

Académie Vétérinaire de France

Les nouvelles techniques permettant d'induire des modifications ciblées dans le génome des animaux domestiques et leurs applications potentielles

Note destinée à un groupe de travail coordonné par M. Jean-Louis Guénet

Certaines techniques récemment développées par les généticiens permettent de produire, pratiquement à volonté, des modifications ciblées dans le génome des animaux domestiques. Tout comme les techniques classiques de transgénèse, ces techniques conduisent à la production d'organismes génétiquement modifiés (OGM), mais elles sont par nature très différentes de ces dernières et doivent plutôt être considérées comme procédant d'une véritable "ré-écriture" de certaines parties du génome¹.

Des expériences faites sur des animaux de laboratoire (souris, rats, etc.) et des animaux de rente (porcs, bovins, ovins, etc.) laissent entrevoir un avenir prometteur et un très large champ d'applications pour ces techniques, un avenir que la profession vétérinaire ne peut ignorer car il n'a d'autres limites que celles de l'imagination d'une part et celles de l'éthique relative au bien-être animal d'autre part.

Ce document présente, de manière didactique et simplifiée, l'essentiel des données de base qui permettent de comprendre le principe de ces techniques et d'en apprécier le potentiel. Il a pour but de stimuler une réflexion objective de la part des membres d'un groupe de travail mis en place par l'Académie Vétérinaire de France et sera éventuellement suivi d'un avis sur le sujet (*voir note page 24*).

1. Éléments permettant la prise en compte du contexte scientifique

1.1. Les outils de la génomique

1.1.1. Les nucléases

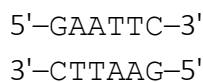
Les nucléases sont des enzymes qui fragmentent ou dégradent les acides nucléiques. Il en existe deux types principaux : les **exonucléases** et les **endonucléases**.

Les exonucléases dégradent les acides nucléiques (ADN) à partir d'une extrémité de la chaîne libérant un nucléotide à la fois. Certaines de ces exonucléases fonctionnent dans le sens 5' vers 3' d'autres dans le sens inverse, de 3' vers 5'. Au terme de leur action, et dans la mesure où celle-ci est complète, les ADNs sont réduits à l'état d'un mélange de désoxyribonucléotides.

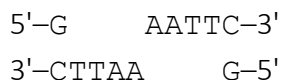
Les endonucléases coupent les acides nucléiques à l'intérieur de la chaîne. Parmi ces endonucléases, les **endonucléases de restriction** (ou **enzymes de restriction**) coupent les ADN bi-caténaires à des **endroits précis**, caractérisés par une séquence spécifique, en général assez courte (de 4 à 7/8 paires de bases), qui porte le nom de **site de restriction**.

¹ Nous expliquerons plus loin l'origine de l'expression "ré-écriture" du génome.

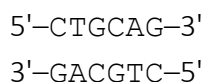
Une fois clivé par une enzyme de restriction, l'ADN est réduit à l'état de fragments de longueurs variables ayant, ou bien des extrémités cohésives (des "bouts saillants" ou "protubérants"), ou bien des extrémités "franches" (des "bouts francs") selon l'endonucléase utilisée². Ainsi, l'enzyme *EcoR1* (préparée à partir d'*Escherichia coli* **R1**) reconnaît dans l'ADN génomique des sites composés de six nucléotides contigus :



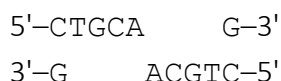
et produit des fragments avec des extrémités cohésives de type 5' protubérant :



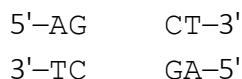
L'enzyme *Pst1* (*Providencia stuartii* **1**) reconnaît elle aussi des sites composés de six nucléotides contigus :



et produit, elle aussi, des fragments avec des extrémités cohésives, mais celles-ci sont de type 3' protubérant/saillant :



L'endonucléase *Alu1* (préparée à partir d'*Arthrobacter luteus*) reconnaît des sites à quatre paires de bases et produit des fragments avec des extrémités franches :



Sur une base purement statistique Il est clair que les sites de restriction à quatre paires de bases doivent être (au moins théoriquement) plus nombreux dans le génome que les sites à six paires de bases. Il en résulte des fragments de restriction plus courts : 250 paires de bases en moyenne contre 4.000 paires de bases pour les sites à six paires de bases. Le raisonnement peut être extrapolé à des sites plus longs et par conséquent plus rares encore et qui ne se rencontrent qu'un très petit nombre de fois, voire qu'une seule fois, dans un génome de mammifère ou d'oiseau ! Nous reviendrons sur ce point.

Prenant en compte les observations décrites ci-dessus, on comprendra qu'en mélangeant des fragments de restriction provenant d'ADN d'origines différentes mais produits par l'action d'une même enzyme de restriction on peut créer des molécules d'ADN hybrides et artificielles. En effet, une fois mélangés, les fragments de restriction "oublient" leur origine et ont une propension

² Pour une endonucléase déterminée tous les fragments engendrés ont des extrémités de même nature (cohésives ou franches) mais ils ne sont pas tous de même taille puisque la localisation des sites de coupure dans la molécule d'ADN est variable.

spontanée à se réassocier (au hasard ?), formant un ADN artificiel et hétérogène : c'est l'un des principes sur lesquels se fonde le "génie génétique" pour produire des "ADNs recombinants"³.

Les endonucléases de restriction sont produites par certaines bactéries et servent à protéger ces dernières contre les infections par les virus bactériophages. En effet, l'irruption d'un quelconque ADN exogène dans une bactérie permissive induit, à la fois, la production d'une endonucléase de restriction spécifique, qui inactive par fragmentation (par restriction) l'ADN (ou l'ARN) du phage infectant, et une autre enzyme, une méthylase, qui protège (qui modifie) l'ADN bactérien en masquant les sites de restriction situés dans ce dernier. Ce système de défense inné des bactéries contre les infections virales porte le nom de "restriction/modification" : il est très efficace.

1.1.2. Les méganucléases, les ZFN et les TALENs

Les méganucléases sont des nucléases d'ADN qui ont un site de reconnaissance (en anglais un *DNA binding site*) de grande taille (de 12 à 40 pb) ce qui fait qu'en général il n'existe pas plus d'un seul ou d'un très petit nombre de tels sites dans le génome d'une espèce domestique donnée⁴.

Les Zinc Finger nucléases - ZFN

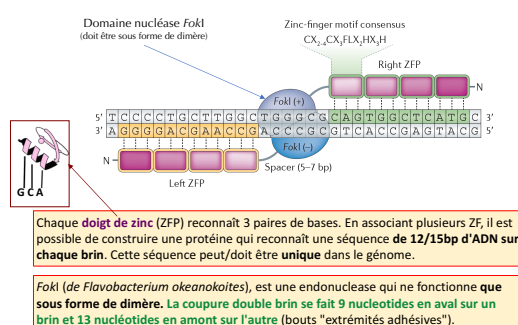


Figure 1a

Les Transcription Activator-Like Effector - TALEN

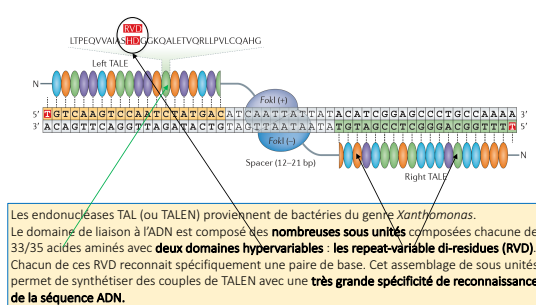


Figure 1b

Deux nucléases de ce type méritent de retenir l'attention : ce sont les nucléases à "doigts de zinc" ou *Zinc Finger Nucleases – ZFN* et les "nucléases effectrices de type activateur de transcription" ou *Transcription Activator-Like Effector Nucleases – TALEN*.

Ainsi qu'il est montré sur les Figures 1a et 1b, les méganucléases de la famille ZFN ou TALE sont composées de deux domaines physiquement associés mais ayant des fonctions différentes : un domaine de reconnaissance et d'appariement dans l'ADN génomique (le "*DNA-binding domain*"), de taille variable, et un domaine emprunté à l'endonucléase FokI, un "*cleavage domain*", où se produit la coupure double brin lorsque l'appariement est réalisé.

³ Seuls les ADNs terminés par des extrémités cohésives se ressoudent spontanément entre eux. Pour les fragments à "extrémités franches", les généticiens peuvent néanmoins forcer les soudures en rajoutant des "manchons" artificiels ayant une séquence donnée, complémentaire (palindromique).

⁴ Pour donner un ordre de grandeur il suffit de retenir que, pour avoir la quasi-certitude qu'au moins un site de restriction sera reconnu par la méganucléase I-SceI de *Saccharomyces cerevisiae* (18 paires de bases), il faut que l'ADN ciblé ait au moins 20 fois la taille du **génome humain** (i.e. $\sim 20 \times 3,4 \times 10^9$ paires de base).

L'intérêt de ces nucléases est que leur *DNA binding site* peut être modifié à façon (en français "*customisé*") en utilisant les techniques modernes d'ingénierie des protéines. Cette modification à façon permet donc de cibler la coupure sur pratiquement n'importe quelle séquence choisie *a priori* par le généticien. Des endonucléases de type ZFN ou TALEN "*customisées*" peuvent être synthétisées en laboratoire en associant divers domaines ZF (ou RVD) capables de reconnaître un *DNA binding domain* d'environ 12 à 40 paires de bases. L'association des protéines ZF (ou RVD) à l'ADN entraîne un changement de conformation de la molécule ZFN (ou TALEN) qui, finalement, active la coupure.

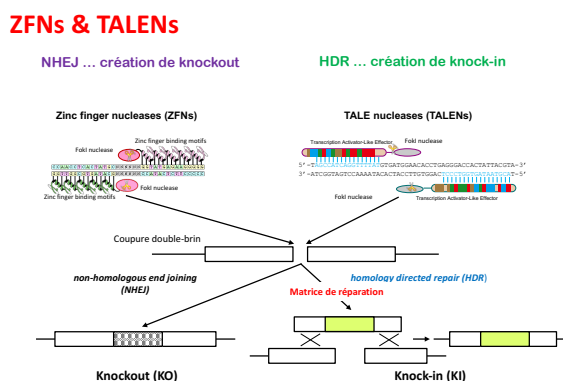


Figure 1c

Les ZFN ou TALEN sont comparables à de véritables **ciseaux moléculaires** qui permettent de faire des coupures ciblées dans l'ADN. Une fois ces coupures effectuées deux situations sont alors possibles (Figure 1c) qui ont des conséquences radicalement différentes :

- ou bien la réparation de l'ADN ne se fait pas du tout ou bien elle se fait mal (**Non-homologous end joining – NHEJ** – à gauche sur la Figure 1c) et l'ADN ciblé porte alors une mutation (en général une délétion de plus ou moins grande taille). Le gène ainsi muté ne sera plus fonctionnel. C'est un **knockout**.

- ou bien la réparation de l'ADN est dirigée (= guidée) par addition d'une matrice d'ADN exogène qu'une polymérase recopie plus ou moins fidèlement (**Homology directed repair** ou **HDR** sur la Figure 1c – droite). Dans ce deuxième cas, si la séquence de l'ADN qui sert de matrice est normale (c'est à dire native) il y a réparation *ad integrum* (peu d'intérêt !). En revanche, si l'ADN matrice à une séquence qui correspond à un gène d'intérêt ou une séquence potentiellement intéressante et à évaluer, la mutation est alors un **knock-in**⁵.

La nature moléculaire des mutations ponctuelles induites par les ZFN ou les TALE nucléases peut être analysée et confirmée à tout instant par séquençage de la région. Cela permet de trier les mutations en fonction de leur intérêt potentiel.

⁵ Lorsque la séquence synthétisée correspond à une séquence matrice choisie par l'expérimentateur, les généticiens anglophones parlent de "*genome editing*". Malheureusement, la traduction de cette expression en "édition du génome" n'est pas convenable car le verbe anglais "*to edit*" n'a pas le même sens que le verbe français "éditer". Nous utiliserons l'expression "**ré-écriture**" du génome, utilisée par plusieurs Académies, et qui correspond bien à la réalité.

La synthèse de méganucléases customisées de type ZFN ou TALEN se fait sur commande, dans certains laboratoires spécialisés (par exemple *Collectis* en France). Elle est coûteuse et aujourd'hui pratiquement abandonnée depuis l'avènement de la stratégie CRISPR-Cas9.

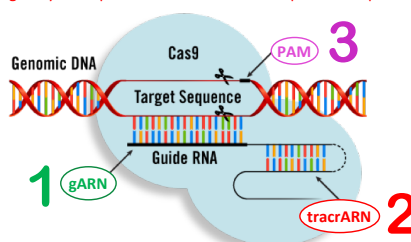
1.1.3. Le cas particulier de la technique CRISPR-Cas9

Une nouvelle technique d'ingénierie génomique, fondée sur le même principe que celui présenté ci-dessus, a été récemment développée par les généticiens⁶. Elle s'inspire, elle aussi, d'un mécanisme de défense inné qui existe chez la plupart des microorganismes et leur confère la possibilité de lutter contre les infections par des ADN ou des ARN exogènes (les bactériophages par exemple). Cette technique, est connue sous la désignation anglo-saxonne de "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9*" et elle est devenue populaire sous l'acronyme *CRISPR-Cas9*. Avec cette technique, la reconnaissance du *DNA binding domain* se fait par un **ARN-guide**, synthétisé à la demande, et non plus par une protéine de type ZFN ou TALEN. Cet ARN guide, symbolisé **gARN**, (**sgARN** s'il s'agit d'une molécule simple brin) reconnaît avec une grande précision un ou plusieurs site(s) d'une taille de 20/24 nucléotides, choisi(s) par l'expérimentateur, dans la séquence du génome de l'espèce ciblée. La technique CRISPR-Cas9 est **plus simple** à mettre en œuvre, **plus efficace et surtout moins onéreuse** que celle qui fait usage des nucléases ZFN ou TALEN. L'**endonucléase de restriction** qui coupe l'ADN au niveau du site porte le nom de Cas9 (pour *CRISPR associated protein 9*).

La méthode CRISPR-Cas9 a **pratiquement supplanté les anciennes techniques faisant usage des ZFN ou des TALENs**. Elle a déjà fait l'objet de nombreuses applications, dans plusieurs domaines et dans plusieurs espèces. La Figure 2 schématise le mécanisme d'action en trois étapes.

Les CRISPR/Cas9

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Caspase 9



L'ARN guide (gARN), complémentaire de la séquence-cible, forme un complexe avec le tracrARN, le stabilise, le guide vers la cible et active l'endonucléase Cas9. Celle-ci clive alors l'ADN, de façon spécifique, dans une **séquence cible** d'environ 18 à 24 paires de bases, immédiatement en amont d'une courte séquence de 2 à 6 paires de bases, le **PAM (Protospacer Adjacent Motif) (..5' -NGG- 3'..)**.

Il faut noter qu'avec CRISPR-Cas9 le guidage vers la cible est fait par un ARN

Figure 2

⁶ Notamment par la généticienne française Emmanuelle Charpentier, actuellement directrice de l'Institut Max-Planck de Biologie Infectieuse à Berlin.

1.1.4. Les enzymes de réparation de l'ADN : les ligases, les ADN polymérases, etc...

Les **ligases** ou **ADN-synthases** sont des enzymes qui permettent la fusion de deux molécules d'ADN ou d'ARN par des liaisons covalentes. Ces ligases sont utilisées au laboratoire pour ré-associer des fragments de restriction d'un ADN en une molécule unique d'ADN recombinant.

Les **ADN polymérases** représentent une très grande famille de molécules impliquées dans la réplication de l'ADN, notamment au cours du cycle cellulaire. Ces enzymes sont utilisées pour la "réparation spontanée" d'éventuelles mutations. Elles procèdent par l'addition successive de désoxyribonucléotides (ATP; GTP, etc...), en copiant la séquence nouvelle à partir d'un ADN utilisé comme **matrice**⁷.

1.2. Le clonage et les vecteurs d'amplification, le séquençage, etc...

1.2.1. Le clonage et les vecteurs de clonage

Cloner un ADN consiste à en isoler un fragment jugé intéressant à partir de certains critères et à l'insérer, par recombinaison, dans l'ADN d'une structure stable capable de s'auto-réplicuer : *un vecteur d'amplification*. Cela se fait en général en utilisant une enzyme de restriction qui coupe (de préférence une seule fois) l'ADN du vecteur de réplication et une fois de part et d'autre de l'ADN à cloner. L'ADN inséré est appelé **insert**. Les vecteurs d'amplification sont généralement des plasmides ou des bactériophages. Il est alors nécessaire d'introduire ces bactériophages ou ces plasmides dans les bactéries permissives pour réaliser leur amplification.

Dans certains cas spécifiques les généticiens utilisent aussi des vecteurs capables d'amplifier des ADNs plus longs : ces vecteurs "poids lourds" sont soit des cosmides, pouvant contenir des ADNs mesurant jusqu'à 40/45 kb, des *bacterial artificial chromosomes* ou BACs – ou des *yeast artificial chromosomes* ou YACs⁸. Les YACs permettent de cloner des fragments d'ADN de très grande taille (300 à 1 000 kb) mais ils présentent l'inconvénient d'être instables et parfois délétés ou hybrides (segments d'ADN non contigus). Les techniques traditionnelles de transgénèse ont très largement fait appel au clonage de l'ADN dans des vecteurs pour en obtenir un nombre de copies très élevé.

1.2.2. Le séquençage de l'ADN

Le séquençage des ADNs fait appel à un ensemble de techniques⁹ qui consistent à déterminer l'ordre linéaire des différents nucléotides dans un segment donné. Longtemps considéré comme une étape complexe, fastidieuse et très onéreuse, le séquençage des acides nucléiques est désormais largement robotisé et cette robotisation a contribué à une réduction considérable du coût⁹. Cela se traduit par le fait que, de nos jours, un nombre croissant de génomes sont intégrale-

⁷ Ce brin matrice peut être natif (naturel). Il peut aussi résulter d'une synthèse complète faite au laboratoire d'où la notion de "ré-écriture du génome" utilisée dans ce cas. Dans ce contexte il faut bien comprendre que le généticien peut désormais réparer des gènes en reconstituant une structure dégradée, mais il peut aussi faire synthétiser par un "gène artificiel" quelconque une protéine qui n'existe pas naturellement.

⁸ Il existe des banques toutes prêtes d'ADNs clonés (commercial).

⁹ Une des techniques de séquençage fréquemment utilisée est le séquençage par synthèse (Illumina). Cette technique est précise à 99%, elle est d'un rendement très élevé et elle est la moins coûteuse. Avec cette technique le coût du séquençage d'un génome de mammifère entier est de 1.000 US \$.

ment séquencés¹⁰ et disponibles sans frais, sur internet dans des bases de données spécialisées. La base de données de séquences génomiques la plus conviviale est "*Ensembl*". Elle est accessible à l'adresse : <http://www.ensembl.org/index.html>. Elle héberge la séquence d'environ une centaine d'espèces de vertébrés. Elle est accompagnée d'un "tutorial" dont la lecture est indispensable.

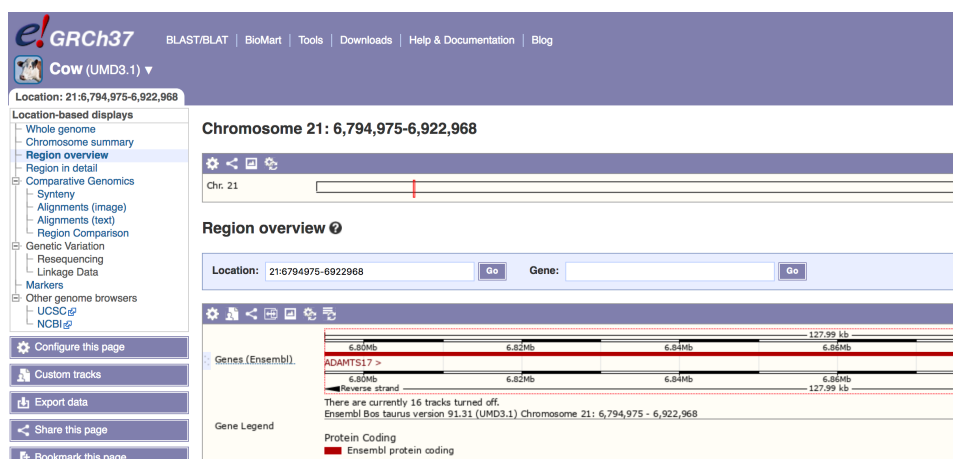


Figure 3a - Extrait (matérialisé par un petit rectangle rouge – en face de Chr. 21) représentant un fragment (de 127993 bp) repéré, du chromosome 21 de *Bos taurus*

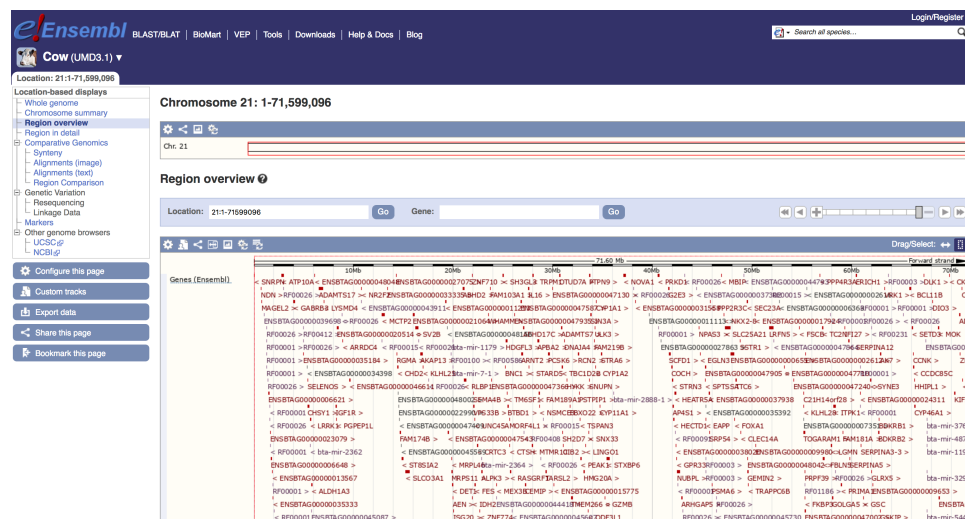


Figure 3b – Liste des gènes du chromosome 21 de *Bos taurus* (vue partielle). Le chromosome en question comporte 71.599.096 bp; chaque gène est séquencé et la séquence complète est accessible en 2/3 "clicks" à partir du symbole affiché.

http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Location/Overview?r=21:1-71599096

¹⁰ Ou **quasi** intégralement car il est très difficile, sinon impossible, de séquencer certaines régions génomiques constituées de séquences dupliquées en tandem.

1.3. Les mutations

1.3.1. La nature, la fréquence et l'importance des mutations

Les mutations sont des événements rares et soudains qui surviennent dans le génome de tous les êtres vivants et qui en modifient la structure à des degrés divers. Les mutations qui n'affectent qu'un seul ou un très petit nombre de nucléotides (= substitutions, insertions ou délétions) sont les plus fréquentes sans doute parce qu'elles sont globalement les moins graves. Au contraire, la perte ou la rétention d'un chromosome entier (monosomies ou trisomies) sont des mutations rares et graves. Tous les intermédiaires ont été observés.

Le remplacement d'un nucléotide par un autre n'entraîne parfois aucun changement dans la séquence d'acides aminés de la protéine traduite et, dans ce cas, les conséquences sont tout simplement inexistantes (on parle de **mutations silencieuses** ou "**même sens**"). Dans d'autres cas les effets de la mutation sont de sévérité variable pouvant aller, par exemple, d'une simple variation de la charge électrique de la protéine codée sans aucune altération de la fonction, jusqu'à la mort de l'embryon à un stade plus ou moins précoce de son développement.

Chez la souris, une espèce où il existe des lignées consanguines (*inbred strains*), de nombreuses études ont été faites pour mesurer avec une bonne précision la fréquence des mutations qui surviennent au cours du temps et cela aussi bien spontanément qu'après un éventuel traitement mutagène¹¹. Parmi ces études, on peut rapporter les observations publiées par une équipe de généticiens japonais qui a comparé la séquence génomique de deux lignées (C57BL/6J et C57BL/6N) ayant la même origine ancestrale mais ayant divergé depuis 64 ans (= environ 250 générations) (Medaka *et al.* 2015). En comparant les séquences ADN de ces deux lignées les chercheurs ont identifié 277 différences ne concernant qu'un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphism* – en abrégé SNP). Parmi ces 277 SNPs, 10 (c'est peu !) entraînaient une substitution d'acide aminé dans la protéine codée par l'ADN mutant (**mutations faux-sens** – en anglais *missense*) et seulement 4 (c'est très peu !) étaient identifiées comme conduisant à la synthèse d'une protéine ayant une fonction différente ou une fonction dégradée ou tout simplement plus aucune fonction (**mutation non-sens**)¹². Ainsi, comme on le constate, peu de mutations survenant spontanément dans une séquence donnée du génome des mammifères ont un effet "dommageable" sur le phénotype. Cela ne veut pas dire que les mutations, considérées au niveau génomique, ont relativement peu d'importance car il faut aussi tenir compte du fait que le génome est immense à l'échelon moléculaire (environ 3×10^9 bp – avec probablement 30 à 35000 unités transcrites en protéines ou ARN). En pratique, on pourrait calculer que c'est une bonne vingtaine de nouvelles mutations qui apparaissent à chaque génération, chacune avec des caractéristiques

¹¹ Les lignées consanguines représentent un matériel de choix pour ce genre d'étude parce que leurs pédigrées sont connus et leurs génomes entièrement séquencés. Les observations faites à propos du polymorphisme au niveau de l'ADN peuvent être extrapolées à toutes les espèces de mammifères. D'autre part, la fréquence des mutations ainsi que leur nature sont très semblables à ce qui s'observe dans les autres espèces de mammifères, homme compris.

¹² L'analyse de la séquence d'acides aminés d'une protéine donnée et sa comparaison avec les séquences qui sont déjà dans les bases de données permet parfois de prédire si le changement de structure engendré par une mutation est susceptible d'avoir ou non des conséquences sur la fonction de la protéine.

spécifiques, certaines sévères (mutations à effets **délétères**) et d'autres non¹³. Certaines de ces mutations seront transmises d'autres seront perdues. Le génome est donc une entité fluide, qui se modifie avec le temps..... générations après générations, une entité sur laquelle l'homme peut néanmoins exercer une action comme nous le verrons.

Les mutations n'ont pas toujours des effets négatifs ou délétères. En effet, il apparaît de temps en temps certaines mutations dont les effets sont potentiellement favorables et *a priori* dignes d'être pris en compte dans un protocole de sélection. Un bon exemple est celui d'une mutation, survenue spontanément chez le porc, dans le gène *ECF18R* (*Escherichia coli* F18 receptor – chromosome 6), qui code un des récepteurs spécifiques des facteurs d'adhésion situés à la surface des entérocytes. Cette mutation est récessive et, lorsqu'elle est à l'état homozygote, elle entraîne une résistance accrue au syndrome diarrhéique des porcelets. A ce titre, elle peut donc être avantageusement sélectionnée dans les élevages (Ji et al. 2016 - Nguyen et al. 2016).

Des situations analogues à celle que nous venons de décrire sont assez fréquentes chez la souris de laboratoire où plusieurs mutations ponctuelles ont été reconnues comme étant capables de modifier de manière radicale la sensibilité de certaines lignées à des infections de toutes natures (*Flavivirus*, *Orthomyxovirus*, *Coronavirus*, *Entérobactéries*, *Mycobactéries* etc.) tandis que d'autres ont été identifiées comme étant capables de modifier quantitativement la sensibilité des animaux à une infection particulière. Si, comme probable, de tels gènes et partant de telles mutations existent aussi dans les espèces de rente (bovins, ovins, caprins, porcins, etc), avec la même fonction que chez la souris, alors leur intérêt devient évident dans la perspective d'une exploitation zootechnique : quel éleveur n'a jamais rêvé d'un troupeau entier qui serait résistant à la fièvre aphteuse, aux prions, aux mammites ou bien encore à la peste porcine ?

Malheureusement, de telles situations ou des mutations apparues spontanément ont des effets "miraculeux/providentiels" sont rarissimes ! Dans la plupart des cas elles apparaissent mais elles ne sont pas révélées parce que la rencontre de l'individu mutant avec l'agent infectieux ne s'est pas faite. Ou bien elles n'apparaissent pas dans la bonne espèce (ou la bonne race) et il faudra alors un long protocole de croisement (et de la chance) pour exploiter leurs effets protecteurs, ... Quoi qu'il en soit, on se rend vite compte de l'intérêt qu'il y a de rechercher ou de produire de nouvelles mutations dans les espèces domestiques parce que certaines d'entre elles sont potentiellement capables d'améliorer les qualités zootechniques des animaux.

1.3.2. – Les moyens de produire ou d'identifier de nouvelles mutations chez les espèces domestiques

Chez les souris ou les rats de laboratoire il existe aujourd'hui une grande variété de techniques qui permettent de produire, à la demande, des mutations de toute nature. Dans ces espèces on peut produire des mutations conditionnelles inductibles et même réversibles. Cette possibilité est

¹³ L'observatoire National des Anomalies Bovines (ONAB) recense et catalogue (pour la France) les anomalies des bovins et collabore très activement à leur caractérisation dans le but de les éradiquer. A l'échelon international la base de données OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals – <http://omia.angis.org.au>) recense toutes les anomalies génétiques qui affectent les animaux domestiques (F.H. Nicholas – Sydney).

longtemps restée le privilège des animaux de laboratoire mais ce n'est plus le cas depuis l'avènement récent des techniques faisant appel aux méganucléases programmables et en particulier à la technique CRISPR-Cas9 dont nous avons parlé ci-dessus. A l'heure actuelle, il apparaît même sérieusement envisageable de mettre en place un véritable programme de mutagenèse ciblée, applicable aux espèces de rente et, éventuellement, aux espèces de compagnie. Pour cela, une condition résolutoire doit cependant être remplie : il faut que le généticien ait la maîtrise complète des techniques de manipulation et des conditions de maintien en survie *in vitro*, des embryons prélevés aux stades pré-implantatoires du développement.

Pour illustrer cette approche nouvelle, nous avons choisi de rapporter ici une expérience réalisée dans un laboratoire de l'Institut Pasteur de Montevideo, en collaboration avec un laboratoire de l'INSERM, à Nantes, et destinée à produire dans la race de mouton *Australian Merino*, connue pour une exceptionnelle qualité de sa laine, des mutations dans le gène codant la Myostatine (*MSTN*), une protéine qui, chez l'animal normal, inhibe la différenciation et la croissance des cellules musculaires. Cette mutation n'a rien à voir avec la sensibilité à une maladie infectieuse quelconque mais elle a un intérêt zootechnique majeur en ce sens qu'elle accroît, de manière substantielle (environ 20%), la production de viande (elle induit le phénotype "culard"). Elle est connue dans plusieurs espèces (bovins, porcins, souris) et elle est bien définie du point de vue génétique et moléculaire. Dans ce cas, le but poursuivi était donc de créer une mutation knockout (*MSTN*⁻) dans un génotype par ailleurs inchangé (celui de l'*Australian merino*), pour obtenir en seulement une ou deux étapes des moutons à laine très fine (mérinos) et meilleurs producteurs de viande, une opération qui, sans cela, aurait nécessité plusieurs générations de croisements.

Pour créer cette mutation knockout, les généticiens ont d'abord préparé un vecteur de clonage (un plasmide) capable d'exprimer, à la fois, la nucléase *Cas9* et un ARN guide¹⁴. Cet ARN guide était synthétisé pour cibler précisément l'exon 1 du gène de la Myostatine. Ils ont ensuite injecté, à l'aide d'une fine micropipette, une très petite quantité du mélange dans le cytoplasme^{15,16} d'embryons juste fécondés. Finalement, après quelques heures de culture, ils ont réimplanté les blastocystes ainsi manipulés (et d'apparence normale) dans des utérus de brebis préparées pour la gestation par des injections hormonales. 22 agneaux sont nés dont 10 porteurs de mutations¹⁷ dans le gène ciblé (voir Figure 4 et 5).

La technique CRISPR-Cas9 peut être utilisée aussi bien pour modifier l'ADN de cellules (**somatiques ou germinales**) cultivées *in vitro*, qu'au niveau de l'embryon précoce. Elle ne nécessite pas un équipement sophistiqué et peut être utilisée, avec quasiment le même protocole, dans **plusieurs espèces de mammifères**. Il faut cependant, comme nous l'avons déjà souligné, que le laboratoire

¹⁴ Des Kits prêts à l'emploi sont disponibles dans le commerce pour aider ces synthèses de vecteurs.

¹⁵ Dans les premières expériences de ce type il était recommandé de procéder à des injections dans l'un des pronuclei (comme cela se fait pour la transgénèse par addition d'ADN linéaire *in ovo*). Depuis, l'expérience a montré que le rendement était (pratiquement) aussi bon en procédant à des injections intra-cytoplasmiques, ce qui est plus facile.

¹⁶ On notera que le mélange injecté ne comportait pas de matrice de réparation de l'ADN. L'intention était donc limitée à la production de mutations de type insertion/délétion (ou "*indels*") empêchant le fonctionnement du gène ciblé.

¹⁷ Ces 10 mutations dans le gène *MSTN* étaient toutes de type "*indel*" (NHEJ). 8 étaient bi-alléliques (avec présence de mutations sur **les deux** chromosomes).

ait la maîtrise totale des conditions de maintien en survie des embryons de l'espèce sur laquelle il expérimente.

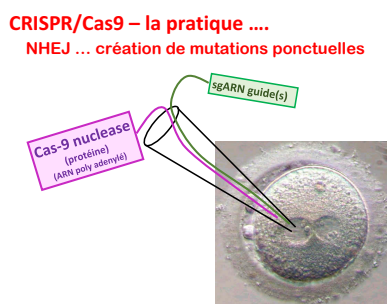


Figure 4. Injection dans le pronucléus de la nucléase Cas9 et de l'ARN guide (gARN) ciblant une séquence ADN précise. Cela induit des coupures double-brin dans la région ciblée (NHEJ). Lorsque l'injection se fait dans le cytoplasme de l'embryon **les deux** chromosomes d'une même paire peuvent être impactés ce qui favorise la production d'homozygotes en une seule étape : un avantage (gain de temps) considérable dans certaines espèces domestiques. A noter que si l'on ajoute une **matrice de réparation** (un oligo-nucléotide) au mélange Cas9/gRNA on peut, dans certaines conditions, "forcer" l'insertion d'une séquence particulière dans l'intervalle créé par la coupure. Dans ce cas on obtiendra une mutation **knock-in**.

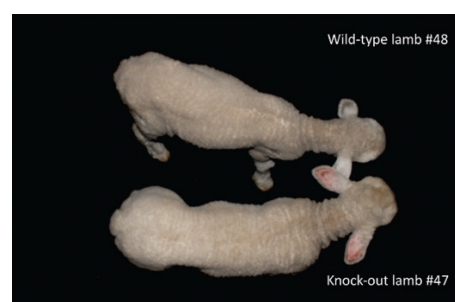
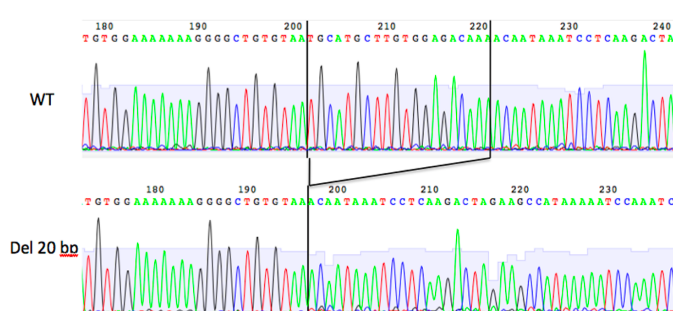


Figure 5. (gauche). L'injection de la nucléase Cas9 et de l'ARN guide (gARN) ciblant une séquence de l'exon 1 du gène *MSTN*, codant la Myostatine a provoqué des coupures double-brin. La plupart de ces coupures n'ont pas été réparées et laissent apparaître des mutations de tous ordres notamment des délétions mesurant une à plusieurs paires de bases. Ces mutations sont en général incompatibles avec la synthèse d'une protéine fonctionnelle : c'est un **knockout**. Dans le cas présenté la délétion porte sur 20 paires de base. **Figure 5 (droite)** Plus de Myostatine : partant plus de régulation de la croissance des cellules musculaires = les agneaux mutants sont "culards" (voir Knock-out lamb #47).

A la date de diffusion de cette note, des embryons génétiquement modifiés par action des ZFN ou TALE nucléases ou par utilisation de la technique CRISPR-Cas9 au stade zygote (stade une cellule du développement embryonnaire) ont été obtenus, avec une fréquence élevée, chez la souris, le rat, le singe *M. cynomolgus*, le furet, ainsi que chez plusieurs espèces de mammifères domestiques telles que les bovins, le mouton, la chèvre, le porc, le chien et le lapin (*voir références*). Des expériences ont également été réalisées avec des embryons humains triploïdes (et par conséquent non-viables à long terme - Tang *et al.* 2017; Ma *et al.* 2017). L'obtention de mutations à l'état homozygote¹⁸ est très avantageuse, dans les espèces domestiques qui ont un temps de génération long. Aucune autre technique n'offre cet avantage.

¹⁸ Il serait plus convenable de parler de "pseudo-homozygotes" car les mutations produites, même si elles sont localisées aux loci homologues des deux chromosomes d'une même paire, résultent néanmoins d'événements indépendants et sont, en général, différentes au niveau moléculaire : ce sont donc des allèles différents.

1.3.3. – Quelques commentaires à propos des mutations produites par utilisation de nucléases programmables (ZFN, TALEN, et principalement CRISPR-Cas9)

Les animaux dont le génome a fait l'objet de modifications ciblées, par utilisation d'une endonucléase programmable (notamment par la technique CRISPR-Cas9 ou une de ses variantes), **ne sont pas des animaux transgéniques *sensu stricto*** (au sens de la directive européenne 2001/18-CE¹⁹) mais constituent une **classe nouvelle d'organismes génétiquement modifiés (OGM)**.

L'addition d'un ADN cloné dans le génome d'un individu, appartenant éventuellement à une autre espèce, aboutit à la création d'un animal transgénique. Chez un tel animal, un ADN exogène s'est intégré au génome du receveur, le plus souvent à un endroit non-ciblé, aléatoire, et se transmet ensuite de manière mendélienne génération après génération. L'ADN exogène peut être composé d'un ou plusieurs gènes, modifié(s) *in vitro* ou non, et exprimé(s) *in vivo* ou non. Par extension, on considère aussi que les animaux dérivés de cellules embryonnaires (cellules ES) cultivées *in vitro*, dont le génome a été modifié par transfection puis recombinaison homologue *in vitro* avec un ADN exogène, sont également des animaux transgéniques. Les animaux transgéniques sont donc des organismes génétiquement modifiés (des OGMs) par l'homme parce qu'ils ont ou sont susceptibles d'avoir un phénotype intéressant du point de vue zootechnique (par exemple, des chèvres transgéniques produisant dans leur lait des protéines d'intérêt médicamenteux) ou simplement pour leur intérêt d'un point de vue médical et scientifique (par exemple pour étudier un gène entraînant la résistance à une maladie infectieuse).

Au contraire, les organismes qui se développent à partir d'embryons génétiquement modifiés par l'action ciblée de nucléases programmées (de type ZFN/TALEN ou par la technique CRISPR-Cas9), **ne sont pas des animaux transgéniques**. Certes, leur génome est porteur de mutations programmées au laboratoire, par le généticien, mais ces mutations sont absolument identiques **à celles qui surviennent spontanément et naturellement dans le génome de tous les mammifères** (Tan *et al.* 2012)²⁰. Il s'agit de l'insertion d'un ou de plusieurs nucléotides contigus ou, au contraire, de la délétion de quelques nucléotides dans la région ciblée (indels ou micro-indels). Il peut aussi s'agir, plus rarement, d'une substitution de nucléotides. Toutes ces mutations se produisent aussi à l'état naturel, et dans toutes les espèces.

Chez les animaux dont le génome a été modifié par l'action ciblée des nucléases programmées, il n'y a aucun ADN d'origine exogène dans le génome²¹. La modification ponctuelle induite par la nucléase est **précisément** localisée, elle est **stable et traçable par séquençage**, ce qui n'est pas le cas d'un ADN transgénique qui peut se mobiliser et interférer avec les gènes environnants.

¹⁹ <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32001L0018>

²⁰ Par analyse de la séquence de l'ADN, rien ne permet de distinguer une mutation d'origine "spontanée" d'une mutation induite par une intervention humaine et notamment par la technique CRISPR-Cas9.

²¹ La matrice de réparation qui est utilisée pour aider ou diriger la réparation des coupures provoquées par les endonucléases (production de *knock-in*) est en général de très courte taille. Il s'agit, en pratique, d'un oligo-désoxynucléotide (d'où le nom d'ODM pour *Oligonucleotide Directed Mutagenesis*). Cet oligonucléotide ne peut pas être considéré comme un ADN exogène et, de toute manière, il ne persiste pas en tant que tel à mesure que l'œuf se développe. Cela est d'autre part facilement contrôlable par séquençage.

Les animaux qui se développent à partir d'embryons génétiquement modifiés par l'action ciblée d'une endonucléase ou après utilisation de la technique CRISPR-Cas9 **ne sont pas non plus des "clones"** car chacun d'entre eux résulte de la **rencontre naturelle de deux gamètes différents**, qui ont fusionné pour former le noyau du zygote, et non pas de la transplantation dans le cytoplasme d'ovocytes préalablement énucléés, de noyaux provenant d'un même individu originel ou de tissus somatiques prélevés après quelques divisions mitotiques.

La législation actuelle relative aux animaux qualifiés de transgéniques ou de clones, n'est donc pas applicable aux animaux génétiquement modifiés par l'action d'une endonucléase programmée.

1.3.4. – Le cas des coupures sauvages ou non-ciblées (off-target).

L'utilisation de la technique CRISPR/Cas9 peut engendrer des **coupures sauvages** (= à des endroits non-ciblés et par définition inconnus) dans le génome des embryons traités (la littérature anglo-saxonne parle de coupures "*off-target*"). Ces coupures non-ciblées, dont le nombre dépend directement de la fiabilité de l'ARN guide et de la qualité de la nucléase associée (Cas9 pour l'instant), **sont rares** et, ici encore, elles ne sont pas différentes du point de vue de leur structure des mutations dues à des erreurs de réplication de l'ADN que l'on observe spontanément dans le génome de tous les nouveau-nés. D'autre part, elles sont pratiquement toujours génératrices de micro-indels (équivalentes à des mutations non-sens) et représentent **autant d'allèles non-fonctionnels**, fortement contre-sélectionnés à l'état naturel. Le problème (plus théorique que pratique) des coupures "*off-target*" ne tardera pas à trouver sa solution avec la découverte et la mise sur le marché de nucléases plus spécifiques et par conséquent plus performantes.

En conclusion

La découverte et la mise au point de techniques permettant de produire, à volonté, des modifications programmées et ciblées dans le génome des mammifères sont sans précédent. Ces techniques impactent d'ores et déjà de manière importante plusieurs aspects de la biologie et de la médecine. Le "monde vétérinaire" est évidemment concerné par plusieurs aspects de cette révolution technologique et doit s'y préparer. Un effort spécial et soutenu devrait être fait pour promouvoir les recherches fondamentales sur les sujets afférents à cette technologie et une législation mieux adaptée devrait être promulguée. La compétition internationale en cette matière (matérialisée par la prise de brevets) est telle qu'il faut associer la notion d'urgence aux actions à entreprendre en la matière.

2. Les réactions et prises de position des Académies et autres organismes concernés par les techniques nouvelles d'ingénierie et de modifications ciblées du génome

2.1. – L'Académie de Médecine

L'Académie de Médecine²² considère qu'avec les nucléases et en particulier avec la technique CRISPR-Cas9, ce sont de nouveaux outils moléculaires très précis et très performants qui ont été décrits et qui sont désormais disponibles dans de nombreux laboratoires pour modifier le génome de manière ciblée. Ces outils ouvrent des perspectives majeures pour la recherche en biologie, y compris dans le domaine médical et **vont très vraisemblablement permettre des progrès considérables pour la thérapie génique somatique.**

Elle souligne néanmoins **qu'aucune des techniques actuellement disponibles ne peut être utilisée, avec toute l'efficacité et l'innocuité requises, pour modifier le génome de cellules germinales ou d'un embryon conduisant à la naissance d'un enfant. Il n'y a donc pas lieu de changer actuellement la législation française sur ce point.**

L'Académie de Médecine poursuit en considérant que l'absence d'application clinique ne doit cependant pas empêcher les recherches fondamentales et précliniques dans ce domaine, y compris celles qui portent sur les cellules germinales et les embryons humains, afin de mieux connaître les mécanismes régulant la gamétogenèse et le développement précoce de l'embryon, ainsi que leurs anomalies. **Ces recherches devraient donc être autorisées et soutenues quand elles sont scientifiquement et médicalement pertinentes.** L'utilisation clinique éventuelle de ces nouvelles technologies s'inscrit dans un mouvement évolutif de la médecine dont les enjeux ne sont pas que techniques ou médicaux mais impliquent aussi des choix éthiques et sociaux. **Dès à présent, il est nécessaire d'affirmer que ces nouvelles technologies ne doivent pas être mises au service d'un eugénisme programmé.**

L'Académie nationale de médecine recommande donc :

- le **maintien de la législation actuelle interdisant toute intervention sur la structure de l'ADN ayant pour conséquence de modifier le génome de la descendance** (telles que définies dans la convention d'Oviedo - ratifiée par de nombreux pays);
- le **développement de la recherche** utilisant les technologies permettant la modification ciblée du génome, y compris sur les cellules germinales et l'embryon humain.
- l'adaptation des textes nécessaires au développement de ces recherches en France et en Europe, concernant en particulier l'interdiction de créer des embryons²³ transgéniques, étant entendu que les embryons ainsi modifiés ne donneront pas lieu à un transfert dans l'utérus en l'état actuel des connaissances et de la législation ;

²² Nous avons repris ici certains éléments développés dans l'avis de l'Académie de médecine formulé en date du 12 avril 2016. Cet avis est accessible *in extenso* au site de l'AMF : www.academie-medecine.fr ou à l'adresse : <https://iatranshumanisme.com/2016/04/29/crispr-cas9-position-officielle-de-lacademie-nationale-de-medecine-sur-les-modifications-du-genome-des-cellules-germinales-et-de-lembrion-humains/>

²³ Il s'agit ici d'embryons transgéniques humains.

- l'ouverture d'une réflexion pluridisciplinaire sur les questions posées par les techniques pouvant modifier de manière ciblée le génome germinale et embryonnaire, ce sujet devant être traité dans le cadre d'un débat plus large portant sur l'ensemble des technologies et interventions médicales réalisées lors de l'assistance médicale à la procréation et pouvant avoir des conséquences sur le génome des enfants à naître et éventuellement sur celui des générations suivantes.

2.2. – L'Académie des Sciences

L'Académie des Sciences a organisé plusieurs colloques sur le sujet des modifications ciblées du génome. Le premier (le 22 mars 2016) consistait en une présentation des techniques disponibles et de leurs potentiels avec des conférences de Mesdames Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier co-découvreuses de la technique CRISPR-Cas9²⁴. Le second (le 21 février 2017) était consacré aux aspects éthiques de l'application des techniques CRISPR-Cas9 chez l'homme, chez les plantes et chez les animaux d'élevage avec trois conférences²⁵ : Georges Pelletier (plantes cultivées) - Jean-Paul Renard (animaux d'élevage) et Pierre Corvol (génome humain). Il est prévu que d'autres colloques soient organisés sur des sujets d'intérêt commun à plusieurs Académies (*à suivre en ce qui concerne une participation éventuelle de l'Académie Vétérinaire*).

2.3. – Les Académies d'Agriculture et des Technologies

Les Académies d'Agriculture de France et des Technologies ont émis un avis en date du 6 juillet 2016 sur la réglementation des mutagenèses ciblées en **amélioration des plantes**. Cet avis porte essentiellement sur trois points²⁶ :

2.3.1. – Les mutations ciblées obtenues par les nouvelles techniques sont d'un grand intérêt pour l'amélioration des plantes car elles permettent d'accélérer l'obtention de variétés d'intérêt et par conséquent la réduction des coûts qui lui sont associés. Elles contribuent par ailleurs à une augmentation de la diversité génétique des créations variétales.

2.3.2. – Dans un paysage réglementaire encore confus au niveau européen²⁷, et en l'absence de recul sur les données concrètes issues du terrain les deux Académies appellent les pouvoirs publics à **laisser se développer les expérimentations en cours, y compris les expérimentations au champ et à en utiliser les résultats pour préparer un cadre réglementaire qui intègre à la fois la biovigilance et les avancées techniques que ces nouvelles technologies permettent d'envisager.**

²⁴ Ces deux conférences sont librement accessibles au site : http://public.weconext.eu/academie-sciences/2016-03-22/video_id_000/index.html

²⁵ Ces trois conférences sont librement accessibles au site : <http://www.academie-sciences.fr/fr/Colloques-conferences-et-debats/ethiques-crispr-cas9.html>

²⁶ L'avis de l'Académie d'Agriculture de France et des Technologies est disponible sur le site de l'Académie d'Agriculture <https://academie-agriculture.fr/publications/academie-communique/avis/13-juillet-2016-avis-sur-la-reglementation-des-mutageneses>

²⁷ Le même commentaire pourrait être fait (aggravé) à propos des OGMs animaux.

2.3.3. – Pour les deux Académies ces techniques de mutagenèse ciblée peuvent (et doivent) être exclues des techniques réglementées par la Directive européenne 2001/18/CE relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, conformément à son Annexe 1B6.

2.4. – La position de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST)²⁸

Dans un rapport rendu public le 29 mars 2017, l'OPECST formule plusieurs recommandations à propos des techniques nouvelles de biotechnologie afférentes à la génomique expérimentale, aussi bien chez les plantes que chez les microorganismes ou **les animaux domestiques**.

Dans ce volumineux rapport, les députés et sénateurs de l'OPECST estiment que les nouvelles technologies de modifications ciblées du génome, en particulier CRISPR-Cas9, représentent une **rupture technologique comme on en a peu rencontré dans le passé** et se prononcent "**pour un effort de recherche accru**" sur leur utilisation afin de faire rapidement progresser les connaissances.

Les rapporteurs de l'OPECST remarquent et déplorent que les recherches appliquées consacrées aux modifications ciblées du génome se concentre désormais aux Etats-Unis et en Chine, alors même que plusieurs chercheurs français ont contribué, de manière décisive, à la découverte et à la mise au point de ces techniques (B. Dujon, E. Charpentier, et d'autres ...).

L'OPECST souhaite qu'une directive européenne clarifie rapidement les questions posées par les nouvelles biotechnologies de modification du génome et **s'oppose à un moratoire sur ces techniques** en considérant qu'il n'y aurait là rien d'autre qu'un nouvel attermolement en matière de conduite à tenir. Les rapporteurs de l'OPECST font remarquer (*eux aussi*) que les "produits" (*pour nous : les animaux*) obtenus par utilisation des techniques de modification ciblée du génome "ne peuvent en aucun cas être considéré comme des OGM au sens de la directive européenne 2001/18" et appellent donc à une clarification réglementaire en France et en l'Europe".

L'OPECST considère que c'est au "politique" de décider des conduites à tenir à propos des risques (éventuels !) associés à l'utilisation d'une nouvelle technologie et non à la Cour européenne de justice.

Le rapport recommande enfin, le transfert à l'ANSES de toutes les missions confiées aujourd'hui au Haut-Conseil des Biotechnologies (HCB) : une façon de résoudre "la crise d'identité à répétition" du dit Comité.

²⁸ L'OPECST est un organe d'information composé de représentants de de l'Assemblée nationale (9 membres) et du Sénat (9 membres également). Il a pour mission "*d'informer le Parlement des conséquences des choix de caractère scientifique et technologique afin, notamment, d'éclairer ses décisions*". L'OPECST est un aréopage de parlementaires compétents permettant au Gouvernement de disposer d'une expertise pour éclairer ses choix politiques. Le Président de l'OPECST est M. Gérard Longuet, Sénateur de la Meuse, et le Premier Vice-Président M. Cédric Villani – député de l'Essonne.

3. – Références bibliographiques

- Bruce A, Castle D, Gibbs C, Tait J, Whitelaw CB: Novel GM animal technologies and their governance. *Transgenic Res* 2013, 22:681-695.
- Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim E-S, Walton M, Oldeschulte D, Seabury C, Sonstegard TS, Fahrenkrug SC: Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotech* 2016, 34:479-481.
- Carroll D, Van Eenennaam AL, Taylor JF, Seger J, Voytas DF: Regulate genome edited products, not genome editing itself. *Nat Biotech* 2016, 34:477-479.
- Chapman KM, Medrano GA, Jaichander P, Chaudhary J, Waits AE, Nobrega MA *et al.* Targeted Germline Modifications in Rats Using CRISPR-Cas9 and Spermatogonial Stem Cells. *Cell Rep.* 2015; 10: 1828-1835.
- Codex Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology: Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA animals. In CAC/GL 68-2008. Edited by 68-2008 CG; 2008.
- Conko G, Kershen DL, Miller H, Parrott WA: A risk-based approach to the regulation of genetically engineered organisms. *Nat Biotech* 2016; 34:493-503.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC *et al.* Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR-Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One.* 2015; 10:e0136690.
- Doudna JA, Charpentier E: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014, 346 (6213) 1258096-1-9
- Ducos A, Bed'hom B, Acloque H, Pain B: Modifications ciblées des génomes : apports et impacts pour les espèces d'élevage. *INRA Prod. Anim.* 2017; 30: 3-18.
- Ducos A, Bed'hom B, Hervé A, Bertrand P. Modifications ciblées des génomes : apports et impacts potentiels des nouvelles technologies pour les espèces aviaires. Douzièmes journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie gras, Tours, 05/06 avril 2017.
- Feng Zhang, Yan Wen, Xiong Guo. CRISPR-Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Mol Genetics* 2014; 23:40-46.
- Food and Drug Administration (FDA): Regulation of Genetically Engineered Animals Containing Heritable Recombinant DNA Constructs. U.S. Department of Health and Human Services; 2009.
- Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho Y-J, Kii E, Alt FW: Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat Biotech* 2015; 33:179-186.
- Gao *et al.* Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology* (2017) 18:13 - DOI 10.1186/s13059-016-1144-4
- Hashimoto M, Takemoto T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR-Cas9-based genome editing. *Sci Rep.* 2015; 5: 11315-11317
- Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K *et al.* Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR-Cas9. *Exp Anim.* 2015; 64:31-37
- Ji HY, Yang B, Zhang ZY, Ouyang J, Yang M, Zhang XF, Zhang WC, Su Y, Zhao KW, Xiao SJ, Yan XM, Ren J, Huang LS: A genome-wide association analysis for susceptibility of pigs to enterotoxigenic *Escherichia coli* F41. *Animal* 2016; 10:1602-1608
- Kaneko T, Mashimo T. Simple Genome Editing of Rodent Intact Embryos by Electroporation. *PLoS One.* 2015; 10: e0142755
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016; 529: 490-495.
- Koo T, Lee J, Kim JS: Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Mol Cells* 2015; 38:475-481.
- Kou Z, Wu Q, Kou X, Yin C, Wang H, Zuo Z *et al.* CRISPR-Cas9-mediated genome engineering of the ferret. *Cell Res.* 2015; 25:1372-1375.

- Li R, Montpetit A, Rousseau M, Wu SY, Greenwood CM, Spector TD *et al.* Somatic point mutations occurring early in development: a monozygotic twin study. *J Med Genet.* 2014; 51: 28-34.
- Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, Koski A, Ji D, Hayama T, Ahmed R, Darby H, Van Dyken C, Li Y, Kang E, Park AR, Kim D, Kim ST, Gong J, Gu Y, Xu X, Battaglia D, Krieg SA, Lee DM, Wu DH, Wolf DP, Heitner SB, Belmonte JCI, Amato P, Kim JS, Kaul S, Mitalipov S. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* 2017;548: 413-419.
- Mekada K, Hirose M, Murakami A, Yoshiki A. Development of SNP markers for C57BL/6N-derived mouse inbred strains *Exp Anim* 2015; 64(1), 91–100.
- Ménoret S, De Cian A, Tesson L, Remy S, Usal C, Boulé JB *et al.* Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci Rep.* 2015; 5:14410
- Mizuno S, Dinh TT, Kato K, Mizuno-Iijima S, Tanimoto Y, Daitoku Y *et al.* Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR-Cas9 system. *Mamm Genome.* 2014; 25:327-334
- Murray JD, Maga EA: Opinion: A new paradigm for regulating genetically engineered animals that are used as food. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016, 113:3410-3413.
- Nguyen UV, Coddens A, Melkebeek V, Devriendt B, Goetstouwers T, Poucke MV, Peelman L, Cox E. High susceptibility prevalence for F4(+) and F18(+) *Escherichia coli* in Flemish pigs. *Vet Microbiol* ;, 2016.
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L *et al.* Generation of gene-modified *cynomolgus* monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one- cell embryos. *Cell.* 2014; 13; 156:836-843
- O'Geen H, Yu AS, Segal DJ: How specific is CRISPR-Cas9 really? *Current Opinion in Chemical Biology* 2015; 29:72-78.
- Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T. *Sci Report* 2016, (6) 23980.
- Petersen B & Niemann H. Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals, *Transgenic Res* 2015; 24:381–396.
- Qin W, Dion SL, Kutny PM, Zhang Y, Cheng AW, Jillette NL *et al.* Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease. *Genetics.* 2015; 200:423-430.
- Sato T, Sakuma T, Yokonishi T, Katagiri K, Kamimura S, Ogonuki N *et al.* Genome Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cell Lines Using TALEN and Double-Nicking CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports.* 2015; 5:75-82.
- Suzuki T, Asami M, Perry AC. Asymmetric parental genome engineering by Cas9 during mouse meiotic exit. *Sci Rep.* 2014; 23:7621.
- Song Y, Cui C, Zhu H, Li Q, Zhao F, Jin Y. *Protein Expres. Purif.* 2015 (112) 1-7.
- Tan WS, Carlson DF, Walton MW, Fahrenkrug SC, Hackett PB. Precision Editing of Large Animal Genomes. *Adv Genet* 2012; 80:37-97.
- Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, Lei M, Zhao F, Wang W, Li X, Liu J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics.* 2017; 292:525–533.
- Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G *et al.* Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med.* 2014; 370:901-910.
- Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Médecine/Sciences* 2015; 31:1014-1022.
- Van Eenennaam AL, Young AE: Animal agriculture and the importance of agnostic governance of biotechnology. *Agriculture & Food Security* 2015, 4:1-10.
- Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H *et al.* Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep.* 2015; 5:13878
- Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL *et al.* Use of the CRISPR-Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod.* 2014; 91:78
- Whitworth KM, Rowland RR, Ewen CM, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG *et al.* Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nature Biotechnology* 2016; 34:20-22.

Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S *et al.* Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*. 2013; 13: 659-662

Wu Y, Zhou H, Fan X, Zhang Y, Zhang M, Wang Y *et al.* Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*. 2015; 25:67-79.

Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet*. 2015; 52:289-96.

Zou Q, Wang X, Liu Y, Ouyang Z, Long H, Wei S *et al.* Generation of gene-targeted dogs using CRISPR-Cas9 system. *J Mol Cell Biol*. 2015; 7:580-3.

Rapport de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST)
- <https://www.senat.fr/opecst/rapport.html>

Sites internet à consulter :

<https://lejournel.cnrs.fr/articles/crispr-cas9-des-ciseaux-genetiques-pour-le-cerveau>

4. – Les raisons susceptibles de motiver un avis de l'Académie Vétérinaire de France

Nous avons rassemblé quelques exemples choisis parmi les plus démonstratifs pour convaincre l'Académie Vétérinaire de France de la nécessité qu'il y a de donner un avis sur l'impact potentiel des stratégies de modification programmées du génome des animaux domestiques. Rarement dans son histoire la profession a été aussi concernée, et d'une manière aussi spécifique, par un développement technologique ...

4.1. – Des troupeaux insensibles, ou moins sensibles, à certaines maladies infectieuses

Le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) est une entité pathologique qui se caractérise par une morbidité élevée et une assez forte mortalité. La maladie, relativement très contagieuse, est à l'origine de pertes économiques importantes. Elle est due à un *arterivirus* dont le récepteur cellulaire (*CD163*) est identifié et caractérisé. L'intégrité de ce récepteur est nécessaire à l'ancrage puis à la pénétration du virus dans les cellules.

En utilisant la technique CRISPR-Cas9, des chercheurs américains ont produit une série de mutations ponctuelles (des micro-indels) dans l'exon 7 du gène codant le récepteur CD163 aboutissant à son inactivation pure et simple et ils ont observé que les porcelets, homozygotes pour cet allèle défectif (*CD163^{-/-}*), étaient devenus totalement résistants à la maladie sans pour autant exprimer un quelconque phénotype morbide indésirable (Whitworth *et al.* 2014 ; 2016). Une observation très semblable avait déjà été faite chez la souris, avec un coronavirus très pathogène (celui de l'hépatite – MHV) et chez l'homme, avec le virus du SIDA pour lequel certains individus ont été démontré génétiquement insensibles en raison de l'absence d'un co-récepteur (mutation CCR5- Δ 32).

Ces résultats indiquent qu'il est sérieusement envisageable de créer des troupeaux résistants à certains types d'infections en induisant des mutations dans le génome, à des sites connus pour leur importance dans le déroulement du processus infectieux. Il est probable que d'autres gènes, impliqués dans le cycle de reproduction d'agents pathogènes seront identifiés dans l'avenir qui pourront, pareillement, représenter autant de cibles intéressantes dans ce contexte. Des expériences un peu analogues à celle que nous avons mentionnées sont d'ailleurs actuellement en cours dans le but de modifier la sensibilité des bovidés à la fièvre aphteuse, à la tuberculose et la sensibilité des porcs à la peste porcine africaine (*African Swine Fever*). Ces expériences représentent une approche nouvelle dans la lutte contre les maladies infectieuses qui pourraient changer radicalement leur pronostic. Elles requièrent toutefois que de nouvelles recherches soient entreprises.

La possibilité d'induire par ingénierie génétique l'insensibilité aux maladies infectieuses, au moins à certaines, est susceptible d'application nombreuses chez les animaux domestiques parce qu'elle représente une alternative très intéressante aux médicaments (aux antibiotiques en particulier) ou aux vaccinations (*a fortiori* lorsque celles-ci ne sont pas autorisées). Des recherches sont d'ores et déjà en cours (notamment à l'INRA) pour la grippe aviaire. D'autres pourraient être développées en ce qui concerne certaines maladies parasitaires à trypanosomes.

4.2. – Produire des animaux présentant des caractéristiques économiquement avantageuses

Les veaux "culards" ou les agneaux "callipyges" présentent une hypertrophie des masses musculaires qui leur confère un avantage économique incontestable puisque leurs carcasses produisent une plus grande quantité (jusqu'à 30 %) d'une viande moins grasse et plus goûteuse. Cette caractéristique est (souvent) déterminée par une mutation qui inactive le gène qui produit la myostatine, un facteur de croissance actif dans les cellules musculaires (muscles striés en particulier). Les bovins de la race Blanc-Bleu Belge et les porcs de la race Piétrain sont autant d'exemples chez lesquels le gène de la myostatine est naturellement inactivé, du fait de mutations apparues spontanément.

Un groupe de chercheurs uruguayens en collaboration avec un groupe de l'INSERM, à Nantes, a utilisé les possibilités offertes par la technique CRISPR-Cas9 pour produire *de novo* une mutation ciblée invalidant le gène de la myostatine chez des moutons de la race mérinos produisant une laine de haute qualité (fibres denses et très fines). Ceci leur a permis de rassembler, en une seule étape, autrement dit après une seule génération de croisement et dans les animaux d'un même troupeau, deux caractéristiques phénotypiques à haute valeur ajoutée (= des masses musculaires augmentée de 30% et une laine très fine). L'addition de ces deux caractéristiques zootechniques aurait, certes, pu se faire "naturellement" mais elle aurait nécessité un très grand nombre de croisements car le déterminisme génétique qui gouverne la qualité "mérinos" de la laine implique un assez grand nombre de gènes (voir Crispo *et al.* 2015 – cité plus haut).

Dans le même ordre d'idée la technique CRISPR-Cas9 permet d'induire des modifications (qualitatives ou quantitatives) dans la composition du lait de vache, de brebis ou de chèvre conduisant à l'élimination ou à la modification de protéine allergisantes ou non tolérées. La même technique, récemment adaptée aux oiseaux, a permis la production d'œufs de poule avec un albumen hypoallergéniques (Oishi *et al.* 2016 ; Song *et al.* 2015).

4.3. – Des bovidés génétiquement écornés – des poussins sexés au mirage

Des expériences récentes ont montré que la pratique de l'écornage, qui se répand dans les élevages de bovins en stabulation, pourrait à l'avenir être avantageusement remplacée par la création de bovins porteurs de mutations induites dans le gène *Polled* (sans corne) - (Carlson *et al.* 2016). Dans ce cas précis, la mutation pourrait être disséminée dans un troupeau à partir de quelques géniteurs fondateurs. Si cela se révélait souhaitable elle pourrait même être "guérie" (et par conséquent éliminée) en utilisant la technique CRISPR-Cas9-HDR. L'absence de cornes "génétiquement programmée", si elle était adoptée, éviterait aux jeunes bovidés d'avoir à subir une intervention chirurgicale risquée et relativement douloureuse. Elle présente donc un aspect éthique en plus de ses aspects pratiques.

Dans le même ordre d'idée, une technique récemment mise au point permet de marquer le chromosome Z des oiseaux avec un fluorochrome ouvrant ainsi la possibilité d'identifier par mirage (effectué précocement) les œufs qui donneront naissance à un poussin mâle (ZZ) et ceux qui donneront naissance à un poussin femelle (ZW). La technique permettrait donc de trier les

œufs fécondés et de recycler avant éclosion les œufs ZW vers une autre utilisation (cultures de virus *in ovo* par exemple...).

4.4. – La correction de maladies génétiques ou la production de mutations chez les carnivores domestiques

Les chiens et chats "de race" sont parfois porteurs d'anomalies génétiques qui ségrègent à bas bruit dans les élevages. Les exemples sont nombreux et la dystrophie musculaire liée à l'X en est un bon exemple. Certaines parmi ces maladies sont difficiles à éliminer par la seule mise en application d'un protocole d'élevage sélectif, avec élimination des malades, car elles ne sont souvent reconnues qu'à un âge avancé et sont par conséquent récurrentes. La technique CRISPR-Cas9 pourrait permettre de contrôler la présence du (ou des) gène(s) défectif(s) voire, dans certains cas, d'aboutir à une correction définitive de l'anomalie !

La modification ciblée de certains gènes *in ovo* pourrait aussi servir à la création d'individus ayant un phénotype particulier (couleur de la robe, texture du poil, etc). Des couleurs de poil "inédites" seraient possible en modifiant certaines protéines impliquées dans la coloration²⁹.

Enfin, chez les carnivores domestiques, des espèces où la durée de vie est longue, il serait sans doute intéressant d'essayer ici aussi de modifier la sensibilité aux maladies infectieuses.

5. – La possibilité de pratiquer des modifications ciblées des gènes chez les animaux de rente doit s'accompagner d'une profonde révision de la législation

La prise en compte des considérations techniques et scientifiques développées et argumentées ci-dessus montre à l'évidence qu'il n'existe aucune raison objective d'appliquer aux animaux domestiques dont le génome a été modifié par utilisation d'une technique faisant appel à une nucléase programmable, et notamment la technique CRISPR-Cas9, **la législation très restrictive censée s'appliquer aux animaux transgéniques**. Les animaux à génome modifié par action d'une nucléase programmée ne sont pas, par nature, comparables aux animaux transgéniques.

Plusieurs laboratoires de recherche français conduisent depuis de nombreuses années des expériences dans le domaine de l'inactivation ciblée de gènes – le plus souvent chez des animaux de laboratoire (souris, rat ou lapin), plus rarement dans des espèces d'intérêt zootechnique (bovins, ovins, porcins). Cela indique que la compétence en matière d'ingénierie du génome est bien établie en France³⁰. Il serait donc très démotivant que les retombées économiques de ces techniques de pointe ne puissent pas être "récoltées" si les animaux de rente génétiquement modifiés devaient rester hors commerce en raison d'une législation inadaptée.

La dissémination, et par voie de conséquence la consommation de la viande provenant d'animaux de rente génétiquement modifiés par l'action de nucléases n'est pas officiellement autorisée alors que rien ne le justifie scientifiquement. (*Nous aurions besoin des textes européens où ceci est publié – Directive EU 2001/18/CE ?*)

²⁹ Comme envisagé actuellement pour modifier les couleurs de certains poissons d'aquarium.

³⁰ Rappelons que l'une des co-découvreuses de la technique (Emmanuelle Charpentier) est française.

La révision de la législation concernant les animaux domestiques dont le génome a été modifié par utilisation d'une technique faisant appel aux nucléases est devenue urgente. Elle devra se faire **au terme d'une réflexion impliquant des agronomes et des vétérinaires** et devra concerner tous les aspects afférents à cette stratégie.

Beaucoup d'expériences sur ce sujet se font à l'étranger créant une situation de concurrence dans laquelle la France apparaît, dans l'état actuel des choses, comme sérieusement handicapée. Ce point a été fortement et explicitement souligné par l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques il est urgent de réagir et à qui s'adresser pour cela sinon aux Académies ?

6. – Quelques commentaires (en vrac) relatifs à la possibilité de pratiquer l'invalidation ciblée de gènes chez les animaux de rente et à la nécessité d'une révision de la législation.

Il est fréquemment avancé que des mutations survenant hors du site ciblé par l'ARN guide et par conséquent dans une région inconnue du génome (mutations *off-target*) pourraient être source d'incertitude potentielle à propos de la qualité des viandes provenant d'individus génétiquement modifiés³¹. Nous considérons que cet argument est très faible si l'on considère la fréquence à laquelle de telles mutations sont supposées survenir. De plus, dans la quasi-totalité des cas des mutations non désirées survenant hors-cible conduiraient à la venue au monde d'individu non viables ou mort-nés. Signalons encore que les nucléases et les ARN guides actuellement utilisés sont d'une excellente qualité et sans doute très fiables. Des progrès sont encore attendus qui conduiront sans doute à une réduction considérable de coupures *off-target*.

En admettant qu'il devienne possible de produire des animaux de rente génétiquement modifiés par action ciblée de nucléases, il faut noter que cela n'engendrerait aucun risque de dissémination incontrôlée de la mutation car tous les animaux élevés sur le territoire français sont identifiés individuellement (ou pourraient l'être s'il le fallait) et cela depuis leur naissance jusqu'à leur mort. Le risque de dissémination est donc nul (contrairement à ce qui pourrait se passer dans le monde des plantes cultivées).

De la même manière, une modification génomique qui se révélerait avoir des conséquences indésirables (à court ou à long terme) pourrait, s'il le fallait, être éliminée en totalité d'un troupeau et cela à tout instant, exactement comme on peut le faire aujourd'hui pour une tare reconnue au niveau génomique.

La création d'un marquage moléculaire spécifique, par une combinaison de modification ciblées au niveau de l'ADN pourrait même avoir un avantage au niveau de la traçabilité.

³¹ L'hypothèse qu'une protéine anormale, éventuellement toxique ou allergisante, pourrait être produite dans le cas d'une modification induite *off-target* est fréquemment proposée. L'analyse de cas montre que cette hypothèse, si elle est bien sûr envisageable, resterait néanmoins rarissime. En tous cas elle ne pose pas un problème au quotidien pour les mutations spontanées qui se produisent pourtant constamment et sont strictement de même nature que les mutations ciblées qui pourraient être induites *in ovo*, au laboratoire.

Si l'on prend en compte les différences que nous venons de souligner, il est clair que la législation actuellement en vigueur concernant les animaux génétiquement produits par transgénèse n'est pas applicable, sous sa forme actuelle, aux organismes animaux génétiquement modifiés par l'action des nucléases, notamment en ce qui concerne leur dissémination (donc leur commercialisation et la consommation éventuelle de leurs produits (lait, laine, viande, œufs, peauxetc.). C'est essentiellement pour cette raison que l'Académie d'Agriculture de France et l'Académie vétérinaire de France appellent à une révision extensive de la nomenclature et de la législation concernant ces animaux.

Ce document doit être considéré comme un « document de travail » et ne doit pas être diffusé en dehors du groupe de travail mis en place par l'Académie vétérinaire de France

Certaines parmi les illustrations utilisées dans ce document ont été communiquées à l'auteur à titre amical (sans MTA). Elles ne doivent pas être utilisées à d'autres fins.