

Modification ciblée des génomes par la technologie CRISPR-Cas9 : nouveaux développements, nouveaux problèmes

Les ruminants d'élevage sur le front des connaissances

Jean-Paul Renard

Membre de l'Académie d'Agriculture de France,
directeur de recherche honoraire INRA



à la différence des plantes, aucune production issue d'animaux génétiquement modifié n'a été à ce jour commercialisée pour l'alimentation humaine

à une seule exception

Saumon aquadvantage

Mai 2016



Les premiers animaux OGM de laboratoire (souris) et d'élevage (porcs bovins) sont pourtant contemporains

Transgénèse aléatoire

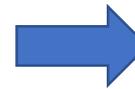
Souris 1982 beta globine: Costantini F, Lacy E, Science).

Bovin 1990 Lactoferrine: Taureau Hermann

Transgénèse ciblée

Souris 1985 Beta globine: O. Smithies (Nature J)

Porc 1991 α 1,3-galactosyltransferase. K. Hauschild (PNAS)



Gen Pharm Lab



Naturalis, Leyde, Pays-Bas

Taureau Hermann: 50M d'euros!

Depuis 2010 avec le séquençage des génomes, deux révolutions sont en cours en élevage :

- la sélection génétique qui devient génomique.
- la réécriture des génomes animaux qui devient réalité.

La sélection des herbivores est collective

ruminants

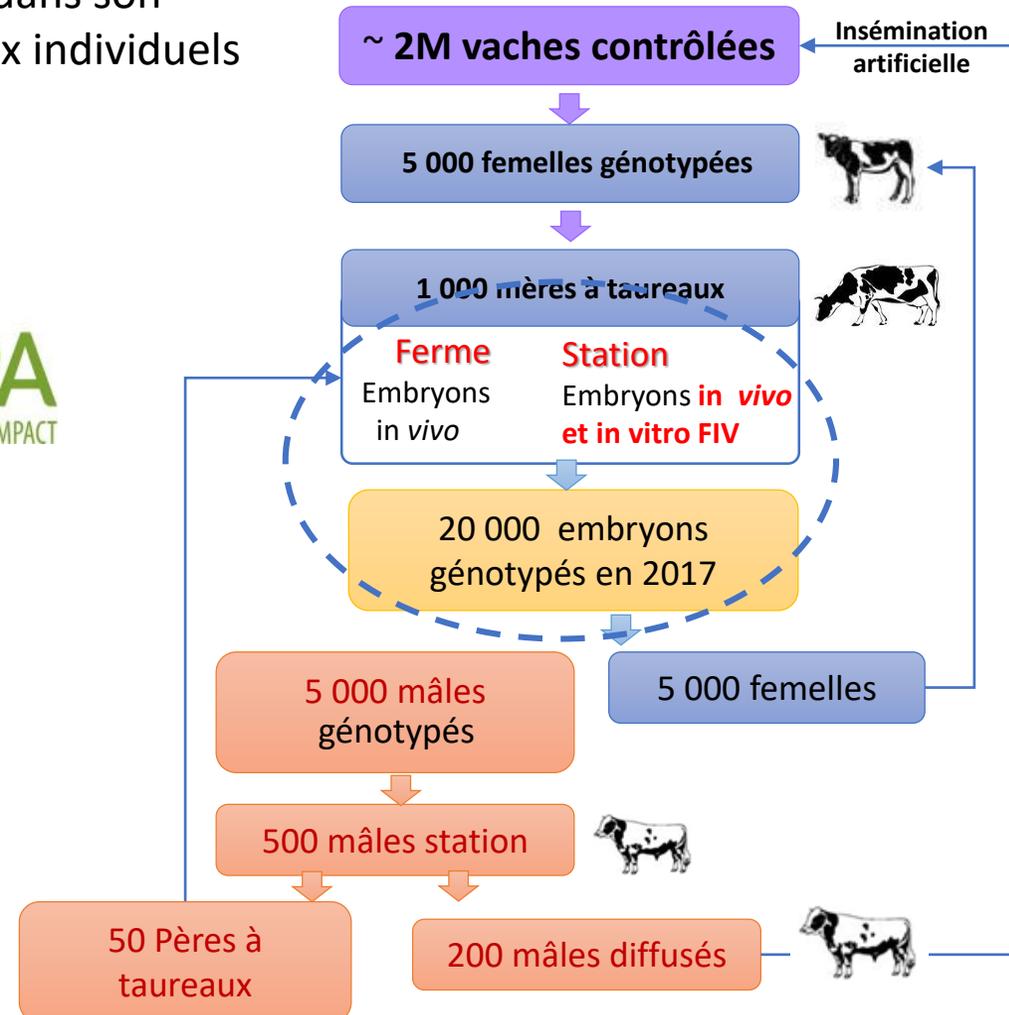
| Espèce(s) | Equidés | Bovins | Ovins-Caprins | Porcs | Volailles | Poissons |
|--------------------------------|-------------|------------|---------------|-------------|-----------|-----------|
| Coût d'entretien des animaux | ++++ | ++++ | ++ | +++ | + | + |
| Taille de descendance des ♂ | + / ++ | + / +++++ | + / ++ | ++ / +++ | ++ | ++++ |
| Taille de descendance des ♀ | - | - | - / + | ++ | +++ | ++++ |
| Intervalle de génération (ans) | 7-12 | 5-7 | 4 | 2-3 | 1 | 2 |
| Renouvellement des ♀ | Auto-R. | Auto-R. | Auto-R. | Pyramidal | Pyramidal | Pyramidal |
| Type animaux commerciaux | Race pure | Race pure | RP/Crois. | Croisés | Croisés | Race pure |
| Animal/concept important | Géniteur | Géniteur | Gén./Type | Type G | Type G | Type G |
| Forme d'organisation | Indiv./Coll | Collective | Collective | Coll./Priv. | Privée | Privée |

La sélection des ruminants implique directement les éleveurs. Elle est organisée aujourd'hui par races

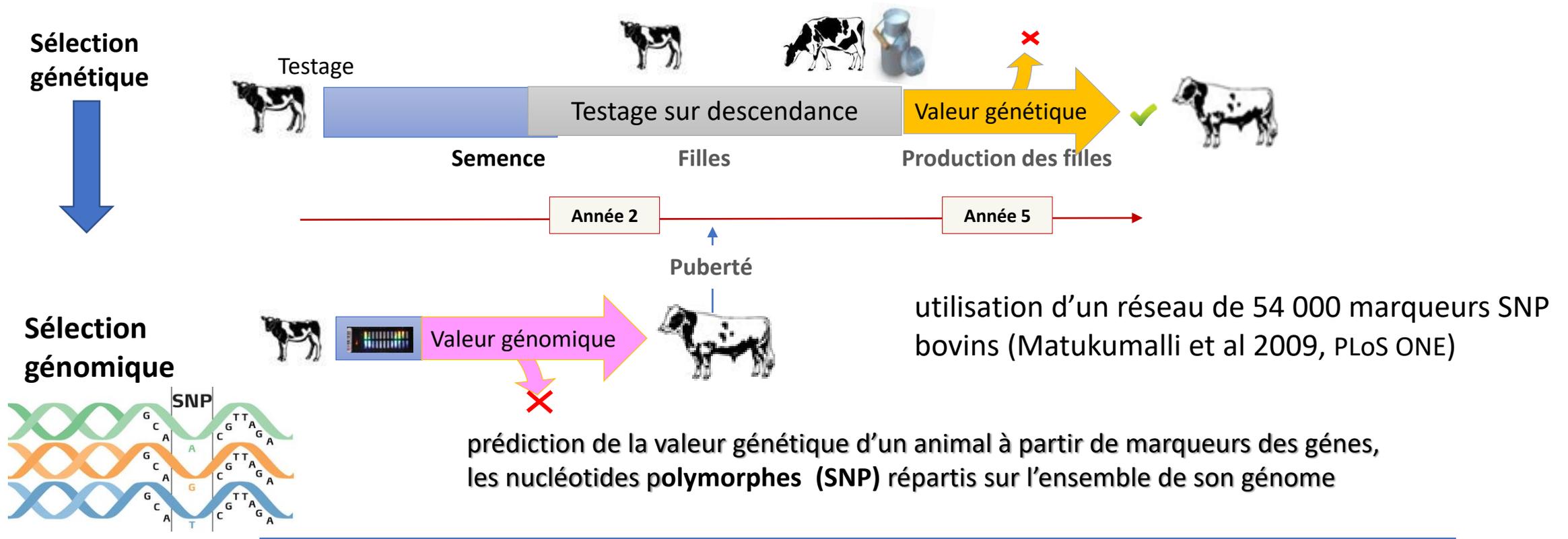
Exemple de schéma de sélection chez les bovins pour la race Holstein

Se raisonne à l'échelle d'une population animale dans son ensemble et non uniquement à celle de troupeaux individuels

production laitière



Depuis 2009 la sélection est devenue génomique:

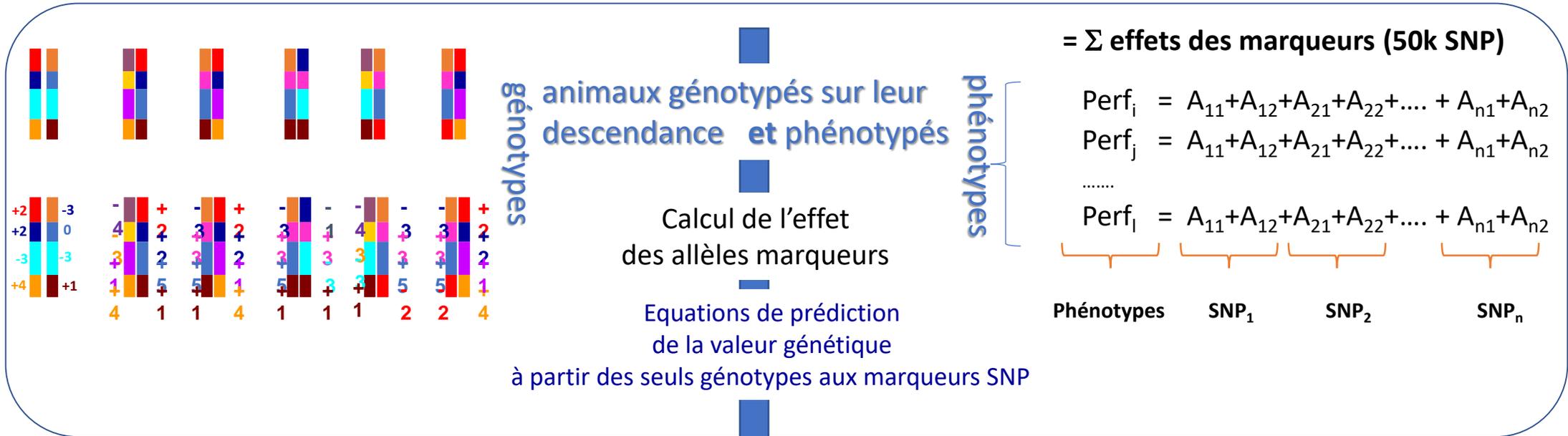


La sélection génomique permet

- une prédiction précoce: dès la naissance - gain de 3 à 4 ans coût d'un reproducteur 10 fois plus faible
- une utilisation plus rapide des reproducteurs - dès la puberté; intervalle de génération plus court
- une prédiction fiable: quelque soit l'héritabilité du caractère sélectionné

La sélection génomique est organisée à partir d'une « population de référence » pour l'indexation génétique de tous les animaux de la population

population de référence



INDEX

somme des effets de tous les segment chromosomiques, tels qu'estimés sur la population de référence

application aux animaux sans données phénotypiques mais génotypés par SNP

Valeur génomique

La taille de la population de référence compte: plus elle est grande plus la fiabilité des index sera élevée

alliances entre groupes de sélection dans les races à plus grands effectifs

| ex: Race | population de référence | |
|------------------|-------------------------|--------------|
| | nb de taureaux | nb de vaches |
| race Holstein | 36 000 | 150 000 |
| race Monbéliarde | 2 600 | 22 000 |
| Rrace Normande | 2 300 | 11 800 |
| race Tarentaise | 1500 | 15 000 |



ex: race Holstein

11 pays d'Europe
10M de vaches laitières
avec valeur génomique

la plus grande population de référence
actuellement dans le monde

mais dans le même temps

compétition de structures privées pour la sélection sur de nouveaux caractères

Labatut et al., 2014 INRA Prod.Anim.27, 303

et évolution de la populations de référence **à partir des femelles pour pallier de façon durable**

à l'élévation de la consanguinité associée à une diminution du nombre de mâles utilisés par génération
(intervalle de génération de 2 ans au lieu de 5 dans les anciens schémas)

Boichard et al.2015 et al., 2015 J.Anim.Breed.Genet. 132,(2) 135-43

Avec la sélection génomique doublement du progrès génétique pour un coût moindre

que celui des anciens schémas génétiques

conséquences

Évolution des objectifs de sélection

ex: race Holstein réduction du poids économique des critères quantitatifs de production de 35% à 50%

augmentation du poids économique des critères fonctionnels de fertilité
et de résistance aux infections bactériennes de la mamelle de 25% à 40%

Prise en compte de nouveaux critères phénotypiques de prédiction de la valeur génomique

- composition fine du lait -profils des acides gras; taux individuels de protéines, de minéraux, -rendement fromager
- tolérance à la chaleur
- troubles métabolique: ex.cétoses; émission de méthane -temps d'ingestion et de rumination;
- microbisme et occurrences de pathologies infectieuses
- efficience alimentaire

Élargissement à de nouveaux modèles d'interactions génotype-milieu pour l'estimation génomique de la valeur d'élevage des bovins (programme européen Gencore)

programme européen

Optimisation de la résilience et de l'efficience alimentaire
des bovins pour les systèmes d'élevage de 11 pays européens

Les ressources génétiques animales sont aussi

des ressources informatiques

Génome bovin

84 millions de SNPs

Hayes BJ, Daetwyler HD 2019
Annu Rev Anim Biosci. 7:89-102



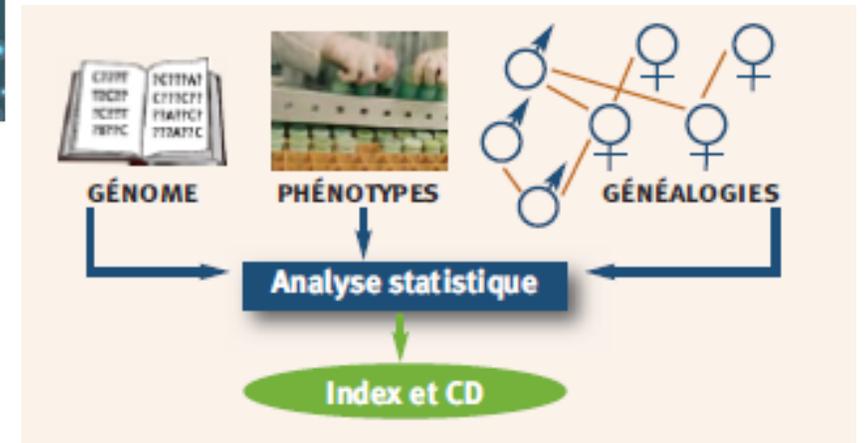
en évolution

ex: programme européen



des ressources numériques

mesures fines et maintenant automatisées
de nombreux caractères d'élevage

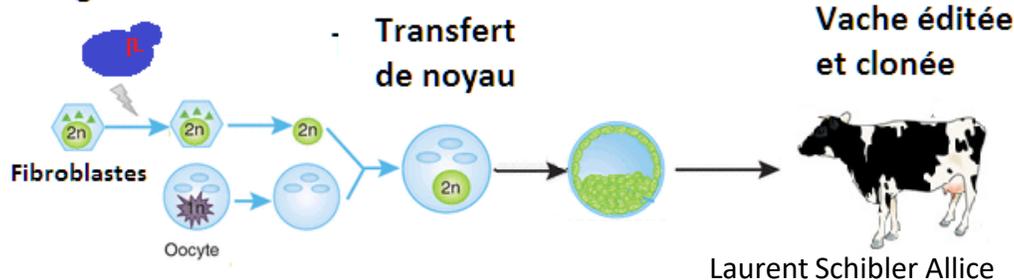


Dans ce contexte, quelles finalités pour Crispr?

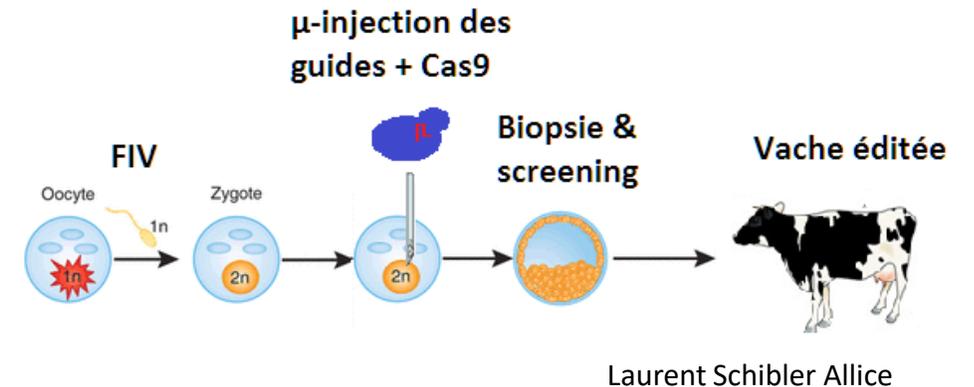
- Création d'allèle de résistance à des maladies-
- Introduction dans un même génome de plusieurs mutations d'intérêt connues
- Introgression d'allèles d'intérêt pour éviter les générations de rétrocroisement
- Réparation d'anomalies
- Création de modèles biomédicaux

Par injection dans l'œuf fécondé in vitro

Electroporation
des guides + Cas9



Par modification de cellules in vitro et clonage



- Création d'allèle de résistance à des maladies

ex: tuberculose bovine

10 millions de cas dans le monde

Infection par *Mycobacterium bovis*.

Antibiorésistance en extension

600 bovins abattus en Normandie en 2018

Premier article montrant que Cas9n peut induire une seule coupure du génome de fibroblastes bovins en culture, à un site prédéfini pour une recombinaison homologue (HDR).

Le gène NRAMP1 de résistance innée a des pathogènes intracellulaire est ici inséré par recombinaison homologue a ce site pour l'obtention après clonage somatique de plusieurs animaux manifestant une résistance partielle mais accrue a *Mycobacterium bovis*.

Le recours à Cas9n permet une détection rapide par PCR de la mutation d'un seul nucléotide au locus ciblé (Tim Wang et al. 2019, Angewandte Chemie · February 2019 DOI: 10.1002/ange.201901292)

Gao et al. Genome biology 2017, 18:13

Gao et al. Genome Biology (2017) 18:13
DOI 10.1186/s13059-016-1144-4

Genome Biology

RESEARCH

Open Access

Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects



Yuanpeng Gao^{1,2†}, Haibo Wu^{1,2†}, Yongsheng Wang^{1,2†}, Xin Liu^{1,2}, Linlin Chen², Qian Li^{1,2}, Chenchen Cui^{1,2}, Xu Liu^{1,2}, Jingcheng Zhang² and Yong Zhang^{1,2*}



The CRISPR/Cas 9 system could give dairy cows a protein that helps fight off bovine tuberculosis.

6 animaux avec résistance accrue après challenge infectieux

- Introduction dans un même génome de plusieurs mutations d'intérêt connues

CRISPR-Cas9 pour une édition multiplex (GE) des variants nucléotidiques à effet majeur sur un caractère quantitatif (QTN)

- ⇒ Similaire à une sélection génomique G si appliqué à >80% des taureaux en marché (avec un progrès x2)!
- ⇒ Impact principalement du nombre d'individus édités : le nombre d'édition conditionne surtout le gain de progrès génétique.
- ⇒ ~300 à 500 QTN par caractère!

-une approche encore théorique pour les bovins qui impliquera la prédiction de l'effet de mutations par testage d'allèle?

mais progrès rapide de l'édition de cellules en culture

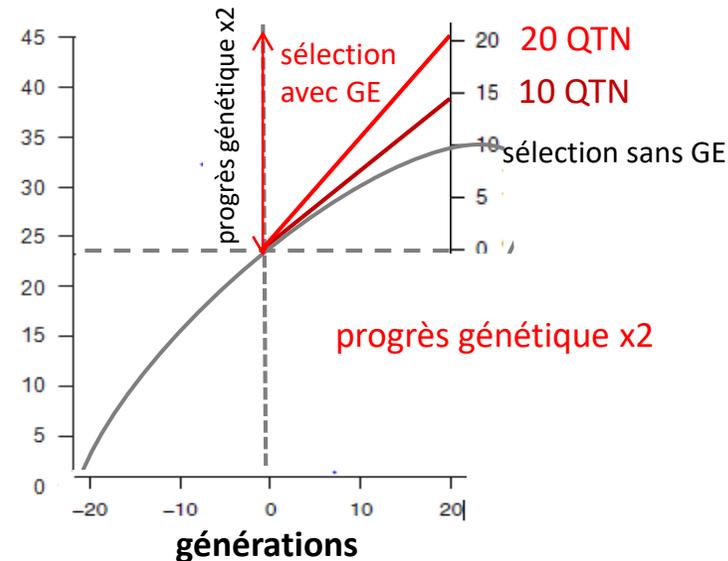
ex: utilisation de variants de CRISPR-Cas 12a pour des éditions génétiques et épigénétiques multiplex.

Kleinstiver et al. Nat.Biotechnol.2019, 37:276-282. doi: 10.1038/s41587-018-0011-0

GSE RESEARCH ARTICLE Open Access

Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs

Jenko et al. *Genetics Selection Evolution* (2015) 47:55



- Introgression d'allèles d'intérêt pour éviter les générations de rétrocroisement

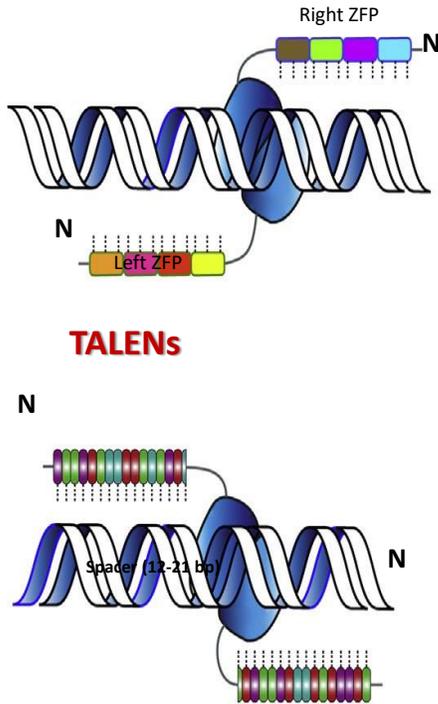
Ex: locus polled, dominant responsable de l'absence de cornes chez les bovins présent naturellement dans plusieurs races. Une alternative génétique à l'écornage,

Carlson et al 2016, Nature biotech. 5, 477-479

Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines

To the Editor:
Physical dehorning of dairy cattle is practiced to protect animals and their handlers. Genetic analyses have identified

In the United States, an estimated 80%¹ of all dairy calves (4.8 million per year) and 25% (8.75 million animals) of beef cattle are dehorned every year. A lower



| GE in vitro | SCNT- clonage | gestations | veaux nés | veaux à 2 mois |
|------------------|----------------------|------------|-----------|----------------|
| | nb d'embryons clonés | | | |
| cellules bovines | 64 | 0/9 | 0/9 | 0 |
| cellules bovines | 15 | 0/1 | 0/1 | 0 |
| cellules bovines | 82 | 2/9 | 2/9 | 2 |
| cellules bovines | 23 | 2/7 | 2/7 | 0 |



2019

20 taureaux homozyotes pour le gène Polled
pas de mutations hors cible détectée par WGS (x20)

Allison Van Eneemaan

Totefois mutation causale encore non connue

4 allèles identifiés chez les bovinæ dont
allèle celtique = 1 duplication de 200pb + 1 délétion 10pb.
allèle frison = 3 SNP + 1 duplication 80kb

Des phénotypes associés chez les bovins

Présence de cils broussailleux chez les SC celtiques, frisons

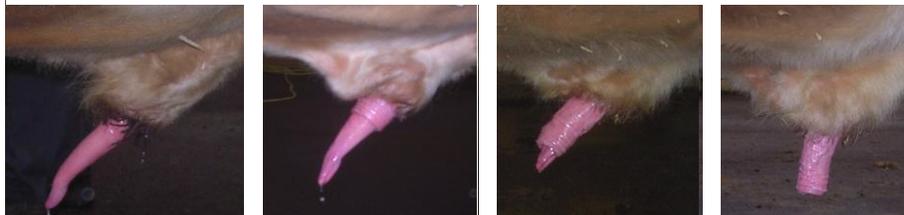


Cornu

Hétéro celtique

Hétéro frison

Problèmes de rétractation du prépuce chez certains sans cornes celtiques et absence chez les sans cornes frisons



Cornu

Hétéros celtiques

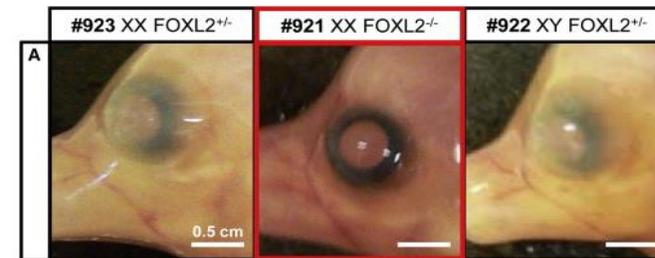
INRA en collaboration avec ALLICE
Laurent Capitan

Phénotypes sans corne associé chez les caprins au syndrome d'intersexualité

mutation causale connue affecte la régulation
de l'expression du gène FOXL2



PIS-/- intersexed female
(



Boulanger *et al.*, 2014

INRA équipe Eric PAILHOUX en collaboration avec
ALLICE- Aurélie Bonnet

Dans ce contexte, quel cadre réglementaire ?

cadre réglementaire actuel pour la réécriture des génome animaux

| Country | | Additional Regulations? | Basis of trigger/regulation? |
|----------------|---|-------------------------|---|
| Argentina |  | No | Novel DNA sequence/transgene |
| Australia |  | Yes | Use of “long” template |
| Brazil |  | No | Novel DNA sequence/transgene |
| Canada |  | No | Trait novelty (i.e. novel product risk) |
| European Union |  | Yes | Is a GMO if used a mutagenesis technique not in existence before 2001 |
| Japan |  | No | No exogenous genes |
| New Zealand |  | Yes | Using of in vitro technique that modifies the genes/genetic material |
| United States |  | Yes | New Animal Drug |

Etats Unis:

Lancement en décembre 2018 par le Centre pour la Médecine Vétérinaire (Center for Veterinary Medicine, CMV) de la Food and Drug Administration (FDA) d'un nouveau programme pilote

Un cadre « moderne et souple » pour la sécurité des produits tout en promouvant l'innovation » pour:

- Favoriser des voies de regulation innovantes de l'évaluation des risques.
- Sensibiliser le public aux nouvelles biotechnologies
- Accroître un engagement partagé de la FDA avec tous les acteurs

<https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/BiotechnologyProductsatCVMAnimalsandAnimalFood/AnimalswithIntentionalGenomicAlterations/ucm620835.htm>

Europe:

Une évolution du cadre législatif qui apparaît nécessaire suite à la décision de la Cour de Justice de l'Union européenne du 25 juillet 2018 sur la mutagenèse par réécriture du génome

Plus précisément, pour la réécriture du génome des ruminants d'élevage?

combiner principe d'action et de précaution

- en présentant une démarche au cas par cas à partir de la finalité de l'action
- en définissant le cadre d'essais « de plein élevage » avec des autorisations limitées dans le temps et révocables au vu d'évaluations *ex post*.
- en associant les acteurs de la sélection génomique dont l'organisation collective de la recherche développement permet d'associer prudence et innovation

autrement dit

*«déterminer un seuil qui tienne compte à la fois
de la marge scientifique de vraisemblance et de la marge sociale de tolérance »*

Mireille Delmas Marty,

« Aux quatre vents du monde » Ed. du Seuil 2016, p.97-98