

ARTICLE ORIGINAL

CRISPR-Cas9, cellules germinales et embryon humain

Pierre Jouannet*

Université Paris Descartes, 12 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

Reçu le 28 mai 2017

Résumé – Les performances des outils moléculaires utilisant CRISPR-Cas9, qui permettent de modifier de manière ciblée l'ADN, ont suscité de nombreuses applications en recherche et ouvrent des perspectives prometteuses en clinique humaine. Largement utilisé pour faire naître des animaux transgéniques après modification ciblée du génome au stade zygotique, CRISPR-Cas9 a été aussi testé sur des embryons humains à titre expérimental. Bien qu'il existe des indications médicales potentielles pouvant justifier une modification ciblée du génome de l'embryon ou des cellules germinales, les incertitudes relatives à l'efficacité et à l'innocuité de la méthode ne permettent pas d'envisager de mettre en œuvre ce type de thérapie génique germinale à court terme. Il est cependant nécessaire de réfléchir aux enjeux scientifiques et éthiques de cette démarche.

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

Abstract - CRISPR-Cas9, germinal cells and human embryo. The performance of the molecular tool using CRISPR-Cas9, which makes it possible to induce targeted modifications of the DNA, has found numerous applications in research and open promising prospects in human clinic. CRISPR-Cas9 has been widely used to generate transgenic animals after targeted modification of the genome at the zygotic stage. It was also tested on human embryos on an experimental basis. Although there are potential medical indications that may justify a targeted modification of the embryo or germ cell genome, the uncertainties regarding the efficacy and safety of the method do not allow us to consider implementing such germline gene therapy in the short-term. However, it is necessary to weigh the scientific and ethical issues involved in this approach.

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

Abréviations

CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DPI	Diagnostic préimplantatoire
DPN	Diagnostic prénatal
HDR	Recombinaison homologue dirigée (<i>Homology Directed Repair</i>)
ICSI	<i>Intra-Cytoplasmic Sperm Injection</i>
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues (<i>Non-Homologous End Joining</i>)

À la suite des progrès accomplis dans la compréhension du rôle joué par les gènes dans les fonctions cellulaires et leurs dérèglements, on a cherché à modifier la structure de l'ADN afin d'invalider des gènes délétères, de les corriger ou de modifier leur expression. La démarche pouvait être

entreprise à titre expérimental, y compris en fabriquant des animaux transgéniques mais aussi dans un but thérapeutique. Dans les deux cas cependant, les procédures étaient particulièrement complexes, difficiles à mettre en œuvre et réservées à quelques laboratoires spécialisés.

Récemment, de nouveaux outils moléculaires ont été développés qui s'inspirent d'un système de réparation de l'ADN utilisé par les bactéries, le système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Jinek *et al.*, 2012). 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 le fragment de la molécule visé ou d'insérer une nouvelle séquence d'ADN (Figure 1). 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).

*Auteur correspondant : pierre.jouannet2@gmail.com

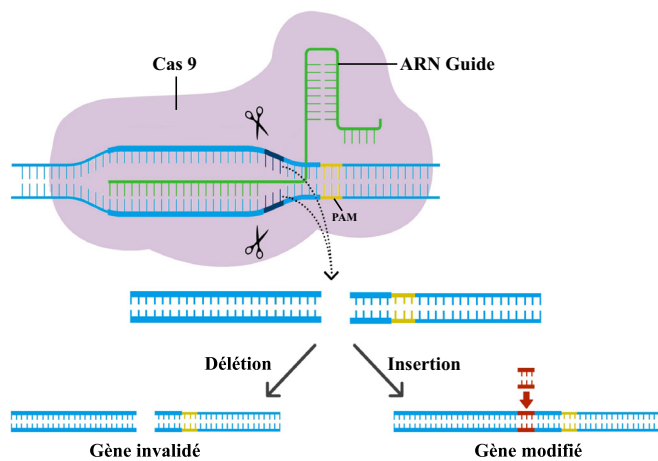


Figure 1. Mode d'action du système CRISPR-Cas9. La nucléase (Cas9) est associée à une séquence guide d'ARN qui permet d'atteindre une cible d'ADN située à proximité de PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). Cas9 peut alors cliver les deux brins de la molécule d'ADN situés entre la cible et PAM. Une autre séquence d'ADN exogène peut alors être incorporée.

