

MODIFICATIONS CIBLÉES DU GÉNOME ("GENOME EDITING") CHEZ LES ANIMAUX D'ÉLEVAGE : OÙ EN EST-ON EN FRANCE ET EN EUROPE ?

GENOME EDITING IN FARM ANIMALS: WHERE WE ARE IN FRANCE AND IN EUROPE?

Par Eric PAILHOUX¹ & Jean-Luc VILOTTE²

(Communication présentée le 26 janvier 2023, manuscrit accepté le 6 mars 2023)

RÉSUMÉ

Des nouvelles nucléases permettent de modifier de façon ciblée le génome de nombreuses espèces. Concernant les animaux de rente, les applications envisagées peuvent se classer dans trois grandes perspectives : (i) les projets à visée de recherche fondamentale, notamment lorsque les espèces modèles (souris, poisson zèbre, ...) ne peuvent pas être utilisées (cornage, saisonnalité, rumination, à titre d'exemples) ; (ii) les projets à visée biomédicale pour créer des animaux modèles de pathologies humaines ; et (iii) les projets à visée agronomique pour apporter un caractère favorable, décrit dans une autre espèce ou race, à une race ou une espèce ne possédant pas ce caractère. La législation européenne qui classe les animaux ainsi obtenus comme OGM limite le développement de ces approches et le financement des recherches finalisées associées. Nous illustrerons ici, à travers l'exemple d'un des rares projets européen utilisant ces outils, leurs potentiels, leurs limites et le paradoxe induit par une réglementation qui semble inappropriée, ou a minima moins en adéquation que celles mises en place dans d'autres régions du globe.

Mots-Clés : Modifications ciblées du génome ; animaux de rente ; applications

ABSTRACT

New nucleases make it possible to modify the genome of many species in a targeted manner. With regard to livestock, the applications envisaged can be classified into three main categories: (i) projects aimed at fundamental research, particularly when model species (mouse, zebrafish, etc.) cannot be used (for horn development, seasonality, rumination, as examples); (ii) projects aimed at biomedical research to create animal models of human pathologies; and (iii) projects aimed at agronomy to bring a favorable trait, described in another species or breed, to a breed or species that does not have this trait. European legislation classifying animals obtained by this way as GMOs limits the development of these approaches and the funding of associated research. We will illustrate here, through the example of one of the rare European projects using these tools, their potential, their limits and the paradox induced by regulations that seem inappropriate, or at least less appropriate than those put in place in other regions of the world.

Key-Words: Genome editing, Livestock, NBT: New Breeding Techniques

1- Directeur de Recherche à INRAE ; Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, Jouy-en-Josas, France. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, BREED, Maisons-Alfort, France. Courriel : eric.pailhoux@inrae.fr

2- Directeur de Recherche à INRAE ; Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas, France.



