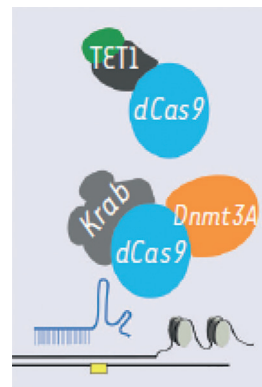


► Les connaissances accumulées sur la biologie du virus VIH-1 ont permis l'émergence de techniques exploitant l'architecture des rétrovirus, leurs propriétés infectieuses, et leur capacité d'intégration dans le génome cellulaire. Ce champ d'étude constitue la vectorologie rétrovirale qui s'est démocratisée dans les laboratoires par l'usage des vecteurs lentiviraux. En détournant de manière différente l'assemblage rétroviral, d'autres systèmes émergent et sont de plus en plus cités dans la littérature récente. En particulier, des particules défectives permettent une livraison transitoire d'effecteurs qui ciblent le génome. Cette caractéristique en fait des outils très adaptés pour l'administration de « scalpels génétiques », dont la persistance à long terme n'est pas requise dans la cellule ou l'organisme cible. Depuis la description du système CRISPR/Cas9 en 2012, les techniques d'ingénierie génomique n'ont cessé d'évoluer en terme de capacité et de fiabilité. Plusieurs dérivés du système CRISPR permettent aujourd'hui l'édition du génome humain avec une précision à l'échelle nucléotidique. Livrer ces facteurs effecteurs dans la cellule, ou l'organisme, reste un défi technique majeur sur lequel les vectorologues se sont penchés. La présente revue décrit les principaux systèmes rétroviraux utilisés pour manipuler le génome. Après un tour d'horizon des techniques d'ingénierie génétique, nous verrons comment, en manipulant divers éléments architecturaux des rétrovirus, les chercheurs ont développé une grande variété d'outils génétiques. Les subtilités, les potentialités et les limites des particules pseudo-virales rétrovirales (VLP_r) seront abordées. ◀

Ingénierie rétrovirale pour la modification des génomes

Philippe-Emmanuel Mangeot, Théophile Ohlmann



CIRI, Centre international de recherche en infectiologie
Université de Lyon, Inserm U1111,
Université Claude Bernard Lyon 1,
CNRS UMR5308, ENS de Lyon,
Lyon, France.
philippe.mangeot@inserm.fr

Les outils de l'ingénierie génétique : principaux effecteurs pour la manipulation du génome

Les recombinaisons et les transposases

Les enzymes telles que la recombinaison CRE (*cyclization recombinaison*) du bactériophage P1 [1] ou la recombinaison FLP (flippase), dérivée du plasmide 2 μ de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*, reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN, appelées sites de recombinaison (LoxP [*locus of crossing-over X of P1*] pour CRE et FRT [*flippase recognition target*] pour FLP), et catalysent des réactions de recombinaison entre ces sites. Cela permet des modifications génétiques contrôlées, telles que des délétions, des inversions ou des translocations de segments d'ADN dans les cellules animales ou végétales [2]. Ces outils s'adressent à des génomes préalablement préparés, porteurs des sites nécessaires à la recombinaison (LoxP ou FRT).

Les protéines clivantes non guidées

Dans les années 1990, les méganucléases¹ ont été parmi les premiers agents développés pour cliver le génome humain. À la différence des enzymes de restriction bactériennes, elles reconnaissent des séquences longues (de 12 à 40 nts) et rares. Elles présentent une grande spécificité, mais leur conception est peu flexible [3]. Les nucléases à doigt de zinc (ZFN) [4] (→) et (→) Voir m/s n° 10, 2007, page 834

¹ Les méganucléases sont des endodésoxyribonucléases qui se caractérisent par un site de reconnaissance de grande taille (12 à 40 paires de bases). Les méganucléases sont considérées comme les enzymes de restriction les plus spécifiques (ndlr).

les TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) [5] (→) sont quant à elles des enzymes artificielles combinant des domaines de liaison à l'ADN modulaires avec un domaine nucléase clivant. Ces outils fondateurs permettent d'introduire des délétions et des insertions géniques, parfois avec une grande précision. Cependant, comme ils sont difficiles à concevoir « à façon », ils ont été supplantés par les techniques CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) depuis 2012.

Les protéines guidées : le système CRISPR et ses dérivés CRISPR/Cas9

Le système CRISPR repose sur l'usage de l'endonucléase bactérienne Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) qui clive l'ADN et d'un petit ARN guide (ARNg) qui définit le site de coupure (→) Voir m/s n° 11, 2015, (Figure 1) [6,7] (→).

La versatilité de la technique, mais aussi sa précision relative vont stimuler la conception de dérivés CRISPR par la fusion de Cas9 avec des enzymes agissant sur le génome. Ces techniques vont fréquemment avoir recours à des mutants de Cas9 ne clivant plus qu'un seul brin d'ADN (Cas9 nickase : Cas9n) ou des Cas9 non clivantes (*dead Cas9* : dCas9) mais dont l'adressage reste possible. Ces chimères Cas9 constituent des attelages efficaces pour positionner des effecteurs génétiques sur des locus cibles, comme ceux décrits ci-après :

- L'édition de base (*base editing*) permet de modifier directement une base d'ADN sans créer de cassure double-brin (DSB) [8], ce qui limite considérablement les effets hors cible. Cette méthode utilise une Cas9 inactive (dCas9) ou une Cas9 nickase (Cas9n) fusionnée à une enzyme de conversion chimique afin de catalyser un changement spécifique dans les bases [9].

- Le « *prime editing* » permet l'édition de petites séquences génétiques [10]. Il repose sur l'association d'une Cas9n avec un domaine de transcriptase inverse (RT). Ici, le pegARN (*prime-editing gRNA*) spécifie la zone de coupure comme un ARNg classique et sa partie 3' peut aussi s'hybrider à l'ADN génomique sur le brin opposé : il encadre l'ADN cible et fournit une matrice ARN à la transcriptase inverse, qui synthétise un nouveau brin d'ADN. Le « *prime editing* » permet une réécriture du génome sur des segments courts, ce qui est idéal pour corriger de petites altérations fréquentes dans des maladies humaines [11] (→).

Grâce à l'absence de cassure double brin et à la double vérification de la séquence cible par le pegARN, le « *prime editing* » est une technique d'édition précise et peu invasive.