La méthode utilisant CRISPR-Cas9 est aussi efficace que les méthodes Talen, nucléases à doigts de zinc et méganucléases développées auparavant. Surtout, elle est beaucoup plus 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 (Doudna & Charpentier, 2014; Ledford, 2015). Ainsi, Pubmed a référencé en 2016 près de 1600 articles mentionnant CRISPR-Cas9 dans le titre, alors qu'il y en avait à peine une dizaine en 2012. La méthode est en perpétuelle évolution et ses performances sont encore susceptibles de pouvoir être améliorées, notamment par l'utilisation de nucléases bactériennes dont les modes d'action sont distincts (Zetsche *et al.*, 2015; Slaymaker *et al.*, 2016; Midic *et al.*, 2017).

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 (Traxler *et al.*, 2016), pour induire des mutations qui pourraient avoir un effet protecteur pour lutter contre les maladies infectieuses (Yin *et al.*, 2017), ou en cancérologie (Cyranoski, 2016). Dans tous les cas, il s'agirait de thérapies somatiques.

Le recours à CRISPR-Cas9 sur l'embryon a facilité la fabrication d'animaux transgéniques et la technique a été utilisée dans de nombreuses espèces (Tableau 1). Dans ce contexte, il était inévitable qu'elle le soit aussi sur des embryons humains. En 2015, une publication chinoise a rapporté les résultats d'une expérience menée sur des embryons triploïdes, donc non transférables. Elle avait pour but de déterminer si CRISPR-Cas9 permettrait de remplacer le gène muté de la β -globine responsable de la thalassémie (Liang *et al.*, 2015). Les résultats n'ont pas été très positifs, le taux de modifications du gène avec HDR était faible, certains embryons étaient mosaïques et des

modifications avaient été aussi provoquées hors cible. À l'époque, 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 (Baltimore *et al.*, 2015; Lanphier *et al.*, 2015).

Depuis 2015, deux nouvelles publications ont rapporté l'utilisation de CRISPR-Cas9 sur des embryons humains. L'une, réalisée sur des embryons triploïdes, avait pour but d'introduire l'allèle *CCR5* $\Delta 32$ qui joue un rôle protecteur contre l'infection à VIH (Kang *et al.*, 2016), l'autre a cherché à corriger des mutations des gènes *HBB* et *G6PD* sur des embryons diploïdes qui avaient été obtenus expérimentalement par fécondation *in vitro* faite avec les spermatozoïdes d'hommes porteurs des mutations concernées (Tang *et al.*, 2017). Dans les deux cas, ces études ont confirmé que l'efficacité de la recombinaison dirigée n'était pas très bonne et des mosaïques ont été observées. Parallèlement, un très large débat a été ouvert dans la communauté scientifique internationale et au-delà. En France, il s'est notamment manifesté par des prises de positions de l'Académie Nationale de Médecine, du Comité d'Éthique de l'INSERM et de l'Office Parlementaire de l'Évaluation des Choix Scientifiques et Technologiques.

Indépendamment des commentaires concernant l'efficacité et l'innocuité des méthodes pouvant modifier de manière ciblée le génome, le risque que celles-ci soient utilisées pour répondre à des aspirations triviales ou eugéniques, selon l'argument de la pente glissante (Jordan, 2015), a été avancé comme c'est régulièrement le cas quand une nouvelle technique susceptible de pouvoir intervenir dans la procréation humaine est mise au point. Sans s'attarder sur les commentaires mettant en avant le désir de créer des enfants sur mesure, qui tiennent plus du fantasme que d'une perspective réellement envisageable, peut-être est-il utile de s'interroger sur les enjeux scientifiques et éthiques d'interventions médicales qui auraient pour but de modifier de manière ciblée le génome d'un enfant à naître.

