supplémentation en gène RHO sain, pourrait offrir une solution de thérapie génique pour le traitement de cette maladie.

Actuellement, les vecteurs viraux sont les plus utilisés pour le transfert des outils d'édition de gène tels que CRISPR/Cas9. Cependant, ils présentent certaines limites quant à une application clinique. En effet, les AAV, adénovirus et lentivirus, entraînent une expression au long terme de la Cas9 dans les cellules, responsable d'immunogénicité et de potentiels effets hors cible qui sont amplifiés par leur capacité relative d'insertion du génome de la Cas9 dans le génome de l'hôte. L'expression transitoire d'outils d'édition de gène tels que les RNP de Cas9 pourrait constituer une alternative plus sûre pour réduire la dégénérescence des photorécepteurs dans la rétinite pigmentaire.

L'objectif principal de notre étude est d'étudier la faisabilité du transfert de RNP de Cas9 sans vecteur dans la rétine neurale, plus précisément aux photorécepteurs. Kim et al. (2017) et Holmgaard et al. (2020) ont démontré la faisabilité de cette méthode dans le RPE, tissu de soutien à la rétine neurale, mais pas à la rétine neurale elle-même. Les RNP de Cas9 sont administrées localement à la rétine par injection sous-rétinienne. Dans leur étude, ils ciblent l'expression du gène VEGFA (Facteur de croissance endothélial vasculaire A) dans le

RPE ; sa surexpression est un des mécanismes en cause dans certaines pathologies dégénératives de la rétine telle que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (72) (73).

Notre étude est la preuve de concept qu'une telle stratégie est efficace pour cibler des gènes exprimés par les photorécepteurs. Afin d'approfondir notre compréhension des enjeux de cette stratégie, dans des travaux précédents, notre équipe a décidé de comparer le niveau d'édition atteignable, dans des travaux précédents, parmi trois gènes hautement exprimés par les photorécepteurs : PDE6b, SAG et RHO (75). Le gène qui a montré le plus haut taux d'indels est SAG, le gène de la S-Arrestine. Nous ciblons donc ici SAG, qui sert ici uniquement d'exemple pour faire la preuve de concept que l'utilisation de RNP de Cas9 sans vecteur peut éditer de manière sûre et efficace les photorécepteurs. La mesure du niveau d'édition sera évaluée par le taux d'indels générés dans SAG et l'effet de cette inactivation sur l'expression protéique de SAG. Le taux d'indels sera mesuré dans la rétine neurale et le RPE en ciblant SAG et VEGFA, qui sera notre référence d'après les études de Kim et al. (2017) et Holmgaard et al. (2020). Nous surveillerons également la distribution de la Cas9 dans la rétine au cours du temps. Un transfert transitoire sûr et efficace de Cas9 permettrait ensuite son application en thérapie génique pour le traitement de nombreuses maladies dominantes de la rétine, comme par exemple l'adRP due à des mutations de RHO.

3.4 Résultats

3.4.1 Quantification des indels induites par CRISPR/Cas9

L'extraction des rétines et RPE est réalisée 7 jours ou 30 jours après injection afin de quantifier le taux d'indels et de comparer le niveau d'édition après une semaine et un mois.

Après extraction, l'ADN des rétines et RPE est amplifié par PCR. Cette amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (*Figure 5A, 5B, 5C et 5D*). On observe pour toutes les conditions la présence de l'amplicon, de 260pb, avec des bandes d'intensité similaire. Après purification du produit de PCR, les échantillons ont été envoyés au Centre de recherche sur l'ADN du Massachusetts General Hospital pour le séquençage NGS (Séquençage de nouvelle génération).

Les fichiers .fastq récupérés sont importés dans CRISPResso2, un outil en ligne d'analyse d'édition de gène, pour quantifier le taux d'indels généré par la Cas9 (*Figure 5E*). Les insertions et délétions autour du site de coupure sont quantifiées. Nous avons pris l'exemple d'un échantillon de rétine ciblé avec *Sag* à 7J. Sur l'exemple, parmi les mutations générées dans cet

échantillon, on retrouve : deux délétions d'une paire différente de bases, l'insertion d'une guanine et une délétion de 4 paires de bases. La substitution observée n'est pas comptabilisée dans le pourcentage d'indels. Elle se situe à une trop longue distance du site de clivage pour être dûe à la Cas9 et provient probablement d'une erreur de la polymérase lors de la PCR ou une erreur lors du séquençage.

A 7 jours, le taux d'édition moyen dans la rétine avec l'ARNg ciblant *Sag* est de 6,26% et de 0,60% avec l'ARNg ciblant *Vegfa*. (Figure 5F) On observe une grande variabilité inter-échantillon avec un minimum à 1,66% et un maximum à 14,88% pour *Sag* dans la rétine.

A 7 jours, le taux d'édition moyen dans le RPE, avec l'ARNg ciblant *Sag* est de 1,14% et de 2,42% avec l'ARNg ciblant *Vegfa* (Figure 5G).

Ensuite, les taux d'édition sont comparés, à 7 et 30 jours, dans la rétine (Figure 5G) et le RPE (Figure 5H). Le taux d'édition dans la rétine à 7 jours comparé à 30 jours ne montre pas de différence significative pour les deux ARNg.

Le taux d'édition est significativement plus élevé pour *Sag* que pour *Vegfa* dans la rétine ($p < 0,005$). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que *Vegfa* n'est pas exprimé dans les photorécepteurs. A l'inverse, le taux d'édition, dans le RPE, est significativement plus élevé pour *Vegfa* que pour *Sag* ($p < 0,1$). Cette différence pourrait s'expliquer par la forte expression de *Vegfa* dans le RPE. La décompaction de l'ADN nécessaire à l'expression d'un gène pourrait faciliter les interactions de la Cas9 avec l'ADN.

Le taux d'édition dans le RPE à 7 jours comparé à 30 jours ne montre pas de différence significative avec l'ARNg ciblant *Sag*.

Nous avons montré ici que les RNP de Cas9 sans vecteur sont capable de générer de l'édition de gènes dans le neurorétine jusqu'à 14,88% pour *Sag*. De plus, nous avons montré que le choix du gène ciblé et de l'ARNg avait une grande importance sur l'efficacité d'édition.

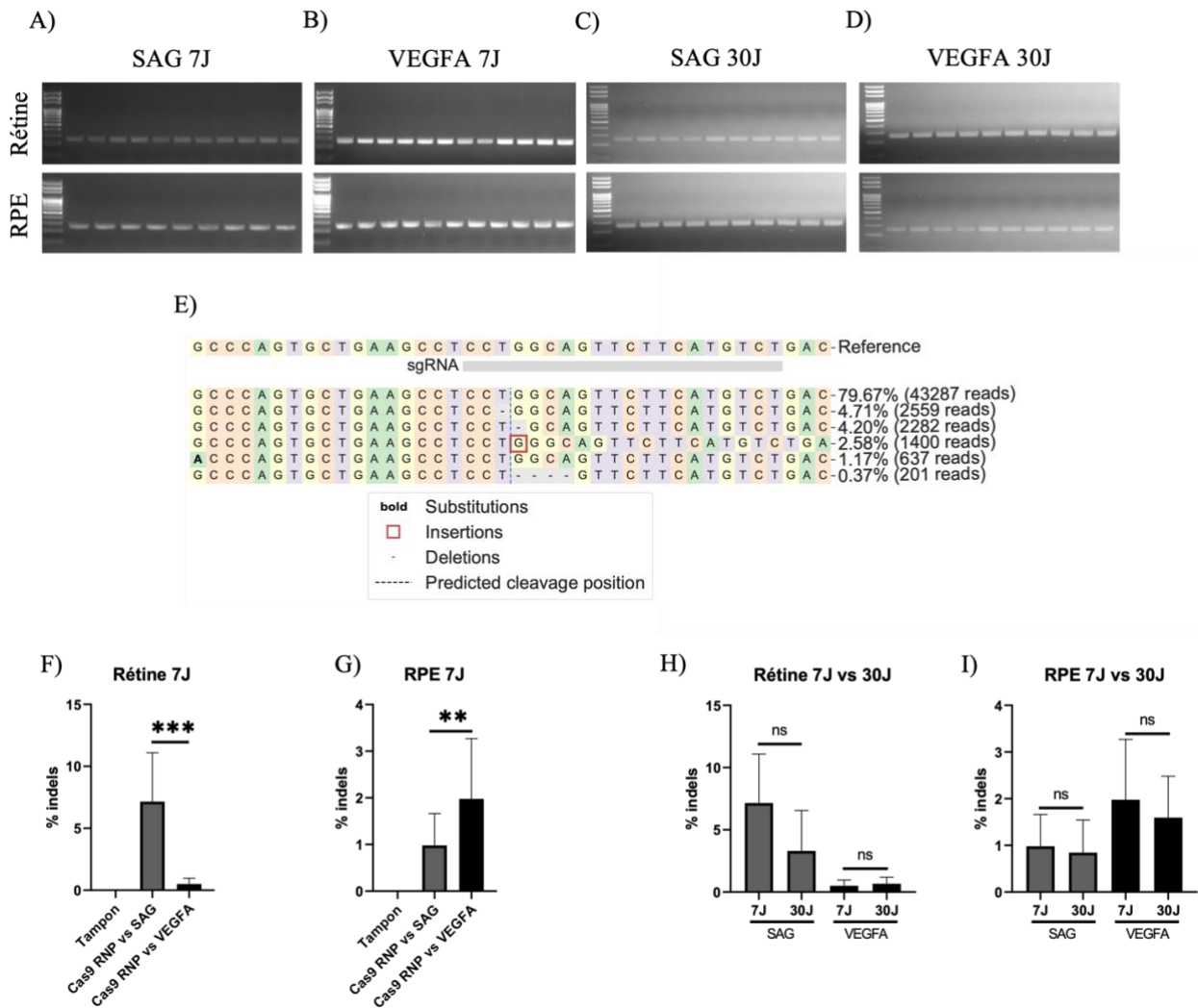


Figure 5 : Analyse génomique et quantification du % d'indels.

A-D) Vérification de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à partir de l'ADN extrait des rétines (en haut) et du RPE (en bas) ; A) Amplification de *Sag* 7 jours après injection des Cas9 RNP ciblant *Sag*. B) Amplification de *Vegfa*, 7 jours après injection des Cas9 RNP ciblant *Vegfa*. C) Amplification de *Sag* 30 jours après injection des Cas9 RNP ciblant *Sag*. D) Amplification de *Vegfa*, 30 jours après injection des Cas9 RNP ciblant *Vegfa*. E) Exemple de tableau résumé des mutations par CRISPResso2 pour un échantillon de rétine 7 jours après injection avec RNP ciblant *Sag*. F-G) Le contrôle négatif correspond à l'injection du tampon (HEPES/KCl) sans RNP. F) Comparaison du % d'indels dans la rétine à 7 jours pour *Sag* et *Vegfa*. G) Comparaison du % d'indels dans le RPE à 7 jours pour *Sag* et *VEGFA*. H) Comparaison du taux d'édition dans la rétine à 7 jours et 30 jours. I) Comparaison du taux d'édition dans le RPE à 7 jours et 30 jours.

3.4.2 Analyse de la distribution de la Cas9 dans la rétine au cours du temps

Les extractions des rétines ont été réalisées 3 jours ou 7 jours après injection afin de déterminer si la protéine Cas9 est toujours présente et d'apprécier sa distribution dans la rétine au cours du temps. Après extraction, les rétines ont été fixées, incluses puis coupées au cryostat, avant de réaliser l'immunomarquage et la détection par microscopie confocale. Les noyaux ont été marqués au DAPI, la Cas9 a été marquée en vert et la recoverine, une protéine spécifique des photorécepteurs, a été marquée en rouge. Le contrôle négatif est le marquage par les anticorps primaires et secondaires de coupes de rétines injectées uniquement avec du tampon (HEPES/KCl).

L'imagerie confocale au X40 des coupes de rétines a permis de mettre en évidence la présence sous-rétinienne de la Cas9 à 3 et 7 jours post-injection. L'injection est réalisée entre le RPE et la rétine neurale. Cependant, on n'observe pas de diffusion de la Cas 9 dans la rétine, elle est concentrée au niveau des segments externes des photorécepteurs (*Figure 6*). Le niveau de Cas9 ne semble pas avoir diminué entre J3 et J7.

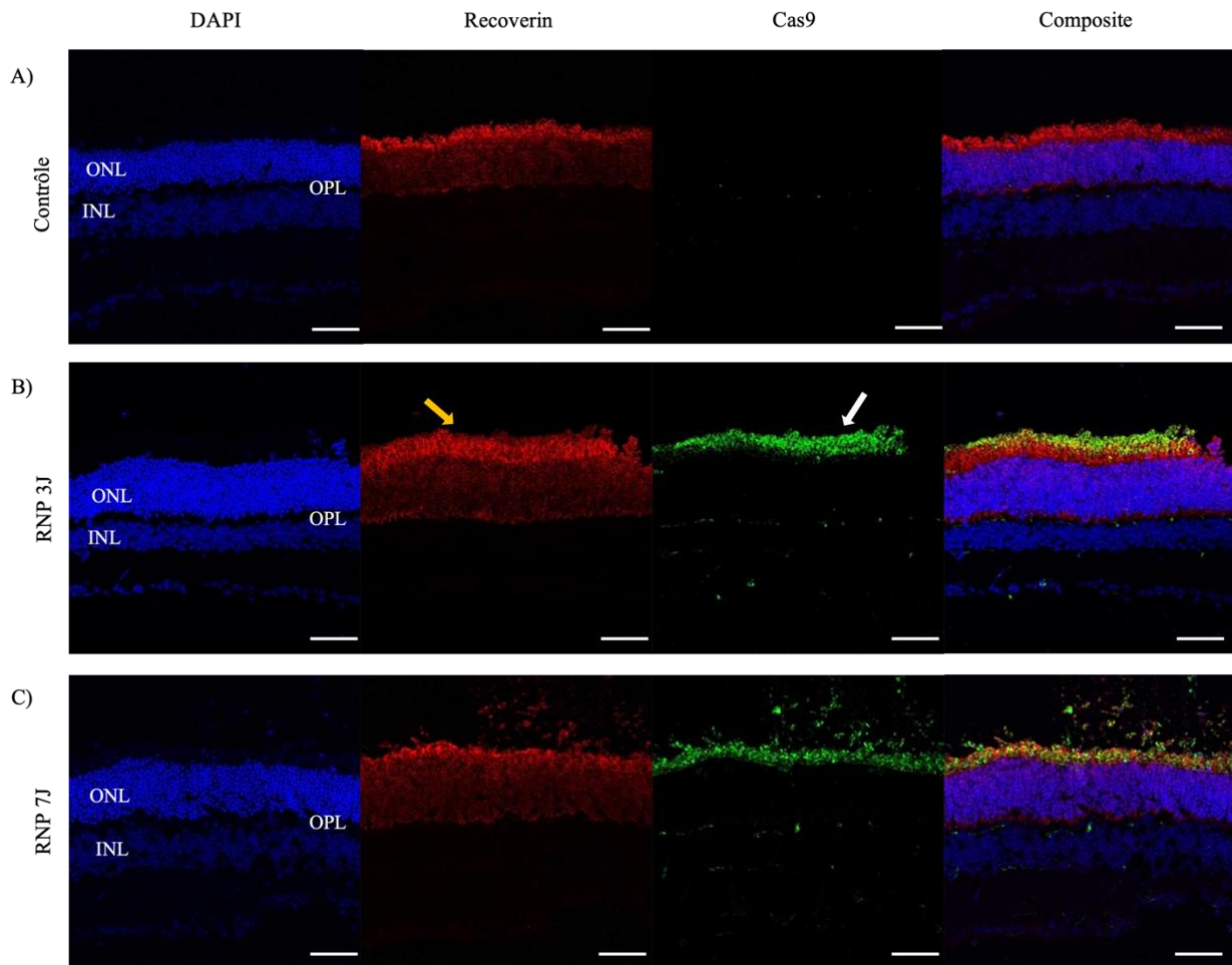


Figure 6 : Imagerie confocale des coupes de rétines de 12 μ m à 3 et 7 jours post-injection sous-rétinienne chez la souris.

