

INTERÊTS DES TECHNIQUES DE MODIFICATIONS CIBLÉES DU GÉNOME («GENOME EDITING») CHEZ LES ANIMAUX DE RENTE

INTEREST OF TARGETED GENOME MODIFICATION TECHNIQUES IN TERRESTRIAL LIVESTOCK SPECIES

Par *Éric PAILHOUX*⁽¹⁾ & *Jean-Luc VILOTTE*⁽²⁾
(Communication présentée le 3 Octobre 2019,
Manuscrit accepté le 9 Novembre 2019)

RÉSUMÉ

Des nouvelles nucléases permettent de modifier le génome de nombreuses espèces de façon ciblée ; à un endroit précis et défini dudit génome. Concernant les animaux de rente, les applications envisagées peuvent se classer dans trois grandes perspectives: (i) les projets à visée de recherche fondamentale, lorsque l'espèce murine ne peut pas être utilisée (cornage, saisonnalité, à titre d'exemples) ; (ii) les projets à visée biomédicale pour créer des animaux modèles de pathologies humaines quand le modèle murin n'est pas adéquat ; et (iii) les projets à visée agronomique pour apporter un caractère favorable, décrit dans une autre espèce ou race, à une race ou une espèce ne possédant pas ce caractère. Ces techniques représentent une alternative très efficace à l'introggression, tout en abolissant la barrière d'espèce. Elles pourront également être envisagées en appui à la sélection génomique pour éliminer les allèles défavorables lorsque leur utilisation sera autorisée en Europe, ce qui n'est pas encore le cas.

Mots-clés : Modifications ciblées du génome, animaux de rente, applications.

ABSTRACT

Nowadays, new endonucleases make it possible to target precisely defined alterations in the genomic DNA of many species. With regard to livestock, the envisaged applications can be divided into three broad perspectives: (i) the projects with a basic research objective, when the mouse species cannot be used (horns development, seasonality, as examples) ; (ii) biomedical projects to create animal models of human pathologies when the mouse model is not adequate ; and (iii) agronomic projects aimed at providing an interesting character already described in another species or race, into a race or species not possessing such a character. These techniques represent a very effective alternative to introgression, while abolishing the species barrier. They may also be considered in support of genomic selection to eliminate adverse alleles once the use of these techniques of gene editing will be allowed in Europe, which is not yet the case.

Keywords: Genome editing, Livestock, NBT: New Breeding Techniques.

INTRODUCTION

La découverte et la maîtrise des nouveaux outils que sont les nucléases spécifiques permet (au moins en théorie) de modifier le génome de n'importe quelle espèce de façon ciblée : c'est à dire à un endroit précis et défini dudit génome (**Figure 1**). Ces nucléases sont, dans l'ordre chronologique de développement : (i) les méganucléases, (ii) les nucléases à doigts de zinc (ZFN:

Zinc Finger Nuclease) et (iii) les TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*). À cela est venu plus récemment s'ajouter le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats - CRISPR-associated gene 9*) (Razzaq *et al.*, 2019). A part les méganucléases dont l'utilisation n'a été possible que dans quelques cas précis (du fait que l'on ne peut pas modi-

(1) Directeur de Recherche à l'INRA ; UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, Jouy-en-Josas, France.
Courriel : eric.pailhoux@inra.fr

(2) Directeur de Recherche à l'INRA ; UMR GABI, INRA, AgroParis Tech, Université Paris Saclay, Jouy-en-Josas, France.

