

Deux femmes récompensées conjointement par le prix Nobel : un inédit !

Oui, deux femmes, Emmanuelle Charpentier, une Française, et Jennifer Doudna, une Américaine, ont partagé en novembre 2020 le prix Nobel de chimie pour des travaux qu'elles avaient réalisés ensemble il y a moins de dix ans et qui ont révolutionné les techniques de modification des génomes, que ceux-ci soient des génomes bactériens, des génomes végétaux ou des génomes animaux et humains. Elles n'ont pas collaboré très longtemps, mais cette collaboration a été d'une efficacité impressionnante, menant à la publication en 2012 d'un article fondateur dans la revue *Science* [1]. C'est la première fois qu'un prix Nobel a été décerné conjointement à deux femmes en pleine activité.

Emmanuelle Charpentier (52 ans) est donc la cinquième Française lauréate du prix Nobel après Marie Curie, deux fois prix Nobel – prix Nobel de physique en 1903 pour ses travaux sur les radiations et prix Nobel de chimie en 1911 pour sa découverte du radium et du polonium – ; Irène Joliot-Curie, fille de Marie Curie, prix Nobel de chimie en 1935 pour sa découverte de la radioactivité artificielle, c'est-à-dire la synthèse de nouveaux éléments radioactifs ; Françoise Barré-Sinoussi, prix Nobel de physiologie ou médecine en 2008 pour la découverte du virus HIV responsable du SIDA ; et Esther Duflo, prix Nobel d'économie en 2019 pour ses méthodes proposées pour réduire de la meilleure façon la pauvreté dans le monde. De fait, 57 femmes et 873 hommes ont été nobélisés depuis la création du prix en 1901 ! Ces chiffres soulignent le caractère exceptionnel de l'évènement commenté ici...

L'aventure d'Emmanuelle, Jennifer et CRISPR/Cas9

Que la technologie CRISPR/Cas9 de modification des génomes serait un jour récompensée par le prix Nobel était évident depuis quelques années. On y pensait surtout beaucoup pour les deux chercheuses qui ont été sélectionnées en 2020 par Stockholm car elles avaient déjà été de multiples fois honorées ensemble par de très grands prix, tels que les Prix Gairdner, Prix Kavli et le Prix L'Oréal-UNESCO. Mais plusieurs autres chercheurs avaient aussi contribué à ces découvertes et étaient aussi pressentis. Alors pourquoi elles, qui n'avaient pratiquement pas étudié le système CRISPR ? Parce que ce sont elles qui ont publié l'article qui a déclenché toute la technologie de modification ciblée des génomes chez de nombreux organismes.

En bref, en collaborant, toutes deux ont tiré profit de la découverte faite par Emmanuelle Charpentier qui travaillait sur le rôle des petits ARN non codant des streptocoques, mettant en évidence le mode d'action précis de la protéine Cas9 et son utilisation possible dans la modification ciblée des génomes. Reprenons brièvement l'historique de toute cette aventure. Plusieurs microbiologistes, dont Francisco Mojica, avaient repéré la présence de séquences répétées à un endroit du chromosome des bactéries, qu'on appelle le locus⁽¹⁾ CRISPR pour « clustered regularly interspaced short palindromic repeats ». Ces séquences répétées sont interrompues par de



Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, prix Nobel de chimie 2020. © Fondation L'Oréal.