A) ONL (couche nucléaire externe), OPL (couche plexiforme externe), INL (couche nucléaire interne) ; Le contrôle correspond à l'injection du tampon seul (HEPES/KCl), les rétines sont extraites 3 jours après l'injection. Les coupes de cryostat sont marquées au DAPI, la recoverine, une protéine spécifique des photorécepteurs, est marquée en rouge et la Cas9 est marquée en vert. B) Les RNP de Cas9 complexées avec leur ARNg sont injectées puis les rétines sont récupérées 3 jours après l'injection. On observe la présence de la Cas9 (flèche blanche) dans les segments externes des photorécepteurs (flèche orange). C) Les RNP de Cas9 sont injectées puis les rétines sont récupérées 7 jours après l'injection. La barre d'échelle représente 50 μ m.

3.4.3 Analyse du niveau de l'expression protéique

L'objectif est de générer suffisamment d'indels pour inactiver le gène. L'analyse du niveau d'expression protéique permet d'évaluer l'impact des indels créés. Le niveau de protéine *Sag* est mesuré par Western Blot.

Après extraction, les protéines sont précipitées dans de l'acétone et re-suspendues dans le tampon de lyse. Le dosage est réalisé par le kit Pierce Rapid Gold BCA assay, par mesure de l'absorbance. Les concentrations sont obtenues à l'aide de la courbe de concentration de la gamme (*Figure 7A et 7B*). Les résultats du dosage permettent aussi de confirmer la validité de la méthode d'extraction.

Pour analyser les protéines sur un même gel, elles sont regroupées par conditions en groupes de deux par puits. Les protéines sont séparées par migration sur un gel de polyacrylamide 7,5% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. SAG et le contrôle de charge, la β -caténine, sont marquées séparément et révélés par chimiluminescence (*Figure 7C*).

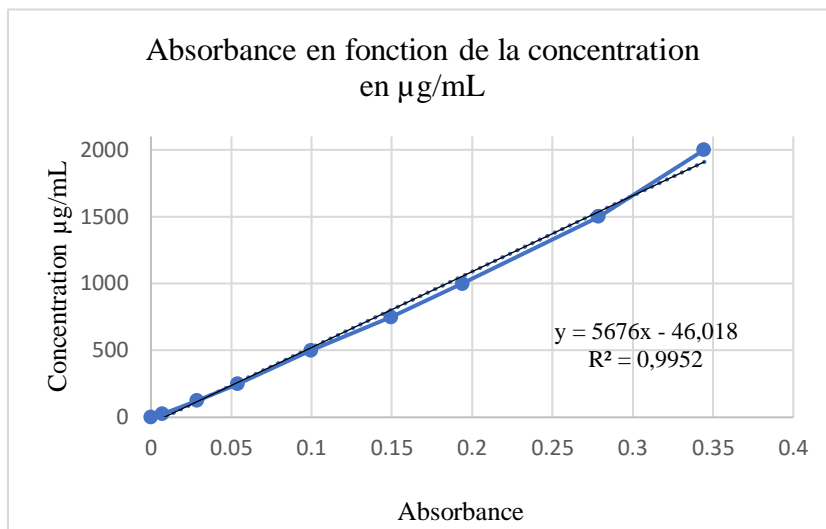
Les trois premières bandes, à partir de la gauche, sont les échantillons les injections contrôles. Les trois bandes suivantes sont les échantillons injectés avec des RNP de Cas9 et l'ARNg ciblant *Vegfa*. Les trois bandes suivantes sont les échantillons injectés avec des RNP de Cas9 et l'ARNg ciblant *Sag*.

Enfin, les deux dernières sont les protéines extraites de foie murin, tissu dans lequel *Sag* n'est pas exprimé. Ces échantillons servent de contrôle négatif pour le marquage de SAG, ils permettent de s'assurer de la spécificité de l'anticorps anti-SAG. La spécificité de l'anticorps anti-SAG est vérifiée par l'absence de bande, autour de 57kDa, pour les deux échantillons de protéines de foie.

Les bandes de β -caténine ne sont pas d'intensité similaires, les échantillons ne sont donc pas comparables pour le niveau d'expression de *Sag*.

De plus, on peut observer la présence d'un « smear ». Un autre type de gel de migration a été testé pour le minimiser, le gel à gradient 4-15%. Toutes les étapes du protocole sont restées inchangées. Ce type de gel a été testé sur un échantillon, afin de sauvegarder le maximum d'échantillon, le temps de l'optimisation de la méthode. L'utilisation de ce type de gel de migration a permis d'obtenir des bandes plus claires et aucun « smear » n'est observé (*Figure 7D*). L'analyse protéique est encore en cours d'optimisation, à ce jour aucune conclusion sur le niveau de l'expression protéique ne peut être faite.

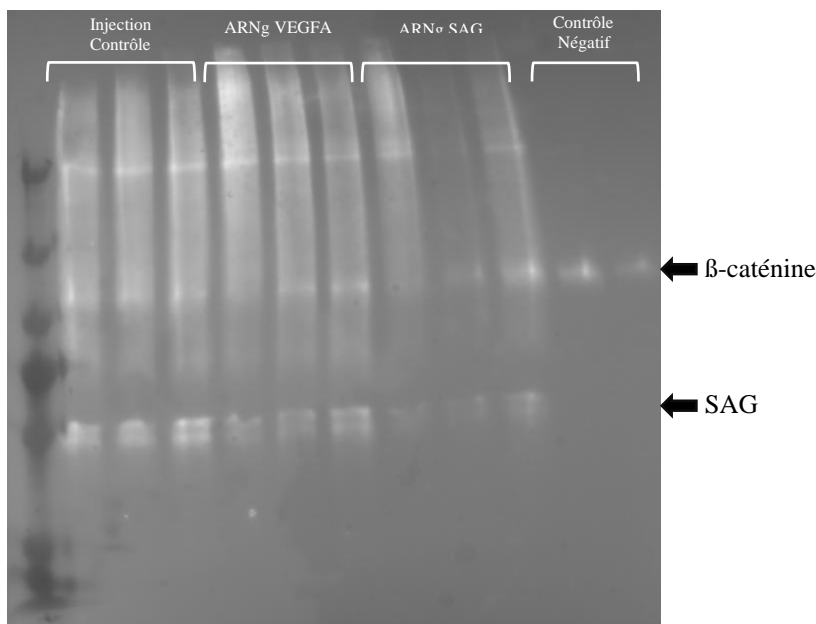
A)



B)

	Échantillon	Concentration (µg/µL)
Injection Contrôle	4323 OD	1211,723482
	4324 OD	1090,48979
	4326 OG	969,3037581
	4333 OG	1332,121628
	4336 OG	1469,18988
VEGFA	4345 OG	1702,481498
	4325 OD	927,0881901
	4328 OD	968,4199981
	4331 OG	899,0993621
	4332 OD	1028,931386
SAG	4334 OD	1138,707468
	4344 OD	1294,764032
	4335 OD	1002,511056
	4339 OG	1284,776544
	4340 OD	1158,59523
	4341 OD	828,1987421
Contrôle Négatif	Foie 1	1933,68147
	Foie 2	1825,06584

C)



D)

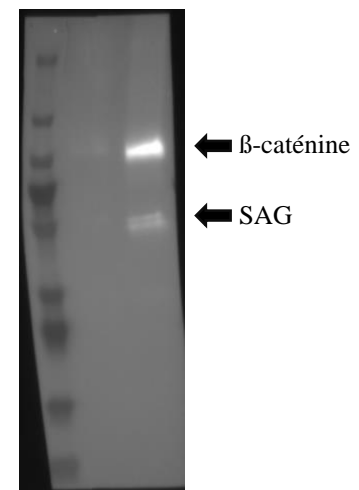


Figure 7 : Analyse du niveau d'expression protéique.

A) La courbe d'étalonnage obtenue le Pierce Rapid Gold BCA assay. B) Les concentrations obtenues pour les échantillons dans les trois conditions : injection contrôles (injection du tampon), injection de RNP de Cas9 ciblant VEGFA et injections de RNP de Cas9 ciblant SAG. Des protéines de foie murin sont utilisées comme contrôle négatif pour le marquage de SAG. C) Toutes les protéines sont analysées sur un même gel, elles sont regroupées par conditions en groupe de deux par puits. D) Optimisation du protocole de Western Blot, migration sur un gel à gradient 4-15%.

3.5 Conclusion et discussion de l'étude de cas

L'édition de gène par CRISPR/Cas9 pour inactiver un gène dans les maladies génétiques dominantes dues à des mutations gain de fonction (protéine toxique) et/ou dominant négatif, est une stratégie prometteuse dans le traitement des maladies dégénératives de la rétine. Notre étude cherche à démontrer la preuve de concept qu'une édition de gène est possible dans les photorécepteurs en utilisant CRISPR/Cas9 sous forme de RNP, déjà complexée avec son ARNg. Notre étude cible le gène *Sag*, un des gènes les plus exprimés dans les photorécepteurs et qui a montré une bonne capacité d'édition par cette méthode, dans de précédents travaux de notre équipe. L'analyse de l'efficacité de transfert de RNP de Cas9 dans les photorécepteurs se compose de 3 grandes parties : la mesure du taux d'édition, la distribution de la Cas9 dans la rétine et le niveau d'expression protéique de *Sag*.

La mesure du taux d'édition se traduit par le pourcentage d'indels mesuré dans la séquence cible. Le taux moyen d'indels obtenu dans la rétine pour *Sag* est de 6,26%, avec une très forte variabilité inter-échantillons (minimum à 1,66 % et maximum à 14,88%). Cette variabilité peut provenir des injections, elles sont réalisées manuellement.

Le taux moyen d'indels obtenue dans le RPE pour *Vegfa* est de 2,42%, contre environ 20% dans l'étude de Kim et al. (2017). Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'ils ont mesuré le taux d'indels uniquement dans la zone d'injection et non du RPE total. De plus, leur étude portait sur un modèle de souris ayant un dégénérescence maculaire lié à l'âge tandis que nous travaillons sur des souris de type sauvage.

Le pourcentage d'indels mesuré à 7 jours comparé à 30 jours ne montre aucune différence significative. Dans notre cas, l'édition de *Sag* dans la rétine est le paramètre qui nous intéresse, aucune amélioration est observée entre le taux d'édition à 7 jours et 30 jours.

L'analyse histologique a montré que la Cas9 ne diffusait presque pas dans les photorécepteurs. De plus la présence de la Cas9 n'est pas observable dans les noyaux des photorécepteurs, en effet, aucune colocalisation du marquage au DAPI et de la Cas9 n'a été relevée par l'imagerie confocale. Les propriétés intrinsèques de la couche de photorécepteurs pourraient être à l'origine de ce manque de diffusion de la Cas9 et donc à l'origine du faible taux d'édition. Effectivement, les noyaux des photorécepteurs sont séparés du RPE par leur segment externe et par la membrane limitante externe, cet espace très dense forme une véritable barrière à la diffusion des RNP de Cas9 (*Figure 8*). L'imagerie confocale ne nous permet pas

de différencier la localisation exacte des RNP de Cas9 à leur niveau, c'est-à-dire si elles sont bloquées dans l'espace extracellulaire ou à l'intérieur des différents disques qui composent les segments externes. Dans le premier cas, le problème serait que Cas9 n'arriverait pas à rentrer dans les cellules et dans le deuxième cas, le problème serait la migration jusqu'au noyau. Malgré leur présence à 7 jours, nous ne pouvons pas être certains de l'état des RNP. L'ARNg est une molécule fragile, il est peut-être dégradé à 7 jours, ce qui rendrait la Cas9 inefficace. De même pour la protéine Cas9, la réussite de son immunomarquage ne nous permet pas de conclure si elle est encore intacte ou dégradée, active ou non.

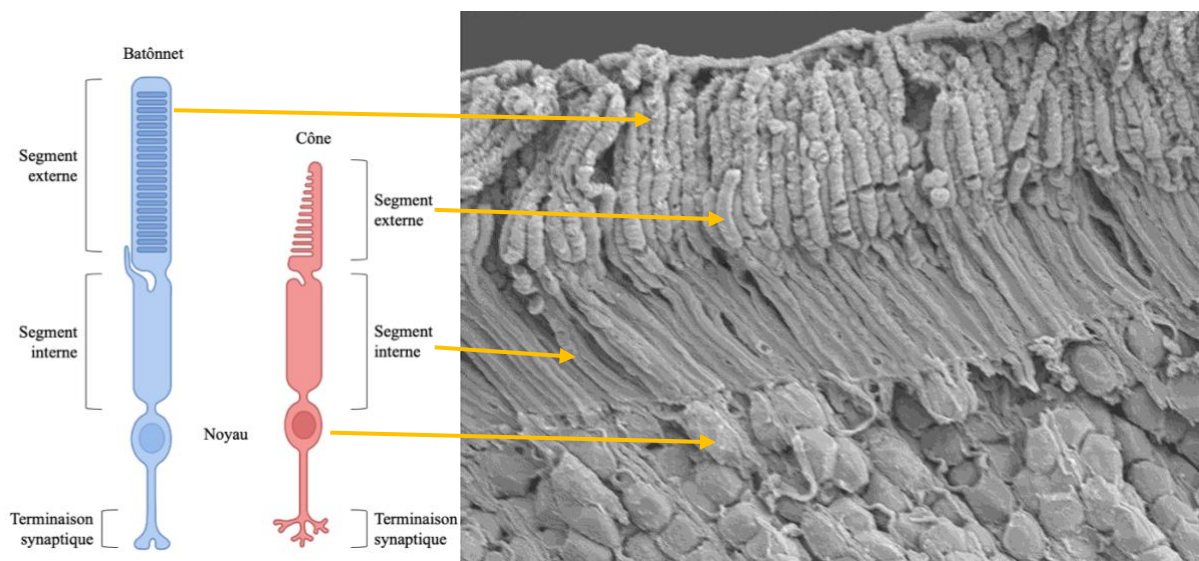


Figure 8 : Les segments externes de photorécepteurs.