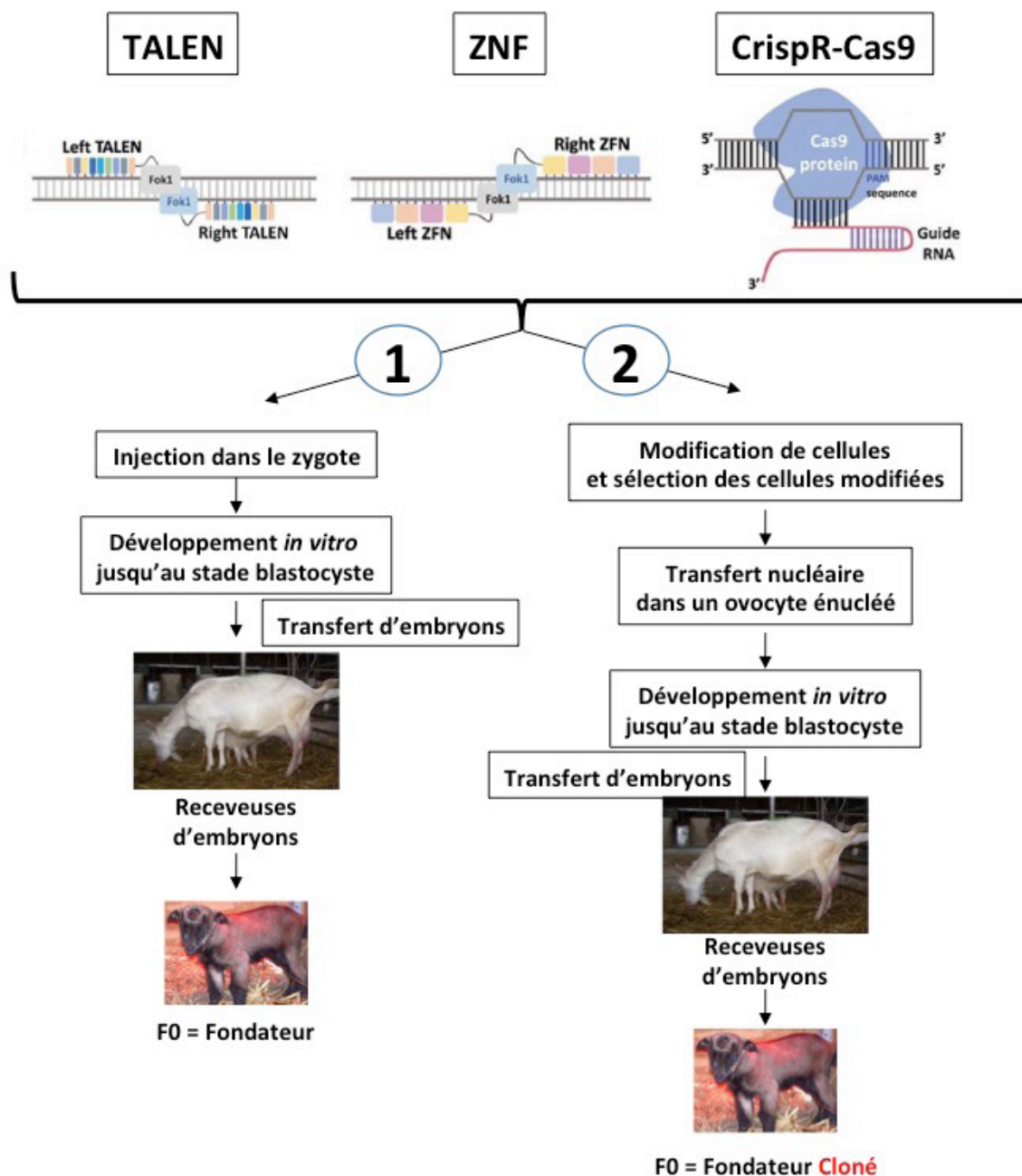


Figure 1 : Différents types de nucléases utilisées pour les techniques de modifications ciblées du génome et les deux voies d'utilisation de ces outils via les biotechnologies de la reproduction. La voie de droite (2) nécessite de modifier le génome de cellules en culture. Cette voie présente l'avantage de choisir précisément le génotype de la cellule à modifier; par contre les animaux issus de ces technologies sont « clonés » et donc interdits sur le marché Européen. Les schémas des nucléases ont été reproduits à partir de l'article : Shim et al. (2017).