- Les techniques CRISPRa et CRISPRi exploitent des protéines dCas9 fusionnées à des facteurs modulateurs de la transcription, comme le complexe VP64-P65-Rta qui active la transcription (CRISPRa), ou le domaine répresseur *Krüppel-associated box* (KRAB) (CRISPRi) [12]. Leur ciblage sur des promoteurs spécifiques permet de contrôler l'expression des gènes. Une autre approche ayant les mêmes objectifs exploite des facteurs modifiant localement la chromatine, comme les histones acétyltransférases [13].

- Les méthodes CRISPRon et CRISPROff : (déméthylation et méthylation ciblées) ciblent des sites clés du génome en fusionnant des enzymes affectant la méthylation de l'ADN, comme l'ADN- méthyltransférase 3A (DNMT3A) ou le domaine déméthylant de la *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase1* (TET1), à dCas9. Elles induisent une extinction durable de l'expression des gènes méthylés, ou leur activation selon la protéine de fusion utilisée [14].

Les pseudoparticules rétrovirales : des véhicules génétiques et protéiques

Le terme général de particules pseudo-virales rétrovirales (VLPr) décrit un type de vésicules structurellement proches des rétrovirus, mais ne conduisant pas à une infection productive. Il englobe à la fois les particules incomplètes générées par les cellules infectées (Figure 2), et les particules conçues artificiellement à partir d'éléments rétroviraux. D'un diamètre de 80 à 120 nm, ces particules sont dotées d'une bicouche lipidique, contiennent un ARN et codent en général la transcriptase inverse, l'enzyme qui rétro-transcrit l'ARN en ADN. Les lentivirus comme le VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine) et les gamma-rétrovirus de type MLV (*murine leukemia virus*) ont été particulièrement exploités pour la conception de VLPr, mais quelques rétrovirus endogènes sont aussi utilisés.

Les VLPr parmi les autres méthodes de livraison

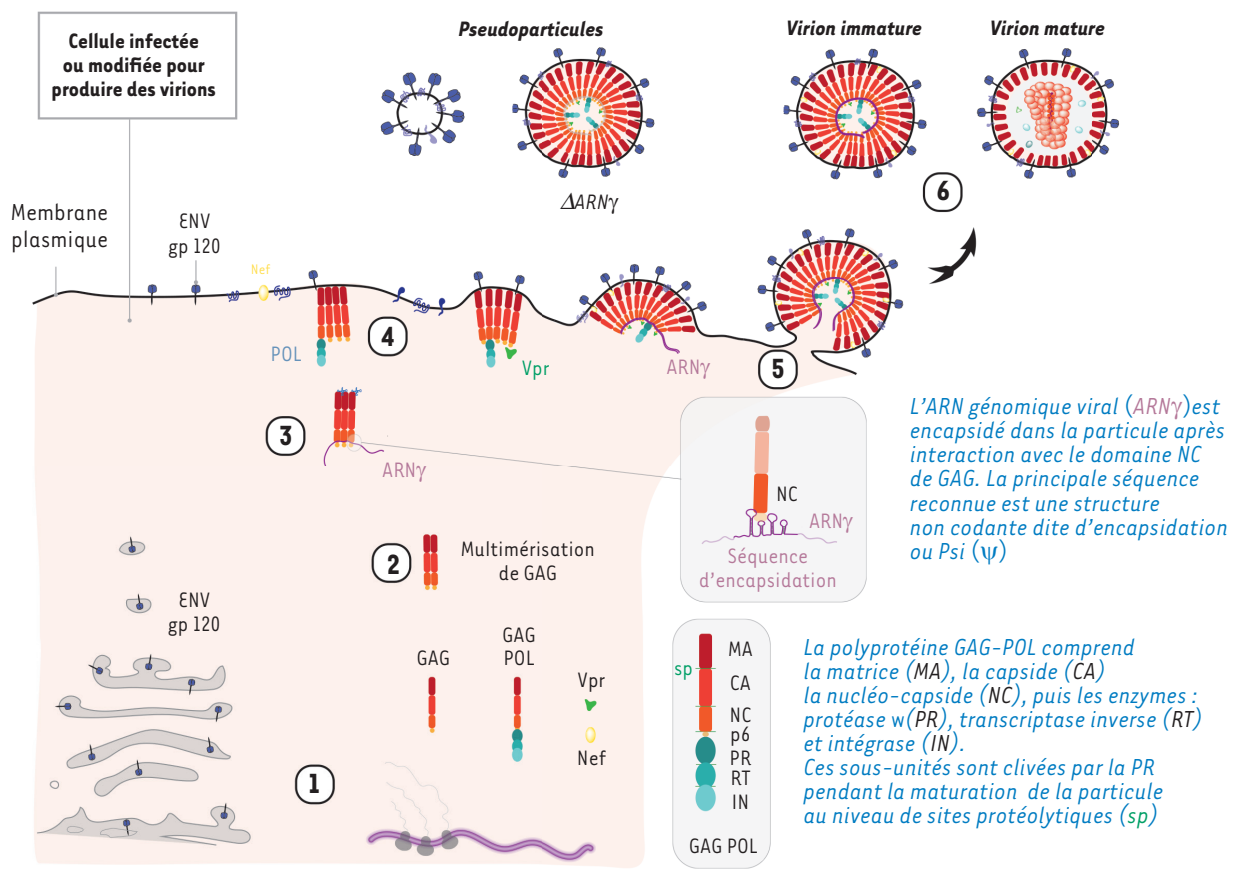
L'introduction d'agents modificateurs du génome dans la cellule ou l'organisme peut être assurée par des particules lipidiques synthétiques, capables d'encapsuler des protéines ou des acides nucléiques, et optimisées pour fusionner avec les membranes cellulaires. Les particules lipidiques, produites facilement et à grande échelle de manière standardisée, sont particulièrement adaptées aux applications *in vivo*, bien qu'elles présentent un tropisme marqué pour le foie. Les vecteurs adénoviraux ou les AAV (*adeno-associated virus*) [15] (→) sont également largement exploités ; ces derniers peuvent être produits

en grande quantité pour des usages cliniques. Les vecteurs AAV et les particules lipidiques sont aujourd'hui les vecteurs de choix pour de nombreuses approches *in vivo*. Une revue plus complète compare les avantages et les limitations de ces systèmes pour l'édition génétique [16].

