



ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE

16, RUE BONAPARTE - 75272 PARIS CEDEX 06

TÉL : 01 42 34 57 70 - FAX : 01 40 46 87 55

www.academie-medecine.fr

Un rapport exprime une prise de position officielle de l'Académie. L'Académie, saisie dans sa séance du mardi 12 avril 2016, a adopté le texte de ce rapport avec 50 voix pour, 20 voix contre et 14 abstentions.

Rapport

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

Genetic modifications of human germinal cells and embryos

Mots-clés : CRISPR-Cas9, modification du génome, ADN, thérapie génique germinale, embryon humain, cellules germinales

Keywords: CRISPR-Cas9, genome editing, DNA, germ line therapy, human embryo, germ cells

Pierre JOUANNET (rapporteur) avec la participation des membres du groupe de travail constitué de :

Membres titulaires : Monique ADOLPHE, Jean-François ALLILAIRE, Raymond ARDAILLOU, Claudine BERGOIGNAN-ESPER, Yves CHAPUIS, Francis GALIBERT, Alain FISCHER, Pierre JOUANNET, 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.

Anne FAGOT-LARGEAULT (Académie des Sciences).

Au nom de la commission 10 Reproduction et développement (Président : Pr Gilles CRÉPIN)

Les membres du groupe de travail déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de ce rapport.

Résumé : Les interventions ayant pour but de modifier le génome de la descendance sont proscrites depuis 1994 en France mais le développement de méthodes comme CRISPR-Cas9 conduit à s'interroger sur leur utilisation potentielle sur les cellules germinales et l'embryon humains. La seule indication médicale acceptable serait d'éviter la transmission d'une pathologie génique à l'enfant mais les conditions, notamment celles relatives à l'efficacité et à l'innocuité de ces méthodes, ne sont pas actuellement réunies pour envisager leur utilisation clinique. De plus il existe d'autres moyens permettant aux couples concernés de réaliser leur projet parental. Les questions éthiques suscitées par ces technologies incitent à recommander l'ouverture d'une réflexion pluridisciplinaire qui devrait être menée dans le cadre d'un débat plus large portant sur l'ensemble des interventions médicales

réalisées lors de de l'assistance médicale à la procréation, pouvant avoir des conséquences sur le génome des enfants à naitre et éventuellement sur celui des générations suivantes. En revanche, les recherches, y compris sur les cellules germinales et l'embryon humains, devraient pouvoir être menées quand elles sont scientifiquement et médicalement justifiées.

Summary: Interventions causing genome modifications that can be passed on to descendants have been prohibited in France since 1994. New methods, such as CRISPR-Cas9, have been developed, raising questions about their potential use on human germline cells and embryos. The only acceptable medical indication would be to prevent the transmission of a disease gene to the child. However, the necessary conditions have not yet been met for this technology to be considered for clinical use, particularly as concerns the efficacy and safety of these methods. There are also other ways for couples to achieve the goal of having children. The ethical questions raised by these technologies will require multidisciplinary discussions within the wider debate on all assisted reproductive technology procedures, which may affect the genome of the unborn child, and, possibly, of subsequent generations. However, this research, including that on germline cells and human embryos, should be carried out provided that it is scientifically and medically justified.

1 Introduction

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. Ceci a permis d'accéder à un grand nombre d'informations sur les variations et les altérations de la séquence de l'ADN et de préciser leur rôle dans le développement de pathologies. L'étape suivante était de pouvoir modifier la structure de l'ADN soit à titre expérimental soit dans un but thérapeutique. 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].

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]. 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 d'insérer une nouvelle séquence d'ADN. La molécule d'ADN ainsi modifiée est ensuite réparée par recombinaison homologue dirigée (HDR) ou 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 depuis sa description [4-7]. De plus, l'utilisation d'autres nucléases bactériennes devrait permettre d'en améliorer encore les performances [8, 9].

Les expériences actuelles sont menées essentiellement sur des modèles animaux ou des cellules *in vitro* mais les applications potentielles de CRISPR-Cas9 ont été rapidement envisagées en clinique humaine pour corriger des mutations en cas d'affection monogénique, en oncologie 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'agit de thérapies somatiques [12]. En 2015, une publication chinoise a laissé supposer que la technique pourrait être aussi utilisée pour modifier le génome d'embryons humains. L'expérience menée sur des embryons triploïdes, 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) mais 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]. Enfin les modifications induites 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.