Les segments externes sont des structures caractéristiques des photorécepteurs et forment une couche très dense. Ils sont plus long pour les batônnetts que pour les cônes. Le segment externe est le lieu de la phototransduction. Le message électrique est ensuite transmis aux autres cellules via les terminaisons synaptiques. *Adapté de (76)*

L'analyse protéique par Western Blot permet la comparaison du niveau de *Sag* entre les différentes conditions afin de déterminer si les mutations générées par les Cas9 RNP dans la séquence, ont inactivé son expression.

La mise en place de ce processus nécessite encore de l'amélioration. Les résultats obtenus ne permettent pas de comparer le niveau d'expression de *Sag* entre les différents groupes d'échantillons car les bandes obtenues, pour la protéine de charge, ne sont pas comparables et sont de faible intensité, avec la forte présence d'un « smear ».

Pour l'extraction des protéines, le kit utilisé est un kit d'extraction d'ADN et d'ARN. Il indique que les protéines peuvent être récupérées en fin de procédé. Il est possible que les différentes étapes nécessaires à l'extraction de l'ADN et ARN puissent détériorer les protéines. Il indique ensuite de faire précipiter les protéines avec de l'acétone mais il précipite également les nucléotides, les sels et différentes petites molécules pouvant contaminer nos échantillons. La précipitation au méthanol, alternative décrite comme plus sûre pour précipiter uniquement les protéines, est une méthode que nous testerons dans de prochains travaux. Une autre hypothèse, expliquant ces résultats, serait un problème dans l'étape de dosage. Une dernière hypothèse est le mauvais choix du gel, que nous avons pu tester plus rapidement. L'utilisation d'un gel à gradient a réduit les « smear » dont la présence ne nous permettait pas de voir clairement les bandes.

Dans la littérature, l'édition de gène basée sur l'utilisation de RNP de Cas9 sans vecteur reste à ce jour peu explorée. Les travaux de Staahl et al. (2017), sur l'optimisation de l'utilisation des RNP de Cas9 pour éditer le cerveau, représentent une approche intéressante. Ils ont montré que le taux d'édition peut être augmenté en supplémentant la Cas9 par des NLS dans sa partie N-Terminale. Ils ont cherché *in vitro* le nombre de NLS en N-terminal de la Cas9 qui obtient le plus haut taux d'édition, de 0 à 7 NLS. La condition produisant le plus haut taux d'édition est la Cas9 possédant 4 NLS en N-terminal. Ils ont testé cette Cas9-4NLS *in vivo* sur des souris et ont observé un niveau d'édition en moyenne 10 fois supérieur comparé aux Cas9 sans NLS en N-terminal (Figure 9).

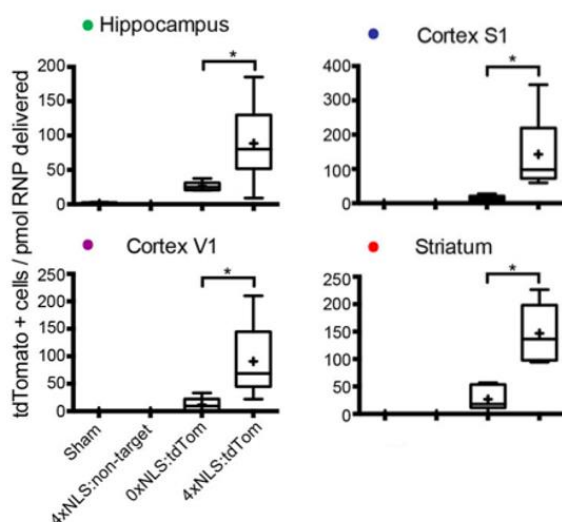


Figure 9 : Niveau d'édition dans différentes parties du cerveau de souris par Cas9 RNP. Comparaison des niveaux d'édition dans différentes parties du cerveau de souris en fonction de la présence ou non de l'ARNg et de NLS ou non sur les Cas9 RNP (74).

D'autres approches ont été décrites pour vectoriser les RNP de Cas9, afin d'améliorer le taux d'édition tout en évitant les effets secondaires liés à l'utilisation de vecteurs viraux, décrits précédemment. Les travaux de Chen et al. (2019) décrivent l'utilisation de nanocapsules synthétiques, transportant les RNP de Cas9. Dans leur étude, ils testent l'amélioration de l'édition entre l'utilisation de RNP de Cas9 sans vecteur, comparée à celle avec leur nanocapsules dans le RPE ainsi que dans les cellules musculaires de souris. Le taux d'édition avec les nanocapsules seules ne montrent pas d'amélioration, comparé aux RNP seules. Les nanocapsules marquées avec un signal cible pour le RPE NC-ATRA (le All-Trans Retinoic acid), ont montré une forte augmentation de l'édition, dans le RPE. Le taux d'édition moyen a été environ multiplié par 3 avec les NC-ATRA comparé aux RNP (77) (*Figure 10*).

En conclusion l'inactivation de gène par CRISPR/Cas9 représente une stratégie prometteuse, appliquée aux dégénérescences dominantes de la rétine. L'utilisation transitoire de la Cas9 sous sa forme protéique limite les inconvénients d'une présence au long terme liés à l'utilisation de vecteurs viraux. Les Cas9 RNP forment une alternative plus sûre pour l'édition des photorécepteurs. Le potentiel théorique de cette approche est certain mais son application nécessite encore de l'optimisation.

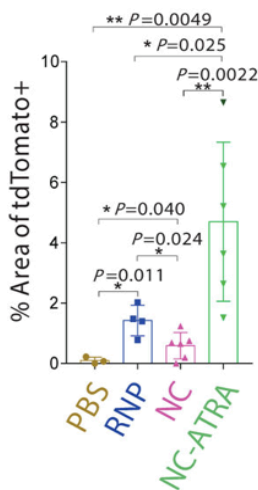


Figure 10 : Niveau d'édition dans le RPE de souris par Cas9 RNP. Comparaison du taux d'édition du RPE par Cas9 RNP seule, dans des nanocapsules ou dans des nanocapsules couplées au All-Trans retinoic acid (NC-ATRA) (77).

4. Autres applications

Dès les premières utilisations de la thérapie génique, la communauté scientifique a entrevu l'étendue de son large spectre d'applications (4). Il en va de même pour CRISPR. Capable d'inactiver des gènes pathogènes, comme l'illustre notre étude de cas sur la rétinite pigmentaire, CRISPR ouvre également de nouvelles perspectives pour réécrire le futur dans d'autres domaines tels que l'oncologie, les maladies neurodégénératives et les infections virales. C'est à travers ces multiples usages que cette technologie continue de repousser les frontières de la médecine et d'apporter de l'espoir face à des problématiques aujourd'hui encore sans réponse (*Figure 11*).

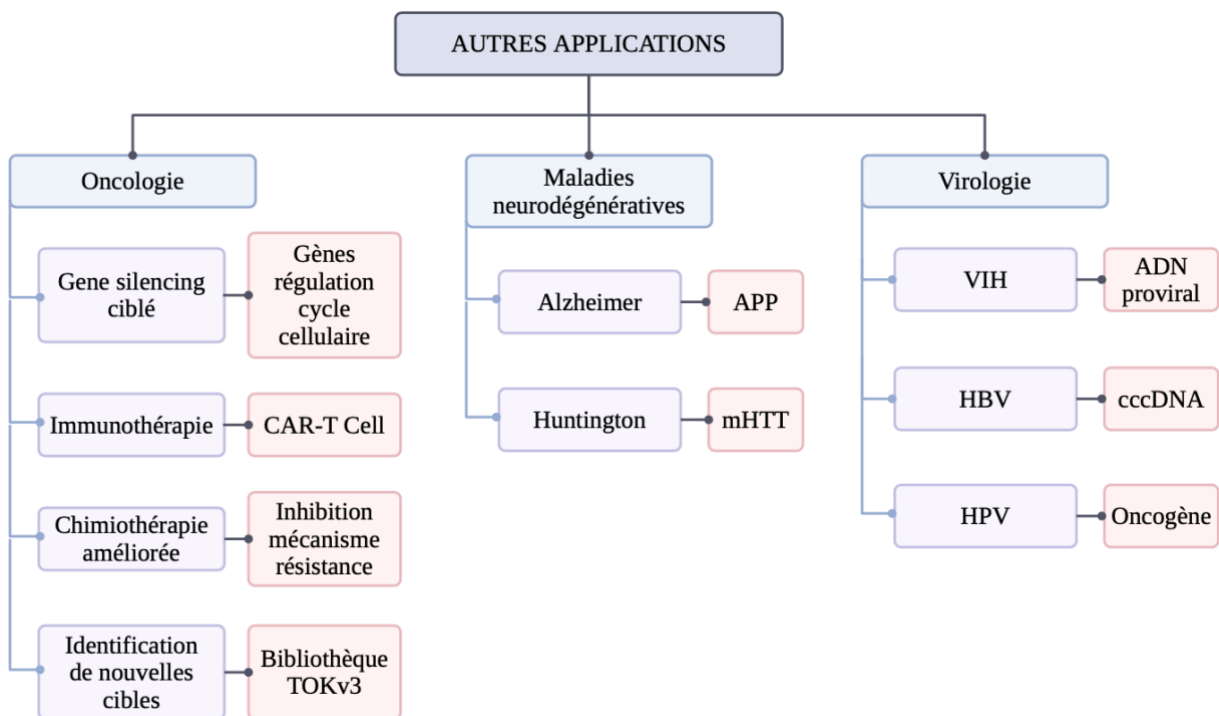


Figure 11 : Vue d'ensemble d'autres applications de CRISPR/Cas9

4.1 Applications en oncologie

CRISPR/Cas9 a ouvert de nouvelles perspectives en oncologie, offrant des outils puissants pour explorer et manipuler le génome à des fins thérapeutiques et de recherche. À différents niveaux, cette technologie permet la modulation des gènes régulant le cycle cellulaire, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, ainsi que la modélisation de tumeurs. Ces applications prometteuses pourraient transformer la compréhension des mécanismes du cancer et favoriser le développement de traitements innovants.

Plusieurs études ont exploré l'utilisation de CRISPR pour effectuer un "gene silencing" ciblé sur des gènes exprimés de manière différentielle dans les tumeurs.

Dans le domaine de l'ostéosarcome, une étude a mis en lumière l'importance du gène CDK11 dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses. En utilisant la technologie CRISPR/Cas9 pour cibler et réduire l'expression de CDK11, les chercheurs ont observé une diminution significative de la prolifération et de la viabilité des cellules, ainsi qu'une réduction marquée de leur capacité à migrer et à envahir les tissus voisins. Ces résultats promettent une nouvelle voie thérapeutique pour améliorer le traitement de l'ostéosarcome (78).

Parallèlement, une autre étude s'est penchée sur le carcinome nasopharyngé (CNP), en mettant en évidence le rôle du gène KLHDC4, un membre des protéines Kelch, comme marqueur de pronostic. Les chercheurs ont trouvé que KLHDC4 est largement surexprimé dans les biopsies de CNP comparé aux tissus normaux, et que son inactivation par CRISPR/Cas9 entraîne une inhibition notable de la prolifération cellulaire, de la formation de colonies et de l'invasion tumorale. L'étude révèle également que la perte de KLHDC4 conduit à une apoptose accrue, suggérant que ce gène joue un rôle clé dans la croissance tumorale en empêchant la mort cellulaire programmée. Ces découvertes offrent une nouvelle approche thérapeutique mais aussi diagnostique du CNP (79).

Ces deux exemples illustrent une variété d'études où CRISPR/Cas9 est utilisé en thérapie génique pour moduler des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, souvent dérégulés dans les cancers. En outre, les capacités de CRISPR peuvent également soutenir d'autres approches thérapeutiques, telles que l'immunothérapie, en enrichissant les stratégies de traitement disponibles.

Une étude de 2019 explore l'amélioration de l'efficacité des thérapies par cellules CAR-T (Cellules T à récepteur antigénique chimérique) ciblant le récepteur PD-1, modifié génétiquement par CRISPR/Cas9, dans le traitement de cancer solide tel que le cancer du sein triple négatif. Le cancer du sein triple négatif, qui n'exprime pas de récepteurs stéroïdes ni de HER-2, répond mal aux traitements ciblés disponibles et a souvent le pronostic le plus défavorable parmi les sous-types de cancer du sein.

Les cellules CAR-T sont des cellules T modifiées pour exprimer un récepteur chimérique spécifique aux antigènes des cellules tumorales, leur permettant ainsi de cibler et détruire ces dernières. Elles sont utilisées en oncologie pour leur capacité à attaquer spécifiquement les cellules cancéreuses, offrant ainsi un traitement ciblé et efficace contre les tumeurs.

PD-1 est un récepteur présent sur les cellules T qui inhibe leur activité pour limiter les réponses immunitaires et prévenir leur épuisement. Cependant, cette inhibition peut également permettre aux cellules tumorales de se soustraire au système immunitaire. Dans ce contexte, l'épuisement des cellules T peut survenir en raison de leur stimulation constante par les antigènes tumoraux, ce qui réduit leur efficacité au fil du temps. L'utilisation de CRISPR pour cibler PD-1 élimine ce phénomène d'épuisement. En désactivant le gène PD-1 dans les cellules CAR-T, on empêche l'expression de ce récepteur, ce qui permet aux cellules T de rester actives et fonctionnelles plus longtemps, réduisant ainsi leur épuisement et augmentant leur persistance dans la lutte contre les cellules tumorales.

Les résultats ont montré que les cellules CAR-T modifiées avec CRISPR pour le "gene silencing" de PD-1 sont plus efficaces pour éliminer les cellules tumorales *in vitro* et démontrent une meilleure persistance et efficacité antitumorale *in vivo*.

Cette étude démontre que l'édition du gène PD-1 avec CRISPR améliore significativement l'efficacité des thérapies CAR-T en oncologie, offrant un potentiel accru pour les traitements contre les cancers solides (80).

Sur le même principe CRISPR peut être utilisé pour essayer de résoudre le problème de la sensibilisation des cellules tumorales à la chimiothérapie classique. L'inhibition de mécanismes de résistance pourrait augmenter l'efficacité des traitements existants.