Les VLPr conservent néanmoins des atouts distinctifs : leur production est techniquement peu exigeante, leur

	Effecteurs	Effet génétique	Issue cellulaire	Effets hors-cible	Objectif génétique	Réf.					
CRISPR-Cas9	CAS9 ARNg PAM 	 <i>Cassure double-brin</i>	<i>Micro insertions/délétion</i> +indels	Coupures illégitimes	<i>Délétions ou destruction de fonction</i>	[6] [7]					
	CAS9 ARNg PAM Matrice en réparation ou 	 <i>Cassure double-brin et recombinaison homologue</i>	<i>ADN transgénique</i> +indels	Réponse P53	<i>Insertions ou délétions ciblées</i>						
Base editing	dCas9- CytD ARNg PAM 	 <i>Desamination locale C>U</i>	<i>Conversion Transversion</i> 	Conversion illégitimes locales	<i>Modification de nucléotides</i>	[8] [9] [23] [24] [56]					
	Cas9n- RT pegARN PAM 	 <i>Transcription par la RT sur le pegRNA matrice</i>	<i>Réécriture locale du génome</i> 	Réécritures illégitimes rares	<i>Édition précise de gènes</i>	[10] [11] [23] [25] [26]					
						dCas9- VPR ou Krab ARNg PAM 	 <i>Activation/Répression transcriptionnelle locale</i>	<i>Modification du transcriptome</i>	Faible (cible une zone promotrice)	<i>Activation ou extinction de gènes</i>	[12]
											dCas9- TET1 Dnmt3A ARNg PAM

Figure 1. Principaux systèmes d'ingénierie génétique dérivés du système CRISPR. ARNg: ARN guide, PAM: protoadjacent motif (NGG), CytD: cytosine desaminase, dCas9: dead-Cas9, Cas9n: Cas9 nickase, RT: transcriptase inverse, pegARN: prime editing ARNg, VPR: chimère VP64-P65-Rta, KRAB: Kruppel associated box, TET1: ten-eleven translocation dioxygenase1, Dnmt3A: l'ADN- méthyltransferase 3A.



Processus de l'assemblage exploités pour redéfinir les particules rétrovirales

② L'assemblage protéique

Les multimères GAG peuvent tolérer des chimères où GAG est fusionné avec des protéines d'intérêt. Introduites dans la cellule, ces fusions GAG sont incorporées dans les particules.

③ L'encapsulation

L'encapsulation d'ARN exogènes peut être assurée en les dotant de la séquence d'encapsulation. Alternativement, des ARNm peuvent être emportés dans les particules par des protéines de capture, elles mêmes enchassées dans une protéine intravirale.

④ La convergence membranaire

En forçant la localisation membranaire de protéines via des domaines homologues à la pleckstrine (DHP), et des motifs farnesyl ou myristyl, leur incorporation dans des particules bourgeonnantes peut être contrôlée.

⑤

Des protéines intravirales non structurales comme Nef ou Vpr peuvent être fusionnées à des protéines d'intérêt qui seront exportées dans la particule.

Figure 2. Représentation schématique des principales phases de l'assemblage du rétrovirus VIH-1, un lentivirus. L'assemblage a lieu dans les cellules infectées, et peut être induit expérimentalement – c'est en général le cas pour la production en masse de particules rétrovirales – dans des cellules « usines » où sont surexprimés les composants viraux (comme les HEK293T). La traduction des ARNm viraux (1) permet l'expression des protéines du virus, incluant les polyprotéines GAG et GAGPOL. ENV est également traduite et dans le cas de certains lentivirus comme le VIH-1 plusieurs protéines régulatrices et auxiliaires. La polyprotéine GAG multimérise dans le cytoplasme (2) où elle peut interagir avec l'ARNg (3), puis rejoint la membrane cellulaire ou endosomale. Son accumulation (4) conduit au bourgeonnement de particules virales empaquetant les complexes GAG/ARNg (5) et d'autres protéines virales. La protéine d'enveloppe glycosylée dans les compartiments golgiens est incorporée dans la membrane des particules finalement libérées dans le milieu extracellulaire (6). La particule subit une phase de maturation où PR clive les polyprotéines embarquées, ce qui conduit au virion mature infectieux. Ce dernier incorpore également des protéines et des ARN cellulaires. Seule une faible proportion des particules émises sont infectieuses, l'assemblage générant aussi des particules sans génome ou incomplètes (pseudoparticules).

enveloppe peut être modifiée pour cibler des cellules spécifiques, et leur structure interne modulable permet l'incorporation de protéines ou d'ARN exogènes. Ces propriétés ont élargi les possibilités d'ingénierie des particules rétrovirales pour la modification du génome et ont favorisé leur grande diffusion dans les laboratoires.

L'assemblage de la particule rétrovirale

Le processus d'assemblage des particules de type VIH-1 illustre la convergence complexe de protéines virales et cellulaires, d'acides nucléiques et de lipides qui préside à la formation des particules virales (Figure 2) [17]

