



Saisine concernant les
questions liées au
développement de la
technologie CRISPR
(clustered regularly
interspaced short
palindromic repeat)-Cas9

Note
du Comité
d'éthique

Février
2016

Contexte de la saisine¹

Par un courrier daté du 17 juin 2015 le PDG de l'Inserm souhaite que le CEI examine spécifiquement les questions liées au développement de la technologie CRISPR et notamment :

- 1- Quelles sont les questions soulevées par la technologie en tant que telle ?
- 2- La rapidité de son développement soulève-t-elle des problèmes particuliers ?
- 3- Sa simplicité d'utilisation appelle-t-elle un encadrement de sa mise en œuvre en laboratoire ?

Composition du Groupe de Travail : Bernard Baertschi, Catherine Bourgain, Hervé Chneiweiss, François Hirsch, Anne-Sophie Lapointe. Rédacteur du rapport Hervé Chneiweiss. Puis commentaires et corrections par l'ensemble des membres du CEI.

Qu'est-ce que le système CRISPR-Cas9 d'ingénierie/édition du génome ?

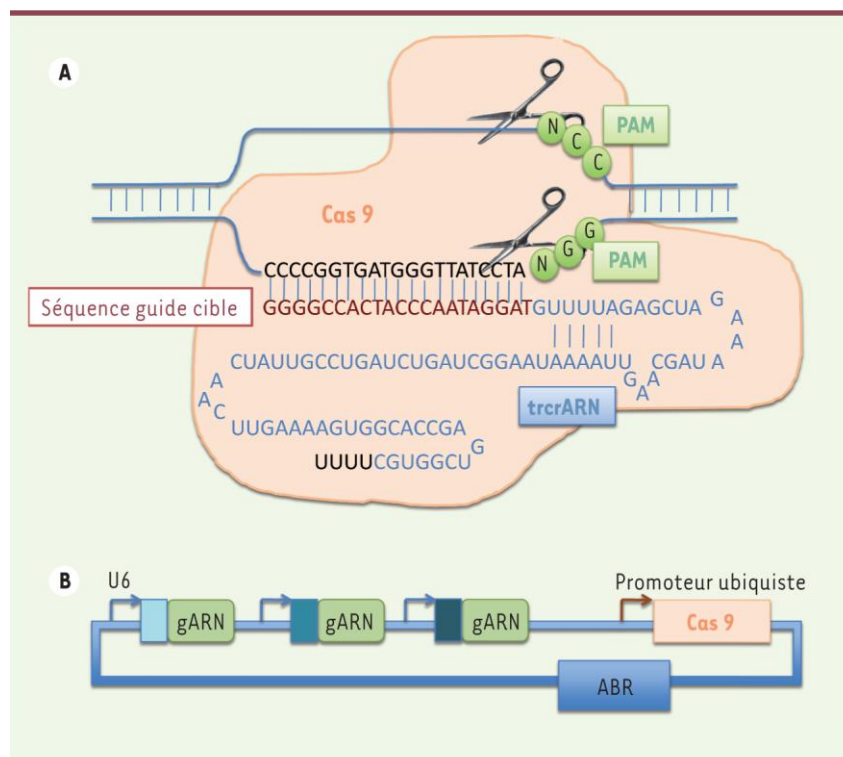
L'ingénierie du génome ou « Editer le génome » (traduit ainsi de l'anglais « genome editing ») consiste à ajouter, enlever, modifier une ou quelques bases dans une séquence d'ADN. Si la séquence correspond à un gène, la conséquence en sera la modification d'expression de ce gène, soit son « invalidation » (perte de fonction, knock-down), soit la modification de la séquence protéique de la protéine qu'il code et dans certains cas le changement d'activité ou de localisation ou de durée de vie ou au contraire la correction d'une fonction altérée, selon le contexte biologique.

La stratégie n'est pas nouvelle : il y a longtemps que les chercheurs essaient de mettre au point des techniques permettant de cibler une séquence précise du génome. Une technique connue depuis plus de 20 ans est celle de la « recombinaison homologe », et d'autres approches ont amélioré cette approche depuis quelques années (voir plusieurs articles publiés par M/S sur les méganucléases²). La raison de l'effervescence de la communauté depuis deux ans est qu'une nouvelle technique, – CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) - est venue détrôner toutes les autres approches, et ce pour quatre raisons : précision, rapidité, fiabilité, faible coût. Plus de 1000 articles indexés dans Pubmed ont été publiés au 15/10/2015. C'est indiscutablement une « révolution » technologique et les enjeux économiques sont énormes.

Notons ici qu'il existe un débat sémantique et lexical sur la meilleure manière de traduire en français « genome editing ». En anglais le terme « editing » porte sur l'action de corriger un texte avant son impression définitive. Cette action apporte par définition une amélioration au texte. Tel n'est pas forcément le cas pour les modifications apportées au génome d'où de multiples propositions : retouche, modification, correction, altération, ... Dans ce rapport nous avons adopté « ingénierie » pour son caractère technique et neutre. Ceci sous-entend d'emblée que la technique elle-même n'appelle pas de question éthique contrairement à son usage dans certains contextes.

De quoi s'agit-il ?

CRISPR-Cas9 est en quelque sorte un ciseau moléculaire capable d'induire une cassure double brin de l'ADN en un site choisi du génome. Il faut pour ce faire d'une part le ciseau, une enzyme nucléase qui coupe les deux brins d'ADN, ici Cas9, et un guide, qui reconnaît la séquence à couper, ici il s'agit d'un ARN-guide, homologue à la séquence que l'on veut cibler (c'est-à-dire que la séquence ARN est complémentaire de la séquence ADN cible). En résumé, la nucléase Cas9, guidée par son ARN guide (gARN) se lie au locus génomique de choix qui doit se situer à proximité d'un motif de reconnaissance appelé PAM. Cas9 crée alors une cassure double brin. Les deux systèmes de réparation de l'ADN existants dans toutes les cellules, soit par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), soit par recombinaison homologue dirigée (HDR), permettront d'apporter des modifications de l'ADN au site de cassure (insertion, mutation, délétion). Si l'idée initiale est d'invalider l'expression du gène, il suffit en général de laisser les systèmes de réparation faire. La cassure est mal réparée et le gène « réparé » sera inefficace. Si l'objectif est de corriger une mutation préexistante, il faudra que la réparation rétablisse une séquence « normale » après la cassure du gène muté, et pour cela, on introduit une séquence-guide et la cellule répare la cassure en copiant la séquence « normale » que l'on aura introduite. Idem pour introduire une mutation mimant un variant du gène.



Principe d'ingénierie du génome par le système CRISPR-Cas9. A. Cassure double brin par le système CRISPR-Cas9. La nucléase Cas 9 (en orange) est guidée par une séquence comprenant une séquence ARN homologue à la séquence cible (en rouge) et une séquence appelée tracrARN (en bleu). La nucléase CRISPR-Cas9 cible une séquence de 3 nucléotides de type NGG appelée PAM (en vert), ouvrant l'ADN complémentaire à la séquence guide (en noir) et créant un hétéroduplex, sgARN-ADN cible. Cas9 comprend deux domaines nucléasiques coupant chacun un des brins d'ADN. **B.** Construction multiplex. Un seul plasmide peut contenir plusieurs séquences guide (gARN) ainsi que la séquence codant pour Cas9 et un gène de résistance à un antibiotique (ABR). Figure empruntée à l'article d'Hélène Gilgenkrantz (ref 2)

Contrairement aux précédentes techniques comme les méganucléases à doigts zinc ou les Talens qui impliquaient des systèmes de reconnaissances de protéines entre elles et étaient très complexes à mettre en œuvre, construire le couple ARN-guide/Cas9 est sans difficulté pour toute personne ayant des connaissances de base en biologie moléculaire, et l'introduire dans la cellule également. Par exemple, il est simple d'injecter ces ARN par microinjection dans un zygote ou un ovocyte.

La simplicité de mise en œuvre et le peu de connaissances nécessaires a priori a pu faire dire à un des premiers développeurs de la technique, Georges Church de Harvard, que la technique pouvait « sur un simple coup de tête (*impulsively*) » permettre à n'importe qui de faire à peu près tout. Il est possible de modifier plusieurs cibles simultanément. Au-delà de l'ADN, la possibilité de modifier notre épigénome, en particulier dans un but thérapeutique, devrait théoriquement être réalisable.....Ces potentialités doivent donc nous conduire à examiner l'usage de la technologie CRISPR-Cas9 au regard des règles actuelles qui encadrent les technologies génomiques et en quoi elles pourraient nous amener à recommander des réglementations complémentaires. Les mêmes questionnements sont suscités par toute autre technologie similaire ayant les mêmes effets. Ainsi les équipes de Church et Zhang ont elles récemment caractérisé de nouvelles endonucléases orthologues de Cas9 et capables d'améliorer la sélectivité, la spécificité et l'efficacité de ciblage d'une séquence ADN particulière³.

Exemples d'applications

Les applications sont multiples et cette technique est aujourd'hui couramment utilisée pour modifier le génome de **cellules somatiques** chez l'animal et chez l'homme (aucune transmission à la descendance). Les génomes de cellules souches embryonnaires et de cellules souches pluripotentes reprogrammées (iPS) – y compris humaines - ont déjà également été modifiés par ces systèmes CRISPR-Cas9. Par exemple l'amplification de triplets CGG du gène codant pour la protéine FMR1 et responsable du syndrome de l'X fragile a pu être corrigée dans des cellules iPS dérivées de patients puis différenciées en neurones, démontrant que l'amplification induit une méthylation du promoteur du gène et sa mise au silence alors que la correction permet sa réexpression⁴.

Les applications cliniques sont très proches : un essai clinique de *genome editing* est déjà en cours chez l'homme (Sangamo Cie, avec une technique antérieure à CRISPR) dans l'infection par le VIH : dans ce cas, le système est utilisé pour « invalider », dans les lymphocytes T (encore non infectés) du patient, le gène codant pour un des récepteurs du VIH. Il est probable que CRISPR-Cas9 se substitue à la technique actuelle. D'autres viennent en discussion : dans le domaine des maladies monogéniques (dont celles actuellement traitées par thérapie génique ; un essai clinique va commencer dans la bêta-thalassémie), ou encore pour la création de cellules T modifiées pour « tuer » les cellules leucémiques (actuellement en clinique) (Novartis).

Nul besoin de mentionner que les enjeux financiers sont devenus énormes, se chiffrant déjà en centaines de millions d'euros investis, et plus d'une dizaine

d'entreprises de biotechnologie ayant mis sur le marché des produits ou services dérivés des CRISPR. La pression induite par la peur de perdre des parts de marché ne doit pas être un obstacle à l'évaluation éthique des applications de la méthode. Il est important de souligner qu'une bataille économique-juridique se joue actuellement sur la question de la priorité des brevets entre Emmanuelle Charpentier, aujourd'hui en poste à Berlin, mais en 2012 associée à Jennifer Doudna (université de Californie à Berkeley), d'un côté, et Feng Zhang (Broad Institute du MIT à Harvard) et d'autres chercheurs bostoniens, de l'autre. Parallèlement, les unes et les autres ont créé des start-up. Jennifer Doudna était l'une des invitées vedettes du Forum économique mondial de Davos en janvier 2016. Cette guerre des brevets réactive le questionnement sur la brevetabilité du vivant naguère soulevé par la brevetabilité des gènes. Un article récent d'Eric Lander dans *Cell*⁵ retraçant l'histoire des découvertes jalonnant les connaissances acquises sur CRISPR illustre remarquablement la dynamique collective et les nombreuses découvertes un temps ignorées qui permettent un jour une application potentiellement utilisable à une échelle industrielle et/ou thérapeutique.

Les enjeux éthiques de la technologie CRISPR-Cas9

Compte tenu des avantages techniques de la méthode et de sa très rapide diffusion, la question est aujourd'hui d'évaluer où, quand et comment son usage pourrait poser un problème éthique. Il nous apparaît d'emblée important de distinguer trois domaines aux enjeux différents :

- 1/ l'application de la technologie à l'homme qui soulève essentiellement la question des modifications de la lignée germinale ;
- 2/ l'application à l'animal, en particulier aux espèces « nuisibles », qui soulève la question d'un éventuel transfert latéral de gènes et l'émergence de dommages irréversibles à la biodiversité ;
- 3/ des risques d'atteinte à l'environnement.

1- des risques techniques encore à maîtriser

Cinq risques techniques au moins ont déjà été identifiés.

Le premier est d'induire l'inverse de ce que l'on souhaiterait par une mutation dite « on-target », car si le système de recombinaison homologue (HR) est très fidèle, le système NHEJ l'est beaucoup moins et pourrait recopier le gène muté au lieu du gène corrigé. Le second risque est le mieux décrit, c'est celui du clivage de l'ADN dans un site non souhaité, effet dit « off-target », susceptible de modifier un gène non désiré et important, ou d'insérer le gène souhaité à une mauvaise place où il ne sera pas ou mal exprimé, ou de submerger la machinerie de réparation de l'ADN. Il a tout d'abord été décrit que plus la concentration de Cas9 était élevée, plus l'efficacité du clivage de la cible était importante, mais plus celui-ci risquait également d'atteindre des cibles non spécifiques. Il semble désormais que les off-targets soient limités à des sites restreints, homologues au guide gARN flanqué par une séquence PAM. Le troisième risque est celui du clivage d'un seul des brins d'ADN, l'effet étant alors incontrôlé et peut induire un mosaïsme ou un chimérisme dans la descendance de la cellule modifiée. Un quatrième risque est que la mutation cible soit équilibrée par d'autres adaptations de l'expression du génome et que sa correction ne provoque un nouveau déséquilibre aux effets inconnus. Enfin les conséquences à long-terme de la correction doivent être évaluées.

Des progrès techniques ont été très récemment publiés, en particulier deux articles récents élargissent le catalogue de séquences d'ADN d'ancrage pour le site PAM et la spécificité d'enzymes endonucléases de la famille Cas9 en rapportant une spécificité et une absence d'effet hors-cible complète à l'échelle des analyses sur le génome entier effectuées⁶.

2- Enjeux éthiques des modifications transmissibles de séquences ADN, donc une action directe sur l'hérédité de certains traits génétiques.

2.1 - Gene drives ou guidage de gènes

Dans les espèces qui se reproduisent sexuellement un gène est en général transmis de façon mendélienne, c'est-à-dire qu'il a 50% de chance d'être hérité par la génération suivante. Mais certains gènes ont naturellement plus de 50% de chance d'être hérités. Ceci est dû à la présence de sites de reconnaissance pour des endonucléases associées à ces gènes qui agissent en coupant le locus correspondant sur le chromosome homologue, déclenchant les mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue qui vont conduire la cellule à réparer la cassure en copiant la séquence du gène guide sur le chromosome endommagé. La cellule présente alors deux copies de la séquence guide. Si la cellule est une cellule de la lignée germinale, la modification se propagera dans la descendance.

Promouvoir ou guider l'héritage biaisé de certains gènes pour modifier des populations entières a été proposé comme stratégie de ciblage de populations d'organismes considérés comme nuisibles tels que les moustiques. En plus de la lutte contre les maladies transmises par les insectes, le guidage de gènes pourrait être utilisé pour contrôler des espèces végétales envahissantes ou pour éliminer la résistance aux herbicides ou pesticides. La mise en œuvre technique a été proposée pour la première fois en 2003 par Austin Burt, un généticien évolutionniste à l'Imperial College de Londres⁷. Burt a suggéré que le guidage de gènes pourrait être utilisé pour prévenir la transmission du paludisme⁸. À l'appui de cette possibilité, des résultats récents (2015) d'une étude test menée au Panama semblent soutenir l'efficacité de la technique puisqu'elle aurait permis de réduire les populations de moustique *Aedes aegypti* qui y transmettent la dengue avec une diminution de 93% du taux de contamination dans la région où les moustiques transgéniques ont été introduits.

Le groupe de Georges Church a proposé dès 2014 l'utilisation du système CRISPR-Cas9 pour du guidage de gène en construisant des unités combinant gènes d'intérêt et CRISPR ciblant le gène « sauvage » correspondant⁹. L'insertion initiale d'une seule copie du transgène souhaité permettrait sa diffusion rapide puisque son couplage à CRISPR inactiverait la copie du gène sauvage homologue à chaque génération. Ce principe pourrait être adapté pour bloquer l'apparition de résistances dans la population cible en détruisant les gènes appropriés. La démonstration a ensuite été faite chez la levure et la drosophile¹⁰. Le processus de diffusion en population générale dépend du rythme des générations : il peut exiger moins d'un an pour certains invertébrés, mais des siècles pour les organismes avec de longs intervalles entre la naissance et la maturité sexuelle, tels que les humains. Des travaux récents démontrent la possibilité d'un guidage de gène chez le moustique

grâce à la technologie CRISPR, permettant d'envisager des stratégies bloquant la transmission du parasite¹¹ ou visant l'éradication de la population de vecteurs¹². A leur tour les académies nationales américaines (Sciences, Technologie, Médecine, NAS) ont créé un comité pour évaluer la technologie de guidage de gène utilisant CRISPR en vue d'un rapport sur la science, l'éthique et la gouvernance de la recherche en ce domaine. Au cours d'une réunion tenue à Washington le 28 octobre 2015, les chercheurs se sont demandés si les cadres réglementaires et éthiques existants sont suffisants pour guider le développement de cette technologie, et ils ont constaté que beaucoup doit être appris sur les effets écologiques d'un « *gene-drive* », la spécificité des cibles, et la capacité de propager efficacement une modification génétique dans une population ou une espèce.

Les questions éthiques associées au guidage de gène peuvent être considérées par une approche ontologique fondamentale s'interrogeant sur l'atteinte à la Nature ou à la frontière d'espèces, ou sous un angle plus utilitariste en considérant:

- 2.1.1- Risque d'effet *off-target* d'inactivation d'un autre gène que le gène cible
- 2.1.2- Il n'a pas encore été démontré qu'un changement entraîné par une construction « gène d'intérêt CRISPR-Cas9 » persiste sur de nombreuses générations. Pour les moustiques, les travaux de modélisation indiquent que le gène-drive devra persister 20 générations pour se diffuser complètement.
- 2.1.3- Avant que la technique du guidage de gène ne soit appliquée à des populations sauvages au lieu de celles bien caractérisées des laboratoires, la technologie doit devenir encore plus précise et contrôlée.
- 2.1.4- En cas d'échappement à notre contrôle de la technologie, un système de secours pour arrêter la propagation d'un gène doit encore être développé. L'un des plus prometteurs consiste évidemment à annuler la modification génétique avec un autre guidage de gène, mais dont le contrôle pourrait à son tour être perdu...
- 2.1.5- Risque de diffusion transversale du gène guide contaminant des populations d'organismes différents de la population cible. L'hybridation entre espèces animales étroitement apparentées doit être mieux comprise avant d'autoriser la technologie pour éviter la transmission latérale dans une espèce non désirée.
- 2.1.6- Impact écologique de l'éradication d'une population « nuisible »/pathogène pour l'homme mais qui peut avoir un autre rôle important pour la biodiversité. Il y a peu de travaux, si même il en existe, qui peuvent prédire l'effet écologique d'un changement induit par la modification d'un gène ou la disparition d'une espèce en un court laps de temps. Il y a ici une énorme place pour l'ignorance, l'erreur humaine ou l'insouciance de causer des dommages.
- 2.1.7- Au lieu de viser à l'extinction d'une espèce considérée comme nuisible, une stratégie écologiquement moins inquiétante serait de modifier le génome de l'insecte de sorte qu'il ne pourrait pas transmettre le pathogène à l'homme. Mais les chercheurs n'en savent probablement pas encore assez sur le système immunitaire du moustique pour cibler un gène spécifique.
- 2.1.8- Effets secondaires indésirables du gène guide pour l'homme (apparition d'une autre pathologie associée au gène guide)
- 2.1.9- Ce sont les pays du Sud qui sont les premiers concernés, en particulier

l'Afrique Sub-Saharienne, et amener les gens locaux à adopter des stratégies de contrôle du guidage de gène prend beaucoup de temps et nécessite une importante éducation.

En conséquence, les effets potentiellement indésirables du guidage de gène doivent être évalués avant toute utilisation hors d'un laboratoire respectant des règles de confinement déjà développées pour d'autres modifications génétiques. Les évaluations doivent se faire sur des périodes longues compte-tenu du caractère transmissible du gène guide. Des mesures de réversibilité devraient être prévues en cas d'échappement ou d'effet indésirable. De telles analyses et l'élaboration de scénarios multiples nécessitent la constitution d'équipes pluridisciplinaires combinant des expertises allant de la biologie moléculaire à l'écologie et aux diverses sciences sociales, avec une évaluation prudente de la balance bénéfique/risque à long terme. A noter qu'en 2013, l'Autorité européenne de sécurité des aliments a publié un guide pratique pour les évaluations environnementales de tous les organismes génétiquement modifiés, et qu'en juin 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales, a publié des lignes directrices pour évaluer les moustiques génétiquement modifiés¹³. Bien que certains chercheurs soutiennent que les réglementations en vigueur concernant l'ADN recombinant sont suffisantes, d'autres considèrent que la *gene drive* et la technique CRISPR-Cas9 sont fondamentalement différentes. De fait en cas d'utilisation du guidage de gène en conditions naturelles, les frontières des Etats n'existeraient plus et il n'y a pas de gouvernance internationale en ce domaine.

2.2- Modification du génome au stade de zygote chez l'animal

Depuis le début 2015 et une réunion de quelques généticiens dans la Napa Valley californienne, la discussion principale concerne l'embryon (stade une cellule, zygote) et les cellules germinales (précurseurs de l'ovocyte et précurseurs des cellules germinales mâles, les spermatozoïdes) puisque toute modification génétique de ces cellules sera transférée à la descendance. L'application à l'homme de cette technique conduirait à rediscuter de l'interdiction de toute modification du génome germinale humaine explicite dans la convention d'Oviedo (signée par la plupart des pays européens mais ni les USA ni de nombreux autres pays dont la Chine) qui mentionne : « *Une intervention ayant pour objet de modifier le génome humain ne peut être entreprise que (...) si elle n'a pas pour but d'introduire une modification dans le génome de la descendance* ». La loi française de 1994 dit : « *aucune transformation ne peut être apportée aux caractères génétiques dans le but de modifier la descendance de la personne* ». La question éthique ne se limite pas à l'évaluation utilitariste des risques et des bénéfices mais pose aussi une question ontologique. En effet la temporalité humaine articule héritage du passé biologique et social et projection vers le futur ou espoir thérapeutique. De plus il ne s'agit pas de bien ou de mal, qui se référerait à un *a priori* ou à un idéalisme ici, mais de choix de société et de l'articulation entre nature, corporéité et histoire humaine.

Le principal objectif chez l'animal est du domaine de la génétique fonctionnelle et vise à créer des mutations dans le génome afin de modéliser des maladies humaines, ou à explorer la fonction d'un gène donné. Les zygotes de plusieurs espèces (dont souris, rat, bovin, porc, mouton..) ont été modifiés avec le système CRISPR-Cas9 depuis 2013 et les embryons transférés ensuite dans l'utérus de femelles¹⁴. Les animaux, une fois nés, peuvent être croisés et leurs descendants

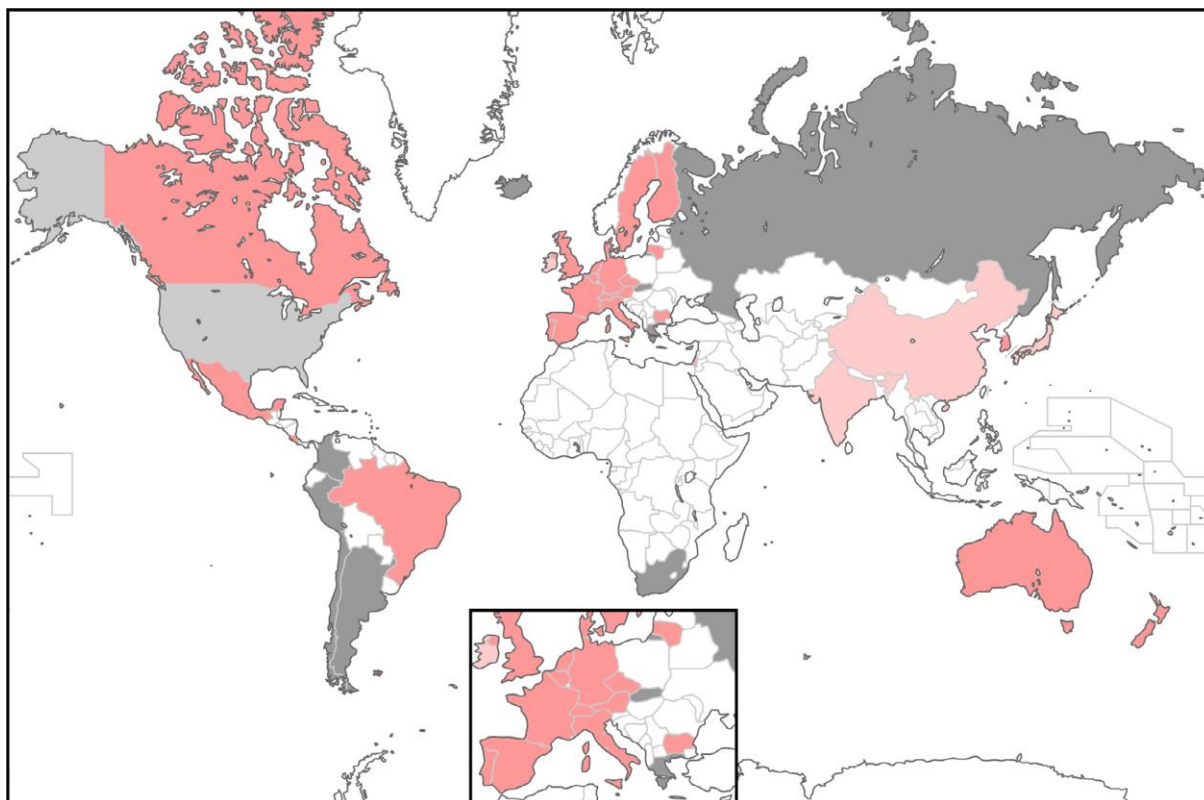
seront porteurs de la mutation génomique. Le tout prend moins d'un mois chez la souris. Un article a fait grand bruit, en février 2014, publié dans la revue Cell par une équipe chinoise¹⁵ : il démontrait la naissance de deux singes macaques tout à fait viables après une triple modification de leur génome au stade zygote par CRISPR-Cas9 – introduction de mutations dans deux gènes différents – puis transfert des embryons. Il semble exister peu de critiques à l'utilisation de CRISPR chez l'animal, la question éthique restant de pouvoir considérer ou non la nature biologique comme modifiable et de pouvoir décider dans quel sens, pour quels buts et avec qui prendre une décision qui n'est pas simplement technique mais recèle des enjeux socio-anthropologiques.

2.3- Modification du génome de la lignée germinale ou au stade de zygote chez l'homme

La question éthique pour l'homme pouvait donc être anticipée après l'article de Cell de 2014. Elle n'est pas de nature fondamentalement différente si l'ingénierie porte sur les gamètes ou leurs cellules précurseurs. De plus et compte tenu des progrès récents sur l'induction de la différenciation de cellules iPS en gamètes, on ne peut exclure un scénario où le fibroblaste initial, ou les iPS qui en résulteraient, seraient génétiquement modifiés par une stratégie CRISPR donnant ensuite naissance à des gamètes génétiquement modifiés sans que la cellule germinale elle-même ait été manipulée). Notons toutefois une différence majeure : s'il est possible de trier des cellules produites en grand nombre afin d'éliminer les échecs et les « *off-targets* », ceci n'est pas possible avec le zygote.

Le besoin de débat s'est accéléré dès février 2015 quand les rumeurs ont couru de publications imminentes d'une utilisation de CRISPR pour modifier le génome d'embryons humains ou de gamètes humains (notamment par des laboratoires en Chine, à Harvard, et une entreprise privée nommée Ovascience). Il est aussi motivé par la crainte d'entreprises privées (Sangamo), qui commercialisent ces « ciseaux moléculaires », que la divulgation prématurée de résultats chez l'embryon humain ne fasse scandale et mette en péril leur approche industrielle dans les cellules somatiques (voir ci-dessous). De fait en avril 2015 un groupe chinois a effectivement publié un travail utilisant la technique CRISPR-Cas9 pour étudier à titre expérimental la possibilité de corriger le gène dont la mutation est responsable de la Beta-Thalassémie en utilisant des zygotes humains écartés du parcours de la fécondation in vitro en raison de leur anomalie (3PN)¹⁶. Il n'est pas dans l'objet de cette Note de faire une analyse technique ou scientifique critique de cet article qui met en évidence une faible efficacité de recombinaison et une forte proportion d'effets hors de la cible (*off-target*). Une barrière technique n'est pas plus une réponse à une question éthique que le succès technique n'est une caution éthique.

Rappelons que si les pays Européens (15 sur 22 dont la France) ont interdit la modification de la lignée germinale, les Etats-Unis ne l'ont pas explicitement interdit même si dans son communiqué du 29 avril 2015 le NIH souligne les multiples règles de prohibition¹⁷ mais la recherche peut être poursuivie avec des fonds privés. En Chine, la loi ne l'interdit pas.



Législation internationale comparée. Carte produite par Ishii T. *Germline genome-editing research and its socioethical implications Trends in Molecular Medicine, August 2015, Vol. 21, No. 8.* Rouge : pays interdisant par la loi toute modification de la lignée germinale. Rose : pays où l'interdiction est l'objet d'une recommandation (guidelines). Gris clair : pays avec une réglementation restrictive. Gris sombre : pays où la réglementation est ambiguë. A noter que la Grande-Bretagne ici indiquée en rouge a adopté une législation en 2015 autorisant une sorte de modification de la lignée germinale comme conséquence du don de mitochondries.

Rappelons aussi la distinction qui est faite par les différents intervenants entre l'ingénierie du génome, sous-entendu du génome « nucléaire », et l'ingénierie cellulaire que constitue le remplacement mitochondrial (récemment autorisé au Royaume-Uni par le Parlement et la HFEA pour éviter la transmission de mutations mitochondriales à expression clinique sévère) tout en admettant qu'il s'agit « aussi » d'une sorte de modification du génome de cellules germinales. Pour mémoire, il s'agit du transfert du noyau d'ovocyte d'une femme porteuse dans un ovocyte énucléé d'une femme non atteinte (après un don d'ovocytes). L'ovocyte (et donc l'embryon) aura un génome nucléaire (ADN du noyau) dont l'origine par filiation est différente de l'ADN des mitochondries. On a pu parler de « 3 parents » : ADN du noyau/ovocyte mère, ADN des mitochondries/ovocyte de la donneuse, et ADN du noyau du spermatozoïde. Il n'y a aucune modification « externe, intentionnelle » de l'ADN. Le Comité d'éthique de l'Inserm observe que la technique CRISPR n'est pas impliquée dans la question du transfert du fuseau méiotique ou du pronucléi, mais constate que dans l'autorisation britannique il y a le sous-jacent que "modifier", au sens ici de remplacement, 37 gènes d'un coup, à savoir les 37 gènes codés par le génome mitochondrial, ne pose pas de problème, soit parce que l'opération est considérée comme l'équivalent d'une greffe d'organelle, sans altération des constituants de l'organelle, soit parce qu'au lieu de coder pour des caractères visibles (couleurs des yeux) ou recherchés (taille, ...) les gènes de la mitochondrie ne coderaient que pour des enzymes du métabolisme "de base". Il convient toutefois de

souligner que compte-tenu de notre ignorance de rôles éventuellement additionnels de ces gènes, ou des mécanismes qui synchronisent l'expression de ces gènes et la soixantaine de gènes nucléaires codant pour d'autres enzymes du métabolisme mitochondrial, certains scientifiques privilégient une thérapie ciblée des pathologies mitochondriales utilisant la technique CRISPR, méthode qu'a récemment publié le groupe de Belmonte chez la souris¹⁸.

Le potentiel thérapeutique de la technologie CRISPR est indéniable, toutefois plusieurs arguments interrogent son intérêt là où des techniques comme le diagnostic pré-implantatoire (DPI) ou le diagnostic anténatal semblent couvrir la majorité des besoins relatifs à la transmission à sa descendance des maladies rares d'origine génétique, et conduisent de nombreuses voix à demander un moratoire sur l'ingénierie du génome nucléaire des cellules germinales dans une perspective clinique humaine. Compte tenu de la diffusion très rapide de la technique, du grand nombre de pays et d'équipes impliquées, la situation est radicalement différentes de celle de 1974 où Paul Berg avait pu rassembler en un seul lieu tous les scientifiques représentant toutes les institutions capables d'utiliser les nouvelles technologies de la biologie moléculaire. Paul Berg lui-même a déclaré ses doutes. Par contre le Comité d'éthique a discuté de la mise en œuvre d'un principe de précaution bien compris¹⁹. Comme le souligne la Commission Européenne : « La définition du principe doit également avoir un impact positif au niveau international, afin de garantir un niveau approprié de protection de l'environnement et de la santé dans les négociations internationales. ». Le recours au principe s'inscrit dans le cadre général de l'analyse du risque qui comprend l'évaluation du risque, la gestion du risque et la communication du risque. Le principe de précaution peut être invoqué lorsqu'un phénomène, un produit ou un procédé peut avoir des effets potentiellement dangereux, identifiés par une évaluation scientifique et objective, si cette évaluation ne permet pas de déterminer le risque avec suffisamment de certitude. Ceci pourrait être le cas pour CRISPR-Cas9 en raison de :

- (1) la « fulgurance » du développement technique, et la concertation insuffisante entre les différents acteurs concernés par ce thème majeur ;
- (2) l'incertitude actuelle sur les risques de la technique – insuffisamment évalués à l'heure actuelle ;
- (3) l'incertitude sur toutes les conséquences de ces modifications de l'embryon sur son développement ultérieur et chez l'enfant (on ne pourra pas savoir avant d'avoir transféré l'embryon....) ;
- (4) les risques du glissement d'une justification de bénéfice thérapeutique à des utilisations non motivées médicalement et éventuellement à l'« *human enhancement* » ;
- (5) Une insuffisante évaluation de la réalité du besoin d'utiliser ces techniques pour la correction génique de maladies rares, et si cette réalité peut conduire à accepter certains risques. Si le zygote est la cellule cible, après une fécondation in vitro il n'est pas techniquement possible de savoir s'il est porteur ou non de la maladie, le diagnostic préimplantatoire se faisant à J3 au stade 8 cellules. Il faudrait donc traiter par CRISPR tous les zygotes, atteints ou non (50% en cas de maladie autosomique dominante, 75% en cas de maladies récessive). La technique ne serait donc supérieure au DPI que dans les très rares cas où tous les embryons sont atteints car l'un des parents est homozygote pour une maladie dominante ou les deux parents sont homozygotes pour une maladie récessive. Ces rares cas de figure, fruits de rencontre au sein de groupes particuliers, devraient faire l'objet d'une discussion

spécifique ;

(6) rappelons enfin l'argument bioconservateur que le génome humain est un patrimoine de l'humanité auquel il est interdit de toucher ; auquel s'oppose radicalement l'argument transhumaniste qui voudrait éradiquer les « mauvais gènes », par exemple APOE e4 associé à la maladie d'Alzheimer. D'autres voix considèrent que le génome humain doit être respecté comme le fruit d'une longue histoire commune et s'inquiètent du mercantilisme sous-jacent aux technologies de modifications.

Concernant les 4 premiers points, c'est la position de l'**ISSCR** (*international society for stem cell research*) (19 mars 2015) qui est la société porte-parole de la communauté scientifique académique menant des recherches sur les cellules souches. Toutefois l'expérimentation à des fins de recherche n'est pas mentionnée.

Un groupe de prestigieux scientifiques (David Baltimore, Paul Berg, Georges Church, Irving Weissman et al, tous américains et certains ayant participé à la conférence d'Asilomar en 1975) s'expriment dans *Science* (*Science express 19 mars 2015*)²⁰ ont fait état des discussions d'une réunion tenue sur le sujet en janvier dans la Napa Valley près de San Francisco à l'initiative de Jennifer Doudna co-inventrice de la méthode CRISPR avec la française Emmanuelle Charpentier.

Ce texte est proche de la position de Hans Jonas dans « l'éthique du futur » et sépare clairement recherche et application clinique, et fait deux recommandations principales :

(1) surseoir à toute modification, du génome nucléaire germinale dans un but thérapeutique, avant que les incertitudes concernant les risques ne soient clairement évalués, même si un bénéfice thérapeutique peut être anticipé, et avant qu'une concertation élargie n'ait statué sur ce scénario. Les auteurs soulignent qu'aucune réglementation n'a, à l'heure actuelle, envisagé cette possibilité, dans les pays où cela n'est pas interdit. L'idée d'une conférence « Asilomar bis » a été soulevée, dans l'esprit de la conférence de 1975, réunissant biologistes moléculaires, médecins, et juristes, qui jetait les bases des recommandations pour l'utilisation d'ADN recombinant dans les organismes vivants²¹. (2) Encourager une recherche qui devra être « transparente » et dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité de la technologie CRISPR dans des modèles expérimentaux utiles à l'évaluation d'une application thérapeutique germinale (*les mots embryon et cellules germinales ne sont pas écrits*). Cette information est essentielle pour pouvoir définir, dans le futur, ce qui pourrait être autorisé chez l'homme en termes d'approches thérapeutiques. David Baltimore au nom de l'Académie des Sciences et de l'académie de médecine Américaine en collaboration avec la Chinese Academy of Sciences et la Royal Society (UK) organise début décembre 2015 une conférence à Washington sur ce thème.

L'industrie, représentée par Sangamo et l'Alliance for Regenerative Medicine (200 industriels des biotechnologies), s'est prononcée également dans le sens d'un moratoire - pour des raisons évidemment différentes (risque d'un arrêt des applications sur cellules somatiques) – dans *Nature* (12 mars 2015). L'argumentation est beaucoup moins précise, notamment dans la distinction entre recherche et application clinique.

Le Nuffield Council on Bioethics, the Hinxton Group²², et **the National Academy of Sciences and Medicine** se sont saisis de la question. En France la Société

Française de Génétique, la société de thérapie cellulaire et l'Académie Nationale de Médecine ont créé des groupes de travail.

Le **Comité d'éthique de l'Inserm** a débattu de cette actualité dès sa réunion plénière du 8 avril 2015 et suit de très près les réflexions et publications scientifiques du domaine. La publication chinoise d'avril 2015 a mis en évidence une très faible efficacité au stade zygote humain et une très grande fréquence des effets *off-target*. On est donc très loin des conditions minimales d'efficacité et de sécurité exigées par une éventualité de transfert vers un essai clinique chez l'homme. Donc en termes d'éthique de la recherche la prudence est de mise.

De plus le Comité remarque que :

- 1) La réflexion est très centrée sur les gènes (fétichisation de l'ADN) et ignore trop les nombreux autres éléments cellulaires intervenant dans la constitution des premières cellules embryonnaires, qui pourraient être modifiés en utilisant CRISPR mais aussi dans d'autres circonstances, et qui pourraient être aussi transmis aux générations suivantes ;
- 2) toutes ces formes d'intervention qui ont pour objectif d'éviter la transmission de pathologies géniques à l'enfant en général ignorent ou sont présentées comme préférables à d'autres actions comme la procréation par don de gamète ou le diagnostic préimplantatoire avec sélection d'embryons. Cette hiérarchie dans l'approche nous semble discutable du point de vue de l'éthique.

Recommandations du CEI

En l'état actuel un moratoire semble peu crédible car il ne récolterait pas le même consensus international que celui issu d'Asilomar. Il n'existe pas ici de questions de sécurité biologique qui n'auraient pas déjà été envisagées par les technologies antérieures.

En conséquence nous proposons dans l'immédiat que l'Inserm adopte les principes suivants :

1. Encourager une recherche dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de la technologie CRISPR dans des modèles expérimentaux pouvant permettre au cas par cas de déterminer la balance bénéfique/risque d'une application thérapeutique y compris éventuellement sur des cellules germinales et l'embryon. Cette information est essentielle pour pouvoir définir, dans le futur, ce qui pourrait être autorisé chez l'homme en termes d'approches thérapeutiques. Un objectif institutionnel pour l'Inserm pourrait être de participer à la définition de méthodes normalisées pour évaluer l'efficacité de toute modification du couple CRISPR-Cas9 et mesurer les incidences d'effet « hors-cible » ou de tout autre effet indésirable, pour comparer les résultats des différentes expériences et leur pertinence clinique.
2. Les effets potentiellement indésirables du guidage de gène doivent être évalués avant toute utilisation hors d'un laboratoire respectant des règles de confinement déjà en vigueur pour d'autres modifications génétiques. Les évaluations doivent se faire sur des périodes longues compte-tenu du

caractère transmissible du gène guide. Des mesures de réversibilité devraient être prévues en cas d'échappement ou d'effet indésirable. De telles analyses et l'élaboration de scénarios multiples nécessitent la constitution d'équipes pluridisciplinaires combinant des expertises allant de la biologie moléculaire à l'écologie et aux diverses sciences sociales, avec une évaluation prudente de la balance bénéfice/risque à long terme.

3. Respecter l'interdiction de toute modification du génome nucléaire germinale à visée reproductive dans l'espèce humaine, et n'appuyer aucune demande de modification des conditions légales avant que les incertitudes concernant les risques ne soient clairement évaluées, et avant qu'une concertation élargie incluant les multiples partenaires de la société civile n'ait statué sur ce scénario. Pour sa liberté et son indépendance il convient que la recherche n'implique pas immédiatement ou forcément d'applications en termes d'innovation thérapeutique. Il convient également que la recherche puisse bénéficier de la confiance du public et pour cela une surveillance appropriée doit être organisée et appliquée aux travaux de laboratoire qui vise à évaluer l'efficacité et la spécificité des technologies d'édition du génome de la lignée germinale humaine. Un objectif institutionnel pour l'Inserm pourrait être de participer à la définition de lignes directrices : il devrait y avoir une coopération internationale des décideurs politiques et des scientifiques pour déterminer des stratégies communes et définir des orientations claires sur ce qui est ou non acceptable sur le plan éthique concernant la recherche.
4. Participer à toute initiative nationale ou internationale qui traiterait les questions de liberté de la recherche et d'éthique médicale. Ces démarches bénéficieraient d'une nouvelle conférence internationale de type Asilomar 2, par exemple la conférence des 3/5 décembre 2015 à Washington à l'initiative de la National Academy of Sciences américaine, sans restriction de nationalités et qui ferait la différence des questions soulevées dans l'application des techniques CRISPR-Cas9 en recherche d'une part et appliquée en clinique humaine d'autre part. L'Inserm et ses partenaires français, via les nombreuses collaborations établies avec des équipes des pays à ressources limitées, pourraient encourager la participation d'experts de ces pays à toute initiative internationale.
5. Enfin attirer l'attention sur la question plus philosophique qui met en tension la plasticité du vivant avec l'idée d'une nature humaine fondée sur le seul invariant biologique. Il convient de susciter une conscience qui fasse la part de l'utopie et des dystopies que peuvent engendrer certaines promesses thérapeutiques. En cela le débat éthique en sciences du vivant participe de la nécessaire acculturation à nos disciplines et resitue la science au cœur de la culture et de la société dans son ensemble. Dans ce contexte il faut construire un processus de réflexion et nous recommandons que l'Inserm/Aviesan crée en son sein un groupe de suivi animé par les membres du CEI volontaires et des scientifiques intéressés par les aspects sociétaux liés aux technologies de la génomique.