Les chimiothérapies telles que la doxorubicine et la gemcitabine, utilisées dans le traitement du cancer du sein, exercent leur effet en interférant avec la réplication et la transcription de l'ADN des cellules cancéreuses. Ces molécules entraînent des cassures dans la double hélice de l'ADN, conduisant à la mort de la cellule cancéreuse. Cependant, certaines

cellules cancéreuses ont développé des mécanismes de résistance en utilisant des enzymes spécialisées dans la réparation de l'ADN, comme BRCA1 et PARP1. Ces enzymes détectent et réparent les cassures, permettant ainsi aux cellules cancéreuses de restaurer leur intégrité et continuer à se diviser malgré le traitement.

Pour surmonter cette résistance, une approche thérapeutique potentielle consiste à cibler BRCA1 et PARP1 en utilisant la technologie CRISPR/Cas9 pour les inactiver dans les cellules cancéreuses. En inhibant ces mécanismes de réparation, les cellules cancéreuses ne sont plus en mesure de résister aux dommages causés par la chimiothérapie.

Des recherches *in vitro* menées sur des modèles de cellules cancéreuses, comme preuve de concept, ont montré que la combinaison de CRISPR/Cas9 pour inhiber BRCA1 et PARP1 avec des chimiothérapies telles que la doxorubicine ou la gemcitabine empêche le développement de résistance au traitement.

Cette approche combinée semble prometteuse pour améliorer l'efficacité des chimiothérapies et surmonter la résistance des cancers aux traitements conventionnels (81).

Au-delà de son utilisation en clinique, CRISPR/cas9 a aussi un rôle essentiel à jouer en recherche fondamentale en permettant, par exemple, d'identifier de nouveaux gènes cibles pour le développement de nouvelles thérapies.

La découverte de nouveaux gènes cibles pour les thérapies s'est améliorée grâce aux bibliothèques CRISPR. La Toronto KnockOut Library (TKOv3), par exemple, référence plus de 70 000 ARN guides qui ciblent plus de 18 000 gènes codant des protéines. CRISPR est utilisé pour créer un knock-out (KO, inactivation) de gènes spécifiques, permettant d'étudier leurs rôles dans différents types cellulaires. Après l'inactivation du gène, les perturbations dans la croissance, la survie et d'autres aspects phénotypiques des cellules sont analysées, ce qui permet d'identifier des gènes essentiels dans des processus biologiques particuliers. (82).

En utilisant les données de la TKOv3, des chercheurs ont exploré cette vaste base de données pour identifier de nouveaux gènes cibles dans le cancer gastrique. En criblant des lignées cellulaires de cancer gastrique, ils ont découvert plus d'une centaine de gènes essentiels à la viabilité et à la prolifération des cellules cancéreuses. Parmi eux, 41 ont été identifiés comme potentielles cibles thérapeutiques. Pour vérifier l'efficacité de leur stratégie de criblage et de sélection, ils ont testé les fonctions biologiques du knock-out du gène MTTL1, l'un des 41 gènes, dans des cellules de cancer gastrique et dans des modèles murins. Dans les deux modèles,

la diminution nette de la viabilité et de la prolifération des cellules cancéreuses observée a permis de valider l'efficacité de leur approche (83).

En conclusion, CRISPR/Cas9 a considérablement enrichi les possibilités en oncologie, en permettant d'explorer de nouveaux gènes et mécanismes impliqués dans le cancer. Cette technologie facilite l'identification de cibles thérapeutiques et l'amélioration des traitements existants, comme les thérapies par cellules CAR-T et les chimiothérapies. Les recherches actuelles, notamment celles utilisant la bibliothèque TKOv3, illustrent comment CRISPR peut aider à découvrir des gènes essentiels et optimiser les approches thérapeutiques contre divers cancers.

4.2 Applications pour les maladies neurodégénératives

Les avancées dans le domaine des mécanismes moléculaires génétiques ont ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer, Parkinson et la maladie de Huntington. En permettant des modifications précises et ciblées du génome, CRISPR/Cas9 offre des opportunités uniques pour explorer des thérapies innovantes et potentiellement curatives pour ces pathologies. En exploitant cette technologie, il devient possible de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces pathologies mais aussi aborder les défis et les progrès récents dans leur traitement.

La maladie d'Alzheimer (AD) est une pathologie neurodégénérative majeure, représentant la principale cause de démence et affectant plus de 47 millions de personnes dans le monde. Elle est caractérisée par l'accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau, aussi appelées plaques séniles. Ces plaques extracellulaires sont principalement composées de peptides A β , produits par le clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par les enzymes de clivage du site β de l'APP 1 (BACE-1) et les γ -sécrétases. Des lésions intracellulaires sont également observées, se manifestant par des enchevêtrements neurofibrillaires causés par la protéine tau altérée. Ces processus pathologiques sont au cœur de la neurodégénérescence associée à la maladie. En parallèle, l'APP peut aussi être clivée par les α -sécrétases, un mécanisme considéré comme neuroprotecteur puisqu'il empêche la formation des peptides A β toxiques (84).

Ces altérations neuronales se caractérisent par une perte progressive de mémoire, des difficultés croissantes dans les fonctions cognitives telles que le langage et la résolution de problèmes, et des changements de comportement. À mesure que la maladie avance, les patients peuvent éprouver une désorientation dans le temps et l'espace, ainsi que des troubles de la reconnaissance et de l'identité. La prise en charge actuelle repose principalement sur des médicaments qui modèrent les symptômes cognitifs mais n'empêchent pas la dégradation continue des fonctions cognitives et la formation de plaques amyloïdes.

Plusieurs études ont exploré l'application de CRISPR pour freiner la progression de l'AD en ciblant des gènes clés impliqués dans son mécanisme physiopathologique, tels que BACE-1 (85). Le mécanisme d'action de cette approche semble résider dans la réduction de l'interaction entre l'APP et BACE-1, empêchant ainsi la formation de peptides A β . CRISPR-Cas9 est utilisé pour cibler spécifiquement l'extrémité C-terminale de la protéine APP. L'objectif est de réduire

le clivage par BACE-1, diminuant ainsi la production de peptides A β toxiques, tout en favorisant le clivage par les α -sécrétases.

Les résultats montrent que l'édition génique de l'APP à l'extrémité C-terminale a été réalisée avec succès, à la fois *in vitro* dans les neurones dérivés d'iPSC humains et *in vivo* dans des modèles murins. Cette édition a conduit à une réduction significative de la production de peptides A β , tout en augmentant la génération de produits de clivage neuroprotecteurs par les α -sécrétases. L'édition génique a donc permis de moduler efficacement la voie amyloïde, réduisant ainsi les effets neurotoxiques de l'APP tout en préservant ses fonctions normales. Les analyses neurophysiologiques n'ont révélé aucun effet délétère sur la croissance neuritique, la longueur des axones, l'organisation synaptique ou l'activité neuronale, ce qui suggère que cette approche est relativement sûre pour les neurones. Enfin, les injections du système CRISPR/Cas9 dans les cerveaux de souris ont montré une édition efficace de l'APP dans les neurones, avec une réduction notable de la production d'A β . Cette étude offre une preuve de concept prometteuse pour l'utilisation de l'édition par CRISPR-Cas9 dans la prise en charge de l'AD pour ralentir, voire arrêter, la progression de la maladie.

Une approche similaire pourrait également être utilisée pour le développement de modèles animaux permettant d'étudier plus en profondeur la physiopathologie de l'AD. En ciblant d'autres gènes mutés associés à cette maladie, il serait possible de reproduire des caractéristiques spécifiques de la maladie dans ces modèles. Parmi ces gènes, preseniline 1 (PSEN1) et preseniline 2 (PSEN2), associés à la forme précoce de la maladie, ont montré être impliqués dans la formation des plaques amyloïdes. Quant à la forme tardive, l'allèle E4 de l'apolipoprotéine (APOE4) constitue un facteur de risque majeur, avec un risque de développement de la maladie multiplié par 10 à 15 pour les homozygotes E4, et par 2 à 3 pour les hétérozygotes. En ayant recours à CRISPR pour manipuler ces gènes dans des modèles animaux, les chercheurs pourraient mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et tester de nouvelles approches thérapeutiques de manière plus ciblée à chaque forme de la maladie (86).

La maladie de Huntington (MH) est une pathologie neurodégénérative héréditaire rare provoquée par la présence de répétitions CAG anormalement nombreuses dans le gène codant pour la huntingtine (HTT). Ces répétitions entraînent la production d'une forme mutante de la protéine HTT, appelée mHTT, qui contient un motif polyglutamine (polyQ) élargi dans sa

région N-terminale. La présence de mHTT dans les cellules neuronales, particulièrement dans le striatum, conduit à une série de dysfonctionnements cellulaires et à l'accumulation d'agrégats toxiques dans les noyaux neuronaux. Ces agrégats provoquent des mouvements involontaires et incontrôlables caractéristiques, appelés chorée, associés à des troubles de la coordination et des altérations du comportement. Les symptômes cognitifs incluent des difficultés de concentration, des troubles de la mémoire et des changements de personnalité, conduisant à une dégradation progressive des capacités mentales et motrices (87).

Les traitements actuels visent à gérer les symptômes moteurs et psychiatriques, principalement à l'aide de médicaments antipsychotiques et de stabilisateurs de l'humeur. Ces traitements n'altèrent pas la progression de la maladie ni ne modifient l'évolution neurodégénérative.

Une approche thérapeutique innovante utilisant CRISPR/Cas9 a été explorée pour cibler spécifiquement l'expression de mHTT dans les neurones du striatum chez des modèles de souris modifiés pour exprimer cette protéine mutée. L'édition de la répétition CAG inactive le gène en introduisant des indels dans la région mutée et réduit les agrégats toxiques (88).

Les résultats obtenus sont prometteurs, on observe une réduction significative de mHTT dans les régions ciblées, avec une diminution notable des agrégats de mHTT et une atténuation de la neuropathologie associée sans affecter la viabilité neuronale. Les souris traitées ont aussi montré une amélioration significative des performances motrices.

Ces résultats suggèrent que la réduction permanente de l'expression de mHTT par CRISPR/Cas9 pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique efficace pour la maladie de Huntington.

Les récentes avancées en matière d'édition génétique, combinées à l'absence de traitements efficaces pour les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington, soulignent l'urgence d'élaborer des thérapeutiques innovantes. La modification génétique précise permise par CRISPR/Cas9 offre un nouvel espoir pour les patients. Il est désormais possible d'explorer des thérapies potentiellement curatives pour ces maladies qui, jusqu'à présent, ne bénéficient que de traitements symptomatiques. Notamment pour ces pathologies causées par un gain de fonction toxique, CRISPR/Cas9 pourrait représenter une avancée majeure en ciblant les mutations génétiques spécifiques, ouvrant ainsi de nouvelles voies pour le développement de traitements plus efficaces et potentiellement curatifs.

4.3 Applications en virologie

Les applications de la technologie CRISPR/Cas9 dans le domaine des infections virales ont ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement de maladies chroniques et potentiellement mortelles. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), reste un défi majeur en raison de sa capacité à échapper au système immunitaire et à s'intégrer de manière stable dans le génome des cellules hôtes. De même, le papillomavirus humain (HPV), responsable de divers cancers et lésions précoces, pose des difficultés importantes en matière de prévention et de traitement. Enfin, le virus de l'hépatite B (HBV), qui provoque une infection hépatique chronique et peut conduire à des complications graves telles que la cirrhose et le cancer du foie, nécessite des approches innovantes pour son éradication. Dans ce contexte, CRISPR/Cas9 offre des avancées prometteuses pour cibler et neutraliser ces virus avec une précision accrue.

Le VIH reste une préoccupation majeure de santé publique à l'échelle mondiale, touchant environ 39 millions de personnes, selon les estimations de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) (89). Bien que les traitements antirétroviraux aient considérablement amélioré la gestion de l'infection, la guérison complète reste un défi. La persistance de l'ADN proviral latent dans les cellules hôtes constitue un obstacle majeur, incitant la recherche à explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour éradiquer le virus.

La thérapie combinée antirétrovirale n'est pas un traitement curatif. Elle supprime la réplication virale, mais ne touche pas à l'ADN proviral latent présent dans les cellules T CD4⁺ et les phagocytes mononucléaires. Cette thérapie empêche la détérioration immunitaire, prévient l'apparition d'infections opportunistes, et bloque la transmission inter-individus tant qu'une observance stricte est respectée.

Une approche curative serait d'inactiver, par CRISPR, les acteurs responsables de l'infection latente du VIH. Les connaissances avancées du mécanisme d'entrée et du cycle viral du VIH permettent d'identifier plusieurs cibles thérapeutiques potentielles. Ces techniques incluent l'excision de l'ADN proviral intégré, la suppression des récepteurs ou co-récepteurs essentiels à l'entrée du virus, la modulation des protéines hôtes impliquées dans la réponse immunitaire, ainsi que l'inhibition de la transcription de l'ADN viral (90).

Pour atteindre différentes souches virales tout en limitant l'échappement par adaptation de nouveaux variants, la stratégie la plus prometteuse consiste à cibler les LTR (Séquences terminales longues répétées). Les LTR sont des régions conservées, essentielles à la transcription des gènes viraux et à l'intégration du génome viral dans celui de l'hôte. En outre,

elles encadrent la totalité des gènes viraux (gènes structurels, gènes régulateurs, gènes accessoires). L'inactivation des LTR par insertion d'indels pourrait inactiver ces gènes, par exemple en créant un décalage du cadre de lecture, tout en supprimant leur promoteur. Cette méthode a démontré son potentiel dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, notamment chez des souris humanisées infectées par le VIH et des primates non humains (macaques rhésus) infectés par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (91) (92) (93) (94).

Bien que les résultats de plusieurs études soient très prometteurs, de nombreuses étapes doivent encore être franchies avant de pouvoir envisager l'application de cette méthode en clinique. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour s'assurer de l'efficacité durable de cette approche avant qu'elle ne puisse être envisagée pour une utilisation clinique chez l'Homme.

La vaccination contre le HPV est efficace, la couverture vaccinale reste largement insuffisante pour réduire la transmission du virus. Plusieurs étapes sont prévues dans la prise en charge. Le dépistage est simple, et un traitement chirurgical préventif, la conisation, permet de réséquer une partie du col avant l'apparition du cancer. Si l'infection évolue en cancer, des traitements comme la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie sont envisageables. Malgré ces mesures, le cancer du col de l'utérus reste une cause importante de mortalité chez les femmes.

Le cancer du col de l'utérus est causé par une infection persistante des cellules épithéliales cervicales par des types de HPV dits à haut risque. L'intégration du génome du HPV dans l'ADN de l'hôte conduit à l'expression de l'oncoprotéine E6. E6 est capable d'inactiver la protéine p53, un suppresseur de tumeur essentiel. Cette inactivation favorise la formation et la croissance des tumeurs (95).