courtes séquences non identiques qui, très vite, se révélèrent être des séquences de bactériophages ou virus de bactéries. De nombreux travaux contribuèrent à montrer qu'en fait la région CRISPR stocke des informations qui sont la trace d'une infection passée. Comment cela se passe-t-il ? Lors d'une infection par un bactériophage, celui-ci s'attache d'abord à la bactérie puis injecte son ADN dans la bactérie qui, dans la plupart des cas, le réplique, le transcrit, et le traduit et fabrique ainsi des centaines de nouveaux virus qui font exploser la bactérie, avec dispersion des particules virales dans l'environnement. Mais dans certains cas, la bactérie se défend en découpant l'ADN qui s'introduit chez elle, bloquant ainsi l'infection (voir *figure*). L'astuce est qu'ensuite elle intègre l'un des fragments de cet ADN du bactériophage dans son locus CRISPR. Lorsque cette bactérie qui a intégré un morceau d'ADN de phage se réplique et se multiplie, toute la descendance garde le souvenir du virus qu'a rencontré l'ancêtre ! De plus, le locus CRISPR est un endroit du chromosome qui est transcrit, c'est-à-dire qu'il produit en permanence des petits ARN, les crARN. Si un jour la bactérie rencontre à nouveau le bactériophage qui a laissé une trace de son passage dans le chromosome, le crARN correspondant vient se coller sur l'ADN injecté par le virus, provoque sa destruction immédiate et donc protège la bactérie de l'infection. On dit que les bactéries se sont immunisées contre le virus. Ces bactéries ont ainsi mis en place une immunité que l'on peut qualifier comme chez les êtres humains d'immunité adaptative. On appelle la première phase d'intégration de l'ADN du bactériophage dans le chromosome de la bactérie, la phase d'acquisition ou adaptation. On appelle la phase d'interaction entre le crARN et l'ADN du virus, l'interférence. Comment se font ces étapes d'adaptation et d'interférence ? Grâce à des protéines dont les gènes sont situés juste à côté du locus CRISPR, les protéines Cas (pour « CRISPR associated proteins »). Selon les bactéries, il y a un nombre différent de gènes et de protéines Cas. Chez les streptocoques, il y a une protéine Cas qui est

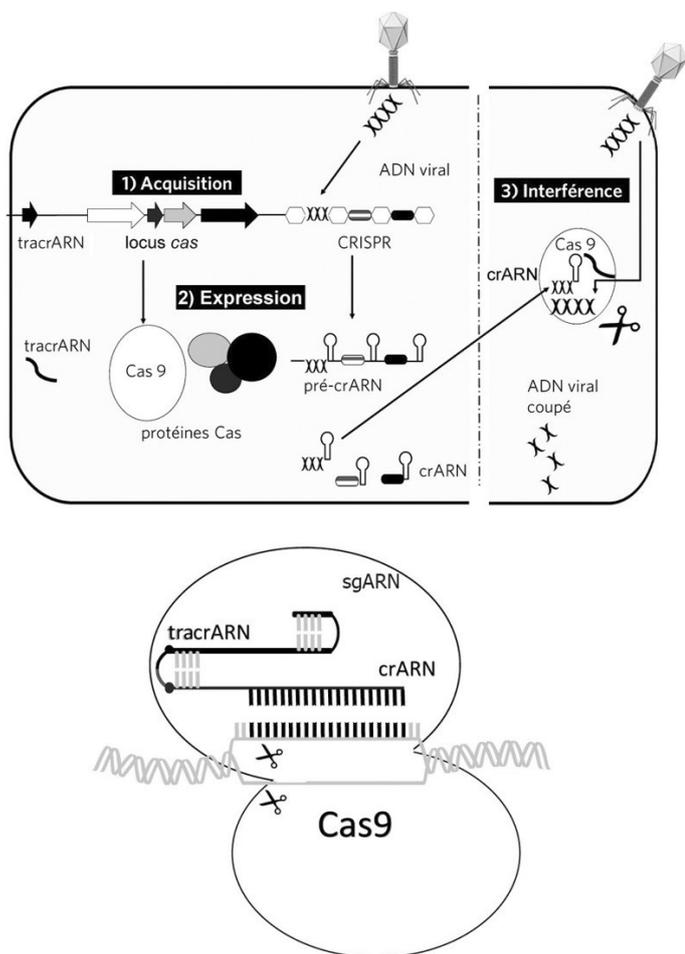


Schéma de la technologie CRISPR/Cas9 (issu de *La nouvelle microbiologie - Des microbiotes aux CRISPR*, Pascale Cossart, Éditions Odile Jacob, 2016, DR).

devenue très connue, la protéine Cas9, car celle-ci peut fixer en même temps un ARN, c'est-à-dire par exemple l'un des crARN, et un brin d'ADN et ensuite couper l'ADN.