fier leur site de reconnaissance), les trois autres types de nucléases sont synthétisables à façon (ZFN : protéine, TALEN : protéine, CRISPR-Cas9 : ARN guide + protéine Cas9) ce qui permet de les rendre spécifiques de la région du génome que l'on souhaite modifier. Les différences entre ces trois types de nucléases spécifiques sont associées à la complexité à les synthétiser qui se reflète dans le coût de leur fabrication (ZFN: ~20k€, TALEN: ~5k€, CRISPR-Cas9: ~0,5k€), ainsi que dans les contraintes spécifiques des sites de reconnaissance potentiels. Le système CRISPR-Cas9 est considéré comme «révolutionnaire» principa-

lement en raison de son faible coût, qui le rend accessible à de nombreux laboratoires, et de la faible contrainte nucléotidique imposée au site de reconnaissance. La propriété commune à toutes ces nucléases est qu'elles produisent une coupure des deux brins de l'ADN à un seul endroit du génome que l'on aura prédéterminé et ciblé lors de la conception de la nucléase utilisée. La réparation de la coupure, nécessaire pour assurer la survie de la cellule, se caractérise alors par deux situations très différentes selon que l'on additionne à l'endonucléase ou non un fragment d'ADN homologue des régions adjacentes à la coupure. (i) Si

aucun fragment d'ADN homologue n'est ajouté, la machinerie de réparation joint tout simplement les deux brins d'ADN en induisant des erreurs par rapport à la séquence initiale. Ces erreurs, qui se caractérisent souvent sous la forme de délétions ou d'insertions de quelques bases à plusieurs centaines de bases, sont autant de mutations transcrites dans la séquence de l'ARN messager puis, éventuellement, dans celle de la protéine, laquelle peut alors devenir non-fonctionnelle). Ce processus, nommé NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*), lorsqu'il survient dans un gène ou un élément régulateur, produit des mutations de type «*knock-out*» (non-fonctionnelles) qui permettent d'évaluer la fonction des gènes. (ii) Si un fragment d'ADN homologue de la région ciblée est additionné en même temps que la nucléase et l'ARN guide alors, dans un certain nombre de cas favorables, la machinerie qui contrôle l'intégrité de l'ADN va réparer la coupure en synthétisant un fragment homologue exogène à la place de la zone à réparer. Cette insertion est réalisée par un processus de recombinaison homologue, dénommé HR (*Homologous Recombination*). Ce processus va permettre, par exemple, de changer une seule base du génome en vue d'une correction ponctuelle (thérapie génique), ou de créer une mutation ponctuelle pour produire, par exemple, un modèle animal d'une maladie humaine. Avant l'avènement des nucléases spécifiques, les modifications ciblées du génome au sein des mammifères n'étaient essentiellement possibles que chez la souris ou le rat par utilisation de cellules souches embryonnaires (cellules ES ou *Embryonic Stem cells*) dans lesquelles on savait introduire de telles mutations. Ces cellules étaient ensuite utilisées pour participer à la formation et au développement d'un embryon. Cependant, malgré des années d'effort pour essayer de dériver de telles cellules ES dans d'autres espèces, dont les espèces d'intérêt agronomique, cela n'a pas été possible. L'avènement des nucléases spécifiques ouvre donc de nouvelles possibilités dans différents domaines de la biologie végétale et animale, de la médecine et de l'agronomie (**Figure 1**). Concernant les animaux de rente, les applications envisagées peuvent se classer dans trois grandes perspectives: (i) les projets à visée de recherche fondamentale, principalement lorsque le modèle murin s'avère soit physiologiquement divergent (cas de la différenciation des gonades), soit inapproprié (études du développement des cornes ou de la saisonnalité, à titre d'exemples) ; (ii) les projets à visée biomédicale pour créer des animaux modèles de pathologies humaines là où le modèle murin n'est pas adéquat (phénotypes divergents entre l'homme et la souris) (Kleinert *et al.*, 2018) ; et (iii) les projets à visée agronomique principalement pour apporter un caractère favorable (déjà décrit dans une espèce ou une race) à