INTRODUCTION

La découverte et la maîtrise des nouveaux outils que sont de nouvelles nucléases ou « ciseaux moléculaires » permet, au moins en théorie, de modifier le génome de beaucoup d'espèces de façon ciblée : c'est-à-dire à un endroit précis et défini dudit génome. L'utilisation de ces nucléases a été qualifiée de « *genome editing* » (GE) en anglais et, faute de mieux, maladroitement traduit par « édition du génome » en français. Ces nucléases sont, dans l'ordre chronologique de développement : (i) les méganucléases, (ii) les nucléases à doigts de zinc (ZFN: *Zinc Finger Nuclease*) et (iii) les TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*). À cela est venu plus récemment s'ajouter le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats - CRISPR-associated gene 9*) (Razzaq *et al.* 2019). Ce dernier outil semble tellement prometteur dans ses différentes applications que leurs découvreuses Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier ont reçu le prix Nobel de chimie en 2020 (Wang & Doudna, 2023). Les champs d'application où ces outils pourraient être utiles sont très variés et couvrent de nombreux domaines de la génétique : de la thérapie génique en clinique humaine à la sélection génétique des plantes et des animaux, sans oublier les micro-organismes et la biologie de synthèse (Wang and Doudna, 2023). Concernant les animaux de rente, les applications envisagées peuvent se classer dans trois grandes perspectives : (i) les projets à visée de recherche fondamentale, principalement lorsque les autres modèles plus classiquement utilisés (souris, poisson zèbre,...) s'avèrent soit physiologiquement divergents (cas de la différenciation des gonades), soit inappropriés (études du développement des cornes ou de la saisonnalité, à titre d'exemples) ; (ii) les projets à visée biomédicale pour créer des animaux modèles de pathologies humaines là où à nouveau les autres espèces ne satisfont pas (Kleinert *et al.* 2018) ou également, plus spécifiquement chez le porc, pour modifier le génome des animaux afin que leurs organes soient utilisables en xénotransplantation chez l'Homme (Cooper & Pierson, 2023) ; et (iii) les projets à visée agronomique ou de bien-être pour apporter un caractère favorable (déjà décrit dans une espèce ou une race) à une espèce ou une race ne possédant pas ce caractère (alternative à l'introgession, création d'un nouveau génotype, abolition de la barrière d'espèce), pour corriger des mutations délétères apparues dans des génotypes par ailleurs performants ou pour induire des caractères de santé ou de résistance aux agents pathogènes spécifiques d'une espèce ou présentant au contraire un spectre large mais une étiologie variée. En agronomie, ces technologies sont actuellement envisagées pour accroître l'efficacité de la sélection génomique, mise en place dans les principales races bovines depuis une dizaine d'années, et qui est susceptible de s'étendre à d'autres races et espèces dans le futur. Les caractères ciblés sont liés à la production animale mais également au bien-être et à la santé des animaux telle que les résistances à certaines pathologies (Van Eenennaam 2017).

Malgré l'engouement international autour de ces nouvelles technologies et du potentiel offert par leur utilisation pour proposer de nouveaux cultivars et de nouveaux animaux dans le domaine agronomique, l'Europe a mis un frein (voire « un coup

d'arrêt » concernant le monde animal) dans ce domaine, en décrétant que les organismes ainsi obtenus sont considérés comme « génétiquement modifiés » et classés OGM (décret de la cour de justice européenne (CJUE) du 25 Juillet 2018, (affaire C528/16)). Suite à cette décision de la CJUE, les entreprises européennes de sélection en génétique animale n'investissent pas (ou peu) dans les applications potentielles de ces technologies, ce qui entraîne également un frein conséquent dans les recherches publiques institutionnelles dans ce domaine. Pour illustrer cet aspect, il faut noter qu'à notre connaissance, au niveau européen un seul appel d'offre à projets de recherche évoquant l'utilisation des techniques de GE chez les animaux d'élevage a été proposé ces dernières années (H2020 – SFS13). Deux projets, coordonnés par INRAE ont été obtenus et financés suite à cet appel d'offre, (i) le projet GERONIMO qui concerne les espèces monogastriques (porc et volaille) et le projet RUMIGEN qui s'intéresse aux ruminants et plus spécifiquement aux races bovines.

LE PROJET RUMIGEN ET LA PLACE DU « GENOME EDITING » DANS CE PROJET

Le projet RUMIGEN est mené par un consortium de 18 partenaires européens localisés dans 9 pays de l'union (<https://rumigen.eu/>). L'objectif du projet est d'améliorer les schémas de sélection en races bovines, pour les races qui sont gérées par la sélection génomique. Pour ce faire, le consortium vise à implémenter les critères de sélection actuellement utilisés par la prise en compte :

- (i) de nouveaux caractères phénotypiques tel que la résistance au changement climatique et notamment au stress thermique, ou génotypiques en préservant la diversité génétique de différentes races locales (Montbéliarde, Abondance, Tarentaise...) ou internationales (Holstein) ;
- (ii) d'informations épigénétiques, notamment les marques de méthylation de l'ADN, évaluées par le développement d'un outil d'épigénotypage à grande échelle et dont l'utilisation pourrait renforcer la justesse des prédictions des équations de sélection;
- (iii) du potentiel des nouvelles technologies applicables à l'élevage (NBT : *New Breeding Technics*) qui comprennent essentiellement le GE.

