

Comment des grenouilles peuvent nous aider à faire évoluer la médecine ?

La découverte des cellules souches

En 1981, des chercheurs ont découvert des cellules très spéciales, à partir d'embryons de souris, qu'on appellera quelques temps après, les cellules souches embryonnaires. Elles possèdent des caractéristiques qui ont permis aux chercheurs de réaliser des prouesses en génétique. En effet, ces cellules sont « totipotentes », c'est à dire qu'elles sont donc capables de se différencier en tous les types de cellules qui composent un organisme adulte (Inserm) et peuvent avoir une croissance quasi-illimitée ! Grâce à ces cellules, on peut transférer des mutations génétiques, réalisées en laboratoire avec la technique de la recombinaison homologue, à des organismes vivants.

La recombinaison homologue

Mais qu'est ce que la recombinaison homologue ? Pour comprendre ce phénomène, il faut avant tout garder à l'esprit que l'ADN dont nous parlons est un ADN double brin, c'est à dire composé de deux séquences de nucléotides, qui sont complémentaires. La recombinaison homologue est

le fait d'insérer, après cassure de cet ADN double brin, de l'ADN double brin, pouvant provenir d'un autre organisme, en place et lieu de la cassure. Cette technique a permis bon nombre de grandes découvertes scientifiques.

Malheureusement, cette technique ne peut s'appliquer que sur des cellules souches embryonnaires. Or ces cellules sont disponibles chez un nombre très restreint d'espèces, comme la souris ou le rat. Comme elles sont rares, leur utilisation représente un coût très conséquent.

La révolution des ciseaux biomoléculaires

Mais ça, c'était avant. En effet, depuis une dizaine d'années, des techniques révolutionnaires pour réaliser des mutations génétiques ont vu le jour. Pourquoi révolutionnaires ? Car elles ne nécessitent pas d'être réalisées sur des cellules souches ! De plus, elles reposent sur des assemblages moléculaires relativement simples, facilement réalisables en laboratoire, et très spécifiques pour le segment d'ADN que l'on veut cibler ! Parmi ces techniques, on retrouve la méthode CRISPR/Cas 9.

Zoom sur CRISPR-Cas 9

La méthode CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) est retrouvée en milieu naturel chez les bactéries *Streptococcus pyogenes* qui utilisent une nucléase appelée Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) pour détecter et couper l'ADN de bactériophages. La Cas9 est une endonucléase, c'est à dire une enzyme qui peut couper

les acides nucléiques, qui constituent l'ADN. Elle utilise une séquence d'ARN (autre forme d'acides nucléiques) dite « guide » pour former une complémentarité avec les paires de bases de la séquence cible d'ADN, et ainsi introduire une cassure double brin en un locus spécifique ¹.

Et les grenouilles dans tout ça ?

Ça arrive, ça arrive. Vous ne le savez peut-être pas, mais l'un des modèles très utilisés en biologie, notamment en biologie cellulaire et développementale, est le xénope. Il s'agit d'une espèce d'amphibien, originaire d'Afrique du Sud. Il possède des caractéristiques très intéressantes pour en faire un modèle de manipulation génétique. En effet, ses organes internes, tels que le pancréas, les reins ou le thymus, sont similaires à ceux des mammifères. De plus, ses œufs sont plutôt gros, permettant des ablations par exemple, son génome, entièrement connu, est relativement petit, si l'on prend le xénope *X.tropicalis*, de 1,7 . 10⁹ pb (paire de base). Un individu devient sexuellement mature à 4 mois (ce qui est peu), et « l'architecture » de son génome est comparable à celui de l'homme, ce qui est pratique pour le manipuler ².

