

Nanoblades : des navettes pseudovirales pour la livraison du système CRISPR-CAS9

Philippe E. Mangeot^{1,2,3,4,5}

¹ CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France

² Team "Translation of eukaryotic and viral mRNAs"

Inserm, U1111, Lyon, France

³ École normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69007 Lyon

⁴ Université Lyon 1, Centre international de recherche en infectiologie, Lyon, France

⁵ CNRS, UMR5308, Lyon, France

L'exploration de la biologie virale et des mécanismes d'assemblage des virus a permis depuis longtemps l'ingénierie de particules « dérivées » non infectieuses, classiquement nommées VLP (*virus like particles*) ou pseudoparticules, utiles pour l'étude fondamentale des virus parentaux ou à des fins vaccinales ou technologiques. Le terme de VLP reste imprécis et désigne une structure multiprotéique ressemblant à une particule virale et dont la composition contient une ou plusieurs entités virales, protéines, ou/et acide nucléique. Selon les cas, il pourra s'agir d'une particule très proche d'un virus mais dont les capacités de réplication ont été altérées. Dans d'autres acceptations du terme, une VLP pourra désigner une microvésicule dont la production est simplement induite par la surexpression d'une seule protéine virale [1, 2]. Au-delà des nombreuses applications en vaccination, les VLP sont également exploitées en biotechnologie pour leur capacité à livrer dans une cellule ou un organisme cible du matériel génétique, des composés chimiques ou des protéines d'intérêt. On parlera alors de transduction virale (par opposition à infection), une technique de transfert qui exploite les propriétés de fixation et de fusion des enveloppes virales à la surface des VLP.

Un des exemples de pseudoparticule cargo très utilisée à des fins biotechnologiques concerne les vecteurs viraux livreurs de transgènes. Dérivés du lentivirus VIH-1 (vecteurs lentiviraux) ou des gammarétrovirus, ces outils sont aujourd'hui très communs dans les laboratoires et présentent l'intérêt de pouvoir intégrer des cassettes génétiques dans le génome des cellules cibles. Leur contenu particulaire est complexe : un acide nucléique ARN encapsidé et un assemblage protéique quasi similaire à celui du virus incluant la reverse-transcriptase et l'intégrase virale dont les actions dans la cible assureront synthèse et intégration stable d'un ADN codant.

Depuis quelques années, d'autres travaux ont émergé pour exploiter différemment la mécanique d'assemblage des rétrovirus, par exemple pour livrer des ARNm non rétrotranscrits mais directement traductibles dans la cellule cible [3-5], ou même des protéines d'intérêt opportunément fusionnées aux protéines de structure de la particule [6, 7]. Les VLP générées par ces approches plus originales sont donc des vecteurs transitoires, moins intrusifs, car ils livrent des entités plus labiles qu'un ADN intégré sans grande pérennité dans la cible [8]. C'est en s'inspirant de ces travaux sur les VLP livrant des protéines embarquées que notre équipe a développé les *Nanoblades* décrites sur la *figure 1*. Ces VLP rétrovirales empaquètent et transfèrent la protéine CAS9, l'endonucléase du système CRISPR dont la spécificité de coupure est programmable par un petit ARN guide (gRNA). Les *Nanoblades* délivrent un scalpel génétique transitoire capable de réaliser des éditions génomiques dans la plupart des cellules cibles testées. Ceci inclut des cellules d'intérêt thérapeutique majeur comme les cellules souches humaines pour lesquelles les méthodes d'ingénierie génétique sont limitées.

La mise en œuvre de cette technologie repose sur une astuce moléculaire déjà décrite par le groupe de Schambach [7] opérant des fusions entre la protéine structurale GAG du virus de la leucémie murine (MLV) et une protéine d'intérêt.