Une stratégie envisageable consiste à cibler spécifiquement le gène E6 du virus avec CRISPR/Cas9 afin d'inactiver son expression dans les cellules du col de l'utérus. L'inactivation est obtenue par les indels générés à la suite de la cassure double brin par CRISPR.

La preuve de concept pour cette approche thérapeutique a été faite *in vivo* sur des modèles murins porteurs de tumeurs cervicales. L'inhibition de l'expression de l'E6 a conduit à une augmentation de l'expression de p53, à l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses et réduisait significativement la croissance tumorale (96).

L'approche CRISPR/Cas9 ciblant l'E6 du HPV pourrait offrir une nouvelle alternative thérapeutique dans la prise en charge du cancer du col de l'utérus, en particulier pour les lésions précancéreuses et les cancers à un stade précoce. Contrairement aux traitements actuels comme la conisation cervicale, qui présente des risques pour la fertilité et n'offre pas toujours une

guérison complète, cette thérapie génique pourrait être moins invasive et plus efficace. Bien que des effets secondaires n'aient pas été observés chez les souris, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour s'assurer que cette approche est sûre pour une application clinique.

En 2022, l'OMS estime à 254 millions le nombre de personnes vivant avec une infection chronique due à l'hépatite B, avec environ 1,2 million de nouveaux cas chaque année. Bien que le vaccin contre l'hépatite B soit efficace, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour l'infection chronique, qui présente un taux de mortalité élevé. L'infection chronique peut évoluer en cirrhose, puis en carcinome hépatocellulaire (97).

Les traitements disponibles visent à réduire la charge virale à l'aide d'analogues nucléotidiques ou nucléosidiques pour limiter l'infection, mais ils ne stoppent pas la transmission du virus. Cela est dû à la présence d'ADN covalent circulaire fermé (ADNccc) dans les hépatocytes, qui est insensible aux traitements. Les ADNccc jouent un rôle crucial en servant de base pour la transcription des protéines virales nécessaires à sa réplication (98). Malgré les efforts pour gérer l'infection par des campagnes de prévention et la vaccination obligatoire pour tous les nouveau-nés depuis le 1er janvier 2018 en France, le besoin de trouver une thérapie curative reste crucial.

Une stratégie envisageable est de cibler les ADNccc avec CRISPR/Cas9 pour introduire des mutations dans leur séquence et ainsi inhiber la réplication virale (99). Cette approche a été testée dans un modèle de souris humanisées pour traiter l'infection chronique par le VHB, montrant que la thérapie est bien tolérée et améliore la survie des hépatocytes humains. Bien que les niveaux d'ADN viral dans le foie n'aient pas diminué de manière significative, les résultats observés au niveau histologique soutiennent le potentiel de cette approche. L'efficacité de l'édition génétique est limitée par des obstacles comme l'expression insuffisante de la Cas9. Ces résultats justifient un optimisme prudent pour le développement futur de cette thérapie.

En résumé, la technologie CRISPR/Cas9 offre des perspectives révolutionnaires pour le traitement des infections virales chroniques comme le VIH, le HPV et l'hépatite B. Bien que les résultats obtenus dans les modèles précliniques soient prometteurs, il est crucial de continuer à explorer et à affiner ces approches pour surmonter les nombreux défis restants. L'efficacité et la sécurité de ces thérapies doivent être rigoureusement évaluées avant de pouvoir envisager

leur application en clinique chez l'Homme. Malgré ces défis, les progrès réalisés jusqu'à présent nourrissent l'espoir d'atteindre un jour une guérison effective et sûre.

5. Enjeux de l'utilisation de CRISPR/Cas9

5.1 Cadre réglementaire

5.1.1 Définitions et réglementation européenne

La réglementation européenne, introduite en 2007, a défini une nouvelle catégorie de médicaments : les Médicaments de thérapie innovante (MTI). Ces médicaments biologiques comprennent des thérapies cellulaires somatiques, des thérapies géniques et des produits issus de l'ingénierie tissulaire, chacun d'eux pouvant être associé à des dispositifs médicaux.

Les MTI sont régis par le règlement européen n° 1394/2007, qui vise à clarifier et à harmoniser les règles d'autorisation de ces produits dans l'Union Européenne (UE). Ce cadre réglementaire a pour objectif de faciliter l'accès des patients à ces traitements innovants, tout en garantissant un haut niveau de protection de la santé publique. Il permet également un suivi à long terme de l'efficacité et de la sécurité des MTI (100).

Les MTI se déclinent en plusieurs catégories, définies de la manière suivante :

- Thérapies géniques : elles consistent à introduire du matériel génétique dans les cellules pour remplacer ou compléter un allèle muté déficient par un allèle fonctionnel ou pour sur-exprimer une protéine thérapeutique.
- Thérapies cellulaires somatiques : impliquent la manipulation de cellules humaines pour traiter des maladies.
- Produits issus de l'ingénierie tissulaire : concernent la création de tissus ou organes à partir de cellules modifiées.
- Médicaments combinés de thérapie innovante (MTI-C) : qui associent un MTI à un dispositif médical.

L'EMA définit, dans la partie IV de l'annexe 2 de la directive 2003/63/CE, les médicaments de thérapie génique (MTG) comme des produits biologiques présentant les caractéristiques suivantes :

- Ils contiennent une substance active constituée entièrement ou en partie d'un acide nucléique recombinant, utilisé chez l'homme pour réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique ;

- Leur effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique est directement lié à la séquence d'acide nucléique recombinant qu'ils contiennent ou au produit de l'expression génétique de cette séquence.

Il convient de noter que les médicaments de thérapie génique n'incluent pas les vaccins contre les maladies infectieuses (101).

L'EMA joue un rôle central dans la régulation des MTI à de nombreux niveaux de l'UE.

Elle a sous sa charge l'approbation et la supervision des essais cliniques assurant que les protocoles respectent les normes de sécurité pour les patients.

Elle évalue les demandes d'autorisation de mise sur le marché via un comité dédié, le comité des thérapies innovantes (CAT) qui apporte un avis scientifique sur les différents types de MTI. Le CAT est principalement chargé de préparer un projet d'avis sur chaque demande de médicament de thérapie innovante avant que le Comité des Médicaments à Usage Humain (CHMP) n'émette un avis final sur l'autorisation de mise sur le marché (102).

5.1.2 Exigences techniques et évaluation des risques pour les MTI

Les MTI doivent suivre les bonnes pratiques de fabrication (BPF) et les bonnes pratiques cliniques (BPC), en plus le CAT est chargé d'élaborer des lignes directrices aux MTI, ces lignes directrices définissent les critères supplémentaires relatifs au développement spécifique de MTG. Il faut évaluer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament, en déterminant son rapport bénéfice/risque. Les développeurs de médicaments de thérapie génique doivent adopter une approche basée sur le risque pour définir les données à inclure et justifier les écarts par rapport aux exigences techniques définies par la directive 2001/83/CE (103).

L'approche fondée sur le risque se concentre sur l'identification et l'évaluation des risques spécifiques associés à un médicament. Elle prend en compte divers facteurs de risque liés à la qualité, à la sécurité et à l'efficacité du médicament, tels que ses caractéristiques biologiques, le processus de fabrication, et son utilisation thérapeutique.

Pour chaque facteur de risque, comme la capacité d'intégration du vecteur dans le génome de l'hôte, il est crucial d'évaluer sa contribution à un risque identifié, par exemple la mutagenèse. Les développeurs doivent se référer à la ligne directrice du CAT sur l'approche fondée sur les risques, conformément à l'annexe I, partie IV, de la directive 2001/83/CE.

Les principaux facteurs à considérer lors du développement incluent l'acheminement du vecteur, sa persistance, et les réponses immunitaires potentielles. Les effets des modifications génétiques doivent être confirmés au niveau cellulaire, et des preuves solides de la transduction et de l'expression sélective sont nécessaires. Des tests de puissance mesurent l'efficacité biologique du médicament, incluant l'évaluation de la fonction de la séquence thérapeutique.

Pour les MTG utilisant des vecteurs viraux, la pathogénicité doit être évaluée afin de minimiser les risques de créer un agent infectieux. L'administration d'un MTG peut provoquer des réponses immunitaires indésirables, qui doivent être prises en compte durant le développement. Des cas d'oncogenèse liés à des événements de mutagenèse insertionnelle ont été rapportés dans des essais cliniques, rendant essentiel l'évaluation des risques d'intégration. Le risque de transmission accidentelle de modifications génétiques à la lignée germinale doit être étudié avant toute utilisation clinique, et des considérations éthiques entourent cette question. Les essais de thérapie génique sur des cellules germinales sont interdits dans l'Union européenne (104).

En somme, les risques associés aux médicaments de thérapie génique sont intrinsèques à leurs caractéristiques, ce qui requiert une évaluation approfondie par des méthodes moléculaires, biologiques et immunologiques pour assurer leur sécurité et leur efficacité.

5.1.3 Disparités et enjeux au niveau international

Les MTG, utilisant souvent des virus génétiquement modifiés comme vecteur, doivent en plus respecter la réglementation des organismes génétiquement modifiés (OGM) conformément à la directive 2001/18/CE. Cette directive définit un OGM comme un organisme dont le matériel génétique a été modifié de manière non naturelle, y compris ceux créés par des techniques comme l'évolution dirigée. L'évolution dirigée est une méthode d'ingénierie utilisée pour créer, par exemple, de nouveaux variants de vecteurs viraux possédant des propriétés améliorées. C'est une approche non rationnelle qui repose sur l'introduction et la modification de nombreuses variations de séquences, suivies d'une étape de sélection dans un environnement donné. Elle permet, notamment, d'augmenter la capacité de transduction d'un vecteur viral pour un certain type cellulaire, comparé aux sérotypes naturels.

Cette directive repose sur deux principaux piliers réglementaires. D'une part l'évaluation des risques environnementaux (ERA), spécifiée à l'Annexe II. En complément l'Annexe IIIa

exige des informations détaillées sur les caractéristiques techniques du vecteur, les modifications apportées et l'impact potentiel sur l'environnement, y compris la faune, la flore et les sols.

Bien que ces règles s'appliquent dans les 27 États membres de l'UE, chaque pays peut imposer des documents supplémentaires et/ou des documents dans sa langue locale.

Les autorités compétentes pour l'évaluation des demandes d'applications cliniques (CTA) et des OGM peuvent être les mêmes dans certains pays (comme l'Allemagne, l'Italie et la Suède) ou distinctes dans d'autres (comme en France, en Espagne et en Belgique) (105). Dans le deuxième cas, cette différence pourrait être à l'origine d'une augmentation du temps de traitement des demandes.

En France, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) collabore avec l'EMA pour prendre en charge au local ses missions : évaluation des demandes de mise sur le marché, supervision des essais cliniques, suivi post-commercialisation, conseil aux promoteurs.

En France, l'ANSM est responsable de l'évaluation des CTA. Depuis le 1er janvier 2022, par le décret n°2021-1905, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), en collaboration avec le Comité d'expertise des utilisations confinées d'organismes génétiquement modifiés (CEUCO), prend en charge les aspects liés à la dissémination des OGM et conseille le gouvernement sur les biotechnologies concernées. Au sein de l'ANSM c'est la Commission nationale de l'expertise des produits de santé (CNEPS) qui est en charge des MTG. Elle est chargée de donner des avis sur les autorisations concernant les thérapies géniques et cellulaires, de répondre à des questions scientifiques sur ces sujets, et d'émettre des recommandations sur leur bon usage (106).

Chaque région du monde, en particulier les grandes puissances comme l'UE, le Japon et les États-Unis, a développé un cadre réglementaire spécifique pour encadrer l'utilisation de MTI en lien avec les exigences concernant les OGM. Elles varient considérablement d'un pays à l'autre créant des défis importants pour le développement et la mise en œuvre de thérapies géniques à l'échelle mondiale.

La réglementation se base sur le protocole de Carthagène. Adopté le 29 janvier 2000 par 170 États, c'est un accord international sur la biosécurité visant à protéger la biodiversité contre les risques des OGM. Il établit des procédures de notification préalable pour leurs mouvements

transfrontaliers. Ce protocole s'inscrit dans le cadre de la Convention sur la diversité biologique. Applicable aux médicaments biologiques comme les MTG, il vise à garantir leur sécurité pour l'environnement et la biodiversité. Il encourage la transparence et le partage d'information sur les risques liés à l'utilisation d'OGM dans les thérapies géniques tels que les vecteurs viraux (107).

Au Japon, la réglementation des OGM dans le cadre de la thérapie génique est également basée sur le Protocole de Carthagène sur la biosécurité. Les OGM sont classés en deux catégories : le type 1, pour les utilisations cliniques, et le type 2, pour les utilisations à des fins de production. La législation japonaise est gérée par le ministère de la Santé, du Travail et des Affaires sociales (MHLW) et inclut une évaluation des risques environnementaux.

Aux États-Unis, les thérapies géniques peuvent être classées ou non comme OGM, cette classification dépend de l'évaluation de la FDA. Si la FDA estime que l'impact environnemental est négligeable, ou dans le cadre d'essais cliniques, la thérapie génique peut être exemptée des exigences liées aux OGM, l'approche est décidée au cas par cas.

Dans ces trois régions, le début des essais cliniques pour les thérapies géniques est retardé par les demandes d'évaluation des risques, qui nécessitent un temps considérable, s'ajoutant aux procédures déjà longues pour les essais cliniques des thérapies classiques.

À titre d'exemple, pour les vecteurs AAV, il faut ajouter une évaluation supplémentaire portant sur la pathogénicité et la capacité de réplication ; pour l'utilisation de CRISPR, une évaluation supplémentaire des effets hors cible est cruciale.

Ces processus complexes et variés d'un pays à l'autre freinent la recherche et le développement clinique, en particulier dans un contexte de collaborations internationales tant au niveau des projets de recherche qu'à l'étape d'industrialisation.

En Europe, le temps moyen d'approbation des OGM dépasse généralement 100 jours, avec des variations notables selon les pays (par exemple, 125 jours en France et 237 jours en Allemagne). Cette disparité rend certaines régions plus attractives pour les industriels, ce qui entraîne une distribution inégale des thérapies géniques au sein de l'UE et à l'échelle mondiale (105).

Une étude co-publiée en 2021 par l'Alliance pour la médecine régénérative (ARM), la Fédération européenne des associations et industries pharmaceutiques (EFPIA) et l'Association Européenne des Bioindustries (EuropaBio) a montré l'impact positif de l'assouplissement des réglementations pour les vaccins contre la maladie à coronavirus 19 (COVID-19).

La situation actuelle rend l'UE moins attractive pour ces essais, retardant l'accès des patients à ces traitements. Malgré des efforts de la Commission européenne pour harmoniser les exigences, des difficultés persistent.

L'ARM, EFPIA, et EuropaBio appellent à un assouplissement des exigences sur les OGM pour ces thérapies, afin de simplifier le processus et accélérer le développement clinique. Une amélioration des processus réglementaires est essentielle pour soutenir le développement efficace de ces thérapies innovantes (108).

Certaines mesures sont mises en place pour alléger la charge administrative pour que l'UE reste une région attractive pour les essais cliniques.

Un exemple concret est l'abrogation du règlement n° 2001/20/CE encadrant les demandes d'essais cliniques, qui stipulait que les promoteurs devaient soumettre des demandes séparées à chaque autorité nationale et comité d'éthique. Depuis janvier 2023, les promoteurs peuvent soumettre une seule demande en ligne via la plateforme CTIS (système d'information sur les essais cliniques), ce qui facilite la conduite d'essais dans plusieurs pays européens.

En résumé, bien que les cadres réglementaires européens sur les médicaments de thérapie innovante visent à harmoniser leur usage tout en assurant leur sécurité pour les patients et l'environnement, leur complexité, notamment en ce qui concerne les OGM, et les disparités entre pays ralentissent encore le développement de ces traitements à l'échelle mondiale. Des initiatives comme la plateforme CTIS apportent une certaine fluidité au niveau européen, mais une harmonisation internationale des régulations, inspirée des progrès récents, pourrait permettre une meilleure accessibilité et un développement plus attractif de ces traitements.

5.2 Enjeux éthiques liés à la modification génétique

Le débat éthique autour de la thérapie génique, notamment avec l'avènement de technologies comme CRISPR/Cas9, soulève des questions profondes sur les limites de l'intervention humaine dans la modification du patrimoine génétique. La capacité de modifier le génome humain, qu'il s'agisse des cellules somatiques ou des cellules germinales, offre des opportunités considérables pour traiter des maladies génétiques graves. Cependant, elle suscite également des inquiétudes majeures sur le plan de la sécurité, de l'éthique et des conséquences à long terme, non seulement pour les individus concernés mais aussi pour l'humanité dans son ensemble.

Dans une publication de 2015 dans *Nature*, intitulée "Don't edit the human germ line", les auteurs mettent en garde contre les dangers potentiels de l'édition génétique de la lignée germinale. Ils soulignent que les outils actuels d'édition de gènes, bien qu'efficaces, n'ont pas été conçus pour être appliqués sur les cellules germinales ou les embryons (109).

Lors de l'édition de cellules germinales ou d'embryons, plusieurs préoccupations s'additionnent. Si la nucléase n'édite qu'une des deux copies du gène cible ou si la cellule se divise avant que la correction soit complète on observe une mosaïque génétique dont les effets précis ne sont pas prédictibles avant la naissance voir des années après.

De plus, la connaissance incomplète et la complexité des systèmes de régulation et d'interactions des gènes, aujourd'hui, ne permettent pas d'affirmer la sécurité d'une modification à ce stade de développement.

Cette inquiétude est renforcée par le fait que l'édition de la lignée germinale pourrait freiner le développement de ces technologies pour des applications thérapeutiques plus sûres, notamment sur les cellules somatiques.

D'autre part, en 2015, la conférence de Napa (Californie) a été organisée pour examiner l'utilisation prudente de CRISPR/Cas9 (110).

Cette conférence réunissait des experts de divers domaines, dont Jennifer A. Doudna, co-lauréate du prix Nobel de chimie en 2020 pour l'utilisation de CRISPR pour l'édition de gènes. Elle a mis en lumière l'urgence de réguler cette technologie pour modifier la lignée germinale. En effet, à partir de leurs travaux, avec Emmanuelle Charpentier, sur le développement d'un unique ARNg pour l'utilisation de CRISPR, tout chercheur possédant des connaissances en

biologie moléculaire peut désormais, à faible coût, modifier le génome. Les possibilités offertes par CRISPR/Cas9, bien que prometteuses, sont perçues comme une "pente glissante", surtout en raison des risques associés à l'imprévisibilité des résultats et à la sécurité des manipulations.

Néanmoins, dans le rapport du NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, USA) de 2019 (111), les chercheurs réitèrent leur soutien à l'édition des cellules somatiques à des fins thérapeutiques, tout en excluant les objectifs d'amélioration humaine. La modification de la lignée germinale, selon eux, ne devrait être envisagée qu'à des fins de recherche, et uniquement lorsque les connaissances scientifiques permettent une évaluation fiable du rapport bénéfice/risque.

À titre d'exemple, son utilisation restreinte à des fins de recherche pourrait approfondir notre compréhension des processus de développement embryonnaire et de créer de nouveaux modèles d'études *in vitro*.

En plus de son potentiel pour des applications cliniques, CRISPR/Cas9 joue un rôle crucial dans la recherche scientifique à divers niveaux. Cette technologie a ouvert de nouvelles possibilités pour la création de knock-out de gènes, ce qui permet non seulement d'approfondir notre compréhension fondamentale du fonctionnement et des interactions des gènes, mais aussi de développer des modèles animaux présentant des pathologies humaines. Ces modèles sont essentiels pour étudier les mécanismes sous-jacents de ces maladies et pour tester diverses thérapies.

Toutefois, le risque de dérives vers des pratiques eugénistes, où des modifications génétiques pourraient être envisagées non seulement pour traiter des maladies, mais également pour "améliorer" l'humain, soulève de sérieuses inquiétudes à un stade où les limites éthiques ont déjà été franchies, ce qui complique la définition de ce qui est acceptable et des implications sociales et morales qui en découlent.

En 2018, le monde scientifique a été profondément bouleversé par une révélation inattendue lors du second sommet international sur l'édition du génome humain à Hong Kong : l'affaire des « bébés CRISPR ».

Le chercheur chinois He Jiankui a annoncé la naissance de jumelles dont le génome avait été modifié au stade embryonnaire, avec CRISPR, pour les rendre résistantes au VIH. Il déclare avoir désactivé le gène CCR5, qui code pour un récepteur responsable de l'entrée du VIH dans les lymphocytes (112). Les jumelles surnommées Lulu et Nana seraient nées en octobre 2018.

Leur état de santé exact et les effets à long terme des modifications génétiques restent confidentiels.

Cette expérience, largement critiquée pour son non-respect des normes éthiques et pour son manque de transparence, a mis en lumière les dangers d'une course à la manipulation génétique sans garde-fou. Une enquête a immédiatement été ouverte sur ses travaux. En janvier 2019, il a été jugé coupable de « pratique illégale de la médecine » et condamné à 3 ans de prison (113). Les retombées de cette affaire ont cependant favorisé une coopération internationale accrue pour encadrer de manière plus stricte l'édition génétique des cellules germinales et des embryons.

Dans une interview accordée au journal *Les Echos* en 2023, He Jiankui déclare : « Les fillettes vivent une vie parfaitement normale, paisible et heureuse » et réfute avoir mis leur vie en danger. Lorsque cette question lui est posée, il répond : « Elles vivent heureuses, c'est ma réponse. » (114).

Cet épisode révèle qu'en dépit des principes éthiques et de bon sens, certains individus sont prêts à franchir des limites évidentes. Il est donc impératif d'établir des régulations strictes pour encadrer ces pratiques et éviter de telles dérives.

En médecine, les décisions sont prises selon un principe fondamental : l'évaluation du rapport bénéfice/risque et comment maximiser les bénéfices en minimisant les risques.

Dans ce cas précis, 3 grandes préoccupations limitent cette prise de décision :

La première préoccupation concerne les limites encore mal définies de la technologie CRISPR. En effet, CRISPR présente une efficacité qui peut être limitée, ce qui entraîne une balance où les risques peuvent dépasser les bénéfices. L'édition incomplète peut mener à du mosaïcisme. L'édition hors cible, rare mais possible, peut provoquer des effets dramatiques ; il est donc crucial d'évaluer ces effets et de se demander si les potentiels bénéfices de ces modifications justifient ces risques, excepté peut-être dans le cadre de traitements oncologiques en dernier recours.

La seconde préoccupation porte sur le futur des organismes modifiés. Il est important de se questionner sur les effets à très long terme de ces modifications génétiques. Quels seront les effets permanents et les conséquences pour les organismes concernés ? Au-delà de ces organismes, la transmission de ces modifications aux générations futures, notamment via des vecteurs viraux, soulève des questions importantes quant à leur impact entre individus.

Enfin, la troisième préoccupation, qui s'ajoute aux deux précédentes, concerne la complexité de la relation entre l'information génétique et le phénotype biologique. Même si l'objectif fonctionnel est atteint, notre compréhension actuelle des mécanismes physiologiques et pathologiques est complexe et reste incomplète. Des aspects tels que la régulation épigénétique, la synergie entre différents mécanismes physiologiques, les éléments de régulation distants et les facteurs environnementaux demeurent des domaines d'étude encore non entièrement résolus.

En conclusion, la thérapie génique et des outils comme CRISPR/Cas9 ouvrent des perspectives prometteuses pour la médecine, notamment dans le traitement de maladies jusqu'ici incurables, mais il est crucial de déterminer où doivent être fixées les limites de leur utilisation. Il est essentiel de garantir que ces technologies soient développées et appliquées de manière responsable, en tenant compte des risques pour les générations futures et en évitant les dérives potentielles vers des pratiques non éthiques. Le défi réside dans la nécessité de trouver un équilibre entre l'innovation scientifique et le respect des valeurs humaines fondamentales.

Conclusion

En conclusion, cette thèse a mis en lumière les avancées majeures dans le domaine de la thérapie génique, en particulier à travers l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9.

L'histoire de la thérapie génique, riche en découvertes et en défis, témoigne de son évolution depuis ses débuts jusqu'à sa concrétisation en tant qu'outil thérapeutique puissant. CRISPR/Cas9, en offrant une précision sans précédent dans l'édition génétique, a marqué un tournant en permettant des interventions directes et spécifiques sur le génome, transformant ainsi le paysage des traitements géniques.

L'étude de cas démontre que CRISPR/Cas9 est une approche prometteuse pour traiter les maladies dégénératives de la rétine causées par des mutations génétiques. Nous avons pu montrer que l'édition du gène *Sag* dans les photorécepteurs est possible, bien que le taux d'édition varie et présente encore des défis techniques.

L'analyse a révélé que la diffusion de Cas9 dans les cellules rétiniennes était limitée, ce qui pourrait expliquer le taux d'édition relativement faible. Les difficultés pourraient être dues à la morphologie des photorécepteurs ou à des problèmes liés à la dégradation des RNP.

Des améliorations sont nécessaires pour optimiser l'efficacité de cette approche. Les recherches futures devront se concentrer sur des méthodes pour améliorer la pénétration et la stabilité de Cas9 dans les cellules cibles afin de maximiser le potentiel thérapeutique de cette technologie.

Au-delà de cette application spécifique, CRISPR/Cas9 a montré des perspectives prometteuses dans plusieurs domaines cliniques majeurs. En oncologie, la technologie a facilité l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et amélioré les approches existantes, notamment les thérapies par cellules CAR-T. Dans le domaine des maladies neurodégénératives, CRISPR/Cas9 offre des opportunités pour développer des thérapies potentiellement curatives pour des pathologies jusque-là traitées uniquement de manière symptomatique. De même, dans le cadre des infections virales chroniques, CRISPR/Cas9 ouvre des perspectives intéressantes pour le traitement d'infections complexes telles que le VIH, le HPV et l'hépatite B, bien que des défis importants subsistent avant une application clinique généralisée.

Cependant, l'évolution rapide de cette technologie pose des défis réglementaires et éthiques considérables. Les cadres réglementaires actuels, bien que conçus pour protéger la

santé publique, présentent une complexité et un manque d'harmonisation qui freinent le développement uniforme des thérapies géniques à l'échelle mondiale. Une révision des réglementations, ainsi qu'une harmonisation internationale, pourraient favoriser une meilleure accessibilité et un développement plus cohérent de ces traitements.

Par ailleurs, les questions éthiques soulevées par l'édition génétique, en ce qui concerne les modifications du patrimoine génétique et leurs implications à long terme, doivent être abordées avec rigueur. Il est crucial de développer et d'appliquer ces technologies de manière responsable, en veillant à respecter les valeurs humaines fondamentales et à éviter les dérives potentielles.

En somme, la technologie CRISPR/Cas9 représente un progrès remarquable en médecine, offrant des solutions potentielles pour des maladies jusque-là incurables. Toutefois, pour maximiser ses bénéfices tout en minimisant les risques, il est essentiel de naviguer prudemment entre innovation scientifique et considérations éthiques, garantissant ainsi que ces avancées profitent pleinement à l'humanité.

La Doyenne de l'UFR de Pharmacie,
Mme Christiane FORESTIER

Le Président du jury,
M. Damien BALESTRINO

Bibliographie

1. Kraus LM. Formation of Different Hæmoglobins in Tissue Culture of Human Bone Marrow Treated with Human Deoxyribonucleic Acid. *Nature*. 1961 Dec;192(4807):1055–7.
2. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *Journal of Experimental Medicine*. 1944 Feb 1;79(2):137–58.
3. Szybalska EH, Szybalski W. GENETICS OF HUMAN CELL LINES, IV. DNA-MEDIATED HERITABLE TRANSFORMATION OF A BIOCHEMICAL TRAIT. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962 Dec;48(12):2026–34.
4. Friedmann T. A brief history of gene therapy. *Nat Genet*. 1992 Oct;2(2):93–8.
5. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv, Matyshevska OP, Danilova VM, Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv, Komisarenko SV, Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiyv; The discovery of genetic control of enzyme and virus synthesis: 1965 Nobel Prize Laureates André Lwoff, François Jacob, Jacques Monod. *UkrBiochemJ*. 2021 Sep 13;93(4):111–9.
6. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature*. 1970 Jun;226(5252):1209–11.
7. Temin HM, Mizutani S. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature*. 1970 Jun 27;226(5252):1211–3.
8. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972 Oct;69(10):2904–9.
9. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973 Nov;70(11):3240–4.
10. Jaenisch R, Mintz B. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974 Apr;71(4):1250–4.
11. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Experimental Biology and Medicine*. 1953 Dec 1;84(3):570–3.
12. Atchison RW, Casto BC, Hammon WMcD. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science*. 1965 Aug 13;149(3685):754–6.
13. Arber W. Restriction Endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1978 Feb;17(2):73–9.
14. Galzi JL. L'édition de gènes dans la découverte du médicament et l'innovation thérapeutique. *Med Sci (Paris)*. 2019 Apr;35(4):309–15.
15. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–21.
16. Cline MJ, Stang H, Mercola K, Morse L, Ruprecht R, Browne J, et al. Gene transfer in intact animals. *Nature*. 1980 Apr;284(5755):422–5.
17. Sun M. Cline Loses Two NIH Grants: Tough stance meant as a signal that infractions will not be tolerated. *Science*. 1981 Dec 11;214(4526):1220–1220.
18. Beutler E. the cline affair. *Molecular Therapy*. 2001 Nov;4(5):396–7.
19. Shimotohno K, Temin HM. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell*. 1981 Oct;26(1):67–77.

