

Modifications du génome des cellules germinales et de l'embryon humains.

Information

Pierre Jouannet, au nom du groupe de travail constitué des personnes suivantes :

Membres titulaires : Monique Adolphe, Jean-François Allilaire, Raymond Ardaillou, Claudine Bergoignan-Esper, Alain Fischer, Pierre Jouannet (coordonnateur), Jean Yves Le Gall, Jean François Mattei, Jacques Milliez, Alfred Spira

Membres correspondants : Gérard Benoit, Nathalie Cartier-Lacave, Marc Delpech, Philippe Jeanteur, Yves Le Bouc, Jean Louis Mandel, Florent Soubrier

Depuis une cinquantaine d'années, des progrès spectaculaires ont été accomplis pour comprendre le rôle joué par les gènes dans les fonctions cellulaires et leurs dérèglements. Dans un premier temps, des outils ont été mis au point pour décrypter le génome ce qui a permis d'accéder à un grand nombre d'informations sur les variations et les altérations de séquence de l'ADN et de préciser leur rôle dans le développement des pathologies. L'étape suivante était de pouvoir modifier la structure de l'ADN soit à titre expérimental soit dans un but thérapeutique afin d'invalider des gènes délétères, de les corriger ou de modifier leur expression. Des essais cliniques ont été progressivement mis en place notamment pour traiter des patients atteints de maladies héréditaires et de certaines formes de leucémies et lymphomes [1, 2]. Cependant la mise en œuvre de ces thérapies géniques fondée sur l'invalidation ou l'addition de la copie d'un gène a des limites : dans ce dernier cas le gène ajouté n'est pas placé dans son environnement chromatinien responsable d'une régulation d'expression physiologique. Si pour certaines pathologies héréditaires ou cancéreuses, cela n'est pas crucial, pour d'autres (nécessité d'une régulation fine d'expression ou pathologie héréditaire dominante par gain de fonction ou par effet transdominant négatif), c'est nécessaire et la stratégie actuelle peut s'avérer inopérante ou dangereuse.

Récemment, de nouveaux outils moléculaires ont été développés qui s'inspirent d'un système de défense contre des ADNs exogènes (bactériophages ou plasmides) utilisé par les bactéries, le système CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) [3]. En effet, l'association d'une séquence d'ARN guide et d'une endonucléase (Cas9) permet de cibler très précisément n'importe quelle séquence du génome, de couper les deux brins d'ADN afin de supprimer ou de remplacer le fragment de la molécule visé ou alors d'insérer une nouvelle séquence d'ADN. La molécule d'ADN ainsi modifiée sera ensuite réparée selon des systèmes existant dans toutes les cellules, soit par recombinaison homologue dirigée (HDR) soit par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).

La méthode utilisant CRISPR-Cas9 est plus efficace que les précédentes (Talen, nucléases à doigts de zinc, Méganucléases), relativement simple à mettre en œuvre et peu coûteuse ce qui explique sa diffusion extraordinaire dans de très nombreux laboratoires depuis qu'elle a été décrite par les équipes d'Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna [4-7]. De plus, ses performances sont encore susceptibles de pouvoir être améliorées notamment par l'utilisation de nucléases bactériennes dont les modes d'action sont distincts [8, 9].

Même si les expériences actuelles sont menées essentiellement sur des modèles animaux ou des cellules in vitro, les applications potentielles de CRISPR-Cas9 ont été rapidement envisagées en clinique humaine que ce soit pour corriger des mutations en cas d'affection monogénique, en cancérologie (inactivation d'un oncogène par exemple) ou pour induire des mutations qui pourraient avoir un effet thérapeutique ou protecteur pour lutter contre les maladies infectieuses [10, 11]. Dans tous les cas il s'agirait de thérapies somatiques [12]. Cependant au printemps 2015, une publication chinoise a fait grand bruit car elle laissait supposer que la technique pourrait être aussi utilisée pour modifier le génome d'embryons humains. L'expérience menée sur des embryons triploïdes, donc non transférables, avait pour but de déterminer dans quelle mesure CRISPR-Cas9 permettrait de remplacer le gène muté de la β -globine responsable de la thalassémie [13]. Les résultats n'ont pas été très concluants (faible efficacité sur le gène cible et modifications indésirables nombreuses). Les réactions ont été vives, critiquant la démarche et appelant la communauté scientifique à un moratoire ou même à bannir toute recherche ayant pour but de modifier l'ADN d'un embryon humain [14,15]. En effet, indépendamment des commentaires concernant l'efficacité et l'innocuité de la méthode, le risque qu'elle soit utilisée pour répondre à des aspirations triviales ou eugéniques (selon l'argument de la pente glissante) a été avancé [16]. D'autre part la possibilité de recourir à d'autres actions, notamment le diagnostic préimplantatoire (DPI), pour maîtriser le risque de transmission d'une pathologie génique à l'enfant semble rendre inutile cette approche dans la grande majorité des situations. Enfin les modifications induites de l'ADN seraient aussi inscrites dans l'ADN des cellules germinales et donc transmises aux générations suivantes, alors qu'on ignore totalement si elles pourraient avoir des conséquences imprévues en dehors de l'effet recherché.

Consciente de l'importance de ces nouvelles avancées de la génétique moléculaire, l'Académie nationale de médecine a souhaité créer un groupe de travail pour examiner l'ensemble des questions relatives à l'utilisation de ces nouvelles technologies dans le champ de la recherche biomédicale ainsi que de leurs applications cliniques éventuelles. Les questions étant très nombreuses et les enjeux étant très variables, il a été choisi de cibler la réflexion du groupe sur les recherches et les applications médicales susceptibles de pouvoir modifier le génome de la lignée germinale humaine. L'objectif a été notamment de préciser les indications éventuelles de ces nouvelles méthodes de génétique moléculaire, de mesurer les incertitudes et les risques relatifs à leur usage dans l'état actuel des connaissances et enfin d'appréhender les questions éthiques qu'elles soulèvent.

Contexte législatif et institutionnel

Les interventions ayant pour but de modifier le génome de la descendance sont clairement proscrites depuis 1994 dans la loi française. L'article 16-4 du code civil stipule : « *...Sans préjudice des recherches tendant à la prévention et au traitement des maladies génétiques, aucune transformation ne peut être apportée aux caractères génétiques dans le but de*

modifier la descendance de la personne ». De plus la convention d'Oviedo qui a été ratifiée par la France en 2011 et par la plupart des pays européens précise dans son article 13 : « *Une intervention ayant pour objet de modifier le génome humain ne peut être entreprise que pour des raisons préventives, diagnostiques ou thérapeutiques et seulement si elle n'a pas pour but d'introduire une modification dans le génome de la descendance* ». Enfin si la modification du génome n'est pas explicitement mentionnée dans la déclaration universelle sur le génome humain et les droits de l'homme publiée par l'UNESCO en 1997, le Comité international de bioéthique de cette institution a publié, le 2 octobre 2015, un rapport précisant notamment que « *La communauté internationale des chercheurs scientifiques devrait être chargée de la responsabilité d'évaluer et d'assurer la sécurité des procédures qui modifient le génome humain* » et que « *Il est important pour les États et les gouvernements d'accepter le principe d'une responsabilité mondiale partagée dans le cas de l'ingénierie du génome humain* ».

Si de nombreux pays ont pris des dispositions pour interdire toute modification du génome susceptible d'être transmise aux générations suivantes par les cellules germinales humaines, la situation internationale est relativement hétérogène. Ainsi aux USA il n'y a pas d'interdiction légale mais un simple moratoire provisoire placé sous le contrôle des organismes encadrant la recherche médicale (FDA et NIH). En Israël l'interdiction est légale mais des exceptions sont possibles et la loi doit être revue en mai 2016. Les dispositions concernant les modifications génomiques de la lignée germinale humaine sont parfois d'autant plus incertaines qu'elles se mélangent avec d'autres dispositions concernant la recherche sur l'embryon ou les organismes génétiquement modifiés (OGM) en général [17].

Depuis la publication de l'article de Liang et al en avril 2015 [13], les prises de position se sont multipliées. Elles émanent de scientifiques, de sociétés savantes mais aussi parfois d'instances gouvernementales.

Aux Etats-Unis, le NIH a déclaré qu'il n'examinerait pas les protocoles de recherche clinique «using germline gene transfer». La Maison Blanche a déclaré le 26 mai 2015 qu'elle soutenait toute évaluation sérieuse des enjeux éthiques dans le domaine tout en soulignant que la modification de la lignée germinale humaine pour raisons cliniques est une frontière qui ne devrait pas être franchie pour le moment. De leur côté les académies des sciences et de médecine américaines ont entamé une réflexion commune et ont organisé un sommet international en décembre 2015 pour examiner les questions scientifiques, éthiques et politiques posées par le « genome editing ».

Du côté des sociétés savantes, la Society for Developmental Biology s'est prononcée pour un moratoire de toute manipulation par «genome editing» de l'embryon humain préimplantatoire [18]. L'International Society for Stem Cell Research a aussi appelé à un moratoire mais uniquement sur les applications cliniques tout en souhaitant une étude scientifique élargie des risques de la méthode et une large discussion publique de ses implications sociétales et éthiques [19]. Ce dernier souhait a aussi été exprimé dans une revue d'EMBO Reports sur le sujet [20]. Le Hinxton group a formulé la même recommandation tout en reconnaissant qu'une fois les questions d'efficacité, d'innocuité et de gouvernance réglées, il pourrait y avoir des applications moralement acceptables de la

technologie en reproduction humaine [21].

Au Royaume Uni, les 5 principaux organismes responsables de la recherche biomédicale ont déclaré qu'ils soutiendraient les recherches précliniques utilisant le « genome editing » y compris sur l'embryon et les cellules germinales et disent croire à des applications cliniques potentielles dans ce contexte [22]. Par ailleurs le Nuffield Council on Bioethics a créé un groupe de travail sur le sujet.

En Allemagne, le gouvernement a débloqué un fond pour organiser le débat sur le sujet.

Enfin la Fédération européenne des académies de médecine a le projet d'organiser un workshop sur le sujet en 2016.

A propos de terminologie.

La traduction de « *genome editing* » en français n'est pas aisée. Il est difficile de trouver un terme précis et non ambigu qui s'applique à l'ensemble des situations et qui soit suffisamment simple pour être compris par tous, scientifiques ou non, experts ou non.

Il s'agit de désigner l'ensemble des actions ayant recours aux techniques qui permettent de modifier la structure de l'ADN en utilisant des outils moléculaires. Cependant le « *genome editing* » ne concerne que les modifications des gènes ou plus précisément de leur structure, leur fonction ou leur expression pouvant être modifiée par d'autres moyens. La séquence d'ADN où le gène ciblé peut se trouver dans différents organites (noyau, mitochondries), différents types de cellules, de tissus ou d'organismes. Enfin l'intervention peut avoir différentes finalités (traiter, prévenir, améliorer...), le même mot pouvant être interprété différemment selon telle ou telle finalité. Ainsi une étude faite récemment dans la presse américaine a montré que le terme « editing » était généralement interprété de manière positive mais qu'il était perçu négativement quand il était associé au terme « embryon » [23].

Le terme « édition du génome » serait inapproprié. Les termes « correction du génome » ou «révision du génome» seraient une traduction plus littérale mais ne recouvrent pas l'ensemble des interventions possibles. Les termes «modification ciblée de la structure de l'ADN nucléaire somatique» et «modification ciblée de la structure de l'ADN nucléaire germinal» sont ceux qui décrivent le mieux les situations envisagées mais leur manque de simplicité les rend pratiquement inutilisables.

Il est parfois proposé « Ingénierie du génome » ou « ingénierie ciblée du génome ». Le terme ingénierie, bien qu'approprié, risque d'être mal interprété notamment pour désigner des actes médicaux. D'autres termes généraux sont quelque fois utilisés : «correction...», «manipulation...», «chirurgie...». Ils ont chacun des avantages et des inconvénients.

Enfin ce sont parfois des métaphores qui sont utilisées : «retouche...», «remodelage...», «réécriture...», «découpe... ».

Afin de faciliter une meilleur compréhension par le public, il est proposé que les termes «modification du génome» ou «modification ciblée du génome» soient utilisés de préférence en précisant chaque fois que nécessaire si les modifications concernées

s'exprimeront au niveau de la lignée germinale. Plusieurs membres du groupe de travail ont souligné néanmoins que le terme « Ingénierie du génome » était le plus approprié à la terminologie scientifique pour désigner les procédures utilisant des outils moléculaires tels que CRISPR-Cas9. C'est cette dernière terminologie qui a été adoptée par le comité d'éthique de l'INSERM [24] et un groupe de travail réuni par la Société française de génétique humaine et la Société française de thérapie cellulaire et génique [25] qui se sont aussi prononcés sur cette question. Ainsi les deux terminologies pourraient être utilisées au moins dans un premier temps.

Enjeux et conséquences de modifications du génome humain susceptibles de toucher la lignée germinale.

Dans un premier temps, le groupe de travail a identifié la nature des questions relatives aux modifications du génome de l'embryon et des cellules germinales humains. Elles concernent :

- Leurs applications cliniques potentielles
- Leur mode d'action
- La recherche
- L'éthique

Toutes ces questions n'ont pas encore été traitées au moment de la rédaction de ce rapport d'étape

1. Applications cliniques potentielles

Différentes catégories d'indications peuvent être envisagées selon qu'elles sont médicales ou non.

En première intention, il peut être souhaité d'éviter de transmettre à l'enfant une pathologie héréditaire particulièrement grave, non susceptible d'être traitée et dont l'anomalie génique causale a été identifiée.

La transmission d'altérations monogéniques à l'enfant peut être évitée par un diagnostic prénatal suivi éventuellement d'une interruption médicale de grossesse ou par un diagnostic préimplantatoire (DPI) réalisé en général au troisième jour du développement (stade 8 cellules) qui permet de ne transférer dans l'utérus que les embryons indemnes de la maladie génétique [26]. Il y a cependant quelques cas exceptionnels où le DPI ne peut répondre à la demande des couples concernés, soit quand l'un des deux partenaires est homozygote pour une altération autosomique dominante (chorée de Huntington), soit quand les deux partenaires sont porteurs homozygotes d'une altération autosomique récessive (mucoviscidose). D'autre part certaines mutations de l'ADN mitochondrial homoplasmiques (comme c'est fréquent dans la neuropathie optique héréditaire de Leber) ne permettent pas non plus d'envisager un DPI.

A côté de ces indications indiscutables mais exceptionnelles, d'autres situations ont été évoquées. L'une des personnalités auditionnée par le groupe de travail a décrit la condition

des couples ayant recours à un DPI mais pour lesquels aucun transfert d'embryon dans l'utérus n'est envisageable. Ainsi sur les 119 DPI réalisés par le centre Necker-Antoine Béchère du 1-1-2015 au 15-11-2015, aucun transfert d'embryon n'a pu être fait pour 22 couples (18 %, soit près d'un sur cinq). Dans la plupart des cas, tous les embryons analysés étaient atteints. L'indication du DPI avait été une maladie autosomique dominante (11), une maladie autosomique récessive (8), une maladie liée à l'X (2) ou une anomalie de l'ADN mitochondrial (1). Il n'est pas rare que les couples concernés demandent si les embryons atteints ne pourraient pas être « traités » plutôt que détruits. Il est très probable que la demande des patients concernés aille de plus en plus dans ce sens comme l'a constaté la *MIT Technology Review* [27].

Si éviter de transmettre une pathologie génique à un enfant pourrait constituer une indication acceptable de modification du génome de l'enfant à naître, les conditions sont actuellement loin d'être réunies pour qu'une approche de ce type soit cliniquement envisageable comme indiqué plus loin. De plus il doit être rappelé qu'il existe d'autres moyens permettant aux couples intéressés de réaliser leur projet parental : adoption, don de gamète, accueil d'embryon, tous ces moyens étant autorisés et couramment utilisés en France. Enfin il n'est pas impossible qu'une des retombées des recherches développées à partir des méthodes comme CRISPR-Cas9 puisse aboutir à la mise au point de thérapies géniques somatiques dont pourront bénéficier les enfants atteints après leur naissance.

D'autres indications s'intégreraient dans une démarche qui aurait pour but de réduire le risque d'apparition de pathologies communes ou de « protéger » l'individu. C'est pourquoi on parle parfois à leur propos d'indications médicales. Mais cette approche est aussi défendue par les personnes qui se réclament du « transhumanisme » car elle pourrait « améliorer » l'humain. Il existe en effet des variants naturels de la structure génomique qui peuvent jouer un rôle « protecteur » fort contre des maladies telles que le diabète (SLC30A8), l'hypercholestérolémie (gène PCSK9) ou certaines infections virales (gène CCR5). L'introduction de ces variants chez les individus, par modification ciblée de la lignée germinale, pourrait donc induire une protection comme l'a évoqué Georges Church [28]. De même, l'élimination du variant $\epsilon 4$ du gène APOE pourrait diminuer le risque de développer une maladie d'Alzheimer [29]. Modifier de manière ciblée ces variants serait donc une façon d'améliorer les performances de l'humain en le rendant moins vulnérable à certaines maladies. Cependant cette démarche pourrait avoir aussi des inconvénients car on ne connaît pas toujours bien les différents rôles joués par ces variants. Ainsi APOE $\epsilon 4$ serait peut être associé à une meilleure mémoire chez les jeunes adultes [30], ce qui mériterait d'être confirmé.

Vu le nombre de gènes impliqués et de maladies auxquelles l'humain est exposé comme les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies neurodégénératives ou les différentes maladies infectieuses, il faudrait multiplier presque à l'infini, les interventions sur le génome humain pour y introduire ces nouvelles qualités. D'autre part beaucoup des variants génétiques identifiés ne sont associés qu'à des effets très faibles, ne sont en général pas directement les variants directement impliqués (ceux-ci restant souvent non identifiés) et agissent en interaction avec d'autres gènes. Leur modification dans le génome humain

rendrait alors totalement illusoire l'obtention de changements physiologiques significatifs pour empêcher la survenue des maladies.

Enfin cette approche purement génétique de ces pathologies, ignorerait les autres facteurs susceptibles d'agir sur leur apparition et leur développement ainsi que les autres moyens existant pour les prévenir ou les combattre. On voit donc les limites d'un tel projet de modification ciblée du génome humain qui chercherait à promouvoir un genre de « sur-homme » et qui est plutôt du registre de la science-fiction.

Les applications non médicales, notamment celles qui pourraient chercher à promouvoir des caractères ou des traits particuliers chez l'enfant à naître (comme par exemple la taille, la couleur des yeux, les performances physiques ou intellectuelles etc...) n'ont pas été discutées dans le groupe de travail au moment de la rédaction de ce rapport d'étape. Elles le seront ultérieurement

2. Mode d'action

La création d'animaux dont le génome avait été modifié au stade embryonnaire est une pratique qui a été développée depuis plusieurs dizaines d'années pour les besoins de la recherche fondamentale en vue d'identifier le gène correspondant à un phénotype donné, pour créer des modèles de pathologies humaines mais aussi pour des objectifs agronomiques [31]. Le rendement et l'efficacité des techniques utilisées ont grandement bénéficié de l'utilisation de nucléases et plus récemment de CRIPR-Cas9.

2.1 Modification ciblée du génome de l'embryon

Depuis trois ans la naissance de petits obtenus après modification ciblée du génome embryonnaire, utilisant la méthode CRISPR-Cas9, a été rapportée dans de nombreuses espèces (tableau 1). En général, la construction moléculaire était micro-injectée in vitro au stade zygote (première cellule embryonnaire), soit dans le cytoplasme soit directement dans les pronuclei. Les embryons étaient ensuite transférés dans l'utérus de femelles pseudo gestantes soit immédiatement soit au stade blastocyste. La proportion de naissances a souvent été très faible. Différents types de gènes ont été ciblés avec pour objectif d'induire une invalidation, une surexpression ou une modification. Dans la plupart des cas, la modification génomique souhaitée n'a été retrouvée que chez une minorité des petits nés, de plus des mosaïques ont souvent été observées. Cette modification incomplète des cellules des individus peut s'expliquer si l'action de CRISPR-Cas9 ne se produit que plus tardivement lors du développement embryonnaire ou par le fait que la modification génique des allèles paternels et maternels se produit à des moments différents lors de la transition des gamètes vers l'embryon [32]. Enfin chez les animaux dont le génome avait été modifié, le phénotype n'était pas toujours celui attendu notamment quand la réparation de la molécule d'ADN s'était faite par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) et non par recombinaison homologue dirigée (HDR).

Auteurs	Espèce	Gène ciblé	Embryons transférés	Petits nés	Petits avec gène modifié
Wu 2013 [33]	souris	<i>Crygc</i>	472	78	36 (46%)
Mizuno 2014 [34]	souris	<i>Tyrosinase</i>	205	60	28 (46%)
Whitworth 2014[35]	porc	<i>CD163</i>	93	4	4
		<i>CD1D</i>	110	4	2
Niu 2014 [36]	Cynomolgus	<i>Ppary, Rag1, Nrob1</i>	83	2	2
Ménoret 2015[37]	rat	<i>Anks3</i>	156	22	4 (18%)
Zou 2015 [38]	chien	<i>Myostatin</i>	35	27	2 (7%)
Kou 2015 [39]	furet	<i>Dcx</i>	117	15	11 (73%)
		<i>Aspm</i>	64	12	8 (75%)
		<i>Disc1</i>	18	4	1
Crispo 2015 [40]	mouton	<i>Myostatin</i>	53	22	10 (45%)
Honda 2015 [41]	lapin	<i>Tyrosinase</i>	67	9	2
Wang 2015 [42]	chèvre	<i>Myostatin, FGF5</i>	416	98	26 (26%)

Tableau 1 : Modifications génomiques observées chez des petits nés après modification du génome induite *in vitro* en utilisant la méthode CRISPR-Cas9 et microinjection au stade zygote du développement embryonnaire (une cellule).

La technique de micro-injection étant difficile à pratiquer et potentiellement dangereuse pour l'embryon, il a été proposé d'introduire les composants du système CRISPR-Cas9 par électroporation des zygotes. Les résultats obtenus chez la souris et le rat sont similaires à ceux de la micro-injection [43-45].

Aucune tentative de modification ciblée du génome embryonnaire ne semble avoir été faite après le stade zygote et avant l'implantation de l'embryon, il n'y a donc pas actuellement de résultats expérimentaux montrant qu'il serait possible d'agir sur des embryons ayant été l'objet d'un DPI, c'est-à-dire à partir du stade 8 cellules ou au-delà. De toute façon à partir de ce stade, les cellules de l'embryon pourraient difficilement être toutes micro-injectées. D'autres vecteurs comme des rétrovirus qui ont été utilisés avec succès sur d'autres systèmes cellulaires [46] et en thérapie génique somatique pourraient-ils être employés à ce stade ? Ici encore il n'y a actuellement aucun résultat expérimental obtenu chez l'embryon qui le suggère.

2.2 Modification ciblée du génome des cellules germinales

Une autre voie d'approche conduisant à une modification du génome des individus consisterait à intervenir avant la fécondation en injectant les différents composants du complexe ARN-Cas9 dans l'ovocyte mature (métaphase II) en même temps que le spermatozoïde ou de manière séquentielle [32]. La possibilité de modifier les gènes dans l'ovocyte a été ainsi testée à titre expérimental chez la souris pour réduire le taux de mutations mitochondriales (en utilisant le système TALEN et non CRISPR-Cas9 comme endonucléase) sans que l'expérience ait conduit à la naissance de petits après correction de mutations mitochondriales [47]. L'application de la technique à un stade plus précoce de l'ovogenèse n'est pas envisageable dans la mesure où tous les ovocytes contenus dans l'ovaire sont difficilement accessibles et sont au stade de prophase méiotique, les ovogonies souches n'étant présentes que dans l'ovaire fœtal.

Il n'en est pas de même pour la lignée germinale mâle, les spermatogonies souches pouvant

être facilement prélevées dans les testicules adultes. Les cellules peuvent alors être traitées *in vitro* par CRISPR-Cas9, mises en culture pour proliférer et former des colonies cellulaires sur lesquelles peuvent être réalisés tous les contrôles nécessaires avant de transférer les spermatogonies modifiées dans les testicules où se produira la spermatogenèse *in vivo*. La technique a été utilisée avec succès chez la souris pour corriger une mutation du gène *Crygc* (*Crygc*^{-/-}) responsable de cataracte. La correction génique a été retrouvée chez tous les petits nés qui avaient un phénotype normal et chez lesquels aucun effet hors cible n'a été observé par séquençage du génome entier [48]. D'autres essais ont été faits chez la souris et le rat qui n'ont pas été aussi efficaces.[49-50].

En effet, la spermatogenèse ne pouvant pas être reproduite *in vitro*, il est nécessaire de transférer les spermatogonies modifiées dans les testicules d'un animal vivant. Mais pour que tous les spermatozoïdes alors produits soient porteurs de la modification génique souhaitée, il faut au préalable que les cellules germinales présentes dans les testicules de l'hôte aient été éliminées, ce qui n'est pas toujours facile à obtenir. Si cette approche est très intéressante pour produire des animaux transgéniques ou pour étudier les stérilités masculines d'origine génétique, il est peu envisageable qu'elle puisse être utilisée pour obtenir des gamètes « corrigés » chez un homme qui serait porteur homozygote d'une mutation génique dont on souhaiterait éviter la transmission à la descendance. Il faudrait en outre s'assurer que le prélèvement des spermatogonies dans le testicule adulte, leur traitement *in vitro* et leur prolifération en culture n'engendreraient pas d'anomalie épigénétique ou d'empreinte génomique avec le risque de transmission aux générations futures.

2.3 Efficacité et innocuité des techniques modifiant le génome des cellules embryonnaires et germinales

Dans le cas où l'objectif serait de modifier toutes les cellules d'un individu, quel que soit le moment où est menée l'action pour modifier le génome (avant ou après la fécondation), le niveau d'exigence concernant l'efficacité et l'innocuité de la méthode employée devrait être beaucoup plus important que celui habituellement requis pour les approches expérimentales ou même pour la thérapie génique somatique. En effet quand les cellules sont modifiées *in vitro*, les contrôles nécessaires concernant l'efficacité et l'innocuité de l'intervention peuvent être faits sur les colonies cellulaires obtenues et seules les cellules présentant les qualités requises sont ensuite transférées pour agir *in vivo*. De même quand le but est de créer des animaux transgéniques, il n'est pas nécessaire que tous soient modifiés car il est possible de sélectionner après la naissance ceux chez qui l'effet recherché a été obtenu pour leur utilisation ultérieure.

En revanche si l'on devait modifier le génome d'un embryon humain dans une perspective d'application clinique, l'échec de l'intervention serait inacceptable car il pourrait conduire à la naissance d'enfants ne présentant pas la modification souhaitée. Il serait donc nécessaire qu'un contrôle d'efficacité soit réalisé avant le transfert des embryons dans l'utérus, par exemple au stade blastocyste.

Le contrôle devrait vérifier aussi l'innocuité de la méthode, notamment l'absence d'éventuels effets de CRISPR-Cas9 en dehors de la cible visée (« off-target »). Des résultats

récents suggèrent que des évolutions technologiques comme l'utilisation de variants de CRISPR-Cas9 pourraient considérablement réduire le risque d'action hors de la cible [51] mais la seule expérience qui a été réalisée sur des embryons humains triploïdes a montré que les effets indésirables n'étaient pas rares. En cas d'application clinique humaine, faudrait-il procéder au séquençage du génome entier des embryons avant leur transfert dans l'utérus ? Faudrait-il ne rechercher que certains effets indésirables en dehors de la cible visée ? Faudrait-il procéder à l'analyse de l'épigénome des embryons ?

La recherche pourrait porter sur la mise au point de techniques permettant de répondre chez l'animal aux exigences définies chez l'homme afin de pouvoir les lui appliquer. Il serait en outre indispensable que des recommandations soient formulées concernant les tests à réaliser pour vérifier l'innocuité de la technique que ce soit en cas de thérapie génique somatique ou en cas de thérapie génique germinale.

Pour toutes ces raisons et indépendamment de toute autre considération d'ordre éthique, il paraît inconcevable que les techniques de modification du génome soient utilisées sur l'embryon ou les cellules germinales avec comme perspective de faire naître un enfant.

Un long chemin de recherche est encore à parcourir et il n'y a pas lieu d'envisager une modification de la législation française actuelle.

3. La Recherche

Si l'on doit refuser actuellement toute tentative ayant pour but de faire naître un enfant dont le génome aurait été modifié, faut-il pour autant interdire la recherche y compris sur les cellules germinales et l'embryon humain ?

Comme cela a été souligné dans les conclusions de la réunion internationale qui a été organisée en décembre 2015 par les Académies nationales des sciences et de médecine américaines, la Royal Society britannique et l'Académie des sciences chinoise : « il y a un besoin important de recherche fondamentale et préclinique 1) pour évaluer les technologies modifiant le génome dans les cellules humaines, 2) pour apprécier les bénéfices et les risques de leur utilisation clinique potentielle, 3) pour comprendre la biologie des cellules germinales et des embryons humains » [52].

Le dispositif législatif et réglementaire français n'interdit plus la recherche sur l'embryon depuis l'adoption de la loi du 6 août 2013. Pour que le protocole soit autorisé, la pertinence scientifique de la recherche doit être établie et celle-ci doit s'inscrire dans une finalité médicale. Par ailleurs et comme le précise l'article L 2151-5 du code de la santé publique, la recherche doit être menée « *à partir d'embryons conçus in vitro dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne font plus l'objet d'un projet parental* » avec le consentement du couple dont les embryons sont issus. D'après le dernier bilan publié par l'Agence de la Biomédecine, au 31 12 2013, 19 335 embryons avaient été donnés à la recherche par 5 883 couples et étaient conservés dans l'ensemble des laboratoires de fécondation in vitro [53]. Cependant et contrairement à la situation existant dans des pays comme l'Allemagne ou la Suisse où les embryons sont congelés au stade zygote, en France les embryons conçus in vitro sont

congelés au stade 4 cellules ou au-delà ce qui ne permettrait pas d'entreprendre une recherche à un stade plus précoce à moins d'utiliser des embryons anormaux (triploïdes ou anomalies morphologiques majeures) qui ne sont ni transférés, ni congelés et ne sont donc plus l'objet d'un projet parental.

Toutes les conditions sont donc apparemment réunies pour que ce type de recherche puisse être mené en France. Il conviendrait toutefois de clarifier, éventuellement par une modification législative, l'ambiguïté qui peut persister au regard de la rédaction des textes suivants:

- l'art 16-4 du code civil qui exclut toute transformation des caractères génétiques dans le but de modifier la descendance mais "sans préjudice des recherches tendant... au traitement des maladies génétiques"

- l'art L 2151-5 du code de la santé publique qui autorise désormais les recherches sur l'embryon avec autorisation et sous conditions.

- l'article L 2151-2 introduit dans le même code de la santé publique par la loi du 7 juillet 2011, qui interdit la création d'embryons transgéniques.

Le groupe de travail est en accord avec l'esprit de la loi qui fait clairement la distinction entre toute intervention qui viserait à modifier les caractères génétiques de la descendance et une recherche qui ne conduit pas à la naissance d'un enfant dont les caractéristiques génétiques auraient été modifiées. La première situation, qui pourrait être la conséquence d'une modification du génome de cellules germinales ou d'embryons humains suivie du transfert in utero de ces derniers, n'a pas lieu d'être actuellement comme cela a été précisé dans le paragraphe précédent. En revanche, la recherche ne conduisant pas à la naissance d'un enfant devrait être autorisée y compris si elle est faite sur des cellules germinales ou des embryons humains. Le groupe de travail estime enfin que les recherches dans ce domaine devraient être soutenues quand elles sont scientifiquement et médicalement pertinentes.

4. L'éthique

Les questions éthiques relatives aux modifications du génome des cellules germinales et de l'embryon humains n'ont pas été abordées de manière complète et approfondies à ce stade de la réflexion du groupe de travail. Elles seront traitées dans la deuxième partie du rapport.

Conclusions

Le législateur français a été clairement précurseur quand il a interdit dès 1994 toute intervention ayant pour but de modifier le génome de la descendance. Cette position a été reprise dans la convention d'Oviedo et ratifiée par de nombreux pays. Depuis, la possibilité de recourir à une thérapie génique s'est imposée progressivement mais non sans difficultés.

Récemment ont été décrits de nouveaux outils moléculaires extrêmement performants pour

modifier de manière ciblée le génome. Devenus très accessibles à de nombreux laboratoires, ces outils ouvrent des perspectives majeures pour toute la recherche en biologie y compris dans le domaine médical. Ils vont très vraisemblablement permettre des progrès considérables pour la thérapie génique somatique.

Les méthodes ayant recours à CRISPR-Cas9 ou à des éléments similaires ont déjà été utilisées chez l'embryon et les cellules germinales de nombreuses espèces pour créer des animaux dont la totalité du génome est modifiée. La même démarche est-elle envisageable dans l'espèce humaine ? Les seules indications médicales possibles seraient d'éviter la transmission à l'enfant de pathologies monogéniques graves, elles sont exceptionnelles.

Aucune des techniques actuellement disponibles ne peut être utilisée, avec toute l'efficacité et l'innocuité nécessaires, pour modifier le génome de cellules germinales ou d'un embryon conduisant à la naissance d'un enfant. Il n'y a donc pas lieu de changer actuellement la législation française sur ce point.

L'absence d'application clinique ne doit pas empêcher cependant les recherches fondamentales et précliniques dans le domaine, y compris sur les cellules germinales et les embryons humains, afin notamment de mieux connaître les mécanismes régulant la gamétogenèse et le développement précoce de l'embryon ainsi que leurs anomalies. Elles devraient donc être autorisées et soutenues quand elles sont scientifiquement et médicalement pertinentes.

Personnalités auditionnées

Alexandra Durr (Pitié-Salpêtrière), Julie Steffann (Necker-Enfants malades), Anne Fagot-Largeault (Académie des Sciences), Hervé Chneiweiss (Comité d'éthique de l'INSERM), Bertrand Jordan (Crebio-PACA), Philippe Arnaud (INSERM1103, Clermont-Ferrand)

Bibliographie

[1] Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A. Dix ans de thérapie génique, Réflexions. Méd Science. 2010; 26 (2): 115-8

[2] Naldini L, Gene therapy returns to centre stage. Nature. 2015; 526 (7573):351-60

[3] 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; 337(6096):816-21

- [4] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346(6213): 1258096
- [5] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*. 2014; 32(4):347-55
- [6] Lombardo A, Naldini L. Genome editing: a tool for research and therapy: targeted genome editing hits the clinic. *Nat Med*. 2014 ; 20(10):1101-3.
- [7] Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature*. 2015; 522(7554):20-4
- [8] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 2015; 163(3):759-71
- [9] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016; 351(6268):84-8.
- [10] Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet*. 2015; 52(5):289-96
- [11] Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, June CH. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014; 370(10): 901-10.
- [12] Jordan B. CRISPR-Cas9, une nouvelle donne pour la thérapie génique. *Med Sci (Paris)*. 2015; 31(11):1035-8
- [13] 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 ; 6(5):363-72
- [14] 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. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015; 348(6230):36-8.
- [15] Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015 ; 519(7544):410-1
- [16] Jordan B. Thérapie génique germinale, le retour ? *Med Sci (Paris)*. 2015; 31(6-7): 690-3
- [17] Araki M, Ishii T. International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014; 12:108
- [18] <http://www.sdbonline.org/resource?ResourceID=2398>

- [19] <http://www.isscr.org/home/about-us/news-press-releases/2015/2015/03/19/statement-on-human-germline-genome-modification>
- [20] Sugarman J. Ethics and germline gene editing. *EMBO Rep.* 2015; 16(8):879-80
- [21] http://www.hinxtongroup.org/hinxton2015_statement.pdf
- [22] <http://www.wellcome.ac.uk/About-us/Policy/Spotlight-issues/Genome-editing/WTP059704.htm>
- [23] O'Keefe M, Perrault S, Halpern J, Ikemoto L, Yarborough M. "Editing" Genes: A Case Study About How Language Matters in Bioethics. *Am J Bioeth.* 2015; 15(12):3-10
- [24] <http://www.inserm.fr/qu-est-ce-que-l-inserm/l-ethique-a-l-inserm/saisines-et-notes-du-comite-d-ethique>
- [25] Blasimme A, Anegon I, Concordet JP, De Vos J, Dubart-Kupperschmitt A, Fellous M, Fouchet P, Frydman N, Giovannangeli C, Jouannet P, Serre JL, Steffann J, Rial-Sebbag E, Thomsen M, Cambon-Thomsen 1. Genome Editing and Dialogic Responsibility: "What's in a Name?". *Am J Bioeth.* 2015; 15(12):54-7.
- [26] Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Pehlivan Budak T, Renwick P, De Rycke M, Geraedts JP, Harton G. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update.* 2012; 18(3):234-47
- [27] <http://www.technologyreview.com/news/544141/patients-favor-changing-the-genes-of-the-next-generation-with-crispr/>
- [28] <https://www.ipsell.com/2015/03/georgechurchinterview/>
- [29] Lander ES. Brave New Genome. *N Engl J Med.* 2015; 373(1):5-8
- [30] Evans S, Dowell NG, Tabet N, Tofts PS, King SL, Rusted JM. Cognitive and neural signatures of the APOE E4 allele in mid-aged adults. *Neurobiol Aging.* 2014; 35(7):1615-23.
- [31] Tan WS, Carlson DF, Walton MW, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet.* 2012; 80:37-97
- [32] Suzuki T1, Asami M1, Perry AC1. Asymmetric parental genome engineering by Cas9 during mouse meiotic exit. *Sci Rep.* 2014 23; 4:7621..
- [33] Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 2013; 13(6):659-62
- [34] Mizuno S, Dinh TT, Kato K, Mizuno-Iijima S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Hoshino Y, Ikawa M, Takahashi S, Sugiyama F, Yagami K. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm Genome.* 2014; 25(7-8):327-34
- [35] Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL, Samuel MS, Mao J, O'Gorman C, Walters EM, Murphy CN, Driver J, Mileham A, McLaren D, Wells KD, Prather RS. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod.* 2014 ; 91(3):78

- [36] Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W, Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014 13; 156(4):836-43
- [37] Ménoret S, De Cian A, Tesson L, Remy S, Usal C, Boulé JB, Boix C, Fontanière S, Crénéguy A, Nguyen TH, Brusselle L, Thinard R, Gauguier D, Concordet JP, Cherifi Y, Fraichard A, Giovannangeli C, Aneçon I. Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci Rep*. 2015; 5:14410
- [38] Zou Q, Wang X, Liu Y, Ouyang Z, Long H, Wei S, Xin J, Zhao B, Lai S, Shen J, Ni Q, Yang H, Zhong H, Li L, Hu M, Zhang Q, Zhou Z, He J, Yan Q, Fan N, Zhao Y, Liu Z, Guo L, Huang J, Zhang G, Ying J, Lai L, Gao X. Generation of gene-targeted dogs using CRISPR/Cas9 system. *J Mol Cell Biol*. 2015; 7(6):580-3
- [39] Kou Z, Wu Q, Kou X, Yin C, Wang H, Zuo Z, Zhuo Y, Chen A, Gao S, Wang X. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of the ferret. *Cell Res*. 2015; 25(12):1372-5.
- [40] Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Aneçon I, Menchaca A. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0136690.
- [41] Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K, Izu H, Iguchi A, Ikawa M, Ogura A. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp Anim*. 2015; 64(1):31-7
- [42] Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H, Dong Z, Niu Y, Shi B, Cai B, Liu J, Huang S, Yan H, Zhao X, Zhou G, He X, Chen X, Yang Y, Jiang Y, Shi L, Tian X, Wang Y1, Ma B, Huang X, Qu L, Chen Y. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2015 10; 5:13878
- [43] Qin W1, Dion SL1, Kutny PM1, Zhang Y1, Cheng AW1, Jillette NL1, Malhotra A1, Geurts AM2, Chen YG2, Wang H3. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease. *Genetics*. 2015; 200(2):423-30.
- [44] Hashimoto M, Takemoto T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep*. 2015; 5:11315
- [45] Kaneko T, Mashimo T. Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0142755
- [46] Prel A, Caval V, Gayon R, Ravassard P, Duthoit C, Payen E, Maouche-Chretien L, Crenéguy A, Nguyen TH, Martin N, Piver E, Sevrain R, Lamouroux L, Leboulch P, Deschaseaux F, Bouillé P, Sensébé L, Pagès JC. Highly efficient in vitro and in vivo delivery of functional RNAs using new versatile MS2-chimeric retrovirus-like particles. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2015; 2:15039
- [47] 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; 161(3):459-69

[48] Wu Y, Zhou H, Fan X, Zhang Y, Zhang M, Wang Y, Xie Z, Bai M, Yin Q, Liang D, Tang W, Liao J, Zhou C, Liu W, Zhu P, Guo H, Pan H, Wu C, Shi H, Wu L, Tang F, Li J. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res.* 2015; 25(1):67-79

[49] Sato T1, Sakuma T2, Yokonishi T3, Katagiri K4, Kamimura S5, Ogonuki N5, Ogura A5, Yamamoto T2, Ogawa T6. Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports.* 2015; 5(1):75-82.

[50] Chapman KM, Medrano GA, Jaichander P, Chaudhary J, Waits AE, Nobrega MA, Hotaling JM, Ober C, Hamra FK. Targeted Germline Modifications in Rats Using CRISPR/Cas9 and Spermatogonial Stem Cells. *Cell Rep.* 2015; 10(11):1828-35

[51] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, Keith Joung J High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016; Jan 6. [Epub ahead of print]

[52] <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a>

[53] <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2014/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>