De plus, le projet RUMIGEN comporte un important volet en sciences humaines et sociales qui vise à évaluer l'acceptabilité sociétale des différentes technologies d'élevage. Il s'agira ici de construire un « champ d'acceptabilité » délimitant ce qui pourrait être envisagé. L'ensemble de ces approches devra *in fine* permettre au consortium de proposer de nouveaux schémas de sélection acceptables par les citoyens européens.

La part du GE dans le projet RUMIGEN reste exploratoire. (Figure 1). Le travail comprend des études théoriques sur l'utilisation potentielle du GE dans les schémas de sélection et pour la préservation de la biodiversité au sein de races locales et des aspects plus appliqués, scindés en quatre différentes parties. Une première activité consiste à réaliser et à publier un état des lieux des exemples d'utilisation du GE chez les ruminants d'élevage. Un deuxième aspect va s'attacher à quantifier l'impact que pourrait avoir l'utilisation du système CRISPR/Cas9 sur la génération de mutation *de novo* aux premiers stades de l'embryogénèse, et

de comparer cet impact à celui de culture *in vitro* d'embryons bovins. Enfin, deux exemples d'application du GE chez les petits ruminants vont être développés au cours du projet. Un exemple chez le mouton qui vise à illustrer la possibilité de reproduire une mutation d'une espèce dans une autre (mutation SLICK) ; et le second chez la chèvre qui ambitionne de comparer la transmission d'une mutation par croisements naturels (introgression) versus par GE (mutation PRNP/PRION). Brièvement pour le premier exemple chez l'ovin, le travail est mené à l'institut Roslin d'Edinbourg où un variant du gène PRLR (mutations SLICK apparues naturellement en races bovines), codant pour le récepteur de la prolactine, va être introduit chez des moutons de race Suffolk. Ces mutations particulières du gène PRLR raccourcissent la protéine correspondante et induisent un pelage à poils courts, lisses et moins denses chez les animaux mutants qui, par conséquent, sont plus résistants aux stress thermique. D'ailleurs, les mutations naturelles sont apparues dans des régions tropicales, chez des races bovines très exposées aux fortes températures (Porto-Neto *et al.* 2018).

MUTATION DU GÈNE PRNP CHEZ LA CHÈVRE CONFÉRANT UNE RÉSISTANCE AUX MALADIES À PRION : ILLUSTRATION DU PARADOXE JURIDIQUE EUROPÉEN

Il est démontré, notamment chez la souris, que l'inactivation du gène PRNP, codant la protéine PrP, entraîne une résistance complète aux maladies à Prion. Ces pathologies résultent d'un repliement anormal de la protéine PrP entraînant des atteintes neurologiques appelées protéinopathies. De telles affections se retrouvent chez de nombreuses espèces animales dont l'espèce humaine. Récemment, une mutation naturelle du gène PRNP a été décrite chez certaines chèvres Norvégiennes (Figure 2). Cette mutation est caractérisée par le changement d'un seul nucléotide qui introduit un codon STOP au début du cadre de lecture du gène, ce qui entraîne une absence totale de protéine PrP et une résistance complète à la survenue d'une tremblante (Benestad *et al.* 2012 ; Salvesen *et al.* 2020). Dans le cadre du projet RUMIGEN, nous souhaitons transférer cette mutation de l'espèce caprine Norvégienne (race d'origine) à l'espèce Alpine (race « cible »), très utilisée en France pour ses caractéristiques laitières et la production fromagère. Le transfert de cette mutation va être effectué via les deux procédures possibles actuellement, (i) soit par croisements naturels et insémination artificielle de chèvres Alpines avec de la semence de boucs Norvégiens porteurs homozygotes de la mutation (PRNP^{-/-}) ; (ii) soit par GE en utilisant le système CRISPR/Cas9 et un ADN homologue porteur de la mutation afin d'induire par recombinaison homologue, le « recopiage » à l'identique de la mutation Norvégienne dans la race Alpine (Figure 2). La première stratégie dénommée « introgression » nécessitera plusieurs années de croisements supervisés pour « re-purifier » le génome des animaux hybrides obtenus (50% Alpine/50% Norvégien en première génération dénommée F1) afin idéalement de conserver *in fine*, que la région génomique contenant l'allèle mutant pour le gène PRNP de la race d'origine (99,9% Alpine/0,1% PRNP^{-/-} Norvégien). Cependant, même après une dizaine de croisements supervisés (10 ans chez la chèvre), les animaux obtenus (F10) conserveront a minima une région génomique (de 1 à 10 millions de bases), autour de la mutation PRNP^{-/-}, de la race Norvégienne d'origine. Autrement dit, par introgression, il est presque impossible de ne transférer que la mutation d'intérêt de la race d'origine à la race cible, contrairement à la technique de GE qui ne recopie que la mutation d'intérêt.

