

Rapport de prospective du Conseil Scientifique de l'INSB du CNRS

Préambule

Comme chaque CSI, le CSI de l'INSB doit produire le fruit de ses réflexions quant à la prospective. Ce rapport a été rédigé en concertation entre tous les membres du CSI ainsi que quelques présidents des sections du comité national relevant de l'INSB. Plutôt que de réaliser une liste exhaustive des questions scientifiques d'intérêt pour l'INSB, et plus largement le CNRS, nous avons décidé de concentrer notre rapport sur quelques questions qui ont été identifiées comme étant des défis majeurs à relever ou soulignant de nouveaux modes de pensée. La prospective en neurosciences ayant été abordée par d'autres instances sans concertation avec le CSI de l'INSB, nous laisserons le soin aux personnes y ayant participé de communiquer au CNRS le fruit de leur travail qui devrait aboutir à l'occasion de la rencontre « les neurosciences dans 20 ans » organisée par l'ITMO le 25 juin 2019.

Quelque soient les questions abordées ici, des points de convergence ont été soulignés, ils concernent majoritairement :

1) un développement technique ou technologique donnant un accès à de nouvelles connaissances et/ou outils d'étude du vivant (accès à l'édition du génome dans un large panel d'organismes grâce à CRISPR-Cas9, bio-printing, techniques d'imagerie à résolution temporelle et spatiale élevée).

- **Origine de la vie et grandes transitions évolutives**
- **Ecologie-Biodiversité-Environnement social**
- **Organoïdes – Bioimpression – Biologie synthétique**
- **Homéostasie, interactions hôtes-microorganismes, immunité et inflammation.**
- **Analyses multi échelles : organisme, tissus, cellules et molécules**
- **Interactome 4D multi-échelles.**

2) un questionnement sur l'éthique liée au développement de ces recherches

- **Big Data – points pour discussion**
- **Nouvelles techniques de modification du génome: nouveaux horizons pour un nombre exponentiel de champs disciplinaires; implications sociétales, éthiques et philosophiques**

Le travail des chercheurs est fortement dépendant de multiples évaluations (publications, demandes de financements, rapports d'activité, promotions). Le récent développement de la science ouverte va nécessairement s'accompagner de changements d'attitude, en particulier en ce qui concerne les modes d'évaluation. Il est donc important que le CNRS soit un acteur volontaire dans la mise en place et la prise en compte de ces changements. Deux aspects sont à dissocier : 1) le dépôt de manuscrits en archives ouvertes avant expertise par les pairs, qui vont désormais figurer dans les dossiers à évaluer et 2) le dépôt en archives ouvertes des articles publiés, mais également des données brutes obtenues par les chercheurs. Il est impératif que le CNRS se dote des outils nécessaires pour être un acteur clé lors de l'établissement de ces nouveaux modes de publication et de leurs modalités, et pour protéger ses chercheurs et leur production.

D'un point de vue structurel, à l'issue de notre mandat, nous dressons un bilan mitigé de notre travail et de son impact dans le cadre des missions du Comité National. Ces interrogations ne sont pas propres au CSI de l'INSB, une réflexion plus large a été menée par la C3N sur les interactions entre les CSI et leurs instituts. L'INSB faisait parfois figure de modèle, les interactions avec Catherine Jesus ayant été faciles et la nomination de Nathalie Leresche

comme intermédiaire appréciée. Il n'en reste pas moins que des améliorations doivent permettre de rendre le travail du CSI plus efficace.

L'utilité du CSI a été remise en question à de nombreuses reprises par ses propres membres qui, pour certains, se sont découragés. Il est donc essentiel que les missions du CSI soient définies clairement dès le début de mandat et que la direction de l'institut pense à faire appel à ses membres aussi souvent que nécessaire. Tout travail de réflexion, mené au sein de la direction de l'INSB dans un cadre de prospective devrait associer des membres du CSI. Il a été constaté que, lors de réflexions demandées par l'institut portant sur des sujets qui nécessitaient de la documentation, l'institut se trouvait dans l'incapacité de fournir les données (ex. réflexion sur la taille des équipes). Il est indispensable que le CNRS et les instituts aient les moyens humains et techniques de fournir les données chiffrées nécessaires à un travail efficace au sein des CSI. De plus, une plus grande visibilité des travaux des CSI et une communication directe avec les personnels dépendant de l'INSB, via par exemple une liste de diffusion email, sont souhaitables. Enfin, un système de retours sur les recommandations émises et permettant la prolongation de la réflexion serait bénéfique.

Enfin, pour optimiser le fonctionnement du CSI, il nous semblerait préférable d'organiser des réunions de travail de deux jours consécutifs. Ceci permettrait d'inclure des présentations de chercheurs sur des thèmes choisis en association avec les présidents de section, afin de les impliquer plus et de permettre à tous de faire un travail recentré sur la science.

Christelle Baunez, présidente du CSI INSB 2015-2018

Origine de la vie et grandes transitions évolutives

A la croisée des disciplines et fondatrice de la biologie, l'origine de la vie est devenue de plus en plus accessible à l'étude scientifique au cours du XX^{ème} siècle. Initialement, elle a été abordée, d'une part, par la chimie et la chimie prébiotique à travers des approches fondées sur la synthèse et la disponibilité des précurseurs organiques des macromolécules biologiques sur la Terre primitive et, d'autre part, par la biologie à travers des approches fondées sur la reconstruction du dernier ancêtre commun universel, la détermination des dénominateurs communs de l'ensemble du vivant et la conception de la cellule minimale. Toutefois, depuis de nombreuses années, l'astrophysique et l'astrochimie se sont emparées également du sujet en posant la question de l'origine et l'existence de la vie ailleurs, question d'une actualité particulière face à la découverte de nombreuses exoplanètes et de satellites, dont certains sont potentiellement habitables, et devant la présence généralisée de la matière organique dans l'univers. Au-delà des disciplines impliquées, différents courants de pensée se sont opposés traditionnellement de manière dialectique. Chacun favorisait une composante des systèmes vivants comme première et fondatrice : système génétique (réplicateur), système métabolique (réseau autocatalytique) et, en moindre mesure, membrane (compartiment pouvant agir comme réacteur chimique). Si l'idée du monde à ARN, fondée sur la capacité des ribozymes à stocker de l'information et à acquérir certaines capacités catalytiques, semblait une solution possible au dilemme, un monde à ARN seul et en premier apparaît irréaliste dans l'état des connaissances actuelles.

L'origine de la vie constitue la première grande transition évolutive ; elle est à l'origine même de l'évolution darwinienne et de la diversité biologique. A travers l'évolution, une partie de cette diversité donne naissance à des niveaux d'organisation plus complexes (eucaryotes, diverses multicellularités). L'oxygénation de l'atmosphère comme conséquence de l'évolution de la photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries a joué un rôle dans ces transitions, en permettant l'évolution de la respiration aérobie, avec un rendement énergétique plus important, qui a été cruciale pour l'évolution des eucaryotes.