2 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, 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* ». Par ailleurs le Comité international de bioéthique de l'UNESCO a publié, le 2 octobre 2015, un rapport prédisant 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 qu' « *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* ».

De nombreux pays ont pris des dispositions pour interdire toute modification du génome susceptible d'être transmise aux générations suivantes mais la situation internationale est relativement hétérogène. 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 [17].

Depuis la publication de l'article de Liang et al en 2015 [13], les prises de position se sont multipliées, émanant de scientifiques, de sociétés savantes mais aussi 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 en 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, 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 Hinxtion 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 cinq 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 annoncent croire à des applications cliniques potentielles dans ce contexte [22]. 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.

Enfin la Fédération européenne des Académies de médecine organise un workshop en Avril 2016.

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

3.1 Applications cliniques potentielles

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 pré-implantatoire (DPI) réalisé au troisième jour du développement embryonnaire (stade 8 cellules). Ne seront alors transférés dans l'utérus que les embryons indemnes de la maladie génétique [23]. 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 homoplasmiques de l'ADN mitochondrial (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, il y a la situation des couples ayant recours à un DPI mais pour lesquels aucun transfert d'embryon dans l'utérus n'est possible. Sur les 119 DPI réalisés par le centre Necker-Antoine Béchère du 1-1-2015 au 15-11-2015, il n'y a pas eu de

transfert d'embryon pour 22 couples (18 %). 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 aille de plus en plus dans ce sens [24].

Si éviter de transmettre une pathologie génique à un enfant pourrait constituer une indication acceptable de modification du génome de l'embryon, les conditions sont actuellement loin d'être réunies pour qu'une approche de ce type soit cliniquement envisageable. De plus il existe d'autres moyens permettant aux couples intéressés de réaliser leur projet parental : adoption, don de gamète, accueil d'embryon, tous 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 pourraient bénéficier les enfants atteints après leur naissance.

D'autres indications pourraient avoir 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 ceux 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 [25]. De même, l'élimination du variant $\epsilon 4$ du gène APOE pourrait diminuer le risque de développer une maladie d'Alzheimer [26]. 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 [27], 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 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 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 de maladies.

Enfin l'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 « surhomme » et qui est plutôt du registre de la science-fiction.

Serait-il envisageable de modifier le génome des cellules germinales ou de l'embryon pour promouvoir des caractères ou des traits particuliers chez l'enfant à naître ? Depuis des d'années, toutes les nouvelles technologies qui ont été mises au point pour intervenir dans les processus de la procréation humaine (de la fécondation in vitro au DPI) ont été discutées et parfois contestées dans la mesure où elles pourraient être utilisées pour satisfaire les aspirations de parents et de médecins souhaitant « fabriquer des enfants sur mesure » ou pour promouvoir un nouvel eugénisme. Cette menace a été à nouveau largement évoquée depuis la description des techniques permettant de modifier efficacement la structure de l'ADN et notamment depuis la publication de l'article de Liang *et al* sur l'embryon humain [13].

Si le risque d'un mésusage des technologies permettant de modifier le génome de l'embryon pour choisir les caractères physiques de l'enfant à naître ne peut être ignoré, la réalisation d'un projet de ce type serait très aléatoire. En effet la plupart des caractéristiques recherchées seraient imprévisibles sur la base d'une simple modification de l'ADN au stade embryonnaire pour plusieurs raisons. D'une part la structure génomique d'un individu n'est pas stable tout au long de son développement [28]. D'autre part l'expression d'un gène est le plus souvent modulée par l'expression d'autres gènes mais aussi par des facteurs épigénétiques et/ou environnementaux. Il n'y a donc pas de lien simple et direct entre la séquence nucléotidique d'un embryon au tout début de son développement et le phénotype de l'enfant qui en sera issu même s'il est indéniable que certains variants pourraient induire des modifications phénotypiques marquées.