- En résumé, la chèvre Alpine GE présente un génome plus proche d'une autre chèvre Alpine que celui obtenu par introgression et ;

- un génome indistinguishable de celui d'une chèvre Alpine chez qui une mutation serait apparue naturellement au locus PRNP comme cela a été le cas dans la race Norvégienne.

Pourtant, la législation Européenne actuelle classe la chèvre obtenue par la technique de GE comme génétiquement modifiée (OGM). Cela illustre parfaitement le paradoxe de la classification OGM en Europe qui repose sur la « technologie utilisée » et non sur « l'organisme obtenu » comme dans d'autres pays. En effet, un OGM est défini par la directive 2001/18/CE comme « un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas

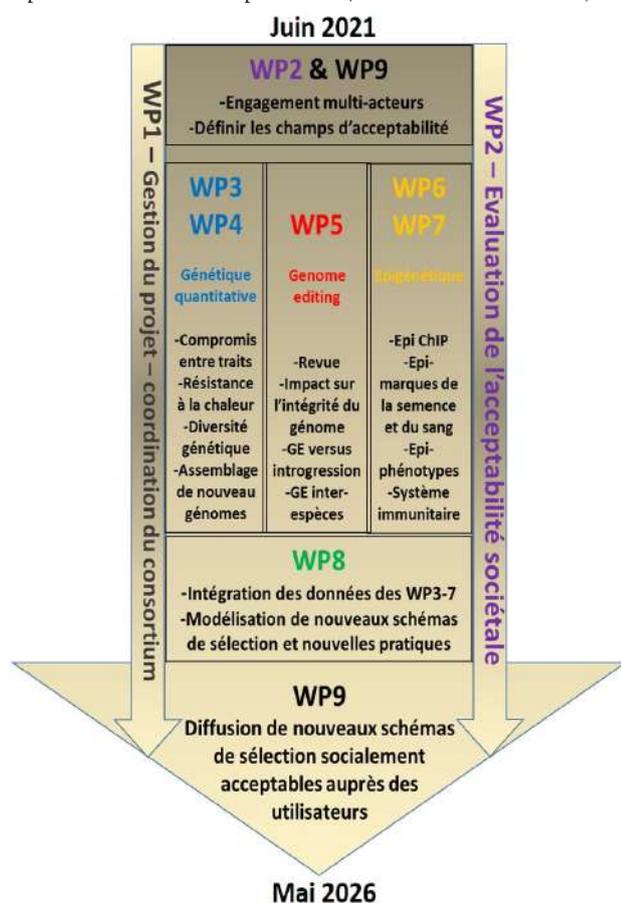


Figure 1 : Résumé du projet H2020 RUMIGEN (GA N°101000226). Le projet est organisé en neuf programmes de travail (WP1 à WP9), mobilisant trois leviers biologiques, la génétique quantitative, l'épigénétique et le GE, ainsi qu'un levier en sciences humaines et sociales. Il est mené par un consortium de dix-huit partenaires européens localisés dans neuf pays différents de l'Union. Pour plus d'informations voir : <https://rumigen.eu>

naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle » (source : <https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-quun-ogm>). Ainsi, cette définition repose sur des notions technologiques, avec des connotations philosophiques et théologiques, assez éloignées de la génétique et des pratiques d'élevage actuelles. En effet, elle revient à classer différemment deux objets pourtant indistinguables sans connaissance préalable de leur origine. Le différentiel induit avec d'autres nations entraîne une forte diminution, voire un arrêt des recherches scientifiques utilisant ces outils, en dehors des domaines purement cognitifs ou à visée thérapeutiques humaines, et des pertes de compétences rapides et drastiques dans le domaine des biotechnologies de la reproduction chez les animaux d'élevage.