Dans un contexte de prospective, les questions scientifiques qu'il est nécessaire d'aborder sont :

1. Concernant l'origine de la vie

- Quelle est l'origine des trois composantes essentielles des systèmes vivants : le système génétique (ADN, ARN et précurseurs potentiels), le système métabolique (réseau de réactions catalytiques, transformation de l'énergie) et la compartimentation (origine des membranes et individualisation indispensable pour une évolution darwinienne).
- Comment s'intègrent et évoluent (co-évoluent) ces trois composantes ? Comment se fait la transition d'une chimie des systèmes à une biologie des systèmes dans un contexte environnemental concret (Terre primitive) encore mal connu et souvent ignoré. Un travail important est à faire au niveau d'une chimie « sale », complexe, dans des conditions géochimiques plausibles.
- Comment s'est faite la transition du non-vivant vers le vivant ? A-t-elle été graduelle ou s'est-elle faite par sauts (émergence) ? Même si une réponse historique n'est pas possible, l'étude des facteurs déterministes est possible à travers, d'une part la biologie de synthèse et d'autre part par la modélisation/l'intelligence artificielle.

L'ensemble de ces questions doit être abordé en appliquant une véritable interdisciplinarité impliquant l'astrophysique, la chimie (astrochimie, chimie prébiotique, biochimie, géochimie), la géologie, la biologie, l'intelligence artificielle, et l'épistémologie/philosophie des sciences (questions sur l'émergence, définition de la vie, sémantique et dialogue entre disciplines), en tirant parti des expertises complémentaires. Les compétences existent en France. En particulier, il y a une longue histoire de multi-, et parfois d'interdisciplinarité dans la communauté liée à l'exo/astrobiologie (avec une participation timide de la biologie). Toutefois, il y a un manque cruel de connaissance mutuelle et de dialogue entre la

communauté « exo/astrobiologie » et celle de la biologie en France. Il serait judicieux de favoriser les échanges entre ces communautés (congrès interdisciplinaires, écoles, ateliers, possibilités de co-encadrement pour une recherche d'interface ?) et le développement d'une vraie culture de l'interdisciplinarité qui puisse imprégner les générations plus jeunes.

2. Concernant les grandes transitions évolutives

- L'origine de la cellule eucaryote. Si l'importance de l'oxygène et le rôle majeur de la symbiose interdomaine archées-bactéries à l'origine de la cellule eucaryote sont désormais solidement fondés, se posent deux grands types de questions dont les mécanismes et l'histoire évolutive restent à résoudre :
 - La nature de la symbiose (métabolique, hôte-parasite ou autre) fondatrice entre l'archée et l'ancêtre alphaprotéobactérien de la mitochondrie, si celui-ci est arrivé tôt ou tardivement dans le processus d'eucaryogenèse, et s'il y a eu d'autres bactéries impliquées dans ce processus
 - L'évolution des systèmes et processus typiquement eucaryotes : noyau et système d'endomembranes, variété des modifications épigénétiques, méiose, etc.
- L'origine et la diversification de la photosynthèse eucaryote, avec un rôle majeur de la symbiose. Alors que la symbiose est un phénomène omniprésent dans les communautés naturelles, l'apparition du plaste (et de la mitochondrie) est un événement unique : pourquoi ?
- L'origine des multicellularités, en particulier y a-t-il des dénominateurs communs qui entraînent une stabilisation et une différenciation des phases multicellulaires (régulation des cycles de vie unicellulaire/colonies, composantes type cadhérine, intégrine, adaptation sélective opportuniste de processus de communication intercellulaire)

L'ensemble de la biologie au CNRS a de fortes compétences dans les champs thématiques pouvant contribuer à faire des avancées significatives pour répondre à ces questions, en particulier la microbiologie environnementale, la phylogénie moléculaire, la métagénomique ou encore la biologie cellulaire et la biologie du développement (évo-dévo). Toutefois, il serait fortement souhaitable de promouvoir une plus forte interaction avec les sciences de la Terre (registre fossile ancien, identification de biosignatures spécifiques - isotopiques, moléculaires, morphologiques - fiables et datables), ces compétences étant également présentes en France. Toute action favorisant l'interaction entre ces disciplines et la formation des jeunes chercheurs à l'interface renforcerait le potentiel d'avancer significativement et de peser dans la scène internationale.

Ecologie-Biodiversité-Environnement social

Une des évolutions épistémologiques importante de la biologie des dernières années est la prise en compte de la notion d'environnement et de contexte, c'est-à-dire une vraie vision écologique de la biologie et des processus biologiques.

Evident pour l'écologie classique, c'est devenu de plus en plus important pour la compréhension des communautés microbiennes dans leur ensemble (microbiomes) dont l'activité globale à un moment donné dépend non seulement de la diversité phylogénétique présente et de ses fonctions individuelles mais essentiellement des interactions biotiques des différentes composantes de la communauté entre elles dans un environnement physico-chimique précis (qui souvent varie avec le temps). L'environnement (biotique et abiotique) joue un rôle clé non seulement au niveau des communautés, mais affecte également les processus biologiques à l'échelle des individus. Ceci est bien illustré par le cas de la biologie du développement. Pendant de très nombreuses années les spécialistes de ce domaine se focalisaient sur un petit nombre d'organismes modèles bien choisis (la souris, la drosophile, le nématode, la plante Arabidopsis) et s'attachaient à travailler sur des souches de laboratoire isogéniques de façon à éviter tout polymorphisme qui était considéré comme un bruit qui allait polluer leurs expériences. Dans un premier temps, avec l'arrivée de l'Evo/Dévo ils se sont aperçus qu'un petit nombre de modèles, aussi puissants soient-ils, ne pouvait suffire pour appréhender l'ensemble des processus biologiques complexes. Ils ont alors développé un plus grand nombre de modèles biologiques de façon à mieux prendre en compte la richesse de la biodiversité. Cette évolution s'est poursuivie lorsqu'on s'est rendu compte que le polymorphisme génétique présent dans les populations naturelles n'était pas du bruit mais la matière même de l'évolution. Avec l'arrivée de l'Eco/Evo/Dévo, sans doute renforcé par la problématique du changement climatique global, le rôle de l'environnement comme facteur du développement embryonnaire est ainsi devenu une thématique en plein déploiement. Et bien sûr la façon dont les organismes dans leur milieu, avec leur variation naturelle répondent aux facteurs environnementaux doit être intégrée: ***l'environnement, la diversité ne sont pas des bruits dont il faut se débarrasser, c'est une dimension des réponses biologiques.***

Il est très intéressant de constater que cette évolution s'est produite dans bien d'autres branches de la biologie: en neuroscience on parle de plus en plus du cerveau social et de la prise en compte des facteurs environnementaux, contextuels dans les résultats obtenus sur des modèles animaux, primates ou rongeurs ainsi que sur l'Homme. Mais cette évolution existe aussi en biologie cellulaire où le comportement de chaque cellule individuelle est suivi non pas de façon isolée mais, là encore dans son contexte "naturel": le tissu, la niche, le microenvironnement ou l'embryon. Enfin, même en biologie structurale on s'aperçoit que les possibilités offertes par la génomique structurale de s'intéresser à des édifices macromoléculaires de grande taille change de façon importante notre vision souvent par trop statique des macromolécules.

Cet élargissement de la façon de concevoir un processus biologique est une véritable révolution qui a des conséquences importantes tant organisationnelles que conceptuelles dans de nombreux domaines de la biologie.