1. Le CEI a réuni un groupe de travail qui s'est appuyé sur une Note déjà transmise au PDG de l'Inserm avant la réunion 2015 des HIROs à Toronto et qui portait sur le débat sur l'opportunité - ou non - d'un moratoire sur les recherches visant à appliquer les techniques d'« édition du génome » de type CRISPR-Cas9 à des gamètes et embryons humains, Note préparée par Laure Coulombel (DR1 Inserm, Médecine/Sciences et Agence de la Biomédecine) et Hervé Chneiweiss (DR1 Cnrs, Comité d'éthique de l'Inserm, CIB de l'Unesco et Médecine/Sciences), ces appartenances étant mentionnées car les questions soulevées par la technologie CRISPR ont été d'une façon ou d'une autre abordées par ces structures.
2. L'ingénierie des génomes par les TALEN Barbara Dupret et Pierre-Olivier Angrand Med Sci (Paris) 2014 ; 30 : 186-193 ; La révolution des CRISPR est en marche Hélène Gilgenkrantz Med Sci (Paris) 2014 ; 30 : 1066-1069.
3. Zetsche et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. Cell. 2015 Sep 25. pii: S0092-8674(15)01200-3. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
4. Kiani et al. Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. Nat Methods. 2015 Sep 7. doi: 10.1038/nmeth.3580.
4. Park CY et al. Reversion of FMR1 Methylation and Silencing by Editing the Triplet Repeats in Fragile X iPSC-Derived Neurons. Cell Rep. 2015 Sep 29. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.084.
5. Lander ES. (2016) The Heroes of CRISPR. Cell. 2016 Jan 14;164(1-2):18-28.
6. Kleinstiver et al. (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature. 2016 Jan 6. doi: 10.1038/nature16526. [Epub ahead of print]. Kleinstiver et al. (2015) Broadening the targeting range of Staphylococcus aureus CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. Nat Biotechnol. 2015 Dec;33(12):1293-1298.
7. Burt, A. (2003). "Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270** (1518): 921.
8. Windbichler, N.; Menichelli, M.; Papathanos, P. A.; Thyme, S. B.; Li, H.; Ulge, U. Y.; Hovde, B. T.; Baker, D.; Monnat Jr, R. J.; Burt, A.; Crisanti, A. (2011). "A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito". *Nature* **473** (7346): 212-215.
9. Esvelt, Kevin M; Smidler, Andrea L; Catteruccia, Flaminia; Church, George M (July 2014). "Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations". *eLife*: e03401.
10. Dicarlo, J. E.; Chavez, A.; Dietz, S. L.; Esvelt, K. M.; Church, G. M. (2015). "RNA-guided gene drives can efficiently and reversibly bias inheritance in wild yeast". doi:10.1101/013896. Gantz, V. M.; Bier, E. (2015). "The mutagenic chain reaction: A method for converting heterozygous to homozygous mutations". *Science*. doi:10.1126/science.aaa5945.
11. Gantz & al. (2015) Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 8;112:E6736-43.
12. Hammond & al. (2016) A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector Anopheles gambiae. Nat Biotechnol. 2016 Jan;34(1):78-83.
13. EFSA - Guidance of the GMO Panel: Guidance Document on the ERA of GM animals. Efsa.europa.eu. doi:10.2903/j.efsa.2013.3200. TDR | A new framework for evaluating genetically modified mosquitoes. Who.int. 2014-06-26.
14. Crispo M, et al. (2015) Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR-Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. PLoS ONE 10(8): e0136690. doi:10.1371/journal.pone.0136690 Zhang et al. Large Genomic Fragment Deletions and Insertions in Mouse Using CRISPR-Cas9. PLoS One. 2015 Mar 24;10(3):e0120396. Zhong et al. CRISPR-engineered mosaicism rapidly reveals that loss of Kcnj13 function in mice mimics human disease phenotypes. Sci Rep. 2015 Feb 10;5:8366. Choi et al. Disruption of exogenous eGFP gene using RNA-guided endonuclease in bovine transgenic somatic cells. Zygote. 2014 Nov 26;1-8. Fujihara Y, Ikawa M. CRISPR-Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. Methods Enzymol. 2014;546:319-36. Mizuno et al. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR-Cas9 system. Mamm Genome. 2014 Aug;25(7-8):327-34. Yen et al. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR-Cas9 RNA injections in mouse zygotes. Dev Biol. 2014 Sep 1;393(1):3-9. Remy et al. Efficient gene targeting by homology-directed repair in rat zygotes using TALE nucleases. Genome Res. 2014 Aug;24(8):1371-83.
15. Niu Y et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. Cell. 2014 Feb 13;156(4):836-43.
16. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. Protein Cell. 2015 May;6(5):363-72. doi: 10.1007/s13238-015-0153-5.
17. « Practically, there are multiple existing legislative and regulatory prohibitions against this kind of work. The Dickey-Wicker amendment prohibits the use of appropriated funds for the creation of human

embryos for research purposes or for research in which human embryos are destroyed (H.R. 2880, Sec. 128). Furthermore, the NIH Guidelines state that the Recombinant DNA Advisory Committee, “...will not at present entertain proposals for germ line alteration”. It is also important to note the role of the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in this arena, which applies not only to federally funded research, but to any research in the U.S. The Public Health Service Act and the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act give the FDA the authority to regulate cell and gene therapy products as biological products and/or drugs, which would include oversight of human germline modification. During development, biological products may be used in humans only if an investigational new drug application is in effect (21 CFR Part 312). »

¹⁸. Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, Luo J, Bacman SR, Williams SL, Sugawara A, Okamura D, Tsunekawa Y, Wu J, Lam D, Xiong X, Montserrat N, Esteban CR, Liu GH, Sancho-Martinez I, Manau D, Civico S, Cardellach F, Del Mar O'Callaghan M, Campistol J, Zhao H, Campistol JM, Moraes CT, Izpisua **Belmonte** JC. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. Cell. 2015 Apr 23;161(3):459-69.

¹⁹. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=URISERV:l32042>

²⁰. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M, Greely HT, Jinek M, Martin GS, Penhoet E, Puck J, Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. Science. 2015 Apr 3;348(6230):36-8. doi: 10.1126/science.aab1028.

²¹. Proc.Nat.Acad.Sci.USA Vol.72,No.6,pp.1981-1984, June1975.

²². http://www.hinxtongroup.org/hinxton2015_statement.pdf