Enjeux scientifiques d'une utilisation de CRISPR-Cas9 pour modifier des gènes dans l'embryon ou les cellules germinales humains

L'indication la plus évidente, et sans doute la seule, serait d'éviter la transmission à l'enfant d'une altération génique responsable d'une maladie particulièrement grave. Cet objectif peut être actuellement atteint en ayant recours à un diagnostic prénatal (DPN) ou à un diagnostic préimplantatoire (DPI). C'est la raison pour laquelle il est souvent affirmé qu'il n'y aurait aucune raison médicale de chercher à modifier le génome d'un embryon. Il y a cependant quelques cas exceptionnels où DPN et DPI ne peuvent répondre au souhait des parents d'avoir un enfant en bonne santé, par exemple quand l'un des deux partenaires est homozygote pour une altération autosomique dominante comme la chorée de Huntington ou quand les deux partenaires sont porteurs homozygotes

Tableau 1. Modifications génomiques observées chez des petits nés après édition du génome embryonnaire au stade zygote du développement en utilisant la méthode CRISPR-Cas9 par micro-injection.

Auteurs	Espèce	Gène ciblé	Embryons transférés	Petits nés	Petits avec gène modifié
Wu <i>et al.</i> , 2013	Souris	<i>Crygc</i>	472	78	36 (46 %)
Mizuno <i>et al.</i> , 2014	Souris	<i>Tyrosinase</i>	205	60	28 (46 %)
Whitworth <i>et al.</i> , 2014	Porc	<i>CD163</i>	93	4	4
		<i>CD1D</i>	110	4	2
Niu <i>et al.</i> , 2014	<i>Cynomolgus</i>	<i>Pparγ, Rag1, Nrob1</i>	83	2	2
Ménoret <i>et al.</i> , 2015	Rat	<i>Anks3</i>	156	22	4 (18 %)
Zou <i>et al.</i> , 2015	Chien	<i>Myostatine</i>	35	27	2 (7 %)
Kou <i>et al.</i> , 2015	Furet	<i>Dcx</i>	117	15	11 (73 %)
		<i>Aspm</i>	64	12	8 (75 %)
		<i>Disc1</i>	18	4	1
Crispo <i>et al.</i> , 2015	Mouton	<i>Myostatine</i>	53	22	10 (45 %)
Honda <i>et al.</i> , 2015	Lapin	<i>Tyrosinase</i>	67	9	2
Wang <i>et al.</i> , 2015a	Chèvre	<i>Myostatine, FGF5</i>	416	98	26 (26 %)
Wang <i>et al.</i> , 2015b	Porc	<i>Npc1L1</i>	315	34	24 (71 %)
Guo <i>et al.</i> , 2016	Lapin	<i>Myostatine</i>	105	11	11 (100 %)
	Chèvre	<i>Myostatine</i>	18	4	1
Petersen <i>et al.</i> , 2016	Porc	<i>CGT-A1</i>	86	12	7 (58 %)

d'altérations autosomiques récessives comme celles responsables de la mucoviscidose. Serait-il alors possible de corriger le gène déficient en intervenant sur l'embryon ?

