



## REMERCIEMENTS

Le travail présenté ici a été soutenu par la Fondation de France (201234497 et 00016818), la Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20110421326) et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-MNPS-018). Nous remercions Prisca Beaudoin pour sa participation au graphisme de la Figure 1.

## LIENS D'INTÉRÊT

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

## RÉFÉRENCES

1. Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000 ; 23 : S2-7.
2. Chaudhuri KR, Schapira AHV. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 2009 ; 8 : 464-74.
3. Barone P. Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine. *Eur J Neurol* 2010 ; 17 : 364-76.
4. Politis M, Niccolini F. Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2015 ; 277 : 136-45.
5. Beaudoin-Gobert M, Epinat J, Météreau E, et al. Behavioral impact of a double dopaminergic and serotonergic lesion in the non-human primate. *Brain* 2015 ; 138 : 2632-47.
6. Porras G, Li Q, Bezdard E. Modeling Parkinson's disease in primates: the MPTP model. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012 ; 2 : a009308.
7. Mounayar S, Boulet S, Tandé D, et al. A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. *Brain* 2007 ; 130 : 2898-914.
8. Jellinger KA. Post-mortem studies in Parkinson's disease: is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J Neural Transm* 1999 ; 56 : 1-29.
9. Politis M. Neuroimaging in Parkinson disease: from research setting to clinical practice. *Nat Rev Neurol* 2014 ; 10 : 708-22.
10. De Win MM, Jager G, Booij J, et al. Neurotoxic effects of ecstasy on the thalamus. *Br J Psychiatry* 2008 ; 193 : 289-96.

## NOUVELLE

### Améliorons notre expérience de la molécule unique grâce à CRISPR

Raphaël Gaudin

Department of cell biology, Harvard medical school and program in cellular and molecular medicine, Boston children's hospital, WAB 136, 200 Longwood avenue, Boston, MA 02115, États-Unis.

[raphael.gaudin@childrens.harvard.edu](mailto:raphael.gaudin@childrens.harvard.edu)

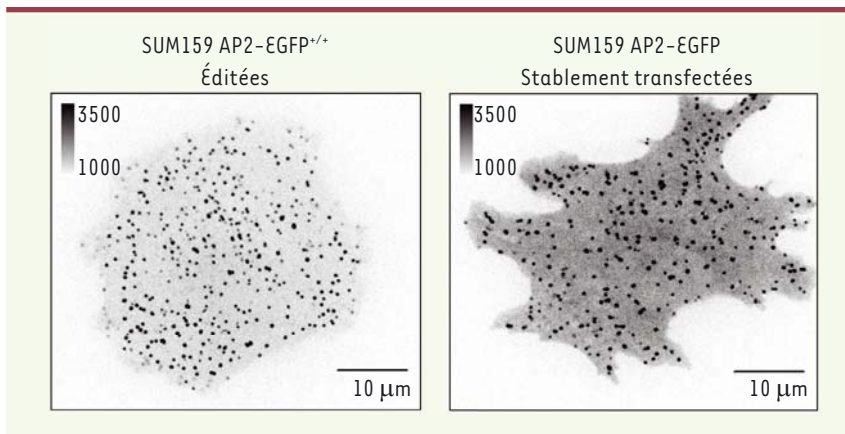
En 1995, parallèlement à l'avènement de la microscopie photonique sur cellules vivantes, le prix Nobel de chimie, Roger Tsien, découvre une protéine de méduse capable de fluorescer : la « protéine verte fluorescente » plus connue sous le nom de GFP (*green fluorescent protein*). Le développement de dérivés de la GFP ainsi que d'autres nouvelles étiquettes fluorescentes, au cours de ces vingt dernières années, associé à l'essor de nouveaux types de microscopes toujours plus résolutifs, sensibles et rapides, a permis aux chercheurs d'approfondir leurs connaissances de la dynamique des tissus, des cellules, des processus subcellulaires, et ce jusqu'aux molécules uniques. Comme dans la plupart des domaines des sciences du vivant, l'arrivée des techniques d'édition du génome utilisant TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*), et maintenant CRISPR-Cas9 (*clustered regularly*