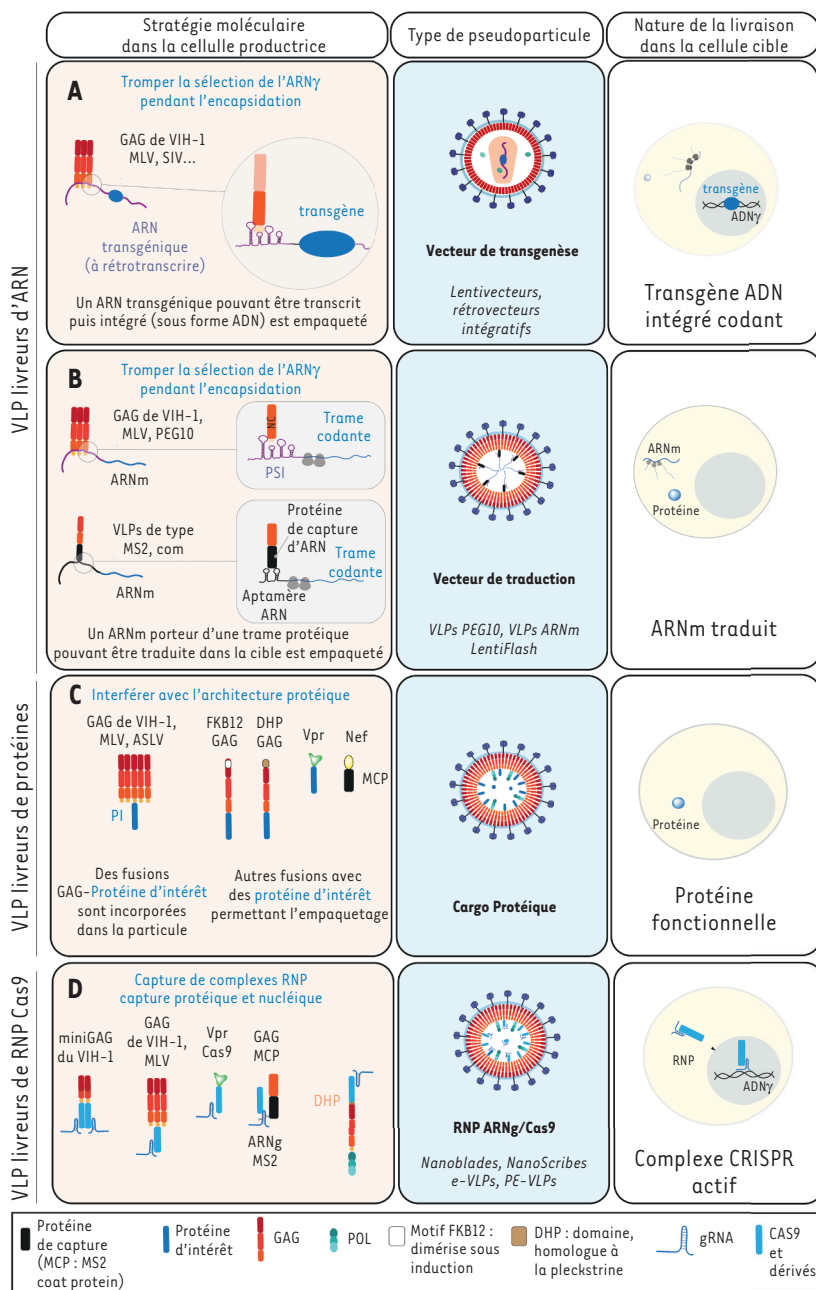


Figure 3. Détails moléculaires des stratégies exploitées pour la conception de pseudoparticules rétrovirales. Les protéines et ARN impliqués dans la production de VLP livrant des ARN (A, B), ou des protéines (C, D) sont schématisés. Le type de particules produites et la destinée du cargo dans la cellule ciblée par ces vecteurs sont représentés.

en imposant d'autres protéines d'enveloppe par pseudotypage [18] (Figure 3).

L'empaquetage d'un ARN exogène

L'incorporation d'un ARN d'intérêt dans les particules peut être induite en dotant l'ARN d'une séquence d'encapsidation rétrovirale naturelle (Psi ou Ψ, Figure 3A-B). En présence des protéines de structure virale, l'assemblage de la particule va alors s'opérer autour de cet ARN transgénique qui pourra être transmis à la cellule cible. Deux types de réalisations sont à retenir. Dans un cas, l'ARN ainsi transporté peut toujours être rétro-transcrit, puis l'ADN résultant intégré grâce aux protéines virales et aux séquences présentes en cis sur l'ARN. On parle alors de vecteur de transgénèse de type lentivecteur ou rétrovecteur (Figure 3A).

Dans un deuxième cas, l'ARN encapsidé est conçu pour être directement traduit dans la cible, sans qu'il soit rétro-transcrit ou intégré (Figure 3B). Les vecteurs deviennent alors des cargos à ARNm (Tableau I). L'encapsidation active de l'ARN d'intérêt peut dépendre de la séquence Psi, ou d'une protéine de capture reconnaissant sur l'ARN un motif aptamère². Le Tableau II, adapté de [19], répertorie les couples aptamère/protéine de capture les plus utilisés.

(→). Chaque type de rétrovirus ayant ses spécificités, nous n'évoquerons ici que les étapes clés, avec une mise en avant des processus pouvant être détournés pour la production de VLP.

(→) Voir m/s n° 1, 2008, page 49

La conception des pseudoparticules rétrovirales

Pour redéfinir le contenu des particules rétrovirales, des stratégies de détournement de l'assemblage consistent à forcer l'empaquetage d'un ARN exogène, ou à induire l'incorporation de protéines d'intérêt, voire les deux en même temps. La surface des particules peut également être modifiée,

L'incorporation de protéines exogènes

Pour assurer l'incorporation d'une protéine dans une particule rétrovirale, l'une des stratégies consiste à réaliser des fusions moléculaires entre une protéine virale présente dans la particule et une protéine d'intérêt, puis à exprimer ces fusions dans la cellule productrice. Après expression, la fusion protéine virale-protéine d'intérêt peut être incor-

² Un aptamère est un oligonucléotide synthétique, le plus souvent un ARN qui est capable de fixer un ligand spécifique (ndlr).

Base du VLPs	Technique	CAS9 sous forme	Technologie(s) décrites	Cibles validées	Nom	Références
MLV	Cas9	ARN	capture MS2 de l'ARNm Cas9 et du gRNA par GAG-MCP	Cellules Jurkat , Fibroblastes primaires	LVPs	Knopp, et al [19 et 48]
HIV-1	Cas9	ARN	capture MS2 de l'ARNm Cas9 par fusions MCP	Cellules B immortalisées, lignées		Lu, et al [19 et 48]
HIV-1	Cas9	ARN	capture MS2 de l'ARNm Cas9 et IDLV codant le gRNA	HEK293T, Rétine de souris		Ling et al [19 et 48]
RSV	Cas9	ARN	capture MS2 de l'ARNm Cas9 et du gRNA par GAG-MCP	Fibroblastes humains et murins, hépatocytes, CD34+ de sang de cordon, Progéniteurs		[49]
HIV-1	Cas9	ARN	capture COM de l'ARNm Cas9 par NC-cpm et gRNA empaqueté dans un IV	HEK293T		yadav, et al [19 et 48]
HIV-1	Cas9	ARN	capture MS2 (Cas9) et PPT (gRNA) par GAG MCP et GAG PPT	hiPSCs	LentiFlash	[28 et 29]
HIV-1	Cas9	Protéique	fusion Cas9-GAGPOL	Cellules T		Choi, et al [48]
HIV-1	Cas9	Protéique	GAG-com capture le gARN qui capture la protéine CAS9	Cellules B immortalisées, lignées.	bionanoparticules	[30]
MLV	Cas9 CRISPRa	Protéique	Fusion GAG-Cas9 et bi-pseudotypage	Lignées, hiPSC, Foie et ovocytes murins, cellules souches murines et humaines	Nanoblades	[21]
HIV-1	Cas9	Protéique	Fusion de Cas9 à Vpr LV et lentivecteur ARNg (DILV)	Lignées humaines cellules T primaires		[33]
HIV-1	Cas9	Protéique	fusion GAG-FKBP12 capturant Cas9-FRB. ARNg libéré par ribozymes	Cellules T, monocytes, iPSCs, neurones dérivés de cellules IPS, cellules myogéniques	Nanomedics	[27]
MLV	Cas9	Protéique	Fusion GAG-Cas9 + AAV et bi-pseudotypage	Cellules T, B, CD34+ humaines	Nanoblades	[35]
HIV-1	PE	Protéique	Fusion GAG-Cas9 et pseudotypage gp120	Cellules T humaines		[32]
MLV	Cas9, BE	Protéique	Fusion GAG-ABE/Cas9, modulation du tropisme	Cellules primaires humaines, murines, cerveau, foie et rétine de souris <i>in vivo</i>	eVLPs	[24]
HIV-1	Cas9, BE, PE	Protéique	GAG-POL-Cas9 ou Cas9-PHD-GAGPOL, domaine homologue à la Pleckstrine	HEK293T, rétine de souris	LVNPs	[23]
MLV	Cas9	Protéique	Fusion GAG-Cas9, bi-pseudotypage et colivraison ARN intégratif	Cellules NK humaines		[31]
MLV	Cas9	Protéique	Fusion GAG-Cas9 et bi-pseudotypage	organoïdes de colon, de prostate murins et humains	Nanoblades	[50]
MLV	PE	Protéique	Fusion GAG-Pemax, capture COM et MS2 par GAG-MCP/COM. Protéine cold coil	Lignées humaines, rétine de souris (<i>in vivo</i>)	Pe-VLPs	[26]
MLV	PE	Protéique	Fusion GAG-Pemax, ipeg POLII, et tri-pseudotypage	Myoblastes, hiPSCs, Cellules souches et motoneurones dérivés d'iPS, lignées	NanoScribes	[25]
HIV-1	Cas9	Protéique	MiniGAG-Cas9	HEK293T, Cellules T	EDVs	[51]
HIV-1	Cas9, BE	Protéique	Capture MS2 du gRNA par GAG-MCP , ciblage neuronal et immunitaire. Cas9 codé par ARNm	Lignées humaines et murines, rétine et cerveau de souris <i>in vivo</i>	RIDE	[34]