une espèce ou une race ne possédant pas ce caractère (alternative à l'introgession, création d'un nouveau génotype, abolition de la barrière d'espèce). En agronomie, ces technologies sont également envisagées pour accroître l'efficacité de la sélection génomique, actuellement mise en place dans les principales races bovines mais qui devrait s'étendre à d'autres races et espèces dans les prochaines années (Van Eenennaam, 2017). Cependant, la récente décision de la cour de justice Européenne de considérer les animaux issus de telles manipulations comme des OGM, contrarie fortement leur développement dans cette région du globe.

KNOCK-OUT DE *FOXL2* CHEZ LA CHÈVRE, UN EXEMPLE EN RECHERCHE FONDAMENTALE

Des travaux utilisant ces technologies de modifications ciblées du génome ont déjà été réalisés en France, à l'INRA de Jouy en Josas, dans l'UMR Biologie du Développement et Reproduction. Ces premiers travaux, à visées purement cognitives, ont permis de démontrer le rôle majeur du gène *FOXL2* dans la différenciation ovarienne chez la chèvre et les bovidés en général (rôle non conservé chez la souris). En l'absence de ce gène, les chèvres génétiquement femelles XX deviennent des mâles dès les stades précoces du développement du sexe (Boulanger *et al.*, 2014). Le gène *FOXL2* contrôle la production d'hormones femelles (œstrogènes) qui a lieu dès les premiers stades de la différenciation ovarienne chez toutes les espèces de mammifères, les rongeurs exceptés. L'abolition de cette production hormonale chez la lapine (par les techniques de «*genome editing*» par ablation du gène *CYP19*, codant l'enzyme P450 aromatasase, seule enzyme capable d'aromatiser les androgènes en œstrogènes) démontre leur rôle crucial (**Figure 2**) dans l'établissement de la réserve folliculaire ovarienne (diminution de plus de 90% des follicules en absence

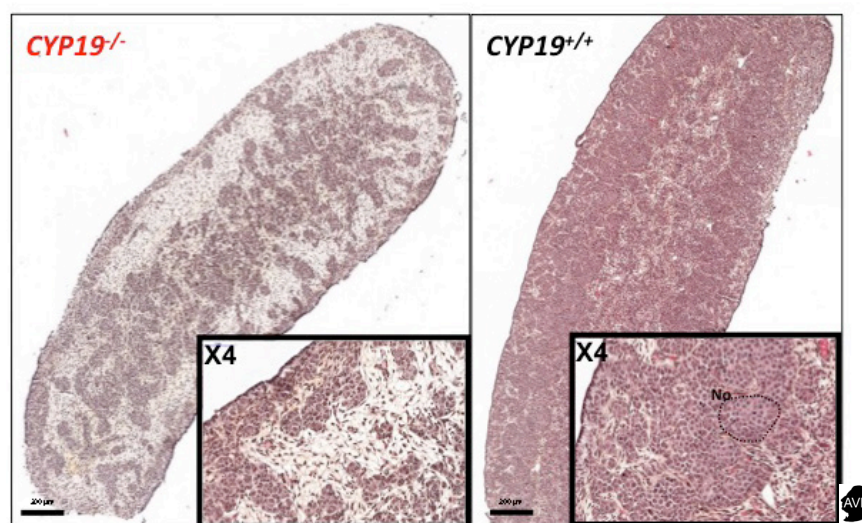


Figure 2 : Histologie des ovaires de lapine trois jours après à la naissance. Les ovaires de lapine *CYP19^{-/-}* (Knock-out du gène codant l'enzyme P450 aromatasase), ont un retard très important de la formation des nids ovigères par rapport aux animaux *CYP19^{+/+}* contrôles. L'absence d'œstrogènes en période fœtale a entraîné une diminution drastique du nombre de cellules germinales et somatiques constituant les nids ovigères. No = nid ovigère : l'exemple d'un nid est délimité en pointillé dans l'ovaire contrôlé.