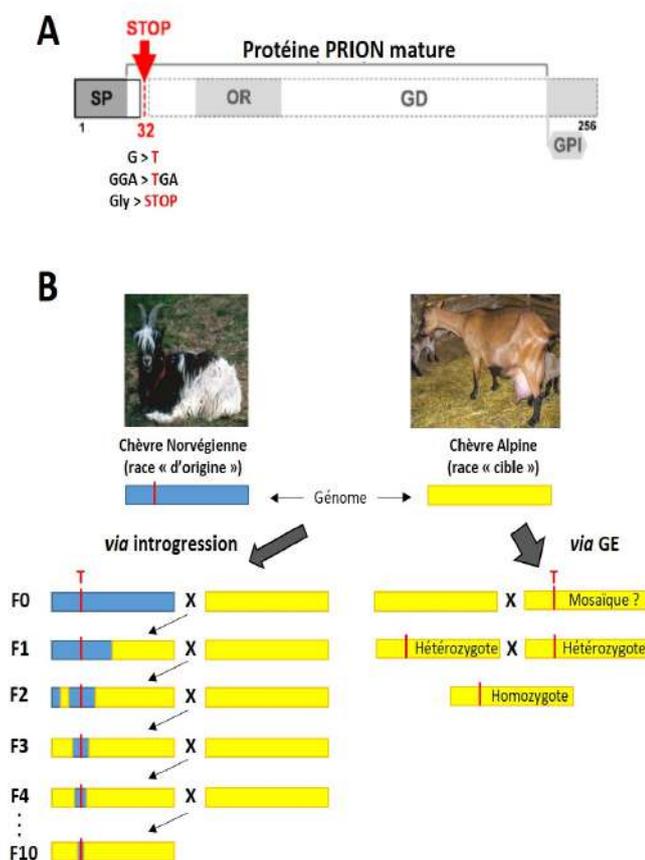


Figure 2 : Mutation du gène PRNP décrite chez les chèvres Norvégiennes et stratégies de transfert en race Alpine. A : La mutation apparue dans la race caprine Norvégienne remplace un « G » par un « T » et conduit à un codon STOP « TGA » en lieu et place du codon « GGA » correspondant à une Glycine. Ce codon STOP annihile la synthèse de la protéine PRION chez les animaux homozygotes pour cette mutation. SP : Peptide Signal ; OR : cinq Répétitions d'un Octapeptide ; GD : Domaine Globulaire ; GPI : ancre GlycoPhosphatidylInositol. B : Deux stratégies de transfert de cette mutation de la race Norvégienne à la race Alpine sont menées dans le cadre du projet H2020 – RUMIGEN, soit par introgression (à gauche), soit par la technique de « genome editing » (GE, à droite). F0 : fondateurs ; F1 : première génération ; F2 : deuxième génération...etc. D'après Benestad et al. (2012).