*interspaced short palindromic repeats - CRISPR-associated protein 9*), a modifié les standards de la biologie cellulaire. Le principe de l'édition de gènes ou édition génique (de l'anglais *gene editing*) est d'insérer, supprimer ou remplacer l'ADN génomique d'une cellule vivante avec une précision exceptionnelle. Une GFP peut par exemple être insérée juste après le nucléotide 46838449 du chromosome 19 en position q13.32 et ainsi permettre de faire exprimer, de façon endogène par la cellule, la sous-unité  $\sigma 2$  du complexe AP2 (*adaptor protein*) fusionnée à la GFP [1]. Cette revue se focalise sur l'utilisation de CRISPR-Cas9 à des fins de visualisation et de quantification de molécules uniques. Nous ne développerons pas les principes fondamentaux des techniques d'édition [2, 9] (→).

(→) Voir la Nouvelle de H. Gilgenkrantz, m/s n° 12, décembre 2014, page 1066, et la Synthèse de J.P. Tremblay, page 1014 de ce numéro

### Les trois ingrédients nécessaires pour l'insertion efficace d'ADN exogène dans un génome

La recette pour insérer du matériel génétique dans le génome d'une cellule de mammifère est la suivante. Premièrement, il est nécessaire d'identifier et de synthétiser un ARN guide composé d'une séquence de 20 nucléotides ciblant une région d'intérêt. Cet ARN guide doit être suivi d'une séquence ARN de 70 à 100 nucléotides formant une structure secondaire reconnue par l'enzyme Cas9. Le choix de la région d'intérêt à cibler doit répondre à trois contraintes. Tout d'abord, cette région doit être adjacente à un motif PAM (*protospacer adjacent motif*) qui varie selon l'enzyme Cas utilisée [3, 4]. Ensuite, la région doit être aussi proche que possible de l'endroit où l'insertion du matériel génétique doit avoir lieu afin que l'efficacité de recombinaison



**Figure 1.** Comparaison de la fluorescence de la sous-unité  $\sigma 2$  du complexe AP2 dans des cellules SUM159 éditées via TALEN (panel de gauche) ou transfectées de façon stable avec l'ADN complémentaire de  $\sigma 2$  (panel de droite).

soit optimale. Enfin, la région choisie doit minimiser les risques de clivages non-spécifiques<sup>1</sup>.

Le deuxième élément nécessaire pour l'édition du génome est l'expression d'une endonucléase Cas au sein des cellules à éditer. L'enzyme Cas9, dérivée de *Streptococcus pyogenes*, est l'endonucléase qui est la plus utilisée, de même que ses variantes, appelées « nickases », qui ne clivent que l'un des deux brins d'ADN. De nouvelles méthodes, fondées sur d'autres types de cette endonucléase, provenant d'espèces de bactéries différentes, commencent aussi à être développées.

Enfin, si les deux premiers éléments sont suffisants pour éteindre un gène, l'insertion d'ADN par recombinaison homologue nécessite une matrice ADN contenant le matériel génétique à introduire. Cet ADN doit être encadré de séquences identiques à celles présentes de chaque côté de la région du génome ciblée. Généralement, plus l'insert est petit, plus l'efficacité d'édition est élevée. Pour insérer la GFP par exemple, qui possède environ 700 paires de bases

(pb), des séquences de 800 pb en amont et en aval du gène sont généralement utilisées. Pour de plus petites étiquettes (comme un « Flag tag »), des séquences de 60 à 100 pb de chaque côté sont suffisantes.