* Elle l'oblige encore plus à **interagir avec les autres disciplines scientifiques et en particulier avec le mode de questionnement et d'inférence venant du monde de l'écologie et de l'environnement. Dans le domaine des neurosciences cela doit impliquer également des contacts plus approfondis avec les SHS.**

* Elle implique de **s'intéresser de plus en plus et à exploiter sur le plan de la connaissance la diversité génétique présente dans les populations naturelles, Homme compris.** Les efforts de séquençage (épigénome, transcriptome, microbiome...) doivent donc être poursuivis pour comprendre d'une façon de plus en plus globale les interactions entre génomes et avec l'environnement. (Le séquençage est nécessaire mais pas suffisant: il est nécessaire d'importer et améliorer des outils (e.g. réseaux) pour mesurer les interactions et évaluer leur direction (bénéfique ou antagoniste – parasites, pathogènes)

* Elle rend la question de **l'observation de l'environnement absolument centrale**. Cette importance a été bien montrée en biologie marine avec la mission Tara. Il y a pourtant encore beaucoup de travail à faire car la mission Tara n'a pour l'instant exploré que le facteur spatial et sans réplicats alors que manque encore l'exploration du facteur temps par des séries temporelles qui permettraient d'analyser les variations avec le temps, en relation avec la dynamique des conditions physico-chimiques. Cela implique **que l'INSB s'intéresse de beaucoup plus près aux grands réseaux d'observation de l'environnement marin et terrestre qui sont déployés (INSU, INEE etc...)**. Les bouées instrumentées en mer, les stations d'observations terrestres vont devoir suivre de plus en plus des variables biologiques et l'INSB doit donc avoir une stratégie en la matière. Mais **la notion même d'observation qui est trop souvent décriée en biologie expérimentale doit être remise à l'honneur** et là encore cela s'applique également à l'environnement urbain et à l'espèce principale qui y vit: l'Homme. *L'environnement des individus, suivis avec toutes les méthodes actuelles de l'informatique et des techniques de communication, les conditions écologiques et sociales de la ville, sont des questions importantes dont les neurosciences vont devoir se saisir et qui supposent aussi que l'INSB travaille en proche collaboration avec les autres instituts tels que l'INSIS, l'INS2I, l'INSU, l'INEE et l'INSHS*. En biologie cellulaire toutes les méthodes d'imagerie tendent justement à suivre, avec une résolution spatiotemporelle chaque jour plus grande, le comportement des cellules vivantes et même celui de molécules individuelles dans les cellules vivantes.

* Elle pose la question de l'acquisition de **données massives qu'il faut être capable de déterminer et de traiter (cf. chapitre « big data »)**.

Homéostasie, interactions hôtes-microorganismes, immunité et inflammation

Analyses multi échelles : organisme, tissus, cellules et molécules

Le système immunitaire exerce un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des organismes vivants. En intégrant une multitude de signaux internes et en faisant face constamment au milieu extérieur, le système immunitaire développe une multitude de réponses qu'elles soient de nature immédiate innée, transitionnelle ou adaptative permettant d'acquérir une mémoire immunitaire à long terme à la base du succès de la protection vaccinale. De nombreux facteurs environnementaux dont le microbiote, la nutrition, un ensemble de signaux physicochimiques perçus aux interfaces cutanée, intestinale et pulmonaire ainsi que les dialogues inter-organes modulent et sculptent la nature des réponses immunitaires. Le domaine de l'immunologie et la modulation des réponses par l'environnement représentent un enjeu majeur vis-à-vis de nombreux défis de santé dans de multiples domaines : pathologies cardio-vasculaires, cancer, maladies infectieuses aiguës ou chroniques, maladies autoimmunes et allergies.

Au fil de l'évolution, les cellules de l'immunité ont développé des interfaces et communications variées avec l'ensemble des tissus de l'organisme créant un système immunitaire aux ramifications complexes et finement régulées. Le microbiote varie aussi de concert avec l'état physiopathologique de l'hôte et exerce un rôle fondamental sur le développement du système immunitaire, du système nerveux et les fonctions métaboliques de l'organisme. En conséquence, **l'étude des interactions entre hôte et microorganismes ne se limite plus aux pathogènes mais concerne en premier lieu les microorganismes symbiotes qui, chez l'Homme, représentent plus de 50% du nombre total de cellules et pourraient jouer un rôle clé dans l'homéostasie, la survenue et/ou l'évolution de diverses pathologies chroniques, voire le développement de l'organisme et en particulier celui du système nerveux central.**

Lors de pathologies infectieuses ainsi qu'au cours de nombreux désordres inflammatoires liés à des pathologies cardio-vasculaires, des cancers, des maladies autoimmunes et des allergies, **l'étude des interactions entre hôtes, pathogènes et microbiote représente un nouveau champ de connaissances qui conditionne notre compréhension des réponses mises en œuvre par le système immunitaire.** Le contrôle des réponses immunitaires est également assuré par un ensemble de lymphocytes régulateurs générés dans le thymus ou les tissus périphériques. Ces lymphocytes sont indispensables pour assurer l'homéostasie du système immunitaire lui-même et au-delà, celle de tous les tissus de l'organisme où ils résident. Leur fonction est particulièrement pertinente aux interfaces avec le milieu extérieur telles que la peau et les muqueuses qui accueillent un microbiote très diversifié composé de microorganismes symbiotes dont certains peuvent se révéler pathogéniques. L'ensemble de ces recherches actuellement menées aux échelles de l'organisme, des tissus, cellules et molécules, contribue grandement à l'émergence de nouvelles modalités thérapeutiques ainsi qu'à l'émergence d'une médecine personnalisée.

Dans ce document de prospective, nous avons identifié de façon non-exhaustive trois axes d'émergence récente, méritant d'être poursuivis ou développés :

Axe 1 : Développer l'analyse des interactions réciproques microbiote/hôte par des approches de biologie des systèmes (à l'échelle de l'organisme)

L'interaction entre le régime alimentaire, les microbes intestinaux et les cellules immunitaires assure les fonctions vitales de l'organisme, telles que l'extraction d'énergie et de micronutriments, la protection contre les microbes pathogènes et le maintien des barrières épithéliales. Ces réseaux complexes sont d'une importance vitale pour l'homéostasie de l'organisme, tandis que des relations inadéquates peuvent conduire à des maladies inflammatoires chroniques et des cancers, qui sont des préoccupations majeures de santé publique.

De nombreux mécanismes qui restent à élucider, régulent les réponses immunitaires de l'hôte aux microbes aux interfaces telles que l'intestin et la peau et il s'avère que le microbiote et les facteurs alimentaires jouent un rôle clef dans le contrôle de l'immunité et de l'inflammation.

Notons aussi l'importance fondamentale du microbiote dans le développement du système nerveux central et du système immunitaire aux interfaces avec l'environnement. Le microbiote sculpte une enveloppe épigénétique et une diversification cruciale pour le fonctionnement de ces systèmes qui communiquent grâce à un réseau d'interactions entre cellules, macromolécules et médiateurs. La diversité et la qualité du microbiote sont intimement liées à l'état physiologique du système immunitaire et du système nerveux.