La découverte qu'a faite Emmanuelle Charpentier est celle d'un petit ARN codé par le génome du streptocoque dans la région chromosomique où se trouve le locus CRISPR et qui se fixe non seulement sur les crARN mais aussi sur la protéine Cas9. C'est un ARN guide, qui guide donc le complexe crARN Cas9 sur la cible reconnue par le crARN. Emmanuelle Charpentier a appelé ce petit ARN, le tracrARN. Lorsqu'elle a discuté des propriétés de ce tracrARN avec Jennifer Doudna, qui était alors déjà l'une des meilleures biochimistes de l'ARN au monde, elles ont décidé de voir si elles ne pourraient pas démontrer que ce système de clivage guidé par le tracrARN, un crARN et la protéine Cas9, marche pour toutes les cibles et avec uniquement la protéine Cas9. Et cela marchait. De plus, elles se sont dit : « On pourrait fusionner le tracrARN et le crARN et voir si ce double ARN (SG = small guide) en présence de Cas9 atteint bien sa cible ADN et la clive. » C'est ce qu'elles ont réussi à faire *in vitro* dans l'article de *Science* [1].

Quelques mois plus tard seulement après la publication de Charpentier et Doudna, les groupes de Feng Zhang et de Georges Church démontraient que le clivage spécifique via la technologie CRISPR/Cas9 pouvait être réalisé dans des cellules complexes, c'est-à-dire des cellules humaines et des

cellules murines, générant des mutations à des endroits précis du génome. Ceci fut alors réalisé chez le poisson zèbre, chez la levure, chez les bactéries, et très vite les premières souris modifiées apparurent. En jouant sur les capacités des organismes à réparer les clivages générés par la protéine Cas9, soit en réalisant des mutations de délétions, soit en intégrant un fragment d'ADN au site de clivage, les recherches sont arrivées à des prouesses en un temps record. Ces prouesses ont énormément servi en recherche, permettant de comprendre la fonction de nombreux gènes. La technologie a aussi permis de rétablir la fonction de gènes mutés en introduisant au site de clivage des gènes fonctionnels, à tel point que la technologie a même été – au grand tollé de tous les chercheurs présents lors de la divulgation de ce résultat – utilisée sur des cellules embryonnaires pour générer des bébés CRISPR/Cas9. Des règles d'utilisation de cette technologie chez l'homme sont maintenant très strictes : son utilisation sur les cellules germinales est interdite. Chez les plantes, l'autorisation de l'utiliser varie suivant les pays.

La leçon qu'a apportée cette magnifique histoire...

C'est que la recherche sur des questions fondamentales comme la recherche sur le rôle des petits ARN non codants peut produire des résultats très inattendus s'ils sont bien exploités et menés avec rigueur et ouverture d'esprit. Cette histoire nous a aussi montré que comme disait Pasteur, « *La chance sourit aux esprits bien préparés.* » Emmanuelle était, comme beaucoup de microbiologistes à l'époque de sa découverte, fascinée par le système CRISPR chez les bactéries. Quand elle découvrit que son petit ARN avait des homologies de séquence avec les régions palindromiques répétées trouvées dans les régions CRISPR, elle sentit immédiatement que le tracrARN était une pépite d'or, et il l'était ! Puis elle sut s'associer avec une star de l'ARN qui, elle aussi, trouva que cette histoire sentait très bon ! La collaboration a été très fructueuse.

En tant que femme scientifique, très proche d'Emmanuelle, car à l'époque de la découverte du tracrARN j'étais dans le même réseau européen qu'elle – nous travaillions tous sur le rôle des petits ARN non codant dans divers microorganismes –, et amie aussi de Jennifer car je l'avais connue en Argentine et rencontrée à des meetings HHMI (Howard Hughes Medical Institute), la nouvelle de ce double prix Nobel m'a vraiment réjoui !

(1) Locus : emplacement précis sur le chromosome.

[1] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, 2012, 337, p. 816-821.

Pascale COSSART,

Professeure à l'Institut Pasteur, secrétaire perpétuel de l'Académie des sciences.

*pascale.cossart@pasteur.fr