Bien que ces trois ingrédients soient la base nécessaire pour réussir une insertion endogène, la recombinaison homologue reste un processus cellulaire très inefficace. La capacité des cellules de la lignée à éditer à être transfectées (*i.e.* leur capacité à internaliser de l'ADN exogène) est un facteur déterminant pour la réussite (ou l'échec) de l'édition génique.

#### Avantage de l'édition de génome par rapport aux méthodes traditionnelles de quantification

L'un des avantages majeurs de l'utilisation des méthodes d'édition génique est la possibilité d'obtenir une quantification précise, absolue et dynamique du nombre de protéines d'intérêt présentes dans un espace donné. Avant l'arrivée de ces méthodes, il était nécessaire, afin de réaliser des mesures quantitatives, d'utiliser des lignées cellulaires transfectées de manière stable exprimant une protéine d'intérêt qui était fusionnée à une protéine fluorescente [5]. Ce type d'étude était complexe et se confrontait à au moins deux obstacles

fondamentaux, intrinsèques au *design* expérimental :

1. Les protéines endogènes n'étant pas étiquetées, des analyses statistiques poussées étaient indispensables afin de prendre en compte la proportion de protéines fantômes (non étiquetées). L'édition génique permet maintenant de mesurer la totalité des molécules d'intérêt, abolissant l'incertitude due aux protéines fantômes ;

2. Lors de la transfection d'ADN complémentaire exogène codant pour une protéine fluorescente, le promoteur et la queue PolyA<sup>2</sup>, contrôlant l'expression de la protéine, induisent fréquemment une production élevée de celle-ci, ce qui se traduit par sa surexpression. Ainsi, les risques de modifier les propriétés biologiques de la protéine considérée, et en conséquence de la cellule elle-même, augmentent et peuvent donc conduire à des quantifications erronées. La génération de lignées cellulaires stables est souvent préférée à l'expression transitoire afin de minimiser cet inconvénient, sans pour autant le supprimer. Grâce aux méthodes d'édition génique, les cellules éditées présentent un niveau d'expression endogène de la protéine, qui est contrôlé par un promoteur et une queue PolyA propres au gène étudié.

Un autre avantage de l'édition génique, que mes collègues et moi-même avons pu constater, est que les cellules éditées présentent une fluorescence ayant un meilleur rapport signal sur bruit de fond que des cellules transfectées de façon stable. Ainsi, nous avons intégré par édition génique, dans le génome de cellules mammifères, une étiquette GFP au sein des deux allèles du gène codant la sous-unité  $\sigma 2$  du complexe AP2 (un initiateur du recrutement de la clathrine à la membrane plasmique), au niveau correspondant à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine ([1] et manuscrit en préparation). Les cellules ainsi éditées

<sup>1</sup> Quelle que soit la séquence cible choisie, des séquences très similaires peuvent être rencontrées ailleurs dans le génome et des clivages à ces endroits peuvent survenir. On parle de clivage non-spécifique. Certains sites internet tels que [crispr.mit.edu](http://crispr.mit.edu) proposent de calculer un score pour la région choisie : plus ce score est élevé, plus le risque de clivages non-spécifiques est minime.

<sup>2</sup> La queue polyA est une succession du ribonucléotide adénosine (A), ajoutée à l'extrémité 3' des ARNm, qui en augmente la stabilité.



présentent une fluorescence, au niveau du cytosol, moins importante que les cellules transfectées de façon stable (Figure 1). Il est probable que l'augmentation de la fluorescence que l'on observe dans les cellules transfectées de façon stable et surexprimant AP2, soit le reflet de l'accumulation de protéines au niveau du cytosol.