- Il y a donc nécessité d'initier et de développer des recherches interdisciplinaires entre neurobiologistes, immunologistes, microbiologistes et comportementalistes afin d'analyser les interactions entre le microbiote (situé aux interfaces cutanée, digestive et respiratoire) et le système nerveux central ainsi que le système immunitaire par l'analyse et l'intégration de multiples approches métagénomiques, épigénétiques, métabolomiques, transcriptomiques, protéomiques et comportementales d'organismes sains et pathologiques.
- Une modélisation mathématique est nécessaire car l'exploitation de ces données est un défi méthodologique demandant de l'innovation en mathématiques appliquées (mettre en corrélation, trouver des relations pertinentes).
- Il faut pouvoir utiliser des banques de données scientifiques massives pour repérer des corrélations entre des modules fonctionnels définis pour chaque système (issus de modélisations mathématiques) afin d'identifier de façon non biaisée, de nouvelles corrélations et axes d'études.

Ces recherches doivent tenir compte de la nutrition et du métabolisme de l'hôte, du microbiote, du sexe, de l'âge ainsi que des pathologies chroniques (neurologiques, psychiatriques, tumorales, infectieuses, auto-inflammatoires et liées à des greffes).

Axe 2 : Poursuivre l'analyse des interactions entre pathogènes, cellules hôtes et système immunitaire avec des technologies nouvelles :

Les extraordinaires diversité et capacité d'émergence des pathogènes, viraux, bactériens et parasitaires sont telles que l'étude des cycles réplicatifs de ces organismes, de leurs mécanismes de virulence et de leurs interactions avec les tissus de l'organisme et les composantes immunitaires, représente une source inépuisable de découvertes potentielles dans le futur.

L'étude de ces interactions hôte-microorganisme-système immunitaire nécessite une interdisciplinarité croissante avec d'autres champs disciplinaires dans le département des sciences de la vie. Nous assistons à un échange croissant d'informations et de connaissances et à la création d'une communauté de langage et de pensée souvent à l'origine de découvertes aussi importantes qu'inattendues nécessitant de poursuivre l'analyse de ces interactions :

- par des approches d'imagerie tissulaire, cellulaire et de suivi de molécules uniques.
- par des approches moléculaires et génétiques (analyses des génomes, des répertoires immunitaires) dans des situations normales ou pathologiques (pathologies aiguës ou chroniques tumorales, infectieuses et auto-inflammatoires).
- par des approches « omiques » globales ainsi que des analyses effectuées à l'échelle unicellulaire.
- par des approches de biologie des systèmes (à l'échelle de l'organisme, des tissus et cellules).

En résumé, l'étude des interactions entre l'hôte et son environnement microbiologique doit prendre en compte le continuum existant depuis les microorganismes symbiotes jusqu'aux microorganismes pathogènes ainsi que l'effet des interactions entre membres du microbiote, et doit être abordée à de multiples échelles depuis l'organisme, les tissus et cellules jusqu'aux aspects moléculaires.

Axe 3 : Développer des études d'immuno-neurologie et d'immuno-métabolisme

Un ensemble de preuves indique qu'en plus de leur programme de développement finement régulé, les cellules immunitaires sont également contrôlées par les signaux alimentaires et neuronaux. Ainsi, bien qu'il existe des preuves tangibles suggérant que les cellules immunitaires possèdent des stratégies de détection très diversifiées, la façon dont les cellules lymphoïdes perçoivent, intègrent et répondent aux signaux environnementaux de toute sorte reste mal comprise et largement inexplorée.

Nous proposons de renforcer les axes d'étude d'immuno-neurologie et d'immuno-métabolisme.

- en relation avec le tropisme des pathogènes pour leurs niches tissulaires et cellulaires particulières.
- en relation avec des pathologies chroniques spécifiques (pathologies auto-immunes, maladies du système nerveux central, tumeurs, maladies infectieuses).
- en relation avec des traitements novateurs : immunothérapie anti-tumorale, transplantation

Il faudrait également :

- étudier de façon conjointe l'homéostasie et le rôle des cellules de l'immunité et de l'inflammation liée aux processus régénératifs et au remodelage des tissus (analyse multi-échelle en situation normale et pathologique).
- aborder précisément les échelles moléculaires et cellulaires : déterminer les acteurs et régulateurs de l'inflammation tissulaire dans le but d'identifier des cibles moléculaires ainsi que des mécanismes afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Loin d'être exhaustifs, nous préconisons : 1) de caractériser avec un niveau de précision plus grand les interactions réciproques microbiote/hôte par des approches de biologie des systèmes ; 2) d'introduire des technologies nouvelles pour étudier les interactions entre pathogènes, cellules hôtes, système immunitaire et microorganismes symbiotes et 3) de développer des études d'immuno-neurologie et d'immuno-métabolisme.

Il va de soi que les efforts doivent être soutenus dans les domaines en pleine expansion conduisant actuellement à de multiples applications thérapeutiques telles que 1) le développement de techniques de transfert et/ou manipulation du microbiote, 2) le développement de nouvelles stratégies vaccinales anti-infectieuses et antitumorales, 3) le développement de stratégies visant à renforcer les réponses immunitaires antitumorales, basées sur le ciblage des points de contrôles des réponses immunitaires, et 4) la reprogrammation ex-vivo des lymphocytes.

Ces points de prospective sont pour l'ensemble, directement reliés et/ou issus de recherches fondamentales conduites au cours des trente dernières années au sein de différents laboratoires soutenus par le CNRS.

Organoïdes - Bioimpression - Biologie synthétique

L'ingénierie cellulaire a connu récemment des avancées décisives avec l'avènement des cellules souches pluripotentes induites. L'environnement cellulaire est aujourd'hui mieux maîtrisé et on peut à présent guider les cellules vers des destins précis et les suivre individuellement. Le développement des microtechnologies (photolithographie, synthèse additive, micro-fluidique, matrices, substrats, micropatterning...) s'est adapté à l'expansion et à la multiplicité des systèmes biologiques : les capteurs sont désormais à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire, les matériaux eux sont devenus biocompatibles.

Au croisement de l'ingénierie cellulaire et des microtechnologies est née la culture tridimensionnelle (3D). En utilisant des milieux complexes, de composition et rigidité contrôlées, enrichis de facteurs de différenciation spatialement contrôlés on parvient à reconstruire des systèmes biologiques structurés, afin de proposer des modèles *in vitro* (organoïdes, organes sur puce) et l'on est aux prémices de la médecine régénératrice par bioimpression.

Ces recherches sont régulièrement l'objet d'attention médiatique en raison d'effets d'annonce, comme par exemple, l'espoir de fabriquer des organes *de novo* pour suppléer au manque de donneurs (greffe d'organes), ou encore, de permettre de proposer des systèmes reconstitués permettant une alternative à l'expérimentation animale (domaine particulièrement sujet à controverses).

Les **organoïdes**, petits organes synthétiques cultivés *in vitro* dans des conditions diverses et contrôlées qui reproduisent une partie de la fonction des organes, permettent l'exploration de phénomènes d'auto-organisation. On constate ainsi que l'auto-organisation cellulaire libre peut facilement se comporter de manière chaotique et entraîner une variabilité substantielle des formes qui en résultent. Les lois physiques déterministes gouvernant l'auto-organisation restent à élucider.

Les organoïdes permettent également de répondre à des questions telles que : qu'est-ce qui détermine la taille des tissus ? Comment la division cellulaire est-elle coordonnée avec la croissance ? Quels mécanismes rétroactifs se mettent en place ? Comment la dynamique du développement code-t-elle la forme ? Quel est le rôle des instabilités, des conditions initiales et des conditions de bords, des gradients chimiques et de l'environnement mécanique dans la production d'organes ?