L'autre risque serait que des modifications du génome de la lignée germinale soient réalisées pour « améliorer » l'être humain ou « augmenter » ses performances. Cette question, évoquée du fait des possibilités théoriques ouvertes par l'utilisation de CRISPR-Cas9 et autres techniques similaires, s'inscrit en fait dans une réflexion plus globale qui concerne l'évolution de la médecine.

La médecine est de plus en plus souvent sollicitée pour agir hors de sa mission traditionnelle du soin. Elle intervient de manière substitutive pour remplacer des organes, des tissus, des cellules ou des gènes défectueux. Elle peut aussi intervenir de manière plus ou moins invasive pour stimuler des fonctions ou améliorer des performances dans de nombreux domaines, par exemples sportif ou militaire. Ces différentes formes d'interventions sont facilitées par des progrès technologiques considérables. Comment se positionnent les nouvelles techniques permettant de modifier la structure de l'ADN dans cet ensemble ? Il a été proposé de classer l'ensemble des technologies d'intervention sur le corps humain en quatre catégories selon leur champ d'action et leur temporalité [29] :

- Action localisée et temporaire ou réversible, par exemple une prothèse amovible ;
- Action générale et temporaire, par exemple une substance dopante ;
- Action localisée et définitive, par exemple certaines thérapies géniques somatique ;
- Action générale et définitive, par exemple la thérapie génique germinale.

Cette dernière qui serait donc la plus interventionniste aurait comme caractéristique supplémentaire d'exercer son action non seulement au niveau de l'individu « traité » mais aussi dans sa descendance.

3.2 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 [30]. Le rendement et l'efficacité des techniques utilisées ont grandement bénéficié de l'utilisation de nucléases et plus récemment de CRISPR-Cas9.

3.2.1 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, en outre 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 a lieu à des moments différents lors de la transition des gamètes vers l'embryon [31]. 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 [32]	souris	<i>Crygc</i>	472	78	36 (46%)
Mizuno 2014 [33]	souris	<i>Tyrosinase</i>	205	60	28 (46%)
Whitworth 2014[34]	porc	<i>CD163</i>	93	4	4
		<i>CD1D</i>	110	4	2
Niu 2014 [35]	Cynomolgus	<i>Ppary, Rag1, Nrob1</i>	83	2	2
Ménoret 2015[36]	rat	<i>Anks3</i>	156	22	4 (18%)
Zou 2015 [37]	chien	<i>Myostatin</i>	35	27	2 (7%)
Kou 2015 [38]	furet	<i>Dcx</i>	117	15	11 (73%)
		<i>Aspm</i>	64	12	8 (75%)
		<i>Disc1</i>	18	4	1
Crispo 2015 [39]	mouton	<i>Myostatin</i>	53	22	10 (45%)
Honda 2015 [40]	lapin	<i>Tyrosinase</i>	67	9	2
Wang 2015 [41]	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 micro-injection 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 [42-44].

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 [45] et en thérapie génique somatique pourraient-ils être employés à ce stade ? Il n'y a actuellement aucun résultat expérimental obtenu chez l'embryon qui le suggère.

3.2.2 Modification ciblée du génome des cellules germinales

Une autre voie d'approche conduisant à une modification du génome dans toutes les cellules d'un individu 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 [31]. 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 [46]. 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 prélevées dans les testicules adultes. Les cellules peuvent alors être traitées *in vitro* par CRISPR-Cas9 puis 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 [47]. D'autres essais ont été faits chez la souris et le rat mais n'ont pas été aussi efficaces [48-50].

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 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 serait complexe dans une perspective clinique humaine. 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 par exemple 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 de l'empreinte génomique risquant d'être transmise aux générations futures.

3.2.3 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 pour la thérapie génique somatique. En effet quand les cellules sont modifiées *in vitro*, les contrôles nécessaires 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 pourraient considérablement réduire le risque d'action hors de la cible [53] 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 devra porter sur la mise au point de techniques permettant de répondre chez l'animal aux exigences définies chez l'homme avant 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 aujourd'hui 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 dans l'état actuel des technologies disponibles. Un long chemin de recherche est encore à parcourir et il n'y a pas lieu d'envisager une modification de la législation française concernant l'utilisation clinique de ces techniques.

