

# L'ÉDITION GÉNOMIQUE DES BOVINS : UNE OPPORTUNITÉ, MAIS PAS À N'IMPORTE QUEL PRIX

## GENOME EDITING IN CATTLE: AN OPPORTUNITY, BUT NOT AT ANY PRICE

Par Laurent SCHIBLER<sup>(1)</sup>  
(Communication présentée le 21 Juin 2018,  
Acceptée le 11 Novembre 2018)

### RÉSUMÉ

L'édition génomique représente une opportunité pour l'élevage bovin, permettant par exemple l'introgession d'allèles d'intérêt d'une race dans une autre en évitant les multiples générations de croisement, ou la création de nouveaux variants pour conférer une résistance à des pathogènes. Par ailleurs, l'organisation collective mise en place pour l'amélioration génétique des ruminants garantit la maîtrise de la génétique par les éleveurs et assure la traçabilité des animaux, faisant de la filière génétique un cadre solide pour tester ces technologies avant d'envisager un éventuel déploiement en élevage. Mais cette technologie peut également être utilisée pour intégrer des portions d'ADN exogènes et franchir ainsi la barrière d'espèce, ou produire des organismes capables de s'autoéditer (« forçage génétique »). Une telle capacité d'intervention sur le vivant soulève des interrogations et l'utilisation de ces technologies fait actuellement l'objet de débats au sein de la filière génétique, avec pragmatisme et réalisme.

**Mots-clés :** Mutagenèse, édition génomique, CRISP-Cas9, bovin.

### ABSTRACT

Genome editing provides new opportunities for the cattle breeding sector. It allows, for example, the rapid introgression of alleles of interest from one breed into another, avoiding multiple generations of backcrossing. It also allows the creation of new variants conferring for example greater resistance to pathogens. Aside of these advantages, the collective organization set up for the genetic improvement of ruminants guarantees the control of the genetics by the breeders and ensures the traceability of the animals, making the cattle genetic sector a good choice for testing these technologies before their implementation on a larger scale. However, this technology can also be used to integrate portions of exogenous DNA within the genome of animals, hence crossing the species barrier, or producing self-editing organisms (« Gene Drive »). Such an ability raises questions and making use of these technologies is currently the subject of societal controversies and discussions within the cattle breeding sector.

**Key words:** Mutagenesis, genome editing, CRISP-Cas9, cattle.

### INTRODUCTION

L'édition génomique regroupe un ensemble de techniques de mutagenèse ayant pour objectif l'introduction, de façon ciblée, d'une ou plusieurs mutations dans un génome. Diverses « nucléases » sont employées pour générer des cassures double-brin au niveau de régions précises de la séquence d'ADN : Zinc

Finger Nucleases (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) et plus récemment Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9 dont l'efficacité a été démontrée dans plus de 40 espèces (Haeussler & Concordet 2016). Cette technologie CRISPR-Cas9, considérée

(1) 1.Responsable Développement & Innovation d'ALLICE, Maison Nationale des Eleveurs, 149 rue de Bercy, 75595 PARIS Cedex 12.  
Courriel : laurent.schibler@allice.fr

comme une révolution dans le monde de la biologie (Lander 2016), permet de modifier le génome de façon précise et efficace, en induisant soit des mutations ponctuelles, soit des délétions ou des insertions, y compris de matériel génétique exogène. L'édition génomique peut donc être utilisée pour introduire dans le génome des variations qui pourraient être obtenues de façon naturelle, ou pour intégrer des portions d'ADN exogène et franchir la barrière d'espèce (transgénèse), voire produire des organismes capables de s'autoéditer (« forçage génétique »). Elle nourrit de grands espoirs chez l'Homme en matière de thérapie génique et ouvre de nouvelles perspectives pour le développement d'animaux d'élevage plus performants, plus adaptés à leur environnement et moins sensibles aux maladies. Si de multiples perspectives d'utilisation ont déjà été décrites (Hsu *et al.* 2014), cette technologie pose également de nombreuses questions d'ordre scientifique, éthique, réglementaire, économique et stratégique (Eriksson *et al.* 2018). En particulier, le principe d'intégrité de l'animal, son bien-être, la perception du risque ou la naturalité sont autant de facteurs qui vont influencer l'acceptabilité sociétale des animaux « à génome édité », ainsi que la réglementation de leur usage. C'est pourquoi l'utilisation de ces technologies fait actuellement l'objet de débats au sein de la filière génétique, débats traités avec pragmatisme et réalisme. Il est évident que l'adoption de l'édition génomique, pour optimiser les schémas de sélection ou créer de nouveaux allèles, dépendra de l'acceptabilité sociétale des animaux « à génome édité » et se fondera non pas sur ce qu'il est possible de faire, mais sur ce qui est raisonnable de faire.

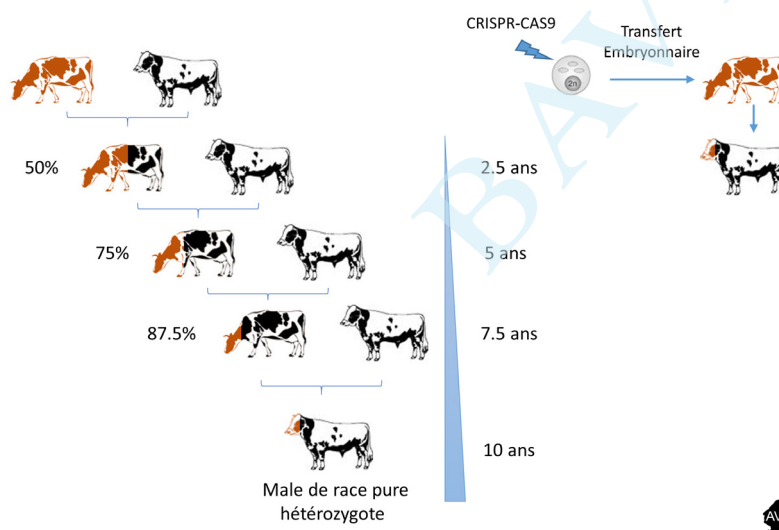
## L'ÉDITION GÉNOMIQUE, UNE OPPORTUNITÉ POUR L'ÉLEVAGE BOVIN

L'édition génomique et CRISPR-Cas9 en particulier est avant tout un formidable outil de recherche fondamentale, permettant, par exemple, d'aborder de façon plus efficace la question des

relations génotype-phénotype, via l'introduction dans le génome de mutations perte ou gain de fonction (Shalem *et al.* 2015). Son utilisation pourrait ainsi permettre de valider plus rapidement les mutations candidates identifiées par les programmes de cartographie génétique, ou d'étudier l'impact des mutations *de novo* détectées par séquençage du génome. Par ailleurs, l'édition génomique permet d'étudier les mécanismes moléculaires gouvernant les grandes fonctions biologiques, non plus dans des espèces modèles comme la souris, mais directement chez les bovins. Cela présente un intérêt majeur, en particulier lorsqu'il existe des différences physiologiques importantes entre le bovin et l'espèce modèle. Par exemple, le développement embryonnaire précoce de la souris est très différent de celui des bovins, qu'il s'agisse de reprogrammation épigénétique, de mise en route du génome embryonnaire ou du processus d'élongation. De multiples applications pratiques sont envisagées pour les espèces d'élevage (Bhat *et al.* 2017, Reardon 2016) et, chez les bovins, l'introgession assistée par édition génomique et la création de nouveaux allèles représentent deux applications particulièrement prometteuses.

### Introgession assistée par édition génomique

L'édition génomique permet l'introgession d'allèles d'intérêt d'une race dans une autre en évitant les multiples générations de croisement. Compte tenu des règles d'inscription dans les livres généalogiques, l'introgession par croisement ne peut se faire que par la voie femelle et l'obtention d'un mâle hétérozygote de race pure peut prendre une dizaine d'années. L'édition génomique permet d'introduire directement l'allèle d'intérêt à l'état homozygote dans le génome de taureaux élites, permettant un gain de temps pouvant atteindre une dizaine d'années (**Figure 1**). L'utilisation raisonnée de cette stratégie et l'édition d'un nombre suffisant de taureaux permet d'éviter l'effet « fondateur » ou « goulet d'étranglement » et leurs conséquences négatives sur la diversité génétique et la consanguinité.



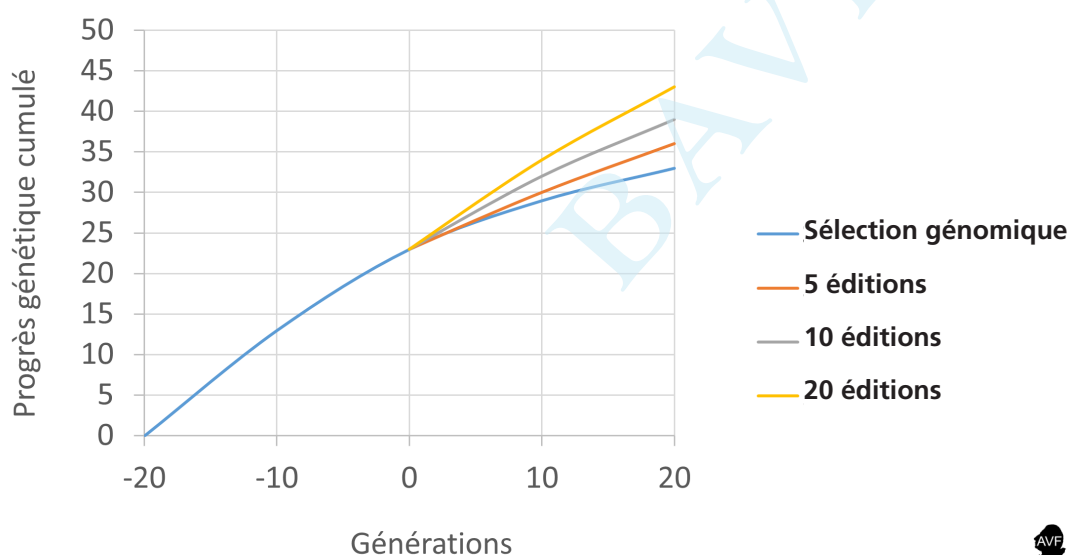
**Figure 1** : Introgession d'allèle d'intérêt par croisement ou édition génomique

Cette approche est particulièrement efficace pour des caractères monogéniques. Ainsi, des bovins porteurs de l'allèle « sans corne » ont été produits par mutagenèse à l'aide de TALEN (Carlson *et al.* 2016). De même, l'inactivation du gène de la myostatine (MSTN) a été réalisée par TALEN pour produire des bovins présentant un phénotype d'hypertrophie musculaire (Proudfoot *et al.* 2015). De nombreuses anomalies génétiques ont été identifiées chez les bovins et l'édition génomique pourrait être employée pour corriger de telles anomalies chez les reproducteurs porteurs, comme cela a été réalisé pour corriger une mutation ponctuelle récessive responsable du syndrome IARS (Isoleucyl-tRNA synthetase syndrome) en race Wagyu (Ikeda *et al.* 2017). Hormis les anomalies génétiques, peu de mutations d'intérêt ont été identifiées pour des caractères monogéniques, ce qui constitue le principal facteur limitant le développement de ces approches. Avec le développement de la sélection génomique et les programmes internationaux de séquençage de milliers de taureaux, les régions et les variants identifiés gouvernent principalement des caractères quantitatifs (QTLs) en lien avec les caractères analysés en routine (production, reproduction, conformation, santé de la mamelle). Même si l'effet de chaque variant est plus faible que dans le cas de caractères monogéniques, des simulations montrent qu'il serait possible de doubler le progrès génétique via l'édition simultanée d'une vingtaine d'allèles gouvernant un caractère d'intérêt (Hickey *et al.* 2016), comme illustré sur la **Figure 2**.

### Création de nouveaux allèles

La création de nouveaux variants pour conférer une résistance à certains pathogènes est séduisante. L'exemple type est celui de l'édition de plusieurs mutations non-sens dans le gène porcine CD163 (Whitworth *et al.* 2016), inactivant la production de la protéine CD163 utilisée comme récepteur par le virus respon-

sable du Syndrome Dysgénique et Respiratoire Porcin (SDRP). Les porcelets édités sont totalement résistants à l'infection par le virus, laissant entrevoir la possibilité d'éradiquer cette maladie très répandue qui provoque des dommages économiques considérables et se manifeste par de la fièvre, une pneumonie, un accroissement de la sensibilité aux infections bactériennes secondaires et des troubles de la reproduction. Chez les bovins, des mutations ont été introduites par TALEN et CRISPR-Cas9 pour invalider le gène PRNP et produire des animaux résistants à l'infection par le prion (Bevacqua *et al.* 2016, Choi *et al.* 2015). Des bovins transgéniques ont également été obtenus par édition génomique afin d'augmenter leur résistance à la tuberculose. Pour cela, une équipe a introduit une copie additionnelle du gène NRAMP1 (Natural resistance-associated macrophage protein-1) dans une région spécifique du génome bovin (Gao *et al.* 2017). Une seconde équipe a introduit une copie du gène murin SP110 (Wu *et al.* 2015). Dans les deux cas, les bovins transgéniques ont bien acquis une résistance accrue à la bactérie. De même, des vaches transgéniques éditées par ZFN ont été obtenues par intégration du gène du Lysozyme humain dans le locus de la  $\kappa$ -caséine. Le lait de ces vaches inhibe la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et les animaux présentent une résistance accrue aux mammites (Liu *et al.* 2014). La création de nouveaux variants peut également apporter des réponses aux enjeux de sécurité sanitaire ou de qualité des produits. Par exemple, l'inactivation par TALEN du gène de la  $\beta$ -lactoglobuline, protéine du lait et allergène majeur, a été réalisée, donnant naissance à des animaux produisant un lait hypoallergénique dépourvu de  $\beta$ -lactoglobuline (Wei *et al.* 2018). De façon générale, l'édition du génome peut contribuer à créer des animaux plus efficaces et en meilleure santé, à produire des produits de meilleure qualité, à améliorer la compétitivité économique des races locales et à réduire l'empreinte environnementale de l'élevage. Toutefois, la connaissance du fonctionnement du génome ne permet pas encore aujourd'hui d'évaluer



**Figure 2** : Impact de l'édition génomique sur le progrès génétique. Adaptée de Hickey *et al.* 2016.

avec certitude toutes les conséquences directes et indirectes d'une néo-mutation, sur l'individu édité ou sa descendance. Dans le cas du gène CD163 porcine par exemple, la protéine joue un rôle clé dans l'élimination par les macrophages du complexe hémoglobine-haptoglobine et protège les tissus contre d'éventuels dommages oxydatifs. Elle jouerait également un rôle dans l'induction locale de l'inflammation en réponse à des bactéries. Son absence dans l'organisme édité pourrait donc engendrer des effets négatifs collatéraux non encore identifiés. Comme le produit des néo-mutations n'a jamais été observé dans la nature, leur création et leur diffusion divisent le monde scientifique et constituent potentiellement une source d'inquiétude pour le grand public.

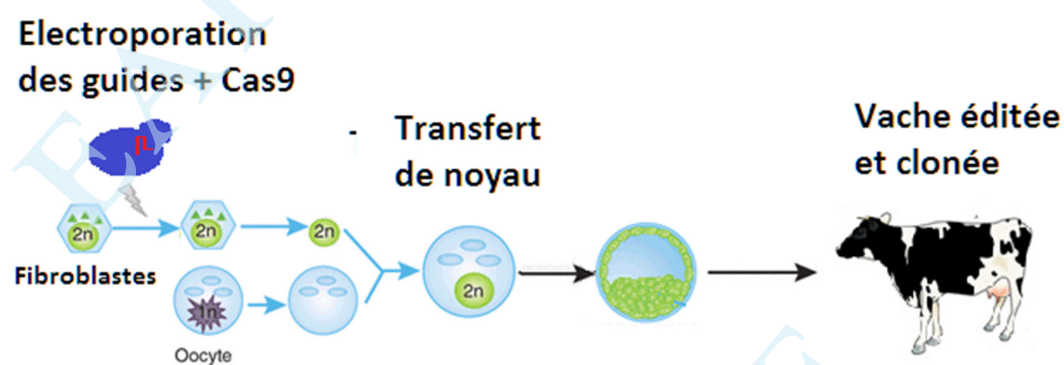
### LA FILIÈRE GÉNÉTIQUE BOVINE PRÉSENTE UN CONTEXTE FAVORABLE

Actuellement, deux approches différentes sont utilisées pour produire des bovins « à génomes édités » : la mutagenèse de

cellules somatiques suivie d'un clonage somatique, ou la mutagenèse du zygote.

L'édition de fibroblastes (**Figure 3a**) permet d'atteindre des taux de mutagenèse élevés et de contrôler *in vitro* la spécificité de l'édition. L'utilisation du clonage somatique permet ensuite de produire des embryons et des animaux édités. La plupart des bovins édités décrits actuellement ont été produits de la sorte, ce qui, en Europe, ne favorise pas l'acceptabilité sociétale de la technologie. La micro-injection dans le zygote (**Figure 3b**) permet d'éviter l'étape de clonage, mais l'efficacité de mutagenèse est plus faible et les embryons obtenus sont parfois mosaïques. Il est possible de sélectionner les embryons édités par séquençage de produits de PCR après biopsie, mais les quantités d'ADN obtenues ne permettent pas actuellement de réaliser un séquençage complet du génome pour vérifier la spécificité de l'édition. La **Figure 4** représente un schéma de sélection type, en présentant les étapes et éléments d'organisation susceptibles de faciliter l'usage de l'édition génomique au sein de la filière génétique bovine.

#### a) Edition des cellules somatiques puis transfert nucléaire



#### b) Edition du zygote par micro-injection

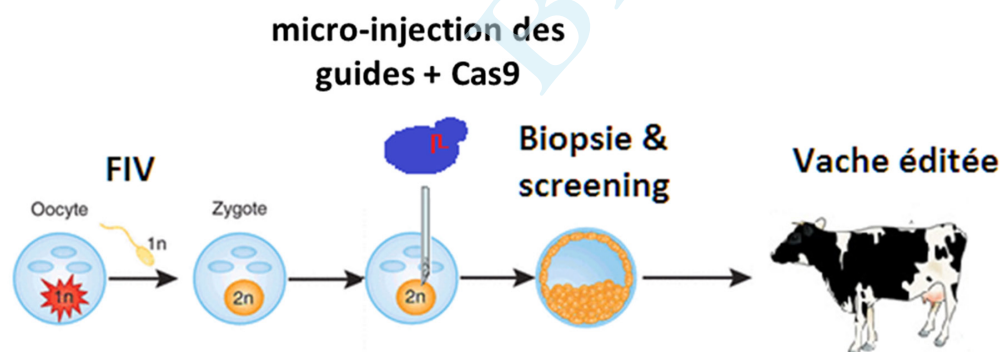


Figure 3 : Stratégies de création de bovins « édités »

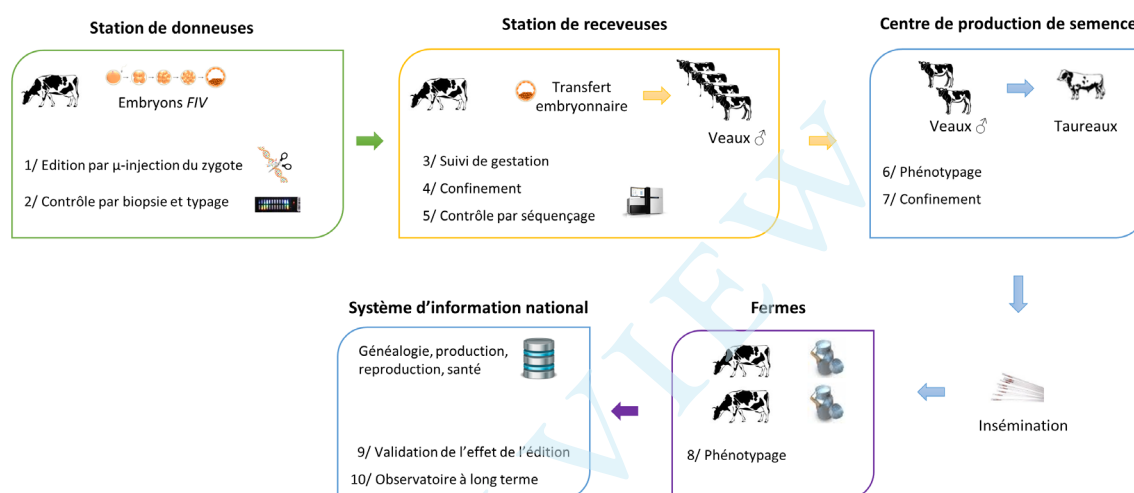


Figure 4 : facteurs clé d'un schéma de sélection, facilitant l'implémentation de l'édition génomique.

L'édition du zygote pourrait être implémentée dans les stations de donneuses d'ovocytes, où la production d'embryons *in vitro* est d'ores et déjà employée pour augmenter le potentiel de reproduction des femelles élites afin d'optimiser les schémas de sélection et d'accroître le progrès génétique. Seuls les embryons mâles correctement édités pourraient être réimplantés, sur des receveuses hébergées au sein de stations des coopératives, permettant ainsi un suivi de la gestation et le confinement des animaux édités, le temps en particulier de vérifier à la naissance l'absence de mutations « hors cible » par séquençage complet. L'élevage des veaux puis la production de semence s'effectue dans des stations d'élevage et des centres de production de semence qui permettraient d'organiser un phénotypage détaillé des animaux édités, de façon à s'assurer de leur bonne santé et de l'absence d'effet négatif avant diffusion de leur semence. Contrairement aux végétaux, où la contamination par dissémination involontaire non contrôlée constitue un risque important, la dissémination volontaire des animaux édités par insémination permet une traçabilité totale. En effet, la sélection bovine et la production des semences de haute valeur génétique repose sur un dispositif collectif très organisé, s'appuyant notamment sur des coopératives et autres organismes pilotés par des éleveurs ainsi qu'un système d'information centralisant les données de généalogies, les informations génomiques et les performances des animaux. Cette organisation garantit l'identification de tous les bovins et l'enregistrement de tous les actes d'insémination dans le système d'information national, permettant l'établissement des parentés. La collecte en routine de nombreux phénotypes en ferme et leur enregistrement dans le système d'information national permet la mise en place d'un observatoire des animaux « à génome édités » visant à mesurer l'intérêt de l'édition et vérifier l'absence d'éventuels effets indésirables, même sur le long terme.

## L'ACCEPTABILITÉ SOCIÉTALE EN QUESTION

En dépit d'un intérêt indéniable des applications de l'édition génomique, les risques potentiels et les interrogations éthiques soulevées par une telle capacité d'intervention sur le vivant méritent des débats au sein de la société. Plusieurs juridictions se penchent actuellement sur le sujet. Le département de l'agriculture des Etats Unis (USDA) a rendu fin mars 2018 un avis, excluant les plantes éditées de la réglementation sur les biotechnologies, dès lors que la modification aurait pu être obtenue naturellement. En France, la Confédération paysanne et huit autres associations ont formé devant le Conseil d'État français un recours portant sur la réglementation française qui exempte les organismes obtenus par mutagenèse des obligations imposées par la directive « OGM » 2001/18/CE du 12 mars 2001. Pour les requérants, l'utilisation de variétés de semences rendues résistantes à un herbicide par édition génomique comporte un risque de dommages importants pour l'environnement ainsi que pour la santé humaine et animale, au même titre que les OGM obtenus par transgénèse. Le Conseil d'État a saisi la Cour de Justice de l'Union Européenne (CJUE) par voie de question préjudicielle, pour répondre à la question de savoir si les plantes obtenues par mutagenèse doivent être soumises à la réglementation OGM. Dans ses conclusions de Janvier 2018, l'avocat général de la CJUE considère qu'un organisme obtenu par mutagenèse peut être un OGM s'il remplit les critères matériels prévus par la directive OGM, en particulier si son matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle. Pour lui, les techniques de mutagenèse sont exemptées des obligations de la directive OGM à condition qu'elles n'impliquent pas l'utilisation de molécules d'acide nucléique recombinant ou d'OGM et préconise un examen au cas par cas. Ceci implique une obligation d'information sur la méthode d'obtention des organismes édités et la traçabilité de la technique. Enfin, il considère que les États membres peuvent prendre des mesures spécifiques et légiférer sur les organismes obtenus par mutagé-

nèse. Compte tenu de la multiplicité des approches exploitant l'édition du génome et de la diversité des applications possibles, il est étonnant que le débat se focalise sur la technologie en elle-même plutôt que sur ces applications. Il serait certainement plus judicieux de distinguer plusieurs cas de figure, en fonction de l'application. Ainsi, l'introduction de mutations existantes dans d'autres races ne devrait pas être soumise à la directive OGM car il n'est pas nécessaire d'en évaluer l'effet. L'introduction de néo-mutation pourrait en revanche justifier une évaluation des risques au cas par cas, en fonction des connaissances sur le gène et son rôle dans l'organisme. L'introduction de nouveaux gènes étant similaire à la transgénèse, il est évident que cette application est soumise à la directive OGM. L'avis de la Cour de Justice de l'Union Européenne a finalement été publié en Juillet 2018, dans l'intervalle séparant la présentation en séance et la publication de ce texte. A rebours des conclusions de l'avocat général, il stipule que les organismes obtenus par mutagenèse ciblée sont considérés comme OGM, ce qui conduit à une situation ubuesque où des règles différentes seront appliquées à des animaux ayant un génome identique, en fonction de la méthode utilisée pour les créer. Le problème du contrôle et de la détection des animaux « à génome édité », et de leurs produits (gamètes, embryons, lait, viande...) à l'importation va également se poser de façon aigue.

## CONCLUSION

Ces technologies constituent une innovation de rupture potentielle. L'enjeu est donc fort pour l'élevage et en particulier les acteurs de la filière génétique. Dans le contexte actuel de controverse sociétale sur l'élevage et compte tenu du risque d'image pour les filières, les entreprises de sélection françaises fédérées au sein d'ALLICE ont décidé de ne pas utiliser ces technologies pour produire en France des animaux « à génome édité ». Toutefois, Allice s'investit avec l'INRA dans le développement de la technologie chez les bovins à des fins de recherche et d'évaluation des risques. L'utilisation de ces technologies fait actuellement l'objet de débats au sein de la filière, avec pragmatisme et réalisme. Car si ces technologies permettent d'espérer plus de progrès génétique et une amélioration du bien-être animal, les avancées possibles chez les ruminants restent actuellement limitées par le faible nombre de mutations d'intérêt identifiées au cours des 10 dernières années. Enfin, la traçabilité des animaux « à génome édité » importés en France doit être maîtrisée, faute de quoi la confiance du consommateur serait ébranlée et tout le système d'évaluation génomique biaisé.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bevacqua RJ, Fernandez-Martin R, Savy V, Canel NG, Gismondi MI, Kues WA *et al.* Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology* 2016; 86:1886-1896 e1881.
- Bhat SA, Malik AA, Ahmad SM, Shah RA, Ganai NA, Shafi SS *et al.* Advances in genome editing for improved animal breeding: A review. *Veterinary world* 2017; 10:1361-1366.
- Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D *et al.* Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nature biotechnology* 2016; 34:479-481.
- Choi W, Kim E, Yum SY, Lee C, Lee J, Moon J *et al.* Efficient PRNP deletion in bovine genome using gene-editing technologies in bovine cells. *Prion* 2015; 9:278-291.
- Eriksson S, Jonas E, Rydhmer L, Rocklinsberg H. Invited review: Breeding and ethical perspectives on genetically modified and genome edited cattle. *Journal of dairy science* 2018; 101:1-17.
- Gao Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Chen L, Li Q *et al.* Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome biology* 2017; 18:13.
- Haeussler M & Concordet JP. Genome Editing with CRISPR-Cas9: Can It Get Any Better? *Journal of genetics and genomics* 2016; 43:239-250.
- Hickey JM, Bruce C, Whitelaw A, Gorjanc G. Promotion of alleles by genome editing in livestock breeding programmes. *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 2016; 133:83-84.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157:1262-1278.
- Ikeda M, Matsuyama S, Akagi S, Ohkoshi K, Nakamura S, Minabe S *et al.* Correction of a Disease Mutation using CRISPR/Cas9-assisted Genome Editing in Japanese Black Cattle. *Scientific reports* 2017; 7:17827.
- Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell* 2016; 164:18-28.
- Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G *et al.* Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 2014; 281:20133368.
- Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, Long CR, Pryor JH, King TJ *et al.* Genome edited sheep and cattle. *Transgenic research* 2015; 24:147-153.
- Reardon S. Welcome to the CRISPR zoo. *Nature* 2016; 531:160-163.
- Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature reviews Genetics* 2015; 16:299-311.
- Wei J, Wagner S, Maclean P, Brophy B, Cole S, Smolenski G *et al.* Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin. *Scientific reports* 2018; 8:7661.
- Whitworth KM, Rowland RR, Ewen CL, 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 H, Wang Y, Zhang Y, Yang M, Lv J, Liu J *et al.* TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112:E1530-1539.