La compréhension de ces processus doit être associée à la modélisation des phénomènes impactant les organoïdes, nécessitant le développement de solutions hybrides, avec différents types de modélisation (numériques, analytiques) à différentes échelles. L'absence de reproductibilité ainsi que la taille réduite des organoïdes (\leq mm) entravent encore leur utilisation systématique dans la recherche fondamentale ou le développement de leurs applications médicales.

L'imagerie de ces organoïdes à haute résolution et l'adaptation des techniques de quantification par microscopie est un enjeu majeur des années à venir. Elle constitue un maillon important entre les approches de description moléculaire classique en cellule unique et l'imagerie fonctionnelle *in-vivo*.

La bioimpression utilise les principes de la fabrication additive (impression 3D) et procède à l'assemblage couche par couche des constituants des tissus (matrice extracellulaire, cellules, biomolécules) selon une architecture 3D prédéfinie par un modèle numérique. La bioimpression 4D implique de considérer la dimension temporelle au cours de laquelle les cellules imprimées vont se différencier, migrer, s'auto-organiser de façon autonome jusqu'à faire émerger les fonctionnalités biologiques spécifiques. La bioimpression vise donc à guider les processus d'auto-organisation cellulaire qui se produisent naturellement au cours de l'embryogenèse, de développement ou lors du remodelage tissulaire. À terme, des stratégies de production d'organes fonctionnels consistant à assembler par bioimpression une structure de soutien et des organoïdes fonctionnels reproductibles sont envisagées.

La bioimpression d'organes fonctionnels reste toutefois un objectif à long terme qui nécessite la levée de verrous dont les plus complexes sont le contrôle du destin cellulaire (différenciation, auto-organisation), la fragilité des cellules primaires et la fonctionnalité du produit bio-imprimé, ainsi que l'investissement interdisciplinaire technologique et en savoir-faire pour les équipes. Les sciences de l'ingénieur apporteront des solutions, telles que la formulation de bio-encre optimales, la rapidité, la résolution, et la parallélisation des procédés d'impression. La recherche en biologie cellulaire devra se pencher sur les questions de la viabilité cellulaire et de la maturation des produits bio-imprimés. Le développement de matériaux supports permettant de favoriser la croissance, la migration, la différenciation cellulaire, l'auto-organisation cellulaire est également crucial. Différentes solutions, à base d'hydrogels, de céramiques ou de polymères ont été proposées, mais il subsiste une marge de progression importante pour satisfaire un cahier des charges complexe faisant intervenir de nombreux facteurs : biocompatibilité, biodégradabilité, structure, porosité, connectivité, propriétés physico-chimiques et mécaniques.

La bioimpression, faisant intervenir de nombreuses disciplines, sciences des matériaux et chimie, ingénierie tissulaire, imagerie, biologie cellulaire et biophysique, est très clairement au centre des processus multidisciplinaires dont l'essor est souhaité par le CNRS.

Les recherches sur les organoïdes et la bioimpression sont au cœur de problématiques biologiques fondamentales, en ce qui concerne le destin des cellules souches ou les mécanismes en jeu dans les processus d'auto-organisation tissulaires. Elles rencontrent également plusieurs limitations majeures, dont le manque de vascularisation, qui nuisent à la survie des cellules et à l'architecture globale des tissus. Bien qu'il y ait eu divers efforts pour vasculariser des constructions tissulaires (organoïdes) en utilisant des approches de bio-ingénierie *in vitro* telles que la micro-fluidique, ces approches peuvent perturber l'architecture auto-organisatrice d'un organoïde. La transplantation chez les animaux permet une vascularisation plus proche de l'angiogenèse qui se produit au cours du développement, et cette approche s'est révélée efficace pour les organoïdes. La bioimpression hétérogène à l'aide de plusieurs types cellulaires (dont celles qui vont permettre la vascularisation) ou la conception du bio-objet équipés des micro-vaisseaux colonisables et éventuellement bio-résorbables sont des pistes prometteuses.

La biologie synthétique

La Biologie de synthèse peut répondre à au moins trois objectifs :

- (1) améliorer notre compréhension des principes gouvernant la biologie, en particulier la cellule
- (2) concevoir et développer en laboratoire des systèmes biologiques accomplissant des fonctions complexes qui n'existent pas dans la nature ou en modifiant, des systèmes existants.
- (3) proposer de nouvelles hypothèses fonctionnelles qui pourront être ultérieurement testés *in vivo*.

Les progrès considérables réalisés dans différents domaines scientifiques constituent un socle pour la biologie de synthèse : la biologie moléculaire (synthèse d'ADN, séquençage nanopore, édition de génomes... ainsi que la maturité des méthodes (bio)informatiques d'analyse des génomes), l'informatique (conception assistée par ordinateur ; modélisation et systèmes d'aide à la décision), la possibilité de stockage longue durée d'information dans l'ADN (archives filmographiques du festival de Locarno, par exemple) , la chimie (élaboration de voies de rétrosynthèse, introduction d'acides aminés non conventionnels dans les protéines...), la physique et les mathématiques (modélisation de systèmes dynamiques permettant d'optimiser le processus biologique implémenté et de simuler sa régulation).

La combinaison de ces nouvelles connaissances et technologies rend possible de répondre à des questions très fondamentales comme la définition du vivant et son émergence à partir de constituants non vivants.

Trois grands niveaux de complexité apparaissent :

- Le niveau cellulaire
- Le niveau de circuit ou assemblage cellulaire primitif

- Le niveau des réseaux complexes ou de l'organe intégré

Les avancées et les développements dans chacun de ces niveaux de complexité se font en parallèle mais du fait de certaines découvertes technologiques certains enjeux apparaissent aujourd'hui comme majeurs notamment au niveau cellulaire. L'un des enjeux majeurs pour répondre à ces questions est de reconstituer une cellule minimale. Une approche utilisée est celle de la réduction de génome (exemple de bactérie « minimale », Craig Venter). Une autre approche est celle de la complexification, l'assemblage par blocs (assemblage d'un porteur d'information, de limites qui définissent l'espace cellulaire et séparent l'information de l'environnement, des constituants métaboliques permettant de maintenir sa balance énergétique interne). L'étape suivante sera d'inclure la possibilité de variation et de correction d'erreurs pour permettre la robustesse de ces systèmes et leur adaptabilité à des modifications de l'environnement. Des méthodes développées actuellement de prédiction pour la modélisation *in silico* de ce qu'est une cellule minimale sont un important soutien, permettant de tester en très peu de temps de très nombreux scénarios.

Les organoïdes et la bioimpression constituent des domaines de recherche à fort potentiel de développement. Alors que l'investissement de certains pays sur ces domaines est très important (USA, Allemagne, Chine, Corée...), la recherche en France est balbutiante et manque de visibilité.

Outre le grand intérêt pour la fabrication d'organes, déjà identifié par les communautés biomédicales, il existe un réel potentiel en biologie fondamentale pour constituer des modèles cellulaires 3D structuraux, dont les organoïdes, qui pourraient alors être fabriqués de façon reproductible et précise. Les organoïdes pourront ensuite être assemblés par bioimpression. Peu de biologistes, en particulier ceux travaillant sur des questions fondamentales, se sont emparés de ces technologies. Les champs d'applications de la biologie de synthèse sont très nombreux, et s'inscrivent en particulier dans la médecine régénératrice.