L'outil moléculaire CRISPR-Cas9 a été utilisé pour modifier de manière ciblée le génome embryonnaire chez de nombreuses espèces. En général, la construction moléculaire était micro-injectée *in vitro* au stade zygote soit dans le cytoplasme, soit directement dans les pronuclei (Figure 2). Différents types de gènes ont été ciblés avec pour objectif d'induire une invalidation, une surexpression ou une modification (Tableau 1). Les embryons étaient ensuite transférés dans l'utérus de femelles pseudo-gestantes, soit immédiatement, soit au stade blastocyste. Le nombre de petits nés par rapport au nombre d'embryons transférés a été souvent très faible. De plus, ils n'étaient pas toujours porteurs de la modification souhaitée (Tableau 1). Certains étaient mosaïques, ce qui peut être expliqué par une action plus tardive de CRISPR-Cas9 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 (Suzuki *et al.*, 2014). Enfin il n'est pas certain que l'intervention n'ait pas induit des effets non désirés. Les conséquences ne sont pas graves quand il s'agit de travaux expérimentaux où les animaux ne présentant pas les caractères souhaités peuvent éventuellement être éliminés. Prendre de tels risques serait inacceptable pour une application dans l'espèce humaine. Il serait donc nécessaire que des tests contrôlant l'efficacité et l'innocuité de la méthode soient réalisés sur les embryons avant leur transfert dans l'utérus.

Une autre voie d'approche consisterait à intervenir sur les cellules germinales avant la fécondation. Les différents composants du complexe ARN-Cas9 pourraient être injectés dans l'ovocyte en métaphase II en même temps que le spermatozoïde ou de manière séquentielle (Suzuki

et al., 2014). Aucune expérience de ce type qui aurait conduit à la naissance de petits ne semble avoir été faite. L'application de la technique à un stade plus précoce de l'ovogenèse ne serait pas cliniquement 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 d'initier la spermatogenèse pour produire des spermatozoïdes porteurs de la modification génique que l'on souhaite transmettre à l'embryon. La procédure a été utilisée avec succès chez la souris pour corriger une mutation du gène *Crygc* (*Crygc*^{-/-}) responsable de cataracte. Après le transfert des spermatogonies souches dans le testicule, obtention de spermatozoïdes et fécondation *in vitro*, 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 (Wu *et al.*, 2015). D'autres essais ont été faits chez la souris et le rat mais n'ont pas été aussi efficaces (Chapman *et al.*, 2015 ; Sato *et al.*, 2015). Chez l'Homme, la modification ciblée de gènes dans les spermatogonies pourrait être envisagée pour éviter la transmission d'une pathologie monogénique quand le DPI est impossible, mais pourrait aussi avoir pour but de corriger des altérations géniques responsables de déficit de la spermatogenèse et de stérilité (Mulder *et al.*, 2016). Cependant l'obtention de spermatozoïdes fonctionnels à partir des spermatogonies modifiées nécessiterait d'avoir

