



de restriction de cette enzyme contre les souches aviaires du virus de la grippe.

Le système CRISPR/Cas9 SAM : un outil précieux dans la lutte antivirale

Tandis que la plupart des cribles réalisés jusqu'à aujourd'hui s'étaient concentrés sur l'identification des facteurs nécessaires à l'infection par le virus de la grippe, cette étude démontre pour la première fois la faisabilité d'un crible visant à identifier les facteurs dont l'activité inhibe l'infection. Ces deux approches sont complémentaires et permettront de mieux appréhender les interactions complexes qui s'établissent entre le virus et son hôte au cours de l'infection. Le système CRISPR/Cas9 SAM prouve donc son efficacité pour l'identification de facteurs de restriction antiviraux. Le facteur de restriction B4GALNT2 décrit dans cette étude est spécifique aux virus aviaires, qui peuvent cependant constituer une menace pour l'homme. On peut faci-

lement supposer que d'autres facteurs de restriction spécifiques aux virus humains existent, qu'il serait également intéressant d'identifier. Le développement de l'utilisation du système CRISPR/Cas9 SAM devrait être d'une grande utilité dans la recherche d'autres protéines cellulaires à action antivirale, que ce soit contre le virus de la grippe ou contre d'autres virus. Il est également important de souligner que l'outil CRISPR/Cas9 SAM peut être exploité à d'autres fins en virologie, notamment de thérapie anti-infectieuse. Par exemple, dans le cadre de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la persistance de provirus latents dans les cellules infectées est l'une des failles les plus importantes des thérapies actuelles. Le système CRISPR/Cas9 SAM pourrait être adapté pour cibler les régions actives des provirus latents [3], ce qui pourrait permettre de réactiver le virus dans ses réservoirs cellulaires et d'éli-

miner ensuite les cellules exprimant le virus. La réactivation ciblée de ces provirus par CRISPR/Cas9 SAM pourrait ainsi s'avérer être une stratégie efficace pour l'élimination des réservoirs de l'infection. ♦

CRISPR/Cas9 SAM (synergic activation mediator): a new strategy to screen for genome-encoded antiviral restriction factors

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Heaton BE, Kennedy EM, Dumm RE, et al. A CRISPR activation screen identifies a pan-avian influenza virus inhibitory host factor. *Cell Rep* 2017 ; 20 : 1503-12.
2. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2015 ; 517 : 583-8.
3. Zhang Y, Yin C, Zhang T, et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 16277.

NOUVELLE

Le système CRISPR/Cas : un outil d'édition des génomes pour le développement de modèles animaux d'infections virales

Garance Castino¹, Martin Guillemet¹, Amélie Joly¹, Anaïs Vignon¹

¹ École normale supérieure de Lyon, département de biologie, Master biologie, Lyon, France.

Le bêta-coronavirus MERS (*middle east respiratory syndrome*), ou MERS-CoV, est un pathogène émergent qui frappe la région du Moyen-Orient depuis 2012. Depuis sa découverte, le virus s'est répandu dans plus de 20 pays. Il a infecté plus de 800 individus et est mortel dans 35 % des cas [1]. C'est une source d'inquiétude pour l'OMS (Organisation mondiale de la santé) car son taux de reproduction de base (R0, correspondant au nombre moyen de nouveaux cas d'infection engendrés par un individu infecté au cours de sa période d'infectiosité) est

passé de 0,79 à plus de 2 au cours des dernières années [2]. MERS-CoV a été transmis à l'homme par le dromadaire, un de ses principaux réservoirs. Cependant, la plupart des cas décrits sont dus à une transmission inter-humaine. Ce virus cause en général des infections respiratoires aiguës, allant jusqu'à la pneumonie, mais peut également être responsable de symptômes gastro-intestinaux. MERS-CoV est un virus enveloppé d'une centaine de nanomètres de diamètre. Il présente à sa surface des glycoprotéines Spike qui possèdent un domaine RBD

(*receptor-binding domain*) capable de lier la glycoprotéine membranaire DPP4 (dipeptidyl peptidase 4) à la surface des cellules cibles [1]. La liaison entre Spike et DPP4 permet au virus d'infecter un large spectre de cellules cibles.

Modélisation de l'infection par MERS-CoV chez la souris grâce à CRISPR/Cas

Étape 1 : modifier le récepteur DPP4

Afin de mieux comprendre le cycle de réplication du virus et de contribuer au développement préclinique de straté-