La mise en œuvre des approches « organoïdes » et « bio-impression » est complexe et nécessite des compétences spécifiques et multidisciplinaires. De part la nécessité d'intégrer des connaissances très diverses (biologie, informatique, chimie, mathématique), la biologie de synthèse est un champ scientifique fondamentalement interdisciplinaire. A ce titre chaque discipline scientifique impliquée dans le développement de ces approches se trouve ou sera confrontée à ses propres défis théorique, méthodologique et parfois expérimental.

Nous considérons qu'il est nécessaire de I) soutenir l'émergence d'une communauté scientifique spécifique basée sur l'interdisciplinaire. II) Aider à la structuration de cette communauté, par exemple par la réalisation d'une cartographie détaillant les compétences et leur localisation, afin de faciliter les collaborations nécessaires et donc le démarrage de ces projets. III) Envisager un investissement pluriannuel. IV) Assurer une meilleure communication entre les différents instituts au CNRS sur ces domaines. V) Proposer des actions incitatives pour que des biologistes rejoignent le domaine de la bioimpression, par exemple, une action Momentum ciblée. VI) Colorier des postes au concours (en CID par exemple).

Enfin, les avancées déjà effectuées dans ces domaines mais également celles à venir sont et seront très certainement associées à des questions d'ordre philosophique et éthique. En effet, le développement d'outils de création d'objets synthétiques se comportant comme des objets vivants posera la question même de la définition du vivant et par conséquent la question de la place que ces objets devront/pourront prendre au sein de nos sociétés. Les acteurs de la recherche en SHS doivent s'emparer de ces questions afin de fournir en amont de ces futures découvertes un questionnement sur le fonctionnement même de nos sociétés en relation avec le vivant.

Interactome 4D multi-échelles

Etudier les communications cellulaires, à toutes les échelles spatio-temporelles

La biologie structurale intégrative, combinant des informations complémentaires venant de la cristallographie, de la RMN, de la cryoEM (prix Nobel de Chimie 2017), du SAXS et d'autres données biophysiques, permet des avancées constantes dans la caractérisation de la structure et de la dynamique de gros complexes supramoléculaires. De même les approches de microscopie de fluorescence permettent une caractérisation toujours plus fine de la localisation (quelques dizaine de nanomètre) et de la dynamique (quelques millisecondes) des constituants moléculaire en cellules vivantes et tissus. Elle ont connu un très important développement depuis dix ans, notamment grâce aux apports très importants de la photochimie, avec le développement des techniques de super résolution (prix Nobel de chimie 2014), des méthodes de suivi de particules uniques ou encore de la microscopie à feuille de lumière. Le développement des biosenseurs associé aux techniques d'imagerie de fluorescence par excitation multiphotonique ou feuille de lumière ainsi que les méthodes de spectroscopie associées (Raman, Raman Stimulé, IR) permettent des études fonctionnelles de plus en plus riches au niveau des cellules et tissus. Simultanément, les méthodes d'imagerie et spectroscopie par IRM, TEP ou ultrasons, permettent quant à elles de passer de l'échelle du tissu, à celle de l'animal entier ou de l'Homme. Ces outils d'imagerie permettent d'accéder à des informations fonctionnelles particulièrement importantes en immuno-sciences, neurosciences, sciences du développement et cancérologie. De plus, les avancées en imagerie ont permis le développement d'outils optogénétiques et photométriques multipliant encore les possibilités d'interrogations fonctionnelles.

Les défis à venir sont à la fois de **développer des méthodes d'analyse et de modélisation numériques permettant de tirer parti de la richesse de ces nouvelles imageries**, ainsi que d'étendre les échelles spatiales accessibles à chaque technique pour combler les vides entre elles, mais aussi **améliorer les résolutions temporelles (temps d'acquisition) afin de passer à des approches 4D à toutes les échelles**. Il s'agit d'ajouter une dimension temporelle (de la psec. à la journée voire semaine dans le domaine végétal par exemple) à chacune de ces mesures, c'est-à-dire passer de banques d'images à des films à plusieurs échelles temporelles. Tous ces progrès devront permettre de caractériser des ensembles hétérogènes du point de vue de leur conformation, de leur localisation ou de leur dynamique, et, *in fine*, **d'apporter une nouvelle vision des mécanismes d'interaction, de signalisation et de communication entre molécules, cellules et organes**.

Pour cela des développements méthodologiques interdisciplinaires et la conception de nouveaux outils numériques d'analyse sont encore nécessaires. Il est nécessaire de mobiliser notamment la communauté des théoriciens et mobiliser la puissance des nouveaux outils numériques (AI) pour disposer de nouvelles modalités pour analyser, conceptualiser et manipuler ces nouvelles masses d'informations multidimensionnelles (outils dit de réalité augmentée).

L'une des ambitions sera le déchiffrement 4D multi-échelles des interactomes. Cela implique différents domaines : biologie structurale (RX, XFEL, RMN liquide et solide, cryo EM, SAXS, AFM, IRM), suivi de particules uniques, imagerie résolue dans le temps (fluorescence, Raman, FLIM, ...), imagerie *in vivo* (IRM, TEP, ultrasons, optique...), développement de modèles et échantillons biologiques (microfluidiques, modèles *ex vivo* and *in vivo*, tissus). Au-delà de l'importance sur le plan de compréhension du vivant de tels projets sont les fondements de la médecine de demain.

En conclusion, il convient de rapprocher des communautés: biophysique, biologie structurale et fonctionnelle, bioinformatique, physique expérimentale et théorique, chimie, mathématiques appliquées, biologie cellulaire, biologie du développement, ingénierie. Les compétences existent, mais travaillent en général de manière disjointe. Il conviendrait de créer une initiative nationale permettant de travailler sur de grands projets pluriannuels

plaçant par exemple l'ambition du décodage de l'intéactome au même niveau que la conquête spatiale. Définir des objets d'applications précis et mobilisateurs pour réunir des équipes, sur des questions scientifiques ayant un fort impact fondamental et sociétal. Le CNRS est idéalement placé pour promouvoir et porter ce type de thématique et de mode de travail, et placer ainsi la France en pointe dans ce domaine.

Big Data – points pour discussion

De plus en plus, la recherche en biologie génère et manipule des quantités énormes de données ("Big Data" en anglais). Les nouvelles approches quantitatives en biologie sont à présent plus semblables à la recherche en physique. Les quantités énormes des séquences d'ADN sont en partie responsables de ce changement de paradigme ; il faut également y ajouter toutes les autres approches dites "globales" (par exemple, les "omiques" comme le transcriptome, le protéome), l'imagerie numérique en 3 et 4D, en plus des données de recherche aux interfaces avec la physique et la chimie. De plus, les avancées en informatique et la globalisation de la recherche (par exemple, Tara Océans) influencent également les données de recherche en biologie. Les défis que cette révolution du Big Data induit sur la recherche en Sciences de la Vie doivent impérativement être anticipés si l'on désire se maintenir en position de tête dans la recherche mondiale.