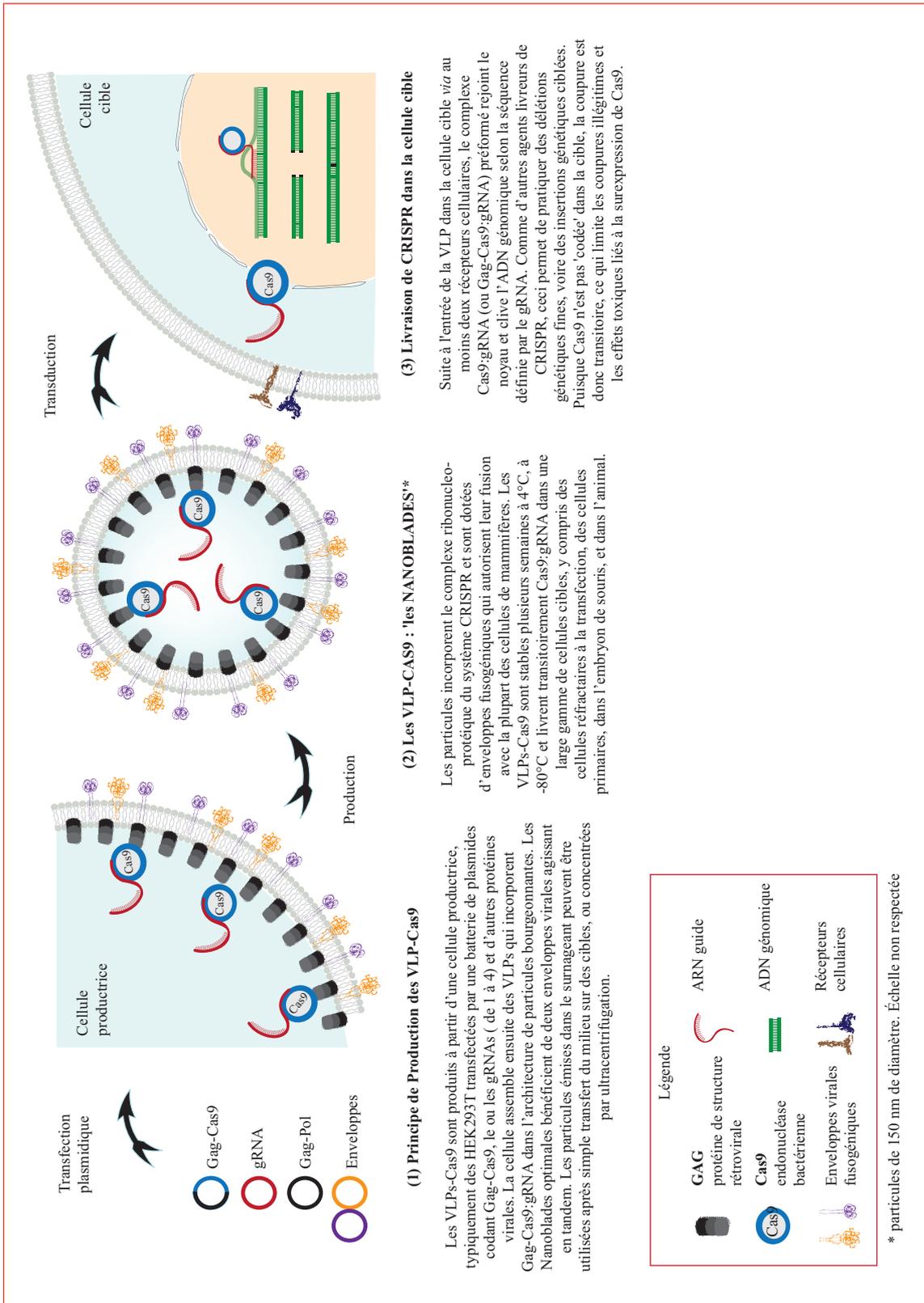


Figure 1. Production et principe des Nanoblades : VLP-CAS9 vecteurs du système CRISPR. Schéma représentatif de l'assemblage des VLP-CAS9 dans des cellules productrices (à gauche) : (1) la protéine de fusion GAG-CAS9 s'accumule à la membrane de la cellule transfectée et est embarquée dans les particules bourgeonnantes. Le gRNA accompagne CAS9 au sein des VLP (2). Ces dernières mises en présence d'une cellule cible (3) transfèrent le complexe CAS9:gRNA pouvant cliver le génome de la cible dans le noyau.

Ce greffage moléculaire force donc l'incorporation de la protéine d'intérêt dans l'architecture même de la pseudoparticule. L'idée ici a été de fusionner GAG avec la protéine CAS9 (*Streptococcus pyogenes*) effectrice du système CRISPR et de l'exprimer massivement en même temps qu'un plasmide codant le gRNA : cette opération induit la production massive de VLP empaquetant la protéine CAS9, incorporée par pontage avec la structure GAG. Ce qui s'est révélé intéressant a été de constater que CAS9 était embarquée associée avec le gRNA et que le complexe ribonucléoprotéique (RNP) était livrable par la particule dans une cellule cible. Le fait que le couple guide/endonucléase puisse ainsi s'apparier dans une cellule productrice, malgré le fait que CAS9 soit greffée à GAG, fut une bonne surprise.

Lors des premières tentatives de production de VLP-CAS9, nous avons testé différentes enveloppes virales classiquement utilisées en virologie. La surprise fut de constater que la plupart des enveloppes explorées étaient inefficaces pour produire des *Nanoblades*, y compris la protéine d'enveloppe de la stomatite vésiculaire VSV-G très commune en vectorologie. En testant des combinaisons d'enveloppes, nous avons découvert que la production de VLP-CAS9 fonctionnels était optimale quand deux enveloppes sont associées : l'enveloppe VSV-G et l'enveloppe d'un rétrovirus endogène de babouin BaEV [9]. Ces résultats restent partiellement inexplicables. Il est possible que VSV-G promeuve massivement la production particulière et que les particules jouissent de deux propriétés de fusion (fusion pH-dépendante pour VSV-G et fusion pH-indépendante membranaire pour BaEV) : ceci pourrait accroître les modalités de diffusion du RNP CAS9 dans la cible.

Ainsi, les VLP-CAS9 sont-elles produites après co-transfection d'une mixture plasmidique incluant un plasmide codant le ou les guide-RNA, GAG-CAS9, les deux enveloppes et une construction auxiliaire GAG POL. Le clonage de construits codant les gRNA étant rapide, il est facile d'établir des stratégies CRISPR livrables dans une grande gamme de cibles et de mettre en œuvre le système complet dans un laboratoire doté d'un laboratoire L2.