gies thérapeutiques, il est nécessaire de disposer d'un modèle animal dans lequel MERS-CoV se réplique et induit des pathologies représentatives de la maladie chez l'homme. Or, la protéine virale Spike est incapable de se fixer au récepteur DPP4 murin [3]. Le virus ne peut donc pas se répliquer dans les modèles habituellement utilisés en laboratoire comme la souris. Des modèles de primates non-humains comme le macaque rhésus [4] et le ouistiti commun [5] ont été développés, mais leur utilisation pose des questions éthiques et pratiques. C'est dans ce contexte que les auteurs de cette étude présentent le développement d'un nouveau modèle animal pour le MERS-CoV obtenu à l'aide de la stratégie d'édition génétique CRISPR/Cas [6]. En effet, les auteurs ont généré une protéine DPP4 murine interagissant efficacement avec le virus. Pour cela, ils ont modifié le gène *mDPP4* en insérant deux codons correspondant à ceux codant la séquence humaine aux positions 288 et 330. Ces deux codons correspondent à la région qui interagit avec le RBD de la protéine virale Spike. Au cours d'une étude préalable, les auteurs ont vérifié *in vitro* que ce récepteur DPP4 chimérique était capable de lier les protéines Spike, rendant les cellules murines permissives [7]. Ensuite, à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9, ils ont obtenu des lignées de souris exprimant ce récepteur DPP4 chimérique à la place de la protéine murine. Ces lignées de souris sont hétérozygotes ou homozygotes pour le gène muté. Dans ces lignées, la version chimérique de la protéine DPP4 est exprimée et elle conserve ses fonctions normales, à savoir son rôle dans le maintien de la glycémie [8] et dans la régulation du système immunitaire [9]. Après avoir réalisé ces contrôles, les auteurs ont montré que le virus se réplique de façon efficace chez ces souris. Cependant, l'infection ne conduit au développement d'aucun des symptômes caractéristiques de l'infection chez l'homme, limitant ainsi l'intérêt préclinique du modèle.

Étape 2 : accroître la pathogénicité du virus

Pour augmenter la pertinence de ce modèle, les auteurs ont cherché à augmenter la pathogénicité de la souche virale utilisée chez la souris. Chez l'homme, un hôte auquel le virus est adapté, la pathogénicité de MERS-CoV est engendrée par une réplication élevée du virus. Pour obtenir une souche virale se répliquant mieux chez la souris, c'est-à-dire plus adaptée à la souris, les chercheurs ont utilisé une caractéristique intrinsèque des virus : l'évolution très rapide de leur génome, permettant une adaptation rapide à un nouvel hôte par sélection naturelle *in vivo*. Ils ont donc mis en œuvre un protocole appelé le passage en série : des souris dont le récepteur DPP4 est modifié par CRISPR-Cas9 sont infectées par la souche virale de départ, puis le virus produit est récolté et on réitère cette manipulation quinze fois. À l'issue de ces passages, la pathogénicité du virus ainsi obtenu est caractérisée. Comme espéré, la capacité du virus à se répliquer a augmenté et on observe désormais qu'une inflammation se développe et que les capacités pulmonaires des souris sont affectées. Les symptômes humains ont donc été reproduits et le modèle murin modifié semble maintenant bien plus pertinent pour l'étude du virus MERS-CoV.

Un modèle animal précieux pour la modélisation thérapeutique

Les auteurs ont ensuite poursuivi la validation de leur modèle en y évaluant l'efficacité des traitements démontrés comme efficaces dans d'autres modèles. D'une part, une immunothérapie passive fondée sur l'injection de l'anticorps monoclonal humain 3B11 est testée. Cet anticorps neutralisant est dirigé contre la protéine virale Spike et sa fixation empêche l'interaction de la protéine avec le récepteur DPP4. Cela bloque donc l'entrée du virus dans la cellule et inhibe ainsi la réplication virale. Ce traitement avait été validé sur un modèle de primates non-humains

[10]. D'autre part, une immunisation active basée sur des pseudo-particules virales exposant la protéine Spike à leur surface (VRP, *venezuelan equine encephalitis replicon particles*) est testée. Le virus équin est inoffensif pour la souris et est donc utilisé uniquement comme vecteur de Spike. Cette immunisation induit la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre Spike qui permettraient d'inhiber la réplication virale lors d'une infection ultérieure par MERS-CoV, comme cela a été précédemment démontré dans un modèle murin [11]. De façon intéressante, dans les groupes de souris traités par ces deux approches, les symptômes résultant d'une infection par MERS-CoV sont réduits : l'obstruction des voies respiratoires est nulle, similaire à celle de souris non infectées. De plus, le virus se réplique beaucoup moins efficacement chez les souris ayant reçu ou produit des anticorps : le titre viral est divisé par 10^7 . Il apparaît donc que l'immunisation a été efficace dans les deux cas.