Tableau I. Récapitulation des différents types de pseudoparticules rétrovirales pour la livraison du système CRISPR. Les références des travaux décrits sont indiquées et renvoient pour certaines à deux revues importantes du domaine [19,48].

aptamère ARN	séquence	protéine de capture
com	GCCUGAAGAAGGGC	com
MS2	ACAUGAGGAUCACCCAUGU	MCP
PP7	GAAUGCCUGCGAGCAUCC	PCP
BOXb	GGAGCAGACGAUAUGGCGUCGUCC	IN22
Csy4	CUGCCGUAUAGGCAGC	Csy4H29A

Tableau II. Principaux aptamères utilisés pour la capture d'ARN dans les particules rétrovirales (adapté de [19]).

porée dans la particule (Figure 3C) comme cela a été démontré par une étude clé utilisant la protéine de capsid GAG de MLV [20]. Des travaux ont montré qu'une protéine de 286 kDa pouvait être ainsi incorporée dans la particule [21]. Cependant, les limites stériques de cette approche restent à documenter. La fusion entre une protéine virale et une protéine d'intérêt peut être incompatible avec un assemblage particulière optimal, ce qui nécessite un dosage précis du ratio protéine virale/protéine d'intérêt lors de la production. L'autre inconvénient est que la protéine d'intérêt fusionnée n'est pas nécessairement bioactive sous cette forme dans la cellule cible, son activité optimale pouvant nécessiter sa séparation de la protéine virale. Le prochain chapitre aborde cette limitation.

Pour contrôler le contenu protéique des VLPr, une autre approche consiste à doter la protéine à incorporer d'un motif la localisant à la membrane, siège de la production particulière, comme un domaine d'homologie à la pleckstrine (DHP) [22,23].

La libération des cargos protéiques

L'incorporation intra-particulaire de biomatériau, notamment via l'interaction avec la membrane de la cellule productrice, est suivie de sa libération dans la cellule receveuse et dans le cas de protéines agissant sur l'ADN, d'un transport nucléaire. Pour relever ce défi d'adressage, les fusions GAG-protéine d'intérêt sont munies de sites protéolytiques pouvant être clivés par la protéase virale lors de la maturation du virus (Figure 2, phase 6). Cette maturation est naturellement incomplète, mais peut suffire à la libération d'une quantité suffisante de protéine fonctionnelle. Ceci explique que pour plusieurs types de systèmes VLPr la fonction protéase codée par le gène Pol soit maintenue, cette enzyme servant de « bistouri » capable de libérer la protéine d'intérêt après assemblage de la particule, et d'assurer ainsi sa biodisponibilité. En testant plusieurs stratégies, des auteurs ont découvert que l'introduction, dans une fusion entre GAG et un éditeur de base (GAG-*base editing*), de signaux d'export nucléaire (NES, *nuclear export signal*) dérivés du VIH-1 améliore significativement la production de VLP-éditeurs. Dans ce cas précis, la protéine GAG-NES-*base editing* se trouve dotée de signaux *a priori* contradictoires : membranaires (la matrice de GAG est affine pour la membrane), nucléaires (l'éditeur de base est doté d'un NLS [nuclear localization signal]) et anti-nucléaires (NES) [24]. Ce design semble constituer un compromis idéal pour permettre à la fois la localisation membranaire de la fusion GAG-*base editing* dans la cellule productrice (ce qui est essentiel pour la production des particules) et la disponibilité nucléaire de l'éditeur de base dans la cellule cible (ce qui est essentiel

pour exercer sa fonction). Il a ensuite été repris pour la conception de VLP-*prime editing* [25,26]. Enfin, certains travaux exploitent des systèmes de dimérisation inducibles qui assurent la connexion entre GAG et une protéine d'intérêt dans la cellule productrice : l'association est alors contrôlée par une petite molécule qui est absente dans les cellules cibles, ce qui libère la protéine d'intérêt [27].

Les approches combinées

Les systèmes de VLPr les plus élaborés administrent des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) qui combinent les stratégies évoquées précédemment (Figure 3D). Par exemple, des VLPr livrant un ARNm Cas9 sont conçues en utilisant une protéine de fusion GAG-MCP (*MS2 coat protein*) capturant l'ARNm Cas9 portant l'aptamère de MS2, pour l'adresser à la membrane [28]. Pour plusieurs types de VLPr-Cas9, la capture intra-particulaire de l'ARNg est assurée par une Cas9 hautement affine pour l'ARNg ou le pegARN [21,24-26], ou par d'autres aptamères de capture comme PP7, dérivé du phage PP7 [29], ou Com, dérivé du phage Mu [30]. Dans ce dernier exemple, c'est le gARN intra-particulaire qui favorise l'incorporation de Cas9 dans la particule. On mentionnera enfin des VLPr conçues pour tirer profit des deux compartiments, nucléaire et protéique, et livrant à la fois des RNP Cas9/gRNA et des transgènes intégratifs [31-33].