4 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 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 » [51].

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 (ABM), au 31 12 2013, 19 335 embryons cryoconservés avaient été donnés à la recherche par 5 883 couples [52]. 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.

Si toutes les conditions sont donc apparemment réunies pour que ce type de recherche puisse être menée en France. Il conviendrait toutefois de clarifier, éventuellement par une modification législative, l'ambiguïté qui persiste 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 plus haut. 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 que les recherches dans ce domaine devraient être soutenues quand elles sont scientifiquement et médicalement pertinentes.

5 L'éthique

5.1 Questions éthiques relatives aux recherches menées sur les cellules germinales et l'embryon humain

La recherche devrait être possible quand elle est scientifiquement et médicalement justifiée, y compris si elle conduit à modifier le génome embryonnaire et dans la mesure où les embryons ne sont pas transférés dans l'utérus. Cette possibilité de recherche est en accord avec les avis précédents de l'ANM sur la recherche concernant l'embryon humain et les cellules souches embryonnaires [53-56]. La recherche doit être strictement encadrée comme le prévoit le dispositif législatif et réglementaire français.

Que la recherche menée sur l'embryon puisse entraîner sa destruction est autorisé dans la mesure où elle est faite à partir d'embryons conçus *in vitro* qui ne font plus l'objet d'un projet parental, comme le prévoit l'article L 2151-5 du code de la Santé publique. Les embryons peuvent être utilisés pour la recherche quand ils n'ont pas d'autre avenir que la destruction et qu'ils ont été donnés dans ce but par les couples. Deux types d'embryons correspondent à cette situation.

- Ou bien il s'agit d'embryons dont les caractéristiques nucléaires, cytoplasmiques ou moléculaires sont jugées, dans les jours suivant la fécondation *in vitro*, incompatibles avec le développement ; ils ne sont alors ni transférés ni congelés. D'après le bilan établi par l'ABM, parmi les 288 495 embryons qui ont été conçus *in vitro* dans les centres d'assistance médicale à la procréation (AMP) en France en 2013, 145 850 soit plus de la moitié n'étaient ni transférables ni congelables [52]. Les embryons ayant fait l'objet d'un DPI et qui, porteurs d'une anomalie génique ou chromosomique, ne sont pas non plus transférés ni congelés (1416 en 2013 d'après le bilan de l'ABM [57]). Ils entrent dans la même catégorie.
- Ou bien il s'agit d'embryons qui ont été conservés congelés mais pour lesquels il n'y a plus de projet parental. En 2013, c'était le cas pour 2744 embryons congelés qui ont été donnés à la recherche par 892 couples [52].

La recherche sur les cellules germinales ne suscite pas de question éthique particulière à condition que les gamètes dont le génome aurait été modifié ne soient pas utilisés pour une fécondation. Sinon il serait nécessaire de supprimer la disposition législative interdisant la création d'embryons pour la recherche, ce qui ne paraît pas souhaitable à la majorité du groupe de travail.

5.2 Questions éthiques relatives à l'utilisation clinique des technologies susceptibles de modifier le génome des cellules germinales et de l'embryon humain

Elles doivent être évoquées dès maintenant, même si cette utilisation est inenvisageable et interdite actuellement. Elles sont de trois ordres :

- Serait-il licite d'intervenir sur un embryon avant son transfert dans l'utérus ?
- L'intervention peut-elle être invasive et modifier le génome de l'embryon ?
- Faut-il exclure par principe toute intervention sur l'embryon ayant des conséquences transgénérationnelles potentielles ?
-

La nature des interventions dont l'embryon, conçu par fécondation *in vitro*, peut être l'objet fait régulièrement débat, d'autant que la limite entre soins, études et recherche n'est pas toujours bien

définie. L'ANM a déjà souligné l'obligation d'assurer à l'embryon les meilleurs soins possibles quand il s'inscrit dans un projet parental [53]. Cette position a été confirmée récemment par le Conseil Constitutionnel se prononçant sur le paragraphe III de l'article 155 de la « loi de modernisation de notre système de santé » du 26 janvier 2016 relatif aux recherches biomédicales menées sur les gamètes et l'embryon dans le cadre de l'AMP. Le Conseil a considéré que les dispositions de cet amendement pouvaient conduire à « prévenir ou soigner des pathologies chez l'embryon », les essais cliniques pouvant être menés en l'occurrence « au bénéfice de l'embryon lui-même » [58]. Il pourrait donc être considéré que le « traitement » d'un embryon porteur d'une mutation génique entre dans ce cadre et qu'il ne serait pas contraire à l'éthique de le traiter plutôt que de le détruire.