d'œstrogènes et ménopause des lapines à l'âge de la puberté). Ces travaux démontrent également que les perturbateurs endocriniens (qui sont principalement des xéno-œstrogènes) doivent avoir un impact sur la fertilité et/ou la prolificité femelle dans nos espèces d'élevage et chez l'homme, de manière beaucoup plus drastique par rapport aux effets enregistrés chez les rongeurs. Ces derniers, en effet, n'utilisent ni les œstrogènes, ni *Foxl2* pour la différenciation ovarienne précoce mais seulement à partir du début de la formation des follicules. Les stades du développement foetal, correspondants aux fenêtres de sensibilité à ces polluants, sont donc également complètement différents entre les gros mammifères et les rongeurs. Par ailleurs, grâce à un savoir-faire établi de longue date en biotechnologies de la reproduction, l'UMR a démontré ses capacités à induire des modifications ciblées du génome (avec un seul changement de nucléotide) dans plus de 50% des embryons bovins produits *in vitro* via l'utilisation du système CRISPR-Cas9 (taux obtenus sur différentes cibles). Grâce à ces nouvelles technologies, l'UMR est en mesure de proposer des projets de modification du génome à visée agronomique (en plus des nombreux projets cognitifs en cours).

UTILISATION DE CES TECHNOLOGIES POUR LA CRÉATION DE MODÈLES BIOMÉDICAUX

Dans ce domaine, les animaux d'élevage (principalement le porc et les petits ruminants) sont utilisés à des fins biomédicales, notamment pour deux principaux aspects : (i) la création de modèles de pathologies humaines chez les «gros animaux», plus proches de la physiologie humaine et plus appropriés pour tester de nouvelles voies thérapeutiques ; et, (ii) le domaine de la xéno-transplantation (principalement l'espèce porcine). La création de modèles de pathologies humaines nécessite des infrastructures d'élevage adaptées. En effet, il ne faut pas perdre de vue que les animaux génétiquement modifiés qui seront produits seront malades, souvent dès leur naissance, et que les infrastructures d'accueil doivent ressembler davantage à des cliniques vétérinaires qu'à des structures d'élevages classiques. Il en va de même pour le personnel exerçant dans ces infrastructures qui doit, en plus des éleveurs, compter dans ses rangs des personnels soignants. Ces considérations, qui peuvent sembler banales, représentent pourtant un frein au niveau Français où les recherches en agronomie et en matière biomédicale sont scindées au niveau de deux instituts distincts : l'INRA d'une part et l'INSERM d'autre part ! Suite à l'avènement des outils de modification ciblée du génome, il est maintenant possible d'envisager la création d'animaux modèles de pathologies humaines dans n'importe quelle espèce animale. Les exemples dans ce domaine ne sont pas rares et ils concernent principalement l'espèce porcine, considérée comme étant la plus proche de l'homme (Bassols *et al.*, 2014). Parmi tous les exemples, on peut citer les différents modèles animaux d'obésité associée au risque accru de développer un diabète de type 2 (Kleinert *et al.*, 2018). Étant donné qu'un tiers de la population mondiale est concerné par cette problématique, notamment dans les pays dits «développés»,

de nombreux modèles animaux de différentes espèces ont été créés afin d'essayer de mettre au point de nouvelles thérapeutiques contre ce «fléau moderne». De nombreux travaux dans diverses espèces (rat, souris, lapin, porc, furet, poisson-zèbre) ont également été menés pour modéliser chez l'animal la pathologie humaine qu'est la mucoviscidose (Leenaars *et al.*, 2019). Pour cette pathologie le problème majeur réside dans le fait que les modèles animaux développent principalement des symptômes *fatals* au niveau du système digestif, alors que dans l'espèce humaine, les symptômes majeurs se manifestent plutôt au niveau du système respiratoire. Néanmoins, les modèles animaux sont encore requis pour les études de cette pathologie, afin d'essayer de nouvelles thérapies géniques où il est question de corriger les mutations du gène *CFTR* par «*genome editing*» dans différents types de cellule souche du patient afin de les lui ré-injecter pour une correction de différents organes cibles. Ces stratégies doivent être mises au point chez des modèles animaux avant d'être envisagées pour des essais cliniques (Hodges & Conlon, 2018). Enfin, ces approches sont également envisagées pour modéliser certaines pathologies neuronales qui n'apparaissent qu'au cours du vieillissement et pour lesquelles les modèles rongeurs ne permettent pas de reproduire l'ensemble des phénotypes.

KNOCK-OUT DE PRNP, CONFÉRANT UNE RÉSISTANCE AUX MALADIES À PRION, UN EXEMPLE EN AGRONOMIE

Il est parfaitement démontré chez la souris que l'absence du gène *Pmp*, codant la protéine Prion, entraîne une résistance complète aux maladies à Prion ; elles-mêmes liées à un repliement anormal de la protéine Prion qui va conduire à une neuro-dégénérescence. Récemment, une mutation naturelle du gène *PRNP* a été décrite chez des chèvres Norvégiennes (**Figure 3**). Cette mutation est caractérisée par le changement d'un seul nucléotide qui introduit un codon STOP au niveau du gène ce qui entraîne une absence totale de protéine Prion (Benestad *et al.*, 2012). Ces chèvres sont donc résistantes à la tremblante et sont minutieusement étudiées afin d'être sûr que l'absence de protéine Prion n'entraîne pas d'autres changements qui pourraient s'avérer négatifs (effets adverses). Ces études ont d'ailleurs permis de révéler un lien entre la protéine Prion et le système immunitaire (Salvesen *et al.*, 2018). Au début de l'année 2018, une équipe a également démontré un rôle de la protéine Prion dans la résistance aux virus de la grippe de type A, chez la souris (Chida *et al.*, 2018). Les souris dépourvues du gène *Pmp* sont en effet hyper sensibles au virus de la grippe de type A et une majorité d'entre elles meurent suite à l'infection par ce type de virus, contrairement à ce qui est observé chez les souris témoins qui survivent. Toutes ces données démontrent que l'ablation du gène *PRNP* doit être prudemment caractérisée avant de produire des populations de petits ruminants dépourvus de la protéine Prion. Certes il est facile d'envisager de reproduire la mutation « Norvégienne » dans des races de chèvres laitières très utilisées en France (Saanen, Alpine) par les techniques de modifications ciblées du génome, et de conférer aux troupeaux français une

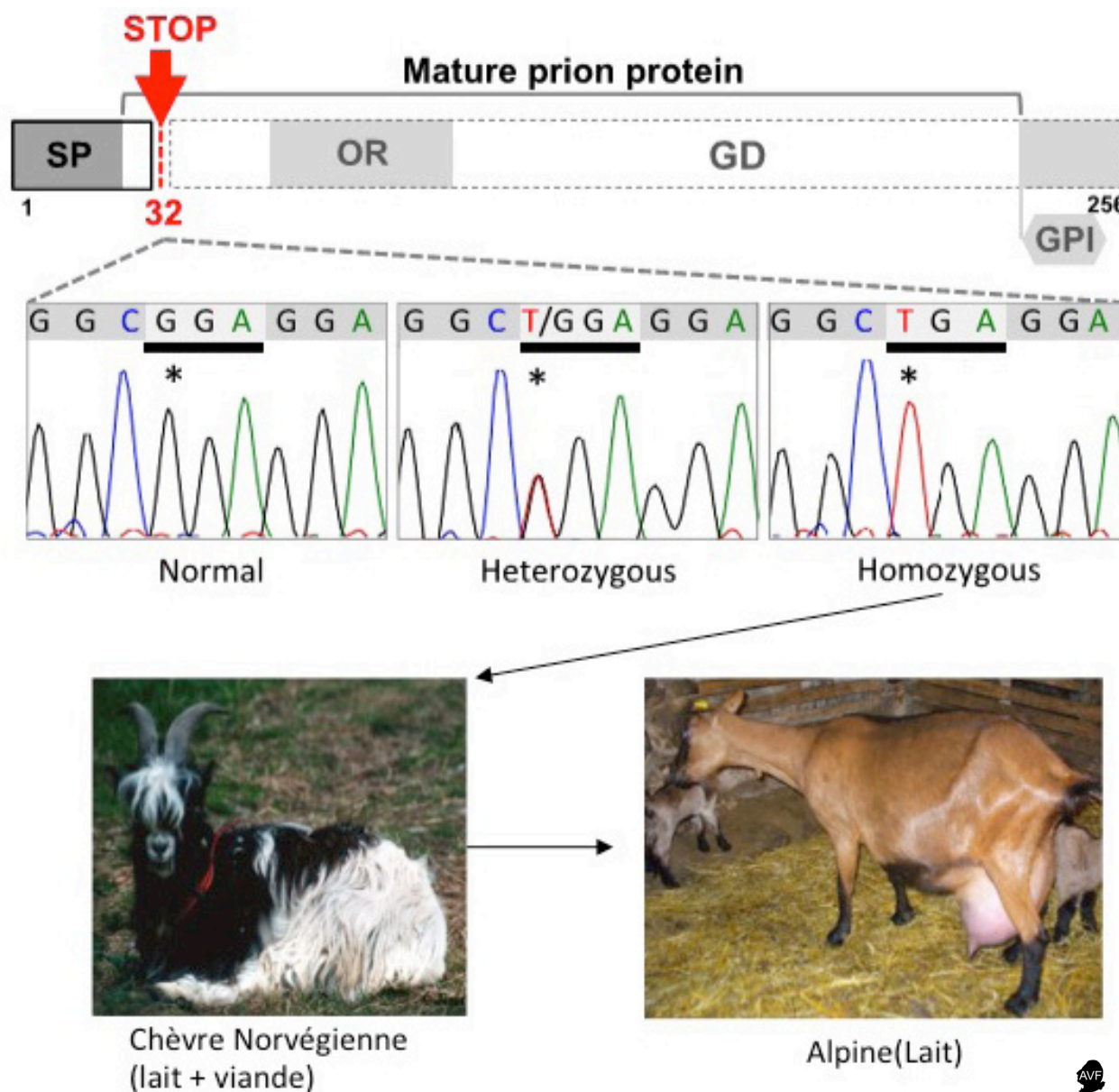


Figure 3 : Mutation naturelle du gène PRNP décrite chez les chèvres Norvégiennes. La mutation apparue dans la race caprine Norvégienne remplace un « G » par un « T » et conduit à un codon STOP « TGA » en lieu et place du codon « GGA » correspondant à une Glycine. Ce codon STOP intervient au tout début de la protéine mature et élimine la présence de la protéine PRION chez les animaux homozygotes pour cette mutation. Par les techniques de « genome editing », il serait tout à fait possible de recréer cette mutation à l'identique dans des races Françaises (Alpines par exemple) ne l'ayant pas. Ceci évite l'introgression qui nécessite une dizaine de croisements successifs (processus très long) et qui conserve des régions génomiques de la race d'origine (co-sélection), les régions génétiquement très proches de la mutation (génétiquement liées). D'après Benestad et al., (2012).

résistance complète à la tremblante. Il ne faudrait pas, par là même, conférer à toutes ces chèvres une sensibilité accrue aux virus de la grippe de type A, voire à d'autres infections virales opportunistes, ce qui pourrait conduire à une crise sanitaire majeure. Cet exemple démontre que, si à l'avenir, de nouveaux animaux génétiquement modifiés doivent être créés à des fins agronomiques, ils devront au préalable faire l'objet d'évaluations minutieuses pour s'assurer qu'aucun effet adverse n'est lié à la modification génétique introduite.

CONCLUSION

Ces nouveaux outils qui sont les nucléases spécifiques permettent désormais de modifier le génome à façon dans n'importe quelle espèce. Ils ouvrent des perspectives impressionnantes dans différents domaines des Sciences de la Vie. Ils permettent, pour les espèces d'intérêt agronomique, de passer d'une science descriptive à une science démonstrative où il est maintenant possible d'évaluer le rôle d'un gène directement dans les espèces cibles ; sans modélisation chez la souris. Dans ce domaine

également, il est maintenant possible d'étudier des traits phénotypiques spécifiques d'espèce (saisonnalité, cornage... etc). Pour les nombreuses applications, tant en clinique humaine qu'en agronomie, le verrou majeur actuel se situe au niveau du législateur, des notions d'éthique et d'acceptabilité sociétale que soulèvent ces technologies. Différents chemins sont suivis selon

les pays considérés ; en Europe, le chemin se présente long et difficile, suscitant, à l'heure actuelle de nombreux débats mais très peu d'exemples concrets, en regard du très faible nombre de financements spécifiques.

REMERCIEMENTS

Eric Pailhox remercie chaleureusement Jean-Louis Guenet et Pascale Chavatte-Palmer pour leur invitation et pour lui avoir donné l'occasion de s'exprimer en séance de l'Académie Vétérinaire de France. Les auteurs remercient l'Agence Nationale pour la Recherche qui au travers de trois projets financés (ANR-06-GenAnimal TEGOD ; ANR-09-GENM-009-03 GENIDOV ; ANR-09-BLAN-0015-01 PRIFAGENE) a permis de développer ces technologies de modifications ciblées du génome chez les mammifères de rente, à l'INRA de Jouy en Josas.

BIBLIOGRAPHIE

- Bassols A, Costa C, Eckersall PD, Osada J, Sabrià J, Tibau J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin Appl.* 2014 ; 8: 715-31.
- Benestad SL, Austbø L, Tranulis MA, Espenes A, Olsaker I. Healthy goats naturally devoid of prion protein. *Vet Res.* 2012 ; 18: 43-87.
- Boulanger L, Pannetier M, Gall L, Allais-Bonnet A, Elzaïat M, Le Bourhis D *et al.* FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr Biol.* 2014 ; 24: 404-8.
- Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E *et al.* Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2018 ; 14: e1007049.
- Hodges CA & Conlon RA. Delivering on the promise of gene editing for cystic fibrosis. *Genes Dis.* 2018 ; 6: 97-108.
- Jolivet G. Utilisation des nouveaux outils de biotechnologie pour la xénotransplantation. *Bull Acad Vet France.* 2019; in press
- Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 ; 14: 140-162.
- Leenaars CH, De Vries RB, Heming A, Visser D, Holthaus D, Reijmer J *et al.* Animal models for cystic fibrosis: A systematic search and mapping review of the literature - Part 1: genetic models. *Lab Anim.* 2019 ; 14: 23677219868502.
- Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM *et al.* Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *Int J Mol Sci.* 2019 ; 20: pii: E4045.
- Salvesen Ø, Tatzelt J, Tranulis MA. The prion protein in neuroimmune crosstalk. *Neurochem Int.* 2018 ; 15: 104335.
- Shim G, Kim D, Park GT, Jin H, Suh SK, Oh YK. Therapeutic gene editing: delivery and regulatory perspectives. *Acta Pharmacol Sin.* 2017 ; 38: 738-753.
- Van Eenennaam AL. Genetic modification of food animals. *Curr Opin Biotechnol.* 2017 ; 44: 27-34.