Le pseudotypage

La plupart des systèmes VLPr sont dotés d'enveloppes modifiées, conférant aux particules des propriétés de tropisme ou de résistance accrue. La glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) est la plus utilisée et assure une transduction³ dans la plupart des types cellulaires, ainsi que de hauts titres en particules produites, au-delà de 1×10^9 par ml. Plusieurs études exploitent des enveloppes optimisées pour des cellules cibles particulières [32,34], voire des mélanges d'enveloppes [21,25,35] ; ces combinaisons optimisent la production des lots de VLPr et leur capacité d'entrée dans la cellule cible. Les techniques de pseudotypage, particulièrement développées dans le cas des lentivecteurs, s'étendent à l'usage de motifs ciblant des molécules de surface membranaire, ou de protéines pouvant activer un signal dans la cellule cible, des stratégies qui visent à améliorer la transduction des cellules immunitaires ou des cellules souches humaines [18].

³ La transduction est le transfert de matériel codant (transgène ou ARNm) ou non codant (protéine ou complexe protéine/ARN) par particule pseudovirale non répliquative.

Preuves de concept conduites au moyen de pseudoparticules rétrovirales

La transduction de recombinaisons

Le transfert de la recombinaison CRE a été validé dans la majorité des systèmes décrits précédemment, en grande partie parce que la recombinaison CRE/LoxP est facilement détectable, tant au niveau génétique qu'au niveau phénotypique. La recombinaison CRE est fonctionnelle même à faible dose, ce qui facilite l'établissement de preuves de concept, y compris pour des systèmes VLP relativement inefficaces. En plus des lentivecteurs qui ont permis, très tôt, la livraison de la cassette d'expression CRE [36], d'autres procédés ont permis d'encapsider l'ARNm CRE, portant la séquence Psi, dans des particules MLV [37], ou en capturant ce même ARN dans des VLPr de type VIH-1 via un aptamère MS2 [28], ou en exploitant une séquence de rétrovirus endogène humain [38]. En fusionnant des recombinaisons à la protéine GAG de MLV, des VLPs livreurs de la protéine ont été décrits pour la CRE [39] et pour la FLPN [20].

La transduction de méganucléases, ZFN et TALEN

La méganucléase I-SceI a été exportée dans des particules du VIH-1 grâce à sa fusion avec la protéine Vpr [40]. Une étude ingénieuse décrit des VLPr dérivées du VIH-1, incorporant des protéines ZFN ou TALEN fusionnées à l'extrémité N-terminale de la protéine GAG [41]. En testant plusieurs stratégies, un autre groupe a comparé des VLPr délivrant soit des ZFN, soit des ARNm ou, de manière innovante, un ADN épisomal codant des ZFN [42] afin de cibler des cellules souches murines.

Transduction de systèmes dérivés de CRISPR

Le système CRISPR a été vectorisé dans divers systèmes rétroviraux en utilisant plusieurs approches d'encapsulation des effecteurs. Les réalisations les plus marquantes ont été regroupées dans le *Tableau 1* et concernent essentiellement la livraison du système Cas9/ARNg, mais aussi la transduction du *base editor* [23,24,34] et du *prime editor* [25,26], qui ont nécessité des optimisations fines au niveau moléculaire.

L'outil lentivecteur : idéal pour l'administration de banques CRISPR

Outils pionniers pour la transgénèse thérapeutique stable [43] (→), les lentivecteurs peuvent coder la plupart des agents d'ingénierie génétique décrits ici [44]. Toutefois, l'intégration stable d'outils génomiques n'est pas nécessairement souhaitable d'un point de vue biosécurité, surtout dans des approches thérapeutiques. C'est pourquoi un bon nombre d'études utilisent des lentivecteurs défectifs pour l'intégration ou capables d'auto-excision [36,45]. Dans le domaine de l'ingénierie génétique, les lentivecteurs sont particulièrement utiles à des fins d'études exploratoires, ou pour la livraison de banques d'ARNg qui permettent de réaliser des cribles à large échelle exploitant le système CRISPR-Cas9 [46,47] ou CRISPRa/i [12].

(→) Voir m/s n° 10, page 768

Les performances et les écueils de la technologie des VLPs

L'atout de la livraison transitoire

Les particules rétrovirales peuvent donc accueillir plusieurs types de molécules sans que cela altère leur production ou leur capacité de transfert. Au-delà de cette polyvalence, l'un des premiers atouts des VLPr non intégratifs (*Figure 3, B-C-D*) est leur capacité à livrer transitoirement leur contenu, ce qui limite les effets hors cibles de la Cas9, comme cela est documenté dans plusieurs études [21,48], ou les imprécisions du *prime editing* [25]. À ce titre, leur précision dépasse celle d'autres systèmes comme ceux reposant sur la transfection plasmidique, les adénovecteurs ou les vecteurs AAV.

L'accès aux cibles primaires et à des applications *in vivo*

Comme indiqué dans le *Tableau 1* pour les approches CRISPR, de nombreux types de VLPr ont été validés dans des cellules humaines primaires avec des taux de succès variés. Une attention particulière doit être portée aux techniques permettant la transduction de cellules d'intérêt thérapeutique majeur comme les cellules souches humaines [21,25,27,29,35,49], les cellules pluripotentes induites humaines (hiPSc) [21], ou les organoïdes humains [50], dans lesquels des clivages par Cas9 ont pu être mesurés à hauteur de 40 %, 67 % et jusqu'à 75 %, respectivement. L'efficacité du *prime editing* a également été quantifiée dans des cellules hiPSc à des taux de 20 %, permettant après clonage la production de lignées IPS (cellules souches pluripotentes induites) isogéniques [25]. Tous ces modèles constituent des cibles fragiles, difficiles à modifier génétiquement, et valident l'usage des VLPr pour des stratégies d'édition *ex vivo*. Dans l'animal, l'équipe du Dr Liu a exploité les VLP-*base editing* pour l'édition efficace de gènes dans le foie, le cerveau, et la rétine de souris [24], où plusieurs éditions correctives ont été rapportées pour l'approche Cas9 [23,34] et celle de *prime editing* [26]. En vue d'une possible utilisation *in vivo*, chez l'homme, une étude récente a aussi évalué, par une batterie de tests, les effets inflammatoires et immunitaires des VLPr dans la souris et le macaque [34]. Dans l'ensemble, ces travaux s'accordent sur le fait que les VLPr sont immunogènes au site d'injection, et provoquent des réactions immunitaires essentiellement contre les protéines virales de structure et l'enveloppe de la VLPr (p24), une limite qui doit être explorée plus en détail avant un usage en clinique.