LES APPORTS POTENTIELS DU « GE » EN ÉLEVAGE

Comme énoncé précédemment, la technique de GE est envisagée pour améliorer la valeur génétique des animaux par deux stratégies, (i) d'une part l'apport d'allèles « favorables » liés, dans la plupart des cas, à des mutations qui vont changer ou annuler la fonction d'un gène (à titre d'exemples, mutations *GDF8/myostatine* ; *PRLR/SLICK* ; *PRNP/PRION*) ou, d'autre part, (ii) la correction et donc l'élimination d'allèles « défavorables » conduisant à des maladies génétiques des animaux et par conséquent des pertes économiques (exemple de l'ataxie progressive du Charolais sur lequel nous reviendrons). Des scénarios d'amélioration génétique de différents animaux d'élevage utilisant le GE à grande échelle sont d'ores et déjà envisagés outre-Atlantique (pour revue, Bishop & Van Eenennaam 2020). Ces scénarios imaginent des modifications génétiques multiples (multiplexage), plus envisageables actuellement sur des cellules embryonnaires souches, et donc l'utilisation des techniques de transfert nucléaire des cellules somatiques modifiées dans des ovocytes énucléés (clonage animal) afin de produire les animaux désirés. Ces scénarios « futuristes » parlent « d'élevage *in vitro* » et utiliseraient à grande échelle toutes les biotechnologies de la reproduction actuellement maîtrisées (clonage animal, transfert d'embryons, insémination artificielle, fécondation *in vitro*, différents types de cellules embryonnaires souches). Ne sachant pas si le futur verra le développement de ce type de scénarios « d'élevage *in vitro* » ou la production de viandes artificielles sans l'utilisation d'animaux (qui sont déjà sur le marché), il faut d'ores et déjà constater que de nombreux animaux produits par GE ont été obtenus (voire commercialisés) dans différents pays hors de l'Union européenne (Bishop & Van Eenennaam 2020). La plupart des exemples publiés concernent des caractères de production avec en « tête de liste » la mutation *GDF8/MSTN/myostatine* qui confère une hypertrophie musculaire (caractère dit « culard ») et qui a été reproduite dans différentes espèces de ruminants d'élevage, mais également chez le porc, le lapin et certains poissons d'élevage et ce, malgré les risques associés connus chez les bovins en terme de bien-être animal et de pratiques d'élevage. Par ailleurs, plusieurs exemples sont liés à des caractères de santé et bien-être animal et visent à conférer des résistances à certaines maladies infectieuses problématiques en élevage, à améliorer l'adaptation des espèces de rente aux changements climatiques (mutation *SLICK*), ou à proposer des alternatives à certaines pratiques d'élevage en passe de devenir « inacceptables » dans nos sociétés actuelles (écornage des ruminants, castration des porcelets (Bishop & Van Eenennaam 2020 ; Florez et al. 2023)).

La technique de GE est également envisagée pour la correction d'allèles défavorables au sein d'haplotypes par ailleurs d'intérêt. Dans ce cas, cette technique devient une alternative à la contre-sélection de caractères non désirés avec un avantage certain au niveau du maintien de la diversité génétique de l'espèce concernée. En effet, l'utilisation de GE n'élimine pas l'haplotype porteur de la mutation à supprimer mais uniquement la mutation. Pour illustrer cet aspect, prenons l'exemple « simple » de l'ataxie progressive du Charolais. Cette pathologie est une anomalie neuro-dégénérative décrite chez les bovins de race Charolaise depuis les

années 1970. Elle affecte le bien-être des animaux atteints et elle engendre des pertes économiques du fait de son expression tardive. En effet, vers l'âge de 18 mois, les jeunes bovins manifestent une paralysie progressive des membres postérieurs conduisant à la mort. Des travaux menés par INRAE ont confirmé le déterminisme récessif de cette affection et ont permis d'identifier la mutation responsable dans le gène *KIF1C* (Duchesne *et al.* 2018). Il s'agit d'un changement d'une seule base de la partie codante du gène qui entraîne le changement d'un seul acide aminé très conservé qui induit un défaut du fonctionnement de la protéine. Depuis que cette mutation est connue, les animaux reproducteurs sont testés (génotypés) pour déterminer s'ils sont porteurs ou non de l'allèle mutant afin de les écarter et ainsi de diminuer la fréquence de cette mutation dans la race. En faisant cela, si cette fréquence va diminuer, celle des allèles des gènes physiquement liés à *KIF1C* et associés à la mutation vont suivre la même tendance. Or, il faut noter que la fréquence de la mutation est actuellement de 13% dans la population Charolaise. Ce chiffre élevé est lié au fait que l'haplotype porteur est aussi associé à un caractère de masse musculaire plus élevée et a donc été sélectionné au fil du temps. L'utilisation du GE pour corriger la mutation dans cet haplotype permettrait de maintenir sa fréquence dans la population Charolaise tout en éliminant son caractère morbide et éventuellement de conserver son intérêt zootechnique si la mutation du gène *KIF1C* n'est pas directement responsable du caractère de masse musculaire plus élevée. Grâce aux données génomiques de plus en plus fournies dans différentes races d'animaux d'élevage, plusieurs haplotypes morbides ont été identifiés dans chaque race tout simplement du fait que ces haplotypes ne sont jamais retrouvés à l'état homozygote (on parle de déficit d'homozygotie). L'utilisation du GE, notamment en multiplexage, permettrait de corriger un grand nombre de ces haplotypes morