

ÉDITION GÉNOMIQUE ET OGMs : QUELLES DIFFÉRENCES ? AVANCÉES RÉCENTES POUR LE CONTRÔLE DES MALADIES INFECTIEUSES

GENOME EDITING & GMOS: WHICH ARE THE DIFFERENCES? RECENT ADVANCES FOR THE CONTROL OF INFECTIOUS DISEASES

Par Martina CRISPO

(Communication présentée le 26 janvier 2023, Note acceptée 25 mai 2023)

Mots-Clés : CRISPR, Une santé, transgénèse, animaux d'élevage, PRRSV.

Keywords: CRISPR, One health, transgenesis, livestock, PRRSV.

INTRODUCTION

Les nouvelles techniques d'édition génomique permettent de remplacer en partie les techniques classiques de transgénèse en raison de leur facilité d'utilisation, leur efficacité et leur précision. Ces techniques permettent de générer des organismes végétaux et animaux génétiquement modifiés avec plus de sécurité pour la consommation humaine ou animale, à condition qu'elles soient utilisées de manière appropriée. Parmi les diverses applications, figurent en particulier les améliorations de l'alimentation, la résistance aux maladies infectieuses chez les animaux et le développement des vaccins. Dans cette note seront décrites les principales différences entre l'édition génomique et les techniques classiques de modification du génome, ainsi que quelques modèles développés chez les animaux d'élevage pour accroître leur résistance aux maladies infectieuses.

DIFFÉRENCES ENTRE ORGANISME GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉ (OGM) ET ÉDITION GÉNOMIQUE

Selon la directive européenne 2001/18/CE, un OGM est défini comme un « organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ». Cette définition a été établie sur la base des techniques classiques de génie génétique dans les-

quelles les organismes génétiquement modifiés sont produits en insérant, dans le génome d'une espèce, de l'ADN étranger provenant d'une espèce différente. Ce processus qui permet d'introduire un nouveau caractère et a été largement utilisé pour générer la majorité des végétaux OGM (Basso *et al.* 2020) et plusieurs modèles d'animaux transgéniques (Menchaca *et al.* 2017). Toutefois, son usage à des fins agronomiques soulève de nombreuses objections scientifiques et écologiques et un rejet important dans la société civile.

L'édition génomique recouvre un ensemble de techniques récentes dans lesquelles la séquence d'une région particulière du génome d'un organisme est modifiée pour en changer les propriétés. Contrairement aux méthodes classiques, ces techniques n'impliquent pas l'introduction d'ADN d'une autre espèce dans l'organisme mais consistent à modifier la séquence génomique de l'espèce en utilisant des enzymes capables de couper la molécule d'ADN (appelées nucléases) pour cibler et modifier un gène spécifique ou un ensemble de gènes. Il existe différents outils d'édition génomique, tels que CRISPR/Cas développé en 2012 (Jinek *et al.* 2012, Cong *et al.* 2013), les nucléases à doigt de zinc (ZFN) et les TALEN, qui ont fait l'objet d'une revue récente dans ce bulletin (Guénet 2021). La technologie la plus utilisée est CRISPR/Cas qui permet, de manière simple et efficace, de générer une construction moléculaire basée sur un ARN guide qui va se lier exactement au site du génome que l'on veut éditer, et une enzyme Cas dont la fonction est de couper l'ADN à l'endroit où l'ARN guide s'est fixé. Les coupures de l'ADN réalisées

1- ORCID 0000-0002-9852-5563, Laboratory Animals Biotechnology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, Uruguay.
Courriel : crispo@pasteur.edu.uy

par la Cas peuvent être réparées par ligation des deux fragments d'ADN (mécanisme appelé *Non Homologous End Joining*), cette réparation se traduisant par la perte de quelques nucléotides au niveau du site de coupure, donc par l'altération de la séquence protéique conduisant généralement à une perte de la fonction (*Knock-Out*). Un autre mécanisme appelé *Homologous Directed Repair* permet, en apportant un court fragment d'ADN (appelé matrice de réparation), de réparer cette coupure en introduisant une modification précise de la séquence du gène. Cette technique CRISPR/Cas est à la fois plus rapide, plus efficace, plus précise et moins coûteuse que les techniques précédentes.

APPLICATIONS DE L'ÉDITION GÉNOMIQUE

La facilité de mise en œuvre et l'efficacité de CRISPR/Cas ont permis à cette technique d'être utilisée dans une diversité d'applications et d'espèces comme les végétaux et les animaux. En ce qui concerne les espèces animales d'élevage, elle a ouvert les portes à un large éventail d'applications telles que l'augmentation de la production animale (Crispo *et al.* 2015), l'amélioration du bien-être et de la résilience des animaux, l'amélioration de la santé animale et de la résistance aux maladies ou la lutte contre les vecteurs de maladies et les nuisibles (Menchaca 2021). Il faut souligner qu'avant l'ère CRISPR/Cas, les modèles génétiquement modifiés chez les grands animaux étaient très difficiles à réaliser et peu variés. En ce qui concerne les animaux d'élevage, l'augmentation de la production pour répondre à la demande d'une population mondiale en croissance constante doit intégrer les enjeux « *One Health* », en particulier liés à l'élevage intensif qui facilite l'évolution et l'adaptation des agents pathogènes à l'Homme. Les productions animales doivent également prendre en compte la résilience aux changements climatiques, la résistance aux antibiotiques, le contrôle des épidémies zoonotiques et préserver le bien-être animal. L'édition génomique peut contribuer à répondre à ces enjeux.

CONTRÔLE DES MALADIES INFECTIEUSES

Un bon exemple de l'apport de l'édition génomique pour conférer à des animaux d'élevage une résistance à des maladies infectieuses concerne le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (PRRS). Le PRRS est une maladie responsable de lourdes pertes économiques qui affecte particulièrement les élevages porcins industriels dans le monde et contre lequel les vaccins offrent une faible protection en raison de la diversité génétique du virus. Le récepteur cellulaire de ce virus est la molécule CD163, dont l'inactivation par édition génomique a été entreprise indépendamment par deux laboratoires, aux États-Unis et au Royaume-Uni, montrant que la génération de porcs résistants au virus du PRRS répond à un enjeu à l'échelle mondiale.

Le groupe de Whitworth a inactivé totalement le récepteur du virus CD163 et a ensuite exposé des porcs modifiés et non modifiés (contrôles) au virus, avec des résultats très prometteurs (Whitworth *et al.* 2016). Pour les porcs contrôles, la virémie est apparue au jour 4 de l'infection, a atteint un pic au jour 11 puis a diminué jusqu'à la fin de l'étude. En revanche, l'ARN

viral n'a jamais été détecté chez les porcs à génome édité au cours de la période d'étude. La réponse en anticorps a atteint un plateau à partir du jour 14 chez les porcs contrôles, alors que les porcs à génome édité sont restés séronégatifs, montrant qu'ils n'avaient pas été infectés. L'analyse histologique pulmonaire des porcs contrôles a montré des lésions habituelles du PRRS, y compris un œdème interstitiel avec une infiltration de cellules mononucléées constituées de lymphocytes et de plasmocytes ainsi que d'un nombre moindre de macrophages. Au contraire, les porcs à génome édité présentaient une histologie normale. Ces données montrent que les porcs dont le gène CD163 avait été inactivé par édition génomique étaient totalement protégés contre une inoculation du PRRSV et un co-hébergement avec des congénères infectés.

D'autre part, le groupe de Burkard *et al.* (Institut Roslin) a ciblé le récepteur CD163 dans l'exon 7 de façon à conserver l'expression du récepteur CD163 mais en supprimant le domaine d'interaction avec le virus du PRRS (Burkard *et al.* 2018). Cette stratégie permet de préserver les fonctions biologiques de la protéine, dont l'inactivation totale peut avoir un impact physiologique négatif sur l'animal, en particulier en ce qui concerne la réponse inflammatoire et/ou la réponse à l'infection par d'autres agents pathogènes. Les auteurs ont pu vérifier que les taux sériques de CD163 soluble (sCD163) n'étaient pas différents entre porcs modifiés et contrôles. Ils ont infecté les deux groupes de porcs avec du PRRSV-1 qui n'induit pas de symptômes respiratoires ou de signes comportementaux. La température rectale des porcs contrôles a été significativement augmentée, alors qu'elle est restée inchangée chez les porcs à génome édité. Le gain de poids de ces derniers a été supérieur à celui de leurs congénères non modifiés sur toute la période et significativement plus élevé au cours des jours 7 à 14. Alors que les porcs contrôles ont présenté une virémie élevée, aucun ARN viral n'a été détecté dans le sérum des porcs à génome édité. Comme dans la première étude, des anticorps anti-PRRSV ont été détectés chez les porcs contrôles à partir du jour 7 et présents à des niveaux élevés aux jours 10 et 14 mais n'ont pas été détectés dans le sérum des porcs à génome édité. Des lésions pulmonaires microscopiques caractérisées par une pneumonie interstitielle multifocale diffuse avec des pneumocytes de type 2, une hypertrophie et une hyperplasie n'ont été observées que chez les animaux contrôles. En conclusion, aucun signe d'infection n'a été détecté chez les animaux à génome édité malgré un inoculum infectieux élevé et l'exposition persistante à des congénères contrôles infectés qui excrètent activement le virus.

Un autre modèle intéressant qui a été développé concerne des poulets résistants au virus de la leucose aviaire. Depuis son identification lors de la première épizootie au Royaume-Uni, le sous-groupe J du virus de la leucose aviaire (ALV-J) est une préoccupation importante pour l'industrie avicole. Il n'existe actuellement aucun vaccin efficace pour prévenir l'infection par l'ALV-J. Le récepteur du virus a été identifié comme étant l'échangeur Na⁺/H⁺ de type 1 (gène *chNHE1*). Le groupe de Koslová a généré des poulets résistants au virus en modifiant l'exon 1 du récepteur *chNHE1* par édition génomique. Treize jours après l'inoculation du virus, tous les poulets hétérozygotes et les poulets contrôles présentaient une virémie, alors que tous

les poulets à génome édité sont restés avirémiques, montrant ainsi leur résistance à l'ALV-J (Koslova *et al.* 2020).

Plusieurs exemples de modèles obtenus par édition génomique chez les porcs et les poulets associés à une résistance à des maladies infectieuses comme la peste porcine africaine, la peste porcine classique, la gastro-entérite transmissible, le coronavirus delta du porc et la maladie de Marek, ou la suppression de rétrovirus endogènes chez le porc, sont décrits dans une revue récente de Sollner *et al.* (2021).

CONCLUSION

En conclusion, à l'inverse des techniques de modification génétique classiques qui ont conduit à la définition des OGMs, l'édition génomique n'introduit pas d'ADN exogène dans le génome mais modifie la séquence d'un individu de façon ciblée et précise. Par son vaste champ d'application, en particulier dans le domaine de la résistance aux maladies infectieuses, l'édition génomique peut contribuer à répondre aux enjeux actuels et futurs des productions animales.

BIBLIOGRAPHIE

- Basso MF, Arraes FBM, Grossi-de-Sa M, Moreira VJV, Alves-Ferreira M, Grossi-de-Sa MF. Insights Into Genetic and Molecular Elements for Transgenic Crop Development. *Frontiers in Plant Science*. 2020; 11: 509.
- Burkard C, Opriessnig T, Mileham AJ, Stadejek T, Ait-Ali T, Lillico SG, *et al.* Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. *Journal of virology*. 2018; 92(16): e00415-18
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 2013;339(6121):819-823.
- 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(8): e0136690.
- Guénet JL. L'édition génomique des animaux domestiques : quels enjeux et quel avenir ? *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 2021; 174: 167-179.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337(6096): 816-821.
- Koslova A, Trefil P, Mucksova J, Reinsova M, Plachy J, Kalina J, *et al.* Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(4):2108-2112.
- Menchaca A, Schlapp G, Noel Meikle M, Crispo M. Transgenesis and Gene Editing in Mammals. Reference Module in Life Sciences: Elsevier; 2017.
- Menchaca A. Sustainable Food Production: The Contribution of Genome Editing in Livestock. *Sustainability*. 2021; 13(12): 6788.
- Sollner JH, Mettenleiter TC, Petersen B. Genome Editing Strategies to Protect Livestock from Viral Infections. *Viruses*. 2021; 13(10): 1993
- 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(1): 20-22.