L'utilisation clinique de CRISPR-Cas 9, ou de technologies similaires, ne serait pas la seule situation où l'intervention médicale aurait des conséquences sur la constitution génique de l'embryon et de l'enfant à naître. Depuis le développement de l'AMP, les possibilités les plus variées sont apparues et ont été mises en œuvre: choix des gamètes de donneurs et de donneuses sur critères génétiques pour diminuer le risque de pathologies chez l'enfant, réalisation de fécondations *in vitro* par ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) avec des spermatozoïdes porteurs de mutations du gène CFTR ou de microdélétions du chromosome Y, dépistage préconceptionnel ou choix de l'embryon après détection d'un allèle morbide comme cela se pratique aux Etats Unis ou en Israël pour l'éradication de maladies génétiques graves telles que la maladie de Tay Sachs ou la thalassémie, utilisation du DPI pour choisir le sexe de l'enfant (interdite en France mais couramment pratiquée aux USA), création d'embryons obtenus par transfert du génome nucléaire des futurs parents dans le cytoplasme ovocytaire d'une donneuse pour éviter la transmission de pathologies mitochondriales (projet approuvé par le parlement au Royaume Uni). Toutes ces interventions sont de nature et de finalité différente mais elles ont toutes des conséquences sur la constitution génique de l'embryon et du futur enfant. Il serait souhaitable que cette dimension génétique de l'AMP soit l'objet d'une réflexion globale pour en fixer les conditions de réalisation et les limites éventuelles. Cette réflexion devrait associer les personnes concernées et l'ensemble de la Société sans laisser de côté l'examen des pratiques dans les autres pays.

La transmission aux générations suivantes de modifications géniques dont les effets sont peu ou mal connus est souvent considérée comme une limite qu'il convient de ne pas franchir. Cependant quand on crée délibérément par ICSI un embryon porteur d'une mutation du gène CFTR, l'altération génique est aussi susceptible d'être transmise aux générations suivantes. Il en sera de même quand des embryons reconstitués, pour éviter la transmission de pathologies mitochondriales, seront transférés dans l'utérus comme prévu en Grande Bretagne. L'utilisation éventuelle de CRISPR-Cas9 quand l'efficacité et l'innocuité de la méthode seront validées aurait-elle plus d'inconvénients pour les générations futures ? La réflexion à mener en la matière ne devrait pas non plus ignorer le rôle que peuvent jouer des facteurs épigénétiques et/ou environnementaux dans la période préconceptionnelle et les conséquences transgénérationnelles qu'ils peuvent avoir. C'est dans ce cadre plus général que la réflexion concernant CRISPR-cas9, une technique parmi d'autres, devrait être menée et que toutes les études nécessaires devraient être entreprises pour lever autant que possible les incertitudes et les risques pour les générations futures.

6 Conclusions

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

De nouveaux outils moléculaires extrêmement performants pour modifier le génome de manière ciblée ont été décrits. Devenus très accessibles dans 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 procédés similaires ont déjà été utilisées chez l'embryon et dans les cellules germinales de nombreuses espèces pour créer des animaux dont le génome est modifié dans l'ensemble des cellules. 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 requises, 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. Cette position pourra être éventuellement reconsidérée ultérieurement en fonction de l'évolution de l'état des connaissances.

L'absence d'application clinique ne doit pas empêcher cependant les recherches fondamentales et précliniques dans ce 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.

L'utilisation clinique éventuelle de ces nouvelles technologies, innovations parmi d'autres, s'inscrit dans un mouvement évolutif de la médecine dont les enjeux ne sont pas que techniques ou médicaux mais impliquent aussi des choix éthiques et sociaux. Dès à présent, il est nécessaire d'affirmer que ces nouvelles technologies ne doivent pas être mises au service d'un eugénisme programmé.