20. Wei CM, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 1981 Sep;39(3):935–44.
21. Tabin CJ, Hoffmann JW, Goff SP, Weinberg RA. Adaptation of a Retrovirus as a Eucaryotic Vector Transmitting the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene. *Molecular and Cellular Biology*. 1982 Apr 1;2(4):426–36.
22. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA⁻ SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):475–80.
23. Ferrari G, Rossini S, Giavazzi R, Maggioni D, Nobili N, Soldati M, et al. An in Vivo Model of Somatic Cell Gene Therapy for Human Severe Combined Immunodeficiency. *Science*. 1991 Mar 15;251(4999):1363–6.
24. Wilson JM. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2009 Apr;96(4):151–7.
25. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao G ping, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2003 Sep;80(1–2):148–58.
26. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile GDS, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science*. 2000 Apr 28;288(5466):669–72.
27. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008 Sep 2;118(9):3132–42.
28. Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nat Biotechnol*. 2004 Jan;22(1):3–4.
29. Zhang WW, Li L, Li D, Liu J, Li X, Li W, et al. The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad- p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Human Gene Therapy*. 2018 Feb;29(2):160–79.
30. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*. 2010 Sep;467(7313):318–22.
31. Rattananon P, Anurathapan U, Bhukhai K, Hongeng S. The Future of Gene Therapy for Transfusion-Dependent Beta-Thalassemia: The Power of the Lentiviral Vector for Genetically Modified Hematopoietic Stem Cells. *Front Pharmacol*. 2021 Oct 1;12:730873.
32. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al. Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011 Dec 22;365(25):2357–65.
33. Nathwani AC, Reiss U, Tuddenham E, Chowdary P, McIntosh J, Riddell A, et al. Adeno-Associated Mediated Gene Transfer for Hemophilia B:8 Year Follow up and Impact of Removing ‘Empty Viral Particles’ on Safety and Efficacy of Gene Transfer. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):491–491.
34. Burnett JR, Hooper AJ. Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther*. 2009 Dec;11(6):681–91.
35. Ylä-Herttuala S. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Molecular Therapy*. 2012 Oct;20(10):1831–2.
36. Gangi A, Zager JS. The safety of talimogene laherparepvec for the treatment of advanced melanoma. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2016 Dec 28;1–5.

37. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020 Feb 28;367(6481):eaba7365.
38. Reardon S. First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. *Nature*. 2016 Jun 22;nature.2016.20137.
39. Pierce EA, Aleman TS, Jayasundera KT, Ashimatey BS, Kim K, Rashid A, et al. Gene Editing for CEP290 -Associated Retinal Degeneration. *N Engl J Med*. 2024 Jun 6;390(21):1972–84.
40. Parums DV. Editorial: First Regulatory Approvals for CRISPR-Cas9 Therapeutic Gene Editing for Sickle Cell Disease and Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *Med Sci Monit* [Internet]. 2024 Feb 21 [cited 2024 Aug 27];30. Available from: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/944204>
41. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987 Dec;169(12):5429–33.
42. Mojica FJM, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified Pst I sites. *Molecular Microbiology*. 1993 Aug;9(3):613–21.
43. Gostimskaya I. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry Moscow*. 2022 Aug;87(8):777–88.
44. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol*. 2005 Feb;60(2):174–82.
45. She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, et al. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jul 3;98(14):7835–40.
46. Jansen Ruud, Embden JanDAV, Gaastra Wim, Schouls LeoM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. 2002 Mar;43(6):1565–75.
47. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):55–61.
48. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709–12.
49. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science*. 2014 Mar 14;343(6176):1247997.
50. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2014 Feb;156(5):935–49.
51. Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*. 2008 Aug 15;321(5891):960–4.
52. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2012 Sep 25 [cited 2024 Aug 26];109(39). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1208507109>
53. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009 Mar 1;155(3):733–40.

54. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011 Mar;471(7340):602–7.
55. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. Margolin W, editor. *J Bacteriol* [Internet]. 2018 Apr [cited 2024 Aug 26];200(7). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.00580-17>
56. Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*. 2020 Jul 1;38(7):824–44.
57. Xue C, Greene EC. DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *Trends in Genetics*. 2021 Jul;37(7):639–56.
58. Ain QU, Chung JY, Kim YH. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *Journal of Controlled Release*. 2015 May;205:120–7.
59. Martin F, Sánchez-Hernández S, Gutiérrez-Guerrero A, Pinedo-Gomez J, Benabdellah K. Biased and Unbiased Methods for the Detection of Off-Target Cleavage by CRISPR/Cas9: An Overview. *IJMS*. 2016 Sep 8;17(9):1507.
60. Manghwar H, Li B, Ding X, Hussain A, Lindsey K, Zhang X, et al. CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Advanced Science*. 2020 Mar;7(6):1902312.
61. Vakulskas CA, Behlke MA. Evaluation and Reduction of CRISPR Off-Target Cleavage Events. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2019 Aug;29(4):167–74.
62. Veleri S, Lazar CH, Chang B, Sieving PA, Banin E, Swaroop A. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. *Disease Models & Mechanisms*. 2015 Feb 1;8(2):109–29.
63. Swaroop A, Kim D, Forrest D. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Aug;11(8):563–76.
64. Sullivan LS, Bowne SJ, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Lewis RA, et al. Prevalence of Disease-Causing Mutations in Families with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa: A Screen of Known Genes in 200 Families. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jul 1;47(7):3052.
65. Athanasiou D, Aguila M, Bellingham J, Li W, McCulley C, Reeves PJ, et al. The molecular and cellular basis of rhodopsin retinitis pigmentosa reveals potential strategies for therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2018 Jan;62:1–23.
66. Pulman J, Sahel JA, Dalkara D. New Editing Tools for Gene Therapy in Inherited Retinal Dystrophies. *The CRISPR Journal*. 2022 Jun 1;5(3):377–88.
67. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014 Apr;32(4):347–55.
68. Han IC, Burnight ER, Ulferts MJ, Worthington KS, Russell SR, Sohn EH, et al. Helper-Dependent Adenovirus Transduces the Human and Rat Retina but Elicits an Inflammatory Reaction When Delivered Subretinally in Rats. *Human Gene Therapy*. 2019 Nov 1;30(11):1371–84.
69. Hanlon KS, Kleinstiver BP, Garcia SP, Zaborowski MP, Volak A, Spirig SE, et al. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun*. 2019 Sep 30;10(1):4439.
70. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med*. 2019 Feb;25(2):229–33.
71. Puppo A, Cesi G, Marrocco E, Piccolo P, Jacca S, Shayakhmetov DM, et al. Retinal transduction profiles by high-capacity viral vectors. *Gene Ther*. 2014 Oct;21(10):855–65.

72. Kim K, Park SW, Kim JH, Lee SH, Kim D, Koo T, et al. Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration. *Genome Res.* 2017 Mar;27(3):419–26.
73. Holmgaard AB, Askou AL, Jensen EG, Alsing S, Bak RO, Mikkelsen JG, et al. Targeted Knockout of the Vegfa Gene in the Retina by Subretinal Injection of RNP Complexes Containing Cas9 Protein and Modified sgRNAs. *Molecular Therapy.* 2021 Jan;29(1):191–207.
74. Staahl BT, Benekareddy M, Coulon-Bainier C, Banfal AA, Floor SN, Sabo JK, et al. Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Biotechnol.* 2017 May;35(5):431–4.
75. Botto C, Rucli M, Tekinsoy MD, Pulman J, Sahel JA, Dalkara D. Early and late stage gene therapy interventions for inherited retinal degenerations. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2022 Jan;86:100975.
76. Wensel TG, Potter VL, Moye A, Zhang Z, Robichaux MA. Structure and dynamics of photoreceptor sensory cilia. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 2021 Sep;473(9):1517–37.
77. Chen G, Abdeen AA, Wang Y, Shahi PK, Robertson S, Xie R, et al. A biodegradable nanocapsule delivers a Cas9 ribonucleoprotein complex for in vivo genome editing. *Nat Nanotechnol.* 2019 Oct;14(10):974–80.
78. Feng Y, Sassi S, Shen JK, Yang X, Gao Y, Osaka E, et al. Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system. *Journal Orthopaedic Research.* 2015 Feb;33(2):199–207.
79. Lian YF, Yuan J, Cui Q, Feng QS, Xu M, Bei JX, et al. Upregulation of KLHDC4 Predicts a Poor Prognosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma. Huen MSY, editor. *PLoS ONE.* 2016 Mar 31 ;11(3):e0152820.
80. Hu W, Zi Z, Jin Y, Li G, Shao K, Cai Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Mar;68(3):365–77.
81. Mintz RL, Lao Y, Chi C, He S, Li M, Quek CH, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis to validate the synergy between PARP1 inhibition and chemotherapy in BRCA1 -mutated breast cancer cells. *Bioengineering & Transla Med.* 2020 Jan;5(1):e10152.
82. Olivieri M, Durocher D. Genome-scale chemogenomic CRISPR screens in human cells using the TKOv3 library. *STAR Protocols.* 2021 Mar;2(1):100321.
83. Zeng Z, Zhang X, Jiang CQ, Zhang YG, Wu X, Li J, et al. Identifying novel therapeutic targets in gastric cancer using genome-wide CRISPR-Cas9 screening. *Oncogene.* 2022 Apr 1;41(14):2069–78.
84. Krolak-Salmon P. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer : le rôle central de la plaque amyloïde et de la protéine Tau. *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie.* 2020 Dec;20(120):120S2–6.
85. Sun J, Carlson-Stevermer J, Das U, Shen M, Delenclos M, Snead AM, et al. CRISPR/Cas9 editing of APP C-terminus attenuates β -cleavage and promotes α -cleavage. *Nat Commun.* 2019 Jan 3;10(1):53.
86. T Rohn T, Kim N, F Isho N, M Mack J. The Potential of CRISPR/Cas9 Gene Editing as a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* [Internet]. 2018 [cited 2024 Mar 19];08(03). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/the-potential-of-crisprcas9-gene-editing-as-a-treatment-strategy-for-alzheimers-disease-2161-0460-1000439-102679.html>
87. McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review. *Euro J of Neurology.* 2018 Jan;25(1):24–34.

88. Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong HE, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2017 Jun 19;127(7):2719–24.
89. World Health Organization (2023). HIV factsheet, <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids#cms>
90. Herskovitz J, Hasan M, Patel M, Kevadiya BD, Gendelman HE. Pathways Toward a Functional HIV-1 Cure: Balancing Promise and Perils of CRISPR Therapy. In: Poli G, Vicenzi E, Romerio F, editors. *HIV Reservoirs* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2022 [cited 2024 Aug 30]. p. 429–45. (Methods in Molecular Biology; vol. 2407). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1871-4_27
91. Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*. 2013 Aug 26;3(1):2510.
92. Herskovitz J, Hasan M, Patel M, Blomberg WR, Cohen JD, Machhi J, et al. CRISPR-Cas9 Mediated Exonic Disruption for HIV-1 Elimination. *EBioMedicine*. 2021 Nov;73:103678.
93. Bhowmik R, Chaubey B. CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1. *AIDS Res Ther*. 2022 Dec 1;19(1):58.
94. Mancuso P, Chen C, Kaminski R, Gordon J, Liao S, Robinson JA, et al. CRISPR based editing of SIV proviral DNA in ART treated non-human primates. *Nat Commun*. 2020 Nov 27;11(1):6065.
95. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Science*. 2007 Oct;98(10):1505–11.
96. Yoshiba T, Saga Y, Urabe M, Uchibor R, Matsubara S, Fujiwara H, et al. CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Dec 10 [cited 2024 Mar 19]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9815>
97. World Health Organization (2024). Hepatitis B factsheet, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
98. Bartosh UI, Dome AS, Zhukova NV, Karitskaya PE, Stepanov GA. CRISPR/Cas9 as a New Antiviral Strategy for Treating Hepatitis Viral Infections. *IJMS*. 2023 Dec 26;25(1):334.
99. Stone D, Long KR, Loprieno MA, De Silva Felixge HS, Kenkel EJ, Liley RM, et al. CRISPR-Cas9 gene editing of hepatitis B virus in chronically infected humanized mice. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2021 Mar;20:258–75.
100. Règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj/fra>
101. Directive 2003/63/CE de la Commission, du 25 juin 2003, modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. [cited 2024 Oct 9]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX%3A32003L0063>
102. Committee for Advanced Therapies (CAT) [Internet]. [cited 2024 Oct 9]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-advanced-therapies-cat>
103. Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain [Internet]. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000518889>

104. RÈGLEMENT (UE) No 536/2014 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 avril 2014 relatif aux essais cliniques de médicaments à usage humain et abrogeant la directive 2001/20/CE (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0536>
105. Tajima G, Huh S, Schmidt NA, Macdonald JC, Fleischmann T, Wonnacott KM. Impact of genetically modified organism requirements on gene therapy development in the EU, Japan, and the US. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2022 Sep;26:74–83.
106. Décret n° 2021-1905 du 30 décembre 2021 pris en application de l'ordonnance n° 2021-1325 du 13 octobre 2021 réformant l'évaluation des biotechnologies et simplifiant la procédure applicable aux utilisations confinées d'organismes génétiquement modifiés présentant un risque nul ou négligeable [Internet]. [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000044638030>
107. Gaugitsch H. Under the Cartagena Protocol on Biosafety – Where is the Roadmap for Risk Assessment Taking Us? *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2016 Jan 21 [cited 2024 Aug 26];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00212/abstract>
108. Alliance for Regenerative Medicine (ARM), European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA), European Association for Bioindustries (EuropaBio), Beattie S, Hubert A, Morrell J, et al. Call for More Effective Regulation of Clinical Trials with Advanced Therapy Medicinal Products Consisting of or Containing Genetically Modified Organisms in the European Union. *Human Gene Therapy*. 2021 Oct 1;32(19–20):997–1003.
109. Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015 Mar;519(7544):410–1.
110. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):36–8.
111. Brokowski C, Adli M. CRISPR Ethics: Moral Considerations for Applications of a Powerful Tool. *Journal of Molecular Biology*. 2019 Jan;431(1):88–101.
112. Cyranoski D. The CRISPR-baby scandal: what's next for human gene-editing. *Nature*. 2019 Feb;566(7745):440–2.
113. Wang D, Wang K, Cai Y. An overview of development in gene therapeutics in China. *Gene Ther*. 2020 Aug;27(7–8):338–48.
114. Schaeffer F. Bébés OGM : les confidences du « Frankenstein » chinois. *Les Echos* [Internet]. 2023 Nov 15 [cited 2024 Aug 2]; Available from: <https://www.lesechos.fr/monde/chine/bebes-ogm-les-confidences-du-frankensteinchinois-2028948>

Annexe : Matériels et méthodes

ARN guide :

L'ARNg ciblant Sag a été conçu à l'aide du site CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>). L'ARNg ciblant Vegfa, publié par Kim et al. (2017), est utilisé comme un contrôle positif du fait de sa bonne efficacité d'édition dans le RPE décrite dans cette étude. (Tableau I)

Nom	Gène ciblé	Séquence
ARNg SAG	SAG	CCTGGCAGTTCTTCATGTCT
ARNg VEGFA	VEGFA	CTCCTGGAAGATGTCCACCA

Tableau I : Séquence des différents ARN guides utilisés.

Complexation des ribonucléoprotéines :

La protéine *Streptococcus pyogenes* Cas9 utilisée dans cette étude a été fournie par le laboratoire Structure et Instabilité des Génomes (MNHN Paris – dirigée par le Dr Jean-Paul Concordet) et produite en *E. coli*.

La protéine Cas9 est complexée avec son ARNg directement avant son transfert dans l'œil. Le ARNg est d'abord dilué dans une solution d'HEPES/KCl, la Cas9 est ensuite ajoutée pour atteindre un ratio molaire de ARNg Cas9 de 1 : 1 (concentration finale de 30 μ M) ; puis incubé à température ambiante pendant 5 minutes.

Injections sous rétinienne chez la souris :

Des souris sauvages C57BL/6J (Janvier Labs) sont utilisées dans cette étude.

Les injections sont réalisées sous anesthésie par inhalation d'isoflurane. Ensuite, leurs pupilles sont dilatées par du néosynéphrine 8% ; les injections sous-rétiniennes de 2 μ L peuvent ensuite être réalisées. 3, 7 ou 30 jours après l'injection, les souris sont sacrifiées par inhalation de CO₂ puis dislocation cervicale.

Les injections et sacrifices ont été effectués par ma maître de stage le Dr Juliette Pulman, j'ai ensuite réalisé toutes les expériences en aval.

Extraction de la rétine et du RPE :

Rétine : Après dissection, les rétines sont détruites manuellement à l'aide d'un micro-pilon. L'ADN et l'ARN des rétines sont ensuite extraits avec le kit Quick DNA/RNA Microprep Plus Kit (Zymo, D7005). Les protéines sont récupérées en fin de protocole et précipitées dans de l'acétone glacial (-20°C), puis centrifugées et seront resuspendues pour l'analyse protéique. L'ARN est transmis à d'autres membres de l'équipe pour analyses ultérieures.

RPE : L'ADN du RPE est extrait par le kit NucleoSpin Tissue DNA Kit (Macherey-Nagel, 740952.250).

Extraction ADN, ARN et protéines :

Après dissection les rétines sont détruites manuellement à l'aide d'un micro-pilon. L'ADN et l'ARN des rétines sont ensuite extraits avec le kit Quick DNA/RNA Microprep Plus Kit (Zymo, D7005). Les protéines sont récupérées en fin de protocole et précipitées dans de l'acétone glacial (-20°C), puis centrifugées et seront suspendues pour l'analyse protéique.

L'ARN est transmis à d'autres membres de l'équipe pour analyses ultérieures. L'ADN du RPE est extrait par le kit NucleoSpin Tissue DNA Kit (Macherey-Nagel, 740952.250).

Analyse génomique :

L'analyse génomique permet de quantifier la quantité d'indels générée dans la séquence de Sag ou Vegfa.

L'ADN des rétines et du RPE est amplifié par PCR avec des amorces bordant le site ciblé par les ARNg de Sag ou Vegfa. (Tableau II) Les PCR ont été réalisées avec le kit PrimerStar GXL DNA Polymerase (R050A, Takara) dans un volume total de 50µL ; dont 10µL de 5X PrimeSTAR CXL Buffer, 0,75µL de chaque amorce, 1µL de PrimeSTAR CXL DNA Polymerase, 150ng d'ADN génomique et la quantité nécessaire d'eau pure pour arriver à 50µL. L'amplification a été faite par un thermocycleur dans les conditions suivantes : 30 cycles composés de 10s à 98°C puis 15s à 60°C et 20s à 68°C. La vérification de la PCR se fait par migration sur gel d'agarose (16500-500, Invitrogen) à 2% durant 45 minutes sous 90V. Les échantillons sont ensuite purifiés par le kit NucleoSpin PCR and Gel Purification Kit (Macherey-Nagel, 740609.250).

Les échantillons sont envoyés au Centre de recherche sur l'ADN du Massachusetts General Hospital pour y être séquencés par séquençage haut débit de nouvelle génération (NGS) pour quantifier les indels. La quantification des indels a été faite à l'aide de l'outil internet CRISPResso2 ([http : crispresso.pinellolab.parteners.org](http://crispresso.pinellolab.parteners.org))

Nom	Séquence
SAG forward	GCTCTGTGCGGTTACTGATC
SAG reverse	AGTGGAAATAAGCTGGTAATTTGCA
VEGFA forward	TCATGGATGTCTACCAGCGA
VEGFA reverse	AATGCCCTCCTTGTACCAC

Tableau II : Séquences des différents amorces utilisés pour la PCR.

Analyse protéique :

L'analyse protéique permet d'évaluer le niveau d'expression protéique relatif de Sag entre les différents groupes : injections contrôle de tampon, injections de la Cas9 ciblant Sag ou ciblant Vegfa.

Après leur extraction, les protéines sont resuspendues dans un tampon de lyse par sonication. Il est composé d'HEPES (H3375, Sigma) à 10mM, NaCl (S5886, Sigma) à 100mM, EDTA (15575-038, Invitrogen) 2mM, NP-40 (74385, Sigma) 0,5% et qsp d'eau pure.

Les protéines totales sont quantifiées par le kit de dosage protéique Pierce™ Rapid Gold BCA (A53227 Thermo Fisher Scientific). Ensuite, les protéines sont séparées par migration sur un gel 7,5% Mini-PROTEAN® TGX Stain- Free (15 puits, 15µL, 4568026 BioRad), puis sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (1704159, BioRad) par Trans Blot Turbo Transfer System (1704150, BioRad).

La membrane est fixée par incubation dans une solution de TBST (Tris-buffered saline et 0,1% de Tween) et de 5% de lait écrémé en poudre (Régilait, Lait écrémé) pendant 1h à température ambiante. Elle est incubée avec les anticorps primaires à 4°C toute la nuit. La membrane est marquée avec un anticorps anti-SAG (rabbit, 1 : 200, PA1-731 Thermo Fisher Scientific). La membrane est lavée trois fois au TBST et incubée avec l'anticorps secondaire HRP IgG (donkey anti-rabbit 1 : 10 000, 32260 Invitrogen) pendant 1h à température ambiante. Un dernier lavage est réalisé au TBST.

L'imagerie se fait par chimiluminescence (Fusion FX7) avec le kit de révélation ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, Cytiva).

Le processus est répété, depuis l'étape de blocage, avec le second anticorps primaire, l'anticorps anti- β -caténine (rabbit, 1 : 2000, C2206, Sigma). La β -caténine est une protéine codée par un gène de ménage, son marquage est le contrôle de charge. La membrane est à nouveau révélée et imagée.

Analyse histologique :

Avant la dissection, une étape de fixation est nécessaire. Celle-ci se fait dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 1h. Les yeux sont ensuite nettoyés par 3 lavages au PBS 1X. Les yeux sont incubés dans une solution de sucrose 10% durant 1h puis dans une solution de sucrose 30% toute la nuit. Après la dissection, les yeux sont inclus dans du milieu d'enrobage (TFM-5 (tissue freezing medium), Microm Microtech) et conservés à -20°C. Des coupes de 12 μ m ont été réalisées avec un cryostat (Leica CM3050S) à -20°C.

Pour l'immunomarquage, les coupes sont d'abord lavées avec du PBS pour retirer le milieu d'enrobage puis bloquées avec une solution de PBS 1X, albumine de sérum bovin 1%, Triton 0,1% et Tween 0,1%, pendant 1h à température ambiante. Ensuite, les coupes sont incubées avec les anticorps primaires à 4°C toute la nuit. L'anticorps anti-recoverine (lapin, polyclonal, 1 : 3000, MAB 5585 Millipore) cible la recoverine, une protéine spécifique des photorécepteurs. Le second anticorps primaire utilisé est l'anticorps anti-Cas9 (souris, polyclonal, 1 : 1000, A01935-40 GenScript). Après une étape de lavage au PBS, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 2h à température ambiante à l'abri de la lumière. Les anticorps utilisés sont l'âne anti-lapin Alexa Fluor™ 488 (1 : 2000, A21206 Thermo Fisher Scientific) et l'âne anti-souris Alexa Fluor™ 546 (1 : 500, A10040 Thermo Fisher Scientific). Après l'incubation, trois lavages au PBS 1X sont effectués, dont un de 10 minutes contenant le DAPI (1 : 2000). Les coupes ont été imagées avec un microscope confocal (Olympus Fluoview FV1000) au grossissement X40.

Serment de Galien

En présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Résumé

La technologie CRISPR/Cas9, en tant qu'outil révolutionnaire d'édition génomique, marque une avancée majeure dans le domaine de la thérapie génique. Depuis les premières explorations dans les années 1960, l'idée de corriger des anomalies génétiques a pris une ampleur considérable, permettant d'envisager des traitements pour un large éventail de pathologies. CRISPR/Cas9, grâce à sa précision, sa flexibilité et son efficacité, s'est rapidement imposée comme une méthode de choix dans ce domaine. Cette thèse explore non seulement l'histoire de la thérapie génique, mais aussi les perspectives offertes par cette technologie innovante, avec une étude de cas sur une application clinique spécifique, tout en abordant la réglementation et les enjeux éthiques que soulève son utilisation.

La première partie de ce travail revient sur l'évolution de la thérapie génique, en se concentrant sur l'émergence de CRISPR/Cas9. Ce système, basé sur un mécanisme de défense bactérien, permet de cibler et de modifier des séquences spécifiques de l'ADN, offrant des possibilités d'intervention thérapeutique d'une précision sans précédent. Contrairement aux méthodes précédentes, CRISPR/Cas9 peut être facilement programmé pour cibler des mutations spécifiques, ouvrant la voie à des traitements potentiellement curatifs.

Une des applications prometteuses de cette technologie est illustrée par l'étude de cas présentée dans cette thèse, centrée sur les dystrophies rétiniennes héréditaires, et plus particulièrement la rétinite pigmentaire autosomique dominante. Cette maladie neurodégénérative de la rétine, causée par des mutations gain de fonction, entraîne une perte progressive de la vision et constitue un défi majeur pour les thérapies actuelles. Les travaux menés dans le cadre de cette étude montrent que CRISPR/Cas9 peut être utilisé pour inactiver les gènes responsables de la production de protéines toxiques dans les photorécepteurs, offrant ainsi une perspective d'intervention innovante.

Des expériences menées sur des modèles murins ont permis de démontrer que l'édition du génome est réalisable dans les photorécepteurs, bien que des défis subsistent, notamment concernant l'administration efficace de la thérapie. L'un des obstacles majeurs identifiés est la diffusion limitée de la protéine Cas9 dans les cellules cibles, ce qui impacte le taux d'édition génétique. L'efficacité de cette méthode reste donc perfectible, et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la pénétration et la stabilité de la protéine dans les cellules cibles. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent ouvrent la voie à des

avancées prometteuses dans le traitement des dystrophies rétinienne, un domaine où aucune solution curative existe actuellement.

Au-delà de cette étude de cas, CRISPR/Cas9 offre également des perspectives dans d'autres domaines thérapeutiques. En oncologie, la technologie permet de cibler avec précision des mutations spécifiques responsables de cancers, facilitant ainsi le développement de traitements plus efficaces, notamment dans le cadre des thérapies CAR-T. De plus, CRISPR/Cas9 offre des opportunités inédites dans le traitement des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Huntington, qui jusqu'à présent ne pouvaient être abordées que de manière symptomatique. Dans ces contextes, l'édition génomique pourrait permettre de s'attaquer directement aux causes sous-jacentes de ces pathologies.

En virologie, CRISPR/Cas9 représente une piste prometteuse dans le traitement d'infections virales chroniques telles que le VIH, le HPV ou l'hépatite B. Cette technologie pourrait offrir des solutions pour éliminer les réservoirs viraux cachés dans l'organisme, un défi auquel les traitements actuels peinent à répondre.

Cependant, malgré ces avancées, l'application clinique de CRISPR/Cas9 dans ces différents domaines reste limitée par des défis techniques et la nécessité de s'assurer de la sécurité à long terme.

Parallèlement aux opportunités thérapeutiques, l'utilisation de CRISPR/Cas9 soulève des enjeux éthiques et réglementaires majeurs. Modifier le génome humain pose des questions fondamentales sur les limites de l'intervention humaine dans la nature. Les inquiétudes portent sur la possibilité de dérives, telles que l'utilisation de la technologie à des fins non médicales, comme l'amélioration des caractéristiques humaines, ou les risques associés à des modifications imprévues du génome. De plus, la complexité des régulations actuelles, nécessaires pour encadrer ces innovations et variant d'un pays à l'autre, peut représenter un frein à l'attractivité du développement de telles thérapies.

Ainsi, cette thèse souligne la nécessité d'un équilibre entre l'innovation scientifique et la prudence éthique. Alors que CRISPR/Cas9 représente une avancée sans précédent dans le domaine de la médecine, offrant des solutions potentielles pour des maladies jusqu'alors incurables, son utilisation doit être encadrée par des principes solides afin d'éviter des conséquences imprévues et potentiellement dangereuses pour l'humanité.

En conclusion, CRISPR/Cas9, en transformant radicalement le paysage de la thérapie génique, ouvre la voie à des avancées majeures dans le traitement de nombreuses maladies, en particulier les pathologies génétiques, les cancers, les maladies neurodégénératives et les infections virales chroniques. Toutefois, pour maximiser les bénéfices de cette technologie et en minimiser les risques, il est essentiel d'aborder les défis techniques, éthiques et réglementaires qu'elle pose avec rigueur et responsabilité. Si ces enjeux sont bien maîtrisés, CRISPR/Cas9 pourrait véritablement révolutionner la médecine moderne et permettre des progrès spectaculaires dans la prise en charge de maladies jusqu'ici incurables.

Mots clés :

Thérapie génique, CRISPR/Cas9, Edition génomique, Rétinite pigmentaire, Applications cliniques, Réglementation, Éthique