L'infection par MERS-CoV dans cette lignée de souris développée grâce au système CRISPR/Cas9 permet donc une bonne modélisation de l'infection par MERS-CoV chez l'homme : le virus s'y réplique efficacement, les symptômes sont reproduits et l'efficacité des traitements peut y être mesurée. Ainsi, l'introduction de la technique CRISPR/Cas en virologie peut-elle participer à la mise en place rapide de modèles animaux innovants. ♦

The CRISPR/Cas system: a genome editing tool to develop animal models of viral infections

LIENS D'INTÉRÊT

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

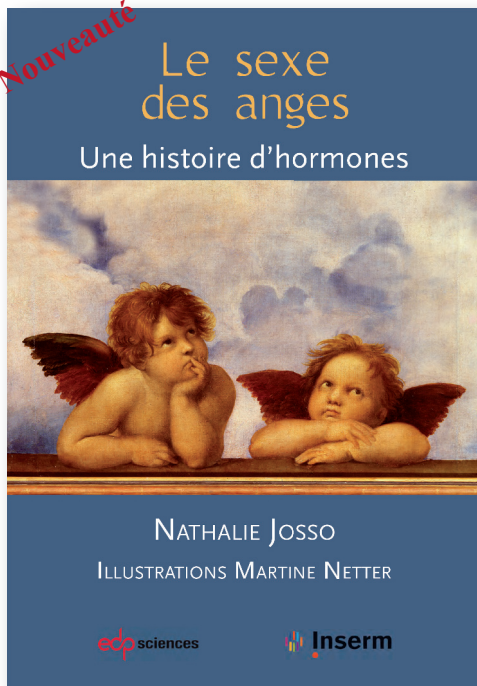
RÉFÉRENCES

1. Van den Brand JMA, Smits SL, Haagmans BL. Pathogenesis of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Pathol* 2015 ; 235 : 175-84.
2. Banik GR, Khandaker G, Rashid H. Middle East respiratory syndrome coronavirus "MERS-CoV": current knowledge gaps. *Paediatr Respir Rev* 2015 ; 16 : 197-202.



RÉFÉRENCES

- Coleman CM, Matthews KL, Goicochea L, Frieman MB. Wild-type and innate immune-deficient mice are not susceptible to the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Gen Virol* 2014 ; 95 : 408-12.
- De Wit E, Rasmussen AL, Falzarano D, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) causes transient lower respiratory tract infection in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 16598-603.
- Falzarano D, de Wit E, Feldmann F, et al. Infection with MERS-CoV causes lethal pneumonia in the common marmoset. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1004250.
- Cockrell AS, Yount BL, Scobey T, et al. A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome. *Nat Microbiol* 2016 ; 2 : 16226.
- Cockrell AS, Peck KM, Yount BL, et al. Mouse dipeptidyl peptidase 4 is not a functional receptor for Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol* 2014 ; 88 : 5195-9.
- Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J. DPP4 in diabetes. *Front Immunol* 2015 ; 6 : 386.
- Wagner L, Klemann C, Stephan M, von Hörsten S. Unravelling the immunological roles of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) activity and/or structure homologue (DASH) proteins. *Clin Exp Immunol* 2016 ; 184 : 265-83.
- Johnson RF, Bagci U, Keith L, et al. 3B11-N, a monoclonal antibody against MERS-CoV, reduces lung pathology in rhesus monkeys following intratracheal inoculation of MERS-CoV Jordan-n3/2012. *Virology* 2016 ; 490 : 49-58.
- Zhao J, Li K, Wohlford-Lenane C, et al. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 4970-5.



ISBN : 978-2-7598-2080-1

142 pages

20 €

Ce livre est l'histoire d'un parcours qui a mené à la caractérisation de l'hormone anti-müllérienne, l'AMH, hormone indispensable à la différenciation des sexes. Sans l'AMH, les filles n'auraient pas le monopole de l'utérus !

Substance testiculaire mystérieuse il y a cinquante ans, elle est aujourd'hui largement utilisée en endocrinologie pédiatrique et surtout en gynécologie pour évaluer les chances de fertilité féminine.

Nathalie Josso raconte, avec une clarté agrémentée d'une forte dose d'humour, les aléas de cette recherche, réussie à force de détermination, d'imagination et de hasards heureux. Son équipe a su attirer des collaborations du monde entier sans négliger pour autant le soutien inattendu d'un ouvrier de l'abattoir de la Villette, de la lapine Céleste et d'une bande de petits kangourous.

Ce témoignage, extrêmement accessible, devrait donner à de jeunes étudiants le goût et l'envie de la recherche.

Pédiatre de formation, Nathalie Josso s'est très vite orientée vers la différenciation sexuelle fœtale, menant de front une activité médicale en endocrinologie pédiatrique et des recherches fondamentales centrées sur l'hormone anti-Müllérienne. Entrée à l'Inserm peu d'années après la fin de son internat, elle y a réuni une équipe jeune et enthousiaste qui, d'abord à l'École Normale Supérieure, puis à l'Université Paris-Sud, a permis à la France de conserver une place de leader dans le domaine de l'hormone découverte par Alfred Jost. Le Prix Andrea Prader, le Prix du Rayonnement Français et le Märta Philipson Award (Hôpital Karolinska de Stockholm) ont récompensé le travail de son groupe. Actuellement, Nathalie Josso partage son temps entre le laboratoire, la musique et les roses de son jardin.

BON DE COMMANDE

à retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex, France
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : françois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir

Le sexe des anges : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | | | N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | | Signature :