7. Recommandations

L'Académie nationale de médecine recommande :

- le maintien de la législation actuelle interdisant toute intervention sur la structure de l'ADN ayant pour conséquence de modifier le génome de la descendance ;
- le développement de la recherche utilisant les technologies permettant la modification ciblée du génome, y compris sur les cellules germinales et l'embryon humain.
- l'adaptation des textes nécessaires au développement de ces recherches en France et en Europe, concernant en particulier l'interdiction de créer des embryons transgéniques, étant entendu que les embryons ainsi modifiés ne donneront pas lieu à un transfert dans l'utérus en l'état actuel des connaissances et de la législation ;
- l'ouverture d'une réflexion pluridisciplinaire sur les questions posées par les techniques pouvant modifier de manière ciblée le génome germinale et embryonnaire, ce sujet devant être traité dans le cadre d'un débat plus large portant sur l'ensemble des technologies et interventions médicales réalisées lors de de l'assistance médicale à la procréation et pouvant avoir des conséquences sur le génome des enfants à naître et éventuellement sur celui des générations suivantes

Références

- [1] Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A. Dix ans de thérapie génique, Réflexions. Med Sci (Paris). 2010; 26: 115-8
- [2] Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. Nature. 2015; 526:351-60
- [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; 337:816-21
- [4] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 2014; 346: 1258096
- [5] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol. 2014; 32:347-55
- [6] Lombardo A, Naldini L. Genome editing: a tool for research and therapy: targeted genome editing hits the clinic. Nat Med. 2014; 20:1101-3
- [7] Ledford H. CRISPR, the disruptor. Nature. 2015; 522:20-4
- [8] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. Cell. 2015; 163:1-13

- [9] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016; 351:84-8.
- [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; 52:289-96
- [11] Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G *et al*. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014; 370: 901-10.
- [12] Jordan B. CRISPR-Cas9, une nouvelle donne pour la thérapie génique. *Med Sci (Paris)*. 2015; 31:1035-8
- [13] Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z *et al*. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*. 2015 ; 6:363-72
- [14] Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G *et al*. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015; 348:36-8.
- [15] Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. Don't edit the human germ line. *Nature*. 2015 ; 519:410-1
- [16] Jordan B. Thérapie génique germinale, le retour ? *Med Sci (Paris)*. 2015; 31: 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: 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] Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB *et al*. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 2012; 18:234-47
- [24] <http://www.technologyreview.com/news/544141/patients-favor-changing-the-genes-of-the-next-generation-with-crispr/>
- [25] <https://www.ipsccell.com/2015/03/georgechurchinterview/>
- [26] Lander ES. Brave New Genome. *N Engl J Med*. 2015; 373:5-8
- [27] 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; 35:1615-23.

- [28] Li R, Montpetit A, Rousseau M, Wu SY, Greenwood CM, Spector TD *et al.* Somatic point mutations occurring early in development: a monozygotic twin study. *J Med Genet.* 2014; 51: 28-34.
- [29] Nouvel P, A scale and a paradigmatic framework for human enhancement *In* : Bateman S, Gayon J, Allouche S, Goffette J, Marzano M. *Inquiring into Human Enhancement, Interdisciplinary and International Perspectives.* London: Palgrave MacMillan 2015. P. 103-18
- [30] Tan WS, Carlson DF, Walton MW, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet.* 2012; 80:37-97
- [31] Suzuki T, Asami M, Perry AC. Asymmetric parental genome engineering by Cas9 during mouse meiotic exit. *Sci Rep.* 2014; 23:7621.
- [32] Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S *et al.* Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 2013; 13: 659-62
- [33] Mizuno S, Dinh TT, Kato K, Mizuno-Iijima S, Tanimoto Y, Daitoku Y *et al.* Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm Genome.* 2014; 25:327-34
- [34] Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL *et al.* Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod.* 2014 ; 91:78
- [35] Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell.* 2014 13; 156:836-43
- [36] Ménoret S, De Cian A, Tesson L, Remy S, Usal C, Boulé JB *et al.* Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci Rep.* 2015; 5:14410
- [37] Zou Q, Wang X, Liu Y, Ouyang Z, Long H, Wei S *et al.* Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *J Mol Cell Biol.* 2015; 7:580-3
- [38] Kou Z, Wu Q, Kou X, Yin C, Wang H, Zuo Z *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of the ferret. *Cell Res.* 2015; 25:1372-5.
- [39] Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC *et al.* Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One.* 2015; 10:e0136690.
- [40] Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K *et al.* Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp Anim.* 2015; 64:31-7
- [41] Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H *et al.* Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 2015; 5:13878
- [42] Qin W, Dion SL, Kutny PM, Zhang Y, Cheng AW, Jillette NL *et al.* Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease. *Genetics.* 2015; 200:423-30.
- [43] 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