Le manuscrit propose de nombreux exemples d'édérations génétiques assistés par *Nanoblades*, dans des cellules primaires, *in vivo* et dans l'embryon murin. Nous avons en effet injecté des VLP-CAS9 dans la zone pellucide d'embryons murins et ainsi édité le génome de la cellule œuf, permettant la naissance d'animaux transgéniques. Si cette approche reste moins performante que les méthodes récentes de transgénèse murine, l'injection dans la zone pellucide est très respectueuse de la survie du zygote et sera intéressante pour la manipulation d'espèces offrant un nombre limité d'embryons.

Cette méthode de livraison ne nivèle pas encore tous les écueils liés à la manipulation du système CRISPR. Dans le cas de la transgénèse animale, la naissance d'animaux mosaïques reste commune, ce qui indique que la coupure est incomplète ou tardive dans l'embryon. De même, les taux de coupures dans une population cellulaire ciblée sont rarement complets, ce qui invite le manipulateur à établir des clones cellulaires pour aboutir à une lignée pure. Nous avons mesuré que le taux de coupures illégitimes induites par *Nanoblades* (*off-targets*) était inférieur à celui observé par des techniques de transfection, une plus-value liée certainement à la nature transitoire de la coupure. Cependant, une surveillance stricte du génome traité par VLP-CAS9 restera nécessaire, notamment pour des applications thérapeutiques. Si les *Nanoblades* offrent une solution nouvelle pour la livraison du système CRISPR dans les cellules primaires, elle reste tributaire des faiblesses du système CRISPR/CAS9, mais sera bénéficiaire de toutes ses évolutions.

Nous avons observé que les pseudoparticules CAS9 pouvaient assister des stratégies d'insertion génétique (*knock-in*), essentiellement dans des lignées ; et que la technologie générale pouvait être adaptée à des variants de CAS9, comme une chimère dCAS9-VPR activant la transcription [10]. C'est dans ces deux territoires : performance de l'insertion génétique ciblée, et livraison d'autres protéines utiles en ingénierie génétique comme les éditases, que la technologie pourrait évoluer.

De façon générale, ce travail illustre une application intéressante des VLP pour la vectorisation de protéines – une approche peu commune qui peut constituer une alternative aux techniques de transfection ou de transduction virale, notamment dans des situations où une expression transitoire est recherchée. Si les VLP rétrovirales ont montré leur efficacité après injection dans la souris, leurs enveloppes restent souvent très immunogènes et sont rapidement reconnues par le système immunitaire de l'hôte, ce qui limite leur usage *in vivo*. En revanche, elles semblent très adaptées pour des traitements *ex vivo* en complément de procédures de thérapie cellulaire ; comme vecteurs de CRISPR, de facteurs de transcription ou de facteurs influençant le homing des cellules souches ; autant de perspectives que nous aimerions explorer.

Liens d'intérêt : Monsieur Philippe E. Mangeot déclare : La technique des *Nanoblades* est protégée par un brevet Inserm Transfert détenu par :

1. Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm),
2. Centre national de la recherche scientifique (CNRS),
3. École normale supérieure de Lyon,
4. Université Claude-Bernard Lyon 1, Villeurbanne.

Inventeurs : Philippe E. Mangeot, Emiliano Ricci, Théophile Ohlmann. Application number WO 2017/068077. Publié le 27 avril 2017.

Références

1. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles : a review. *Mol Biotechnol* 2013 ; 53 : 92-107.
2. Naskalska A, Pyrc K. Virus Like Particles as Immunogens and Universal Nanocarriers. *Polish Journal of Microbiology* 2015 ; 64 : 3-13.
3. Galla M, Will E, Kraunus J, Chen L, Baum C. Retroviral pseudotransduction for targeted cell manipulation. *Mol Cell* 2004 ; 16 : 309-15.
4. Prel A, Caval V, Gayon R, Ravassard P, *et al.* Highly efficient in vitro and in vivo delivery of functional RNAs using new versatile MS2-chimeric retrovirus-like particles. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2015 ; 2 : 15039.
5. Knopp Y, Geis FK, Heckl D, *et al.* Transient Retrovirus-Based CRISPR/Cas9 All-in-One Particles for Efficient, Targeted Gene Knockout. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018 ; 13 : 256-74.
6. Kaczmarczyk SJ, Sitaraman K, Young HA, Hughes SH, Chatterjee DK. Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 16998-7003.
7. Voelkel C, Galla M, Maetzig T, *et al.* Protein transduction from retroviral Gag precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107 : 7805-10.
8. Maetzig T, Baum C, Schambach A. Retroviral protein transfer: falling apart to make an impact. *Curr Gene Ther* 2012 ; 12 : 389-409.
9. Lavillette D, Marin M, Ruggieri A, Mallet F, Cosset FL, Kabat D. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J Virol* 2002 ; 76 : 6442-52.
10. Chavez A, Scheiman J, Vora S, *et al.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods* 2015 ; 12 : 326-8.