Les progrès réalisés grâce au Xénope

Toutes ces caractéristiques font donc du xénope un excellent modèle, notamment en génétique. En effet, ces dernières années, les chercheurs ont réussi divers exploits, en utilisant les techniques d'ingénierie génétiques dont nous avons

parlé avant. L'utilisation de la nucléase Cas 9, avec sa séquence d'ARN guide, a par exemple permis une mutation génétique ciblée, extrêmement précise, sur les 10 gènes de *X.tropicalis* étudiés. Les % de réussite allaient de 45 à 100 %. Pour que cela soit possible, ils ont poussés leurs recherches sur des mutations ponctuelles au niveau de deux locus³ ce qui a entraîné une évaluation phénotypique (des caractéristiques extérieures) directe des embryons de xénope plus simple. De plus, leurs travaux ont permis de mettre en exergue que les mutations induites à la première génération de cobaye se retrouvaient à la génération suivante : la transmission des mutations serait donc très efficace en utilisant ce processus. Enfin, l'utilisation de CRISPR sur des modèles de xénope quelques heures après la fécondation permet, en injectant directement la protéine Cas9 et non son ARNm (car moins toxique), de reproduire les différents phénotypes, sains et malades⁴. Cette technique d'édition du génome ouvre donc la voie de compréhension pour repousser toujours plus les limites de la médecine moderne.

Les challenges à relever !

Si les chercheurs ont d'ores et déjà compris et maîtrisé certains mécanismes, il reste quelques limites attenantes à ces techniques. Par exemple, il est difficile de prévoir si l'on va insérer un segment d'ADN uniquement là où l'on a voulu. En effet, il se peut, quelque part ailleurs dans la molécule d'ADN cible, qu'une séquence ressemblant à celle que l'on

veut couper, soit reconnue par la machinerie CRISPR-Cas9, et donc clivée. C'est ce qu'on appelle des « off-target ». Les mutations engendrées peuvent être muettes, et dans ce cas ne pas poser de problème. Mais si ces mutations sont réalisées au niveau d'un gène de fonction par exemple, elle peuvent avoir des conséquences fortement délétères, et/ou être transmises à la future génération. La taille des segments que l'on veut insérer peut potentiellement représenter une limite. Il est pour l'heure assez compliqué d'insérer des segments dont la taille est supérieure à 7kb, ce qui restreint le nombre de gène que l'on peut étudier/modifier⁵. Ce ne sont que des challenges que les chercheurs devront surmonter dans les prochaines années afin de servir au mieux la cause médicale !

Pour conclure

En conclusion, la découverte des techniques d'édition du génome a totalement révolutionné le monde de la génétique, auparavant cantonné à la recombinaison homologue sur des cellules souches, difficiles à cultiver, et disponibles pour un nombre restreint de modèles animaux. La technique CRISPR/Cas 9 se révèle aujourd'hui être la plus prometteuse, permettant un ciblage spécifique à faible coûts, adaptable en méthode de routine dans la plupart des laboratoires, même petits. Les différents travaux effectués grâce à ces techniques, en particulier sur le modèle du xénope, largement utilisé en biologie cellulaire et développementale, laissent entrevoir un avenir remplis de découvertes pour repousser

toujours plus les limites de la médecine et de la biologie.

BIBLIOGRAPHIE

1. DOUDNA J.A, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;(346).DOI: 10.1126/science.1258096.
2. KASHIWAGI K, KASHIWAGI A, KURABAYASHI A, HANADA H, NAKAJIMA K, OKADA M, TAKASE M, YAOITA Y. *Xenopus tropicalis*: An Ideal Experimental Animal in Amphibia. *Exp.Anim* 2010;(59):395-405.
3. GUO X, ZHANG T, HU Z, ZHANG Y, SHI Z, WANG Q, CUI Y, WANG F, ZHAO H, CHEN Y. Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in *Xenopus tropicalis*. *Development* 2014;141(3):707-14.
4. BHATTACHARYA D, MARFO A.A, LI D, LANE M, KHOKA M.K. CRISPR/Cas9: An inexpensive, efficient loss of function tool to screen human disease genes in *Xenopus*. 2015;(408):196-204.
5. WANG B, LI K, WANG A, REISER M, SAUNDERS T, LOCKEY R.F, WANG J-L. Highly efficient CRISPR/HDR-mediated knock-in for mouse embryonic stem cells and zygotes. *BioTechniques* 2015;(59):201-08.

A PROPOS DE L'AUTEUR

Gwenaëlle Le Port
gwen.lp@hotmail.com

Synthèse encadrée par :
Daniel Boujard
UMS CNRS 3387
Centre de Ressources Biologiques
Xénopes
Campus de Beaulieu
Université de Rennes 1