Les deux constats majeurs en ce moment concernent les contrastes en besoins entre les **producteurs** et les **utilisateurs** de ces données. Les premiers sont généralement experts en informatique, tandis que les "utilisateurs" sont souvent des "informaticiens débutants" ne désirant qu'un outil facile à utiliser. En outre, la gestion des données ne s'effectue typiquement qu'à l'échelle individuelle ou locale, sans aucune coordination au niveau régional ou national.

Les défis pour l'avenir sont multiples et concernent, par exemple, la facilité du **dépôt des données** de séquences générées par la recherche mais aussi le stockage des données de cohortes, d'imagerie et toute les données brutes encore à traiter. Il faut également anticiper les nouveaux formats de données ainsi que les futurs types de fichiers. Finalement, il ne faut pas oublier les données bibliographiques déposées sur des sites comme HAL, PubMed ou les archives ouvertes, car la littérature scientifique explose en nombre de publications. En ce qui concerne les données, les biologistes ont besoin qu'elles soient "pérennes" et pas uniquement stockées sous forme de "back-ups" à tel ou tel endroit.

Pour garantir un succès futur, les consultations, discussions, constructions pour l'avenir des données devraient se décider à plusieurs niveaux - à l'échelle nationale, à l'échelle européenne et/ou à l'échelle internationale - avec la participation d'autres organismes de tutelle (comme l'INSERM, l'INRA, l'INRIA...) et de la recherche.

Plusieurs interrogations subsistent :

1. Faut-il privilégier un accès ouvert aux données ou contrôler l'accès aux données protégées (par ex. la confidentialité des données industrielles ou médicales, les brevets, ...) ?
2. Quelles conditions pour la sécurité des données, surtout pour les données dites stockées "hors site" ?
3. Quelles conditions pour le stockage et les garanties d'accès gratuits, comme pour les données des NCBI, EMBL, PubMed, ?
4. Faut-il des tutelles pour la sauvegarde et le traitement des données pour la France (par exemple le Génomètre pour Tara Océans) ?

Il faut considérer que les utilisateurs veulent des outils d'exploitation de données (sites Web et leurs interfaces) qui soient simultanément puissants mais faciles d'utilisation ("user-friendly").

Il faut aussi anticiper et réfléchir à des technologies et à de l'instrumentation pour la production des données dans le futur aussi bien que pour l'intégration des données biologiques avec d'autres types de données comme celles des SHS et des autres domaines de la science. La biologie reste un atout majeur pour comprendre la vie (sur Terre) mais aussi pour fournir des solutions aux problèmes de toutes sortes. Finalement, il faut initier des discussions sur les besoins de formation des personnes pour développer des logiciels capables de communiquer

avec ceux des disciplines différentes aux interfaces avec la biologie (par ex. : météorologie, chimie, sciences sociales, écologie....)

Dans un avenir proche, il faudra considérer toutes les finalités ultimes, qui comprennent la modélisation en biologie, l'intelligence artificielle et aussi le "Deep Learning".

Nouvelles techniques de modification du génome

Nouveaux horizons pour un nombre exponentiel de champs disciplinaires; implications sociétales, éthiques et philosophiques

Un grand nombre de bonds quantitatifs et qualitatifs dans l'exploration du vivant ont été permis par des innovations technologiques. Parmi celles-ci, l'édition de génomes est un champ technologique au développement croissant dans lequel une séquence d'ADN génomique choisie est modifiée sans insertion obligatoire d'ADN exogène. Pour cela et à la suite de l'utilisation des méganucléases (1985), deux principales techniques étaient précédemment utilisées. La première utilisait les nucléases à doigts de zinc (Zinc finger nuclease, 1996), la seconde les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN, 2009). La technologie d'édition de génome CRISPR/Cas9 est le dernier outil disponible (2013). Cette technique est basée sur un mécanisme bactérien immunitaire de défense contre les bactériophages présent chez *Streptococcus pyogenes*. Elle a par la suite été adaptée pour être utilisée pour la première fois dans des cellules de mammifères en 2013. Contrairement aux autres techniques disponibles, CRISPR/Cas9 utilise un court ARN guide (ARNg) pour cibler une séquence génomique d'intérêt. L'innovation repose sur la spécificité de l'enzyme Cas9 pour cette séquence complémentaire ARNg/ADN. Des développements plus récents permettent d'utiliser une protéine Cas de plus grande fidélité que Cas9. Cette méthodologie est novatrice en gain de temps et de coût car n'impliquant plus de devoir produire des protéines mais la simple synthèse d'une courte séquence nucléotidique. De plus, la technique est simple, polyvalente, multiplexable, et extrêmement efficace. Ces découvertes ont donc ouvert un champ d'applications technologiques et scientifiques d'édition du génome de façon contrôlée et précise, inimaginable avec les précédentes techniques et ceci dans un très grand nombre d'espèces dont l'homme.

Applications en recherche fondamentale :

Modifier à façon le génome a fait l'objet d'une longue quête en recherche fondamentale, pour tester des hypothèses quant au rôle de gènes précis dans le développement des organismes, leur homéostasie ou comme agent causal ou favorisant l'émergence de pathologies. De nombreuses applications qui débordent le cadre de la simple modification d'un gène apparaissent, ou seront développées dans les années qui viennent. A titre d'exemple, on peut citer:

- Ciblage à des fins mutationnelles:

- L'amélioration des techniques de mutagenèse impliquant la recombinaison homologe par l'utilisation de CRISPR et de guides combinant ARN et ADN, et ce de façon rapide dans une très large palette d'espèces.
- L'étude des mécanismes de réparation de l'ADN à des loci précis, de leur cinétique (et l'identification des facteurs impliqués) grâce au ciblage précis, ce système permettant d'induire un nombre contrôlé de coupures dans l'ADN à des loci spécifiques.

- Insertions ciblées dans le génome. Il est possible d'amener, ou d'insérer, des protéines fluorescentes par exemple à des loci spécifiques, ce qui permet:

- D'identifier et suivre dans le temps le comportement d'un ou plusieurs chromosomes (chromosome painting) précis, d'un sous-domaine dans le chromosome, voir d'un locus précis et restreint, en y amenant de multiples copies d'une protéine fluorescente via la reconnaissance d'une séquence de liaison à l'ADN.
- D'étiqueter une "ORF", par exemple avec une protéine fluorescente qui peut être photo-inductible ou convertibile, et de suivre la dynamique d'expression ou la localisation subcellulaire de la protéine produite et son comportement dans la cellule au cours du temps, ou encore d'en réaliser la purification. Cette avancée permet de rendre compte de la dynamique endogène, dans un contexte physiologique.

- Nouvelles applications dérivées utilisant une forme catalytiquement inactive (Cas9i) qui sont amenées par sgRNA à un (des) loci précis; elles sont envisagées pour :

- Induire un changement local de l'épigénome (fusion avec une enzyme modifiant l'ADN ou les histones)
- Moduler la transcription de gènes ciblés, en y amenant des fusions activatrices ou inhibitrices de la transcription - ceci peut être mis en œuvre de façon cellule- ou tissu-spécifique, ou bien encore à un temps donné (contrôle spatio-temporel).
- Identifier les protéines qui se lient à une région de l'ADN, en y amenant une fusion Cas9i avec des activités "taguantes" comme par transfert de biotine. Ceci permet ensuite de purifier les protéines à proximité ayant donc été "taguées".
- Mutagenèse sans coupure de l'ADN: en combinant le ciblage spécifique dû à CRISPR et des formes de Cas9i fusionnées à des déaminases, permettant ainsi de substituer un nucléotide spécifiquement sans passer par les systèmes de réparation de l'ADN des cellules. Cela permettra de diminuer les effets hors cible.
- Détecter des polymorphismes génétiques (par exemple par la visualisation de la fixation de fusion Cas9i-protéine fluorescente).