L'édition génique a permis de rendre plus accessible la quantification de molécules uniques. Elle a permis la création d'une passerelle entre la biologie structurale, la biochimie et la biologie cellulaire, nécessaire pour obtenir cette quantification. Un exemple notable de cette approche a été publié l'année dernière pour la quantification de molécules de dynamine dans des cellules vivantes [6]. La dynamine est une protéine présente dans le cytosol qui intervient dans la formation des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine, et dans la séparation de ces vésicules à partir de la membrane cellulaire. Le but de l'étude publiée était de quantifier le nombre minimal de dynamine-2 nécessaire pour séparer une vésicule recouverte de clathrine, de la membrane plasmique. La dynamine se multimérise en dimères et tétramères qui s'organisent en hélice autour d'un tube lipidique, induisant sa scission par constriction et conduisant *in fine* à la séparation de la vésicule d'endocytose [7]. Notre groupe, ainsi qu'un autre laboratoire, a montré cependant que dans des cellules vivantes éditées qui expriment de façon endogène *dynamine2-EGFP<sup>+/+</sup>* (i.e. la GFP a été insérée, au niveau correspondant à l'extrémité carboxy-terminale, au sein des deux allèles du gène codant la dynamine-2), un seul anneau de dynamine était suffisant pour

qu'une vésicule de clathrine soit séparée de la membrane plasmique, bien que plusieurs tours d'hélices puissent néanmoins être observés [6, 8].

### Inconvénients actuels de l'édition de génome par rapport aux méthodes traditionnelles de quantification

Faire fluorescer des molécules grâce à la méthode CRISPR, ou d'autres techniques d'édition, devrait être à l'origine d'importantes découvertes dans le domaine de la molécule unique. Plusieurs obstacles nécessitent cependant d'être dépassés. En effet, les protéines fluorescentes utilisées actuellement, comme la GFP, sont relativement volumineuses. Elles peuvent donc affecter la fonction des protéines auxquelles elles sont fusionnées. L'utilisation d'étiquettes plus petites, plus brillantes, et éventuellement plus inertes, devrait donc représenter la prochaine grande avancée permettant de visualiser la dynamique du vivant sans induire de perturbations au niveau de la cellule. De même, l'utilisation de microscopes plus sensibles et moins phototoxiques, couplés à ces fluorochromes puissants et de petite taille, sera une des clés permettant de quantifier des molécules uniques avec précision.

### Conclusion

CRISPR-Cas9 s'est imposé comme une vraie révolution pour les sciences du vivant. Cette technique d'édition a supplanté toutes les autres, notamment parce qu'elle est plus simple et plus rapide à mettre en œuvre. La quantification à l'échelle de la molécule unique dans des cellules vivantes devient ainsi

plus accessible et plus précise. Cependant, cette technique doit encore être améliorée pour rendre l'édition génique plus efficace. En trois ans seulement, cette technologie a évolué à une vitesse phénoménale et nul doute que, dans les années à venir, l'édition génique va connaître de nouvelles révolutions. ♦

### Enhancing our single molecule experience using Crispr

### REMERCIEMENTS


Je remercie Dr Margot Carocci pour sa relecture critique du manuscrit et Ophélie Gaudin pour l'édition du texte.

### LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Kural C, Akatay AA, Gaudin R, et al. Asymmetric formation of coated pits on dorsal and ventral surfaces at the leading edges of motile cells and on protrusions of immobile cells. *Mol Biol Cell* 2015 ; 26 : 2044-53.
2. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1066-9.
3. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 2015 ; 523 : 481-5.
4. Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 2015 ; 520 : 186-91.
5. Cocucci E, Aguet F, Boulant S, Kirchhausen T. The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell* 2012 ; 150 : 495-507.
6. Cocucci E, Gaudin R, Kirchhausen T. Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit. *Mol Biol Cell* 2014 ; 25 : 3595-609.
7. Bashkurov PV, Akimov SA, Evseev AI, et al. GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell* 2008 ; 135 : 1276-86.
8. Grassart A, Cheng AT, Hong SH, et al. Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2014 ; 205 : 721-35.
9. 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.



**Tarifs d'abonnement m/s - 2015**

**Abonnez-vous**

**à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

---

**Bulletin d'abonnement**

**page 1046 dans ce numéro de m/s**