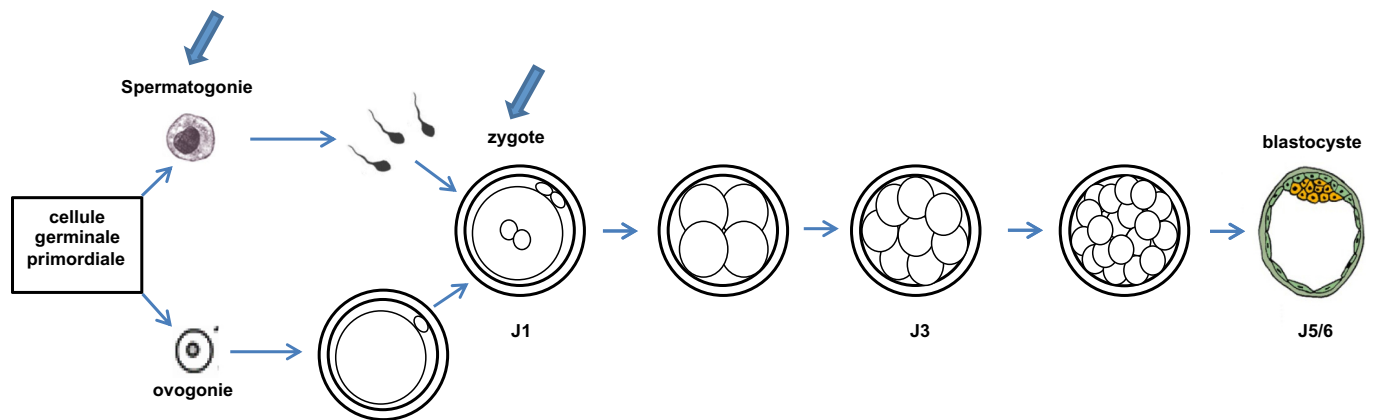


Figure 2. Étapes du développement de la lignée germinale et de l'embryon avant l'implantation. Les flèches grasses indiquent les stades dont le génome a été modifié par CRISPR-Cas9 et ayant conduit à la naissance de petits dont le génome a été modifié chez l'animal (voir texte et [Tableau 1](#)). J1, 3 et 5/6 indiquent le nombre de jours correspondant aux stades du développement de l'embryon humain.

recours à une spermatogénèse *in vitro* ou à une auto-transplantation des spermatogonies souches dans les testicules. Ces deux techniques sont actuellement mal maîtrisées et n'ont pas fait la preuve de leur efficacité et de leur innocuité.

Indépendamment des situations évoquées précédemment, il y a celles des couples qui ont recours à un DPI pour éviter la transmission d'une maladie génétique à l'enfant mais pour lesquels aucun transfert d'embryon dans l'utérus n'est possible car tous les embryons analysés sont atteints. Il est possible que les couples concernés demandent alors si les embryons atteints ne pourraient pas être « traités » plutôt que détruits (<https://www.technologyreview.com/s/544141/patients-favor-changing-the-genes-of-the-next-generation-with-crispr/>).

Répondre à leur demande serait cependant impossible dans l'état actuel des méthodes utilisables. En effet, il faudrait agir sur des embryons ayant déjà eu un DPI, c'est-à-dire au stade 8 cellules ou au-delà. À ce stade, il est difficilement envisageable de micro-injecter le complexe moléculaire CRISPR-Cas9 dans des embryons et l'expérience ne semble pas avoir été faite sur des modèles animaux. Les composants du système CRISPR-Cas9 pourraient être introduits dans les cellules par d'autres moyens comme l'électroporation. Quand cette technique a été utilisée sur des zygotes de souris, les résultats obtenus ont été similaires à ceux de la micro-injection ([Hashimoto & Takemoto 2015](#); [Qin et al., 2015](#)) mais la technique n'a pas été testée à des stades plus avancés du développement. D'autres vecteurs comme des rétrovirus, qui ont été utilisés avec succès sur d'autres systèmes cellulaires 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.

Si éviter de transmettre une pathologie génique à un enfant pourrait constituer une indication acceptable de modification du génome de l'embryon, d'autres indications sont parfois évoquées comme celles qui pourraient avoir pour but de réduire le risque d'apparition de

pathologies communes chez l'individu. Il existe en effet des variants naturels de la structure des gènes qui peuvent jouer un rôle « protecteur » contre des maladies telles que le diabète (*SLC30A8*), l'hypercholestérolémie (*PCSK9*) ou certaines infections virales (*CCR5*). De même, l'élimination du variant $\epsilon 4$ du gène *APOE* pourrait diminuer le risque de développer une maladie d'Alzheimer ([Lander, 2015](#)). Modifier de manière ciblée ces variants pourrait donc être bénéfique. Cependant cette démarche pourrait avoir aussi des inconvénients car on ne connaît pas toujours bien les différents rôles joués par ces variants. D'autre part, la plupart des variants génétiques identifiés ne jouent qu'un rôle très faible. Il serait donc illusoire de croire que leur seule modification puisse entraîner des changements physiologiques significatifs pour empêcher la survenue de maladies. Enfin, une 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 qui chercherait à promouvoir un être humain amélioré et qui est plutôt du registre de la science-fiction.