- **Ciblage de l'ARN messenger:** des approches dérivées utilisant d'autres protéines Cas permettent d'imaginer des approches pour réduire ou perdre complètement l'expression d'un ou plusieurs gènes, simultanément, de façon cellule ou tissu-spécifique et/ou contrôlée dans le temps.

Applications thérapeutiques

Le système CRISPR a rapidement été utilisé en recherche médicale pour traiter des pathologies génétiques. Ces pathologies (cancers, maladies monogéniques) peuvent être spécifiquement ciblées par CRISPR. Les délétions de gènes pathogéniques ou pro-oncogènes sont envisageables dans un premier temps pour traiter au niveau somatique. Les techniques d'administration progressent rapidement (vecteurs viraux, nanoparticules, injection des protéines et guides). La thérapie somatique permet le remplacement ou la correction d'erreurs génétiques et ouvre donc la voie pour "améliorer" l'organisme (notion de dopage génétique et de transhumanisme). Clairement le système CRISPR est l'outil ayant amené cette révolution.

L'amélioration de l'efficacité des greffes tissulaires peut profiter de CRISPR en permettant de rendre le greffon immunologiquement compatible, qui pourrait même être d'origine non humaine. C'est également envisageable pour la médecine régénératrice en permettant aux cellules greffées de venir réparer un tissu endommagé.

En infectiologie/virologie l'utilisation de CRISPR peut permettre non seulement de limiter l'entrée des virus en bloquant les récepteurs mais également de détecter plus facilement les pathogènes viraux en détectant leur signature génomique dans le milieu environnant.

La technologie CRISPR/Cas9 permet de cibler plusieurs gènes à la fois en combinant de nombreux ARNg, permettant d'obtenir des phénotypes poly-factoriels qui nécessitaient auparavant des croisements multiples.

Applications agronomiques

L'amélioration traditionnelle des espèces animales et végétales repose essentiellement sur des croisements effectués entre espèces/races/variétés différentes et la sélection d'hybrides appropriés. Cependant, celle-ci est fastidieuse. Par exemple, l'introduction d'un allèle de résistance à une maladie dans une variété de culture nécessite typiquement une dizaine de générations. L'utilisation de CRISPR/Cas9 permet de réduire cet effort à deux générations et ainsi d'accélérer l'obtention de nouvelles variétés. Un autre avantage réside dans l'absence de restriction à des espèces/variétés sexuellement compatibles. Cette technique a conduit à des applications actuellement testées en champs, notamment en Chine et aux Etats-Unis. Comme exemples, on peut citer la résistance à des maladies virales ou microbiennes, la tolérance à la sécheresse, à la salinité ou encore l'amélioration de la qualité nutritive. Cependant, une sérieuse

contrainte en Europe se situe au niveau législatif. Un arrêt récent de la Cour de justice de l'Union européenne a en effet assimilé les variétés obtenues par CRISPR/Cas9, y compris celles où une mutation ponctuelle a été introduite, aux organismes génétiquement modifiés. Cela paraît illogique quand on rappelle que cette législation restrictive ne s'applique pas aux variétés obtenues par mutagenèse physique ou chimique aléatoire qui génère quantité de mutations inconnues. L'essor des techniques d'édition génomique dans l'agriculture européenne dépendra de la capacité des chercheurs à convaincre les décideurs politiques du bien-fondé de ces techniques moléculaires et de l'importance d'évaluer les risques/bénéfices de la variété obtenue plutôt que la méthode utilisée pour l'obtenir.

En résumé, les forces de ces nouvelles méthodologies sont :

- ***La possibilité d'approches intégrées, in vivo***
- ***Le saut qualitatif et quantitatif qu'elles apportent dans plusieurs champs disciplinaires***
- ***L'absence de limitation dans l'élargissement possible (autres animaux, (vertébrés/invertébrés, plantes) (et moteur d'amélioration de la qualité de séquençage des génomes)***
- ***Leur dissémination rapide (facilité à mettre en œuvre)***
- ***La source de développement de services/compagnies de biotechnologie au niveau national***

Ces nouveaux outils visant à mieux protéger santé humaine et environnement font toutefois face à des défis d'importance auxquels le CNRS, par la diversité de ses champs disciplinaires, est en mesure de proposer des réponses :

- (1) des défis technologiques pour une édition de génome plus efficace et plus précise***
- (2) la possibilité de réverser la modification induite, en particulier si, lors de thérapie génique par exemple, elles s'avèrent délétères pour la santé du porteur***
- (3) le développement d'une surveillance concernant en particulier la précision dans le temps de l'édition de génome induite, la possibilité de réactions adverses à court et long terme***
- (4) l'application stricte de méthodes de confinement afin d'éviter de répandre les organismes modifiés s'ils présentent un risque (environnement, bio-terrorisme)***
- (5) la mise en place d'une politique de suivi et de régulation***

Ils ont également des implications conceptuelles et philosophiques et, au-delà de la recherche fondamentale et appliquée, interpellent la société dans son ensemble, ainsi que le rapport de l'Homme au monde (écologie, médecine, etc)

- **Elargissement du nombre d'espèces modèles** utilisées tant en biologie végétale qu'animale. Concernant les organismes animaux, de nouvelles espèces récalcitrantes jusqu'à présent aux modifications génétiques sont maintenant accessibles à l'édition génomique (e.g. marmouset, etc). Concernant les plantes supérieures, Arabidopsis a longtemps dominé la recherche fondamentale à cause notamment du séquençage de son génome et des banques de mutants KO disponibles. Le séquençage du génome de plusieurs dizaines d'espèces, la capacité de régénération de plantes transformées et l'outil CRISPR/Cas9 ont fortement élargi le spectre d'espèces modèles en fonction des questions de nature fondamentale (e.g., développement, physiologie) posées ou des applications envisagées.
- **Ethique.** L'utilisation de CRISPR/Cas9 pose des questions éthiques qui doivent être abordées mais qui ne sont pas nécessairement distinctes des questions soulevées pour d'autres techniques d'édition. Par exemple, dans le domaine humain, peut-on envisager cette technique pour introduire des modifications génétiques visant à corriger des pathologies au

niveau somatique, voire même embryonnaire ? Concernant les applications agronomiques, les plantes et animaux modifiés par cette technique doivent-ils être considérés comme des organismes génétiquement modifiés ou pas (comme c'est le cas aux USA)? Le cas récent d'une modification via CRISPR du génome de deux bébés humains en Chine pour des raisons médicalement douteuses et en absence de tout contrôle illustre bien les dérives possibles.

- Bouleversement des paradigmes: La découverte de CRISPR/Cas9 permet de voir sous un nouveau jour les mécanismes de l'évolution; en effet ce système peut être considéré comme un système immunitaire adaptatif. De plus, il a la particularité de pouvoir être transmis aux nouvelles générations. C'est donc un système qui démontre la possibilité de la transmission des caractères acquis et ouvre ainsi une nouvelle vision de l'évolution.