L'immunogénicité et le ciblage

L'immunogénicité des protéines constitutives de la particule limite le déploiement des VLPr pour des applications thérapeutiques chez l'homme. Ainsi, plusieurs approches récentes, visent à limiter la quantité de protéines virales nécessaire à l'assemblage de VLPr efficaces, en exploitant des formes tronquées de la protéine GAG [51], en les substituant par des protéines de structure issues de virus endogènes humains [38], ou par des domaines protéiques affins pour la membrane [22,23]. Cette démarche de « déviralisation » est également à l'œuvre au niveau des protéines de surface de la particule, où plusieurs études s'orientent aujourd'hui vers l'usage d'enveloppes de virus endogènes comme les syncytines [25,38,52] (→ Voir *m/s* n° 10, (→) ou de protéines fusogènes naturelles du 2011, page 163 muscle [53]. Un autre axe d'amélioration consiste à doter les particules d'anticorps ciblant des molécules de surface de façon à leur conférer des propriétés d'entrée restreintes [54,55].

Les obstacles à franchir

Au-delà des réactions cellulaires et immunitaires inhérentes à l'usage de vecteurs viraux, la technologie des VLPr connaît quelques écueils intrinsèques : la production de lots standardisés à hauts titres, compatibles avec les applications *in vivo* reste un défi majeur, ce qui est moins vrai pour les vecteurs AAV, ou pour les LNP synthétisés sans matériel cellulaire. Ceci restreint souvent l'usage de VLPr à des modèles animaux de petite taille, ou à des études *ex-vivo*.

Les VLPr peinent également à franchir certaines barrières naturelles, ou à être administrés avec précision dans des organes sans être dégradés par le foie. Ces obstacles sont autant de défis à relever pour les technologies de demain, qui devront travailler à l'optimisation de la bioproduction, une meilleure invisibilité immunitaire des particules et une amélioration de leur biodisponibilité *in vivo*, surtout pour des applications chez l'homme.

Conclusions et perspectives

L'ingénierie du génome fondée sur l'utilisation de VLPr a suivi les évolutions récentes des techniques basées sur les techniques CRISPR et ses dérivés. Il en résulte une grande diversité de systèmes, chacun faisant l'objet de versions progressivement optimisées. Les études récentes parient sur plusieurs modèles de fusion, plusieurs enveloppes, et les comparent exhaustivement. La vectorologie rétrovirale appliquée à la modification du génome semble ainsi devenir un champ d'étude qui a gagné en profondeur, et en exigence. En 2024, un système remarquable d'évolution dirigée a été mis au point dans l'équipe de David Liu pour identifier, parmi une banque de 3800 versions de la protéine GAG, des variants plus performants pour la production de VLP-*base editing* [56]. Si l'on considère cette accélération technologique, l'essor des intelligences artificielles dans le domaine de la protéomique, et les moyens déployés par des sociétés innovantes comme *Nvelop Therapeutics*, on peut s'attendre à l'émergence, dans un futur proche, de particules hyper-optimisées, aux impacts immunitaires restreints. Ces dernières pourraient n'avoir de viral que leur source d'inspiration initiale. ♦

SUMMARY

Harnessing retroviral engineering for genome reprogramming

The accumulated knowledge on the biology of the HIV-1 virus has led to the emergence of technologies that exploit the architecture of retroviruses and their integration or vectorization properties. This field of study constitutes retroviral vectorology, democratized in laboratories by the use of lentiviral vectors. By hijacking retroviral assembly, other systems are emerging and are increasingly mentioned in recent literature. In particular, defective retroviral particles are capable of transiently delivering effectors that act on the genome: they thus appear to be more suitable tools for delivering genetic scalpels, whose persistence in the target cell or organism is not required. Since the description of the CRISPR Cas9 system in 2012, genome engineering techniques have continued to evolve in terms of capacity and reliability. Several derivatives of the CRISPR system can now modify the human genome with nucleotide-level precision. Introducing these effectors into the cell or organism remains a major technical challenge that vector scientists are striving to overcome.

This review describes the major retroviral systems used for genome manipulation. Following an overview of genetic engineering techniques, we will see how researchers have developed a wide range of genomic tools by manipulating different processes in the retroviral architecture. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Meinke G, Bohm A, Hauber J, et al. Cre recombinase and other tyrosine recombinases. *Chem Rev* 2016 ; 116 : 12785-820.
2. Cody JP, Graham ND, Zhao C, et al. Site-specific recombinase genome engineering toolkit in maize. *Plant Direct* 2020 ; 4 : e00209.
3. Pâques F, Duchateau P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2007 ; 7 : 49-66.
4. Dion S, Demattéi M-V, Renault S. Les domaines à doigts de zinc vers la modification de la structure et de l'activité des génomes. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 834-9.
5. Dupret B, Angrand P-O. L'ingénierie des génomes par les TALEN. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 186-93.
6. Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1014-22.
7. Jordan B. CRISPR-Cas9, une nouvelle donne pour la thérapie génique. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1035-8.
8. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 2017 ; 551 : 464-71.
9. Wang D, Zhang Y, Zhang J, et al. Advances in base editing: a focus on base transversions. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2024 ; 794 : 108515.
10. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 2019 ; 576 : 149-57.

11. Bouchard C, Godbout K, Tremblay JP. La correction de mutations pathogènes par *Prime editing*. *Med Sci (Paris)* 2024 ; 40 : 748-56.
12. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013 ; 154 : 442-51.
13. Kwon DY, Zhao Y-T, Lamonica JM, et al. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 15315.
14. Liu XS, Wu H, Ji X, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell* 2016 ; 167 : 233-47.e17.
15. Khabou H, Dalkara D. La conception de vecteurs adaptés à la thérapie génique oculaire. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 529-37.
16. Raguram A, Banskota S, Liu DR. Therapeutic in vivo delivery of gene editing agents. *Cell* 2022 ; 185 : 2806-27.
17. Corbin A, Grigorov B, Roingard P, et al. Réexamen de l'assemblage du VIH-1. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 49-55.
18. Gutierrez-Guerrero A, Cosset F-L, Verhoeyen E. Lentiviral vector pseudotypes: precious tools to improve gene modification of hematopoietic cells for research and gene therapy. *Viruses* 2020 ; 12 : 1016.
19. Lyu P, Lu B. New advances in using virus-like particles and related technologies for eukaryotic genome editing delivery. *IJMS* 2022 ; 23 : 8750.
20. 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.
21. Mangeot PE, Risson V, Fusil F, et al. Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat Commun* 2019 ; 10 : 45.
22. Urano E, Aoki T, Futahashi Y, et al. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C-delta1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. *J Gen Virol* 2008 ; 89 : 3144-9.
23. Haldrup J, Andersen S, Labial ARL, et al. Engineered lentivirus-derived nanoparticles (LVNPs) for delivery of CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes supporting base editing, prime editing and in vivo gene modification. *Nucleic Acids Res* 2023 ; 51 : 10059-74.
24. Banskota S, Raguram A, Suh S, et al. Engineered virus-like particles for efficient in vivo delivery of therapeutic proteins. *Cell* 2022 ; 185 : 250-65.e16.
25. Halebua T, Risson V, Carras J, et al. Delivery of prime editing in human stem cells using pseudoviral NanoScribes particles. *Nature Commun* 4 ; 16 : 397.
26. An M, Raguram A, Du SW, et al. Engineered virus-like particles for transient delivery of prime editor ribonucleoprotein complexes in vivo. *Nat Biotechnol* 2024 ; 42 : 1526-37.
27. Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y, et al. Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat Commun* 2020 ; 11 : 1334.
28. Prel A, Caval V, Gayon R, 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.
29. Mianné J, Nasri A, Van CN, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout and interallelic gene conversion in human induced pluripotent stem cells using non-integrative bacteriophage-chimeric retrovirus-like particles. *BMC Biol* 2022 ; 20 : 8.
30. Lyu P, Javidi-Parsijani P, Atala A, et al. Delivering Cas9/sgRNA ribonucleoprotein (RNP) by lentiviral capsid-based bionanoparticles for efficient «hit-and-run» genome editing. *Nucleic Acids Res* 2019 ; 47 : e99.
31. Jo D-H, Kaczmarek S, Shin O, et al. Simultaneous engineering of natural killer cells for CAR transgenesis and CRISPR-Cas9 knockout using retroviral particles. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2023 ; 29 : 173-84.
32. Hamilton JR, Tschida CA, Nguyen DN, et al. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 and transgenes enables complex immune cell engineering. *Cell Reports* 2021 ; 35 : 109207.
33. Indikova I, Indik S. Highly efficient «hit-and-run» genome editing with unconcentrated lentivectors carrying Vpr.Prot.Cas9 protein produced from RRE-containing transcripts. *Nucleic Acids Res* 2020 ; 48 : 8178-87.
34. Ling S, Zhang X, Dai Y, et al. Customizable virus-like particles deliver CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein for effective ocular neovascular and Huntington's disease gene therapy. *Nat Nanotechnol* 2025 ; 20 : 5433-53.
35. Gutierrez-Guerrero A, Abrey Recalde MJ, Mangeot PE, et al. Baboon envelope pseudotyped «Nanoblades» carrying Cas9/gRNA complexes allow efficient genome editing in human T, B, and CD34+ cells and knock-in of AAV6-encoded donor DNA in CD34+ cells. *Front Genome Ed* 2021 ; 3 : 604371.
36. Pfeifer A, Brandon EP, Kootstra N, et al. Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 ; 98 : 11450-5.
37. Galla M, Will E, Kraunus J, et al. Retroviral pseudotransduction for targeted cell manipulation. *Mol Cell* 2004 ; 16 : 309-15.
38. Segel M, Lash B, Song J, et al. Mammalian retrovirus-like protein PEG10 packages its own mRNA and can be pseudotyped for mRNA delivery. *Science* 2021 ; 373 : 882-9.
39. Kaczmarczyk SJ, Sitaraman K, Young HA, et al. Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : 16998-17003.
40. Izmiryan A, Basmaciogullari S, Henry A, et al. Efficient gene targeting mediated by a lentiviral vector-associated meganuclease. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 7610-9.
41. Cai Y, Bak RO, Mikkelsen JG. Targeted genome editing by lentiviral protein transduction of zinc-finger and TAL-effector nucleases. *Elife* 2014 ; 3 : e01911.
42. Bobis-Wozowicz S, Galla M, Alzubi J, et al. Non-integrating gamma-retroviral vectors as a versatile tool for transient zinc-finger nuclease delivery. *Sci Rep* 2014 ; 4 : 4656.
43. Cavazzana M. Progrès de la thérapie génique dans les maladies génétiques du système hématopoïétique. *Med Sci (Paris)* 2022 ; 38 : 768-71.
44. Dong W, Kantor B. Lentiviral vectors for delivery of gene-editing systems based on CRISPR/Cas: current state and perspectives. *Viruses* 2021 ; 13 : 1288.
45. Carpenter MA, Law EK, Serebrenik A, et al. A lentivirus-based system for Cas9/gRNA expression and subsequent removal by Cre-mediated recombination. *Methods* 2019 ; 156 : 79-84.
46. Wang T, Birsoy K, Hughes NW, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science* 2015 ; 350 : 1096-101.
47. Zhou Y, Zhu S, Cai C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 2014 ; 509 : 487-91.
48. Taha EA, Lee J, Hotta A. Delivery of CRISPR-Cas tools for in vivo genome editing therapy: Trends and challenges. *J Control Release* 2022 ; 342 : 345-61.
49. Baron Y, Sens J, Lange L, et al. Improved alpharetrovirus-based Gag.MS2 particles for efficient and transient delivery of CRISPR-Cas9 into target cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022 ; 27 : 810-23.
50. Tiroille V, Krug A, Bokobza E, et al. Nanoblades allow high-level genome editing in murine and human organoids. *Mol Ther Nucleic Acids* 2023 ; 33 : 57-74.
51. Ngo W, Peukes J, Baldwin A, et al. Mechanism-guided engineering of a minimal biological particle for genome editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2025 ; 122 : e2413519121.
52. Dupressoir A, Heidmann T. Les syncytines — Des protéines d'enveloppe rétrovirales capturées au profit du développement placentaire. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 163-9.
53. Hindi SM, Petranjy MJ, Greenfield E, et al. Enveloped viruses pseudotyped with mammalian myogenic cell fusogens target skeletal muscle for gene delivery. *Cell* 2023 ; 186 : 3520.
54. Streibinger D, Frangieh CJ, Friedrich MJ, et al. Cell type-specific delivery by modular envelope design. *Nat Commun* 2023 ; 14 : 5141.
55. Hamilton JR, Chen E, Perez BS, et al. In vivo human T cell engineering with enveloped delivery vehicles. *Nat Biotechnol* 2024 ; 42 : 1684-92.
56. Raguram A, An M, Chen PZ, et al. Directed evolution of engineered virus-like particles with improved production and transduction efficiencies. *Nat Biotechnol* 2024.

TIRÉS À PART
P.É. Mangeot