- [44] Kaneko T, Mashimo T. Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation. PLoS One. 2015; 10: e0142755
- [45] Prel A, Caval V, Gayon R, Ravassard P, Duthoit C, Payen E *et al.* 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
- [46] Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, Luo J, Bacman SR, Williams SL *et al.* Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. Cell. 2015; 161:459-69
- [47] Wu Y, Zhou H, Fan X, Zhang Y, Zhang M, Wang Y *et al.* Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. Cell Res. 2015; 25:67-79
- [48] Sato T, Sakuma T, Yokonishi T, Katagiri K, Kamimura S, Ogonuki N *et al.* Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR/Cas9. Stem Cell Reports. 2015; 5:75-82.
- [49] Chapman KM, Medrano GA, Jaichander P, Chaudhary J, Waits AE, Nobrega MA *et al.* Targeted Germline Modifications in Rats Using CRISPR/Cas9 and Spermatogonial Stem Cells. Cell Rep. 2015; 10: 1828-35
- [50] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature. 2016; 529: 490-5
- [51] <http://www8.nationalacademies.org/onpinews/newsitem.aspx?RecordID=12032015a>
- [52] <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2014/donnees/procreation/01-amp/synthese.htm>
- [53] David G. Communiqué concernant le projet de loi relatif à la bioéthique. Bull. Acad. Natle Med. 2002, 186 : 195-203.
- [54] Pellerin D. Sur les cellules souches embryonnaires humaines en médecine « régénératrice ». Bull. Acad. Natle Med. 2002, 186 : 913-4
- [55] Le Gall JY, Ardaillou R. Cellules souches et perspectives thérapeutiques. Bull. Acad. Natle Med. 2010, 194:1601-20
- [56] Chapuis Y., Jouannet P., Ardaillou R.. Avis sur le projet de loi relatif à la bioéthique adopté à l'Assemblée Nationale en première lecture le 15 février 2011. Bull. Acad. Natle Med. 2011, 195: 733-40
- [57] <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2014/donnees/diag-prenat/03-preimpl/synthese.htm>
- [58] <http://www.conseil-constitutionnel.fr/conseil-constitutionnel/francais/les-decisions/acces-par-date/decisions-depuis-1959/2016/2015-727-dc/decision-n-2015-727-dc-du-21-janvier-2016.146887.html>

Annexe 1 : 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 ou le gène ciblés peuvent se trouver dans différents organites (noyau, mitochondries), différents types de cellules, de tissus ou d'organes. Enfin l'intervention peut avoir différents buts (traiter, prévenir, améliorer...), le même mot pouvant être interprété différemment selon la finalité. Ainsi une étude réalisée 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 germinale » sont ceux qui décrivent le mieux les situations envisagées mais leur manque de simplicité les rend inutilisables en pratique. 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 parfois 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 meilleure 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 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.

[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; 15:3-10

[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, Anegón I, Concordet JP, De Vos J, Dubart-Kupperschmitt A, Fellous M et al. Genome Editing and Dialogic Responsibility: "What's in a Name?". *Am J Bioeth.* 2015; 15:54-7.

Annexe 2 : 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) Simone Bateman (CNRS UMR 8211– Université Paris Descartes –EHESS –INSERM U988), Jean Michel Besnier (Université Paris-Sorbonne)

Pour copie certifiée conforme
Le Secrétaire perpétuel

Professeur Daniel COUTURIER