Enjeux éthiques d'une utilisation de CRISPR-Cas9 pour modifier des gènes dans l'embryon ou les cellules germinales humains

Depuis 1975 et la conférence d'Asilomar, il était couramment admis qu'aucune thérapie génique germinale ne devait être entreprise. En effet, induire une modification génique qui se manifesterait dans la totalité des cellules du futur individu et qui serait donc transmissible aux générations suivantes semblait inacceptable. Le seul texte international dans lequel cette position est affirmée est la Convention d'Oviedo élaborée en 1997 et qui 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». Cependant, de nombreux pays n'ont pas ratifié cette convention, y compris en Europe. La France pour sa part avait adopté une disposition identique dès 1994 (article 16-4 du Code Civil). Les nouvelles possibilités ouvertes par CRISPR-Cas9 et autres techniques similaires ont conduit à reconsidérer cette position.

À partir de 2015, de nombreux organismes se sont penchés sur cette question et ont publié des rapports comme le Comité d'Éthique de l'INSERM, l'Académie Nationale de Médecine et l'Office Parlementaire d'Évaluation des Choix Scientifiques et Technologiques en France; les Académies Nationales des Sciences, de Médecine et d'Ingénierie aux États-Unis; le *Nuffield Council* au Royaume Uni, etc. Leurs conclusions et leurs recommandations sont généralement concordantes. Elles soulignent la nécessité de ne pas interdire la recherche car CRISPR-Cas9 est devenu un outil moléculaire très précieus pour les recherches fondamentales visant à connaître les mécanismes régulant le développement préimplantatoire de l'embryon humain et leurs dysfonctionnements (Plaza Reyes & Lanner, 2017). Les recherches devraient aussi porter sur l'amélioration des méthodes permettant de corriger des gènes défectueux au niveau des cellules germinales et de l'embryon, sur leur efficacité et sur leur innocuité. En revanche, il y a une unanimité pour souligner que toute intervention clinique à but de thérapie génique germinale est inenvisageable dans l'état actuel des connaissances, même s'il y a des indications médicales, comme mentionné plus haut, qui pourraient justifier ce type de démarche. Il est donc nécessaire de réfléchir dès maintenant aux conditions et aux conséquences d'une thérapie génique germinale humaine. C'est ce qu'a notamment fait le « *Committee on Human Gene Editing: Scientific, Medical, and Ethical Considerations* » réuni par les Académies des Sciences, de Médecine et d'Ingénierie Américaines dans un rapport très bien documenté et publié en février 2017 (voir Annexe 1).

Il serait aussi souhaitable d'intégrer les nouvelles possibilités potentielles ouvertes par le développement de CRISPR-Cas9 et autres méthodes similaires dans une réflexion sur l'ensemble des actes médicaux intervenant dans la procréation humaine et qui ont pour conséquence d'influencer la constitution génétique des enfants à naître. Sans parler des DPI couramment pratiqués dans certains pays pour choisir le sexe de l'enfant, cette réflexion devrait concerner les critères génétiques pris en compte dans les procréations avec don de spermatozoïdes ou d'ovocytes, les reconstitutions embryonnaires associant le cytoplasme énucléé d'un ovocyte de donneuse et le génome nucléaire des futurs parents (Dimond, 2015) ou la réalisation de fécondation *in vitro* par ICSI (FIV-ICSI) avec les spermatozoïdes d'hommes stériles dont on sait qu'ils sont porteurs d'altérations géniques. Il est courant par exemple de pratiquer des FIV-ICSI avec des spermatozoïdes d'hommes stériles porteurs d'une mutation du gène responsable de la mucoviscidose ou d'une micro-délétion

du chromosome Y, altérations qui n'auraient pu être transmises aux générations suivantes sans l'intervention médicale.

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 péri-conceptionnelle 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.

Annexe 1

HUMAN GENOME EDITING
Science, Ethics and Governance
(*National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, 2017*)

- RECOMMENDATION 5-1.*
Clinical trials using heritable germline genome editing should be permitted only within a robust and effective regulatory framework that encompasses
- *the absence of reasonable alternatives;*
 - *restriction to preventing a serious disease or condition;*
 - *restriction to editing genes that have been convincingly demonstrated to cause or to strongly predispose to that disease or condition;*
 - *restriction to converting such genes to versions that are prevalent in the population and are known to be associated with ordinary health with little or no evidence of adverse effects;*
 - *the availability of credible pre-clinical and/or clinical data on risks and potential health benefits of the procedures;*
 - *during the trial, ongoing, rigorous oversight of the effects of the procedure on the health and safety of the research participants;*
 - *comprehensive plans for long-term, multigenerational follow-up that still respect personal autonomy;*
 - *maximum transparency consistent with patient privacy;*
 - *continued reassessment of both health and societal benefits and risks, with broad on-going participation and input by the public;*
 - *reliable oversight mechanisms to prevent extension to uses other than preventing a serious disease or condition.*

Références

- 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. (2015). A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*, 348, 36-38.

- Chapman KM., Medrano GA., Jaichander P., Chaudhary J., Waits AE., Nobrega MA., Hotaling JM., Ober C., Hamra FK. (2015). Targeted germline modifications in rats using CRISPR/Cas9 and spermatogonial stem cells. *Cell Rep*, 10, 1828-1835.
- Crispo M., Mulet AP., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., dos Santos-Neto PC., Nguyen TH., Crénéguy A., Brusselle L., Anegón I., Menchaca A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS One*, 10, e0136690.
- Cyranoski D. (2016). CRISPR gene editing tested in a person. *Nature*, 539, 479.
- Dimond R. (2015). Social and ethical issues in mitochondrial donation. *Br Med Bull*, 115, 173-182.
- Doudna JA., Charpentier E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1258096.
- Guo R., Wan Y., Xu D., Cui L., Deng M., Zhang G., Jia R., Zhou W., Wang Z., Deng K., Huang M., Wang F., Zhang Y. (2016). Generation and evaluation of myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 6, 29855.
- Hashimoto M., Takemoto T. (2015). Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep*, 5, 11315. *Erratum in: Sci Rep*, 2015, 5, 12658.
- Honda A., Hirose M., Sankai T., Yasmin L., Yuzawa K., Honsho K., Izu H., Iguchi A., Ikawa M., Ogura A. (2015). Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp Anim*, 64, 31-37.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara J., Hauer M., Doudna JA., Charpentier E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-821.
- Jordan B. (2015). Thérapie génique germinale, le retour ? *Med Sci (Paris)*, 31, 690-693.
- Kang X., He W., Huang Y., Yu Q., Chen Y., Gao X., Sun X., Fan Y. (2016). Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet*, 33, 581-588.
- Kou Z., Wu Q., Kou X., Yin C., Wang H., Zuo Z., Zhuo Y., Chen A., Gao S., Wang X. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of the ferret. *Cell Res*, 25, 1372-1375.
- Lander ES. (2015). Brave new genome. *N Engl J Med*, 373, 5-8.
- Lanphier E., Urnov F., Haecker SE., Werner M., Smolenski J. (2015). Don't edit the human germ line. *Nature*, 519, 410-411.
- Ledford H. (2015). CRISPR, the disruptor. *Nature*, 522, 20-24.
- 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. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein Cell*, 6, 363-372.
- Ménoret S., De Cian A., Tesson L., Rémy S., Usal C., Boulé JB., Boix C., Fontanière S., Crénéguy A., Nguyen TH., Brusselle L., Thinarat R., Gauguier D., Concordet JP., Cherifi Y., Fraichard A., Giovannangeli C., Anegon I. (2015). Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci Rep*, 5, 14410.
- Midic U., Hung PH., Vincent KA., Goheen B., Schupp PG., Chen DD., Bauer DE., VandeVoort CA., Latham KE. (2017). Quantitative assessment of timing, efficiency, specificity, and genetic mosaicism of CRISPR/Cas9 mediated gene editing of hemoglobin beta gene in rhesus monkey embryos. *Hum Mol Genet*, 26, 2678-2689.
- Mizuno S., Dinh TT., Kato K., Mizuno-Iijima S., Tanimoto Y., Daitoku Y., Hoshino Y., Ikawa M., Takahashi S., Sugiyama F., Yagami K. (2014). Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm Genome*, 25, 327-334.
- Mulder CL., Zheng Y., Jan SZ., Struijk RB., Repping S., Hamer G., van Pelt AM. (2016). Spermatogonial stem cell auto-transplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. *Hum Reprod Update*, 22, 561-573.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2017). Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance. Washington, DC, The National Academies Press. DOI: [10.17226/24623](https://doi.org/10.17226/24623).
- 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. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156, 836-843.
- Petersen B., Frenzel A., Lucas-Hahn A., Herrmann D., Hassel P., Klein S., Ziegler M., Haderer KG., Niemann H. (2016). Efficient production of biallelic GGTA1 knockout pigs by cytoplasmic microinjection of CRISPR/Cas9 into zygotes. *Xenotransplantation*, 23, 338-346.
- Plaza Reyes A., Lanner F. (2017). Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos. *Development*, 144, 1-3.
- Qin W., Dion SL., Kutny PM., Zhang Y., Cheng AW., Jillette NL., Malhotra A., Geurts AM., Chen YG., Wang H. (2015). Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nucleases. *Genetics*, 200, 423-430.
- Sato T., Sakuma T., Yokonishi T., Katagiri K., Kamimura S., Ogonuki N., Ogura A., Yamamoto T., Ogawa T. (2015). Genome editing in mouse spermatogonial stem cell lines using TALEN and double-nicking CRISPR/Cas9. *Stem Cell Reports*, 5, 75-82.
- Slymaker IM., Gao L., Zetsche B., Scott DA., Yan WX., Zhang F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351, 84-88.
- Suzuki T., Asami M., Perry AC. (2014). Asymmetric parental genome engineering by Cas9 during mouse meiotic exit. *Sci Rep*, 4, 7621.
- Tang L., Zeng Y., Du H., Gong M., Peng J., Zhang B., Lei M., Zhao F., Wang W., Li X., Liu J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics*, 292, 525-533.
- Traxler EA., Yao Y., Wang YD., Woodard KJ., Kurita R., Nakamura Y., Hughes JR., Hardison RC., Blobel GA., Li C., Weiss MJ. (2016). A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med*, 22, 987-990.
- Wang Y., Du Y., Shen B., Zhou X., Li J., Liu Y., Wang J., Zhou J., Hu B., Kang N., Gao J., Yu L., Huang X., Wei H. (2015a). Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. *Sci Rep*, 5, 8256.
- 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 Y., Ma B., Huang X., Qu L., Chen Y. (2015b). Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 5, 13878.
- 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. (2014). Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod*, 91, 78.
- Wu Y., Liang D., Wang Y., Bai M., Tang W., Bao S., Yan Z., Li D., Li J. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 13, 659-662.

- 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. (2015). Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, 25, 67-79.
- Yin C., Zhang T., Qu X., Zhang Y., Putatunda R., Xiao X., Li F., Xiao W., Zhao H., Dai S., Qin X., Mo X., Young WB., Khalili K., Hu W. (2017). *In vivo* excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models. *Mol Ther*, 25, 1168-1186.
- 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. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163, 759-771.
- 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. (2015). Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *J Mol Cell Biol*, 7, 580-583.

Citation de l'article : Jouannet, P. (2017). CRISPR-Cas9, cellules germinales et embryon humain. *Biologie Aujourd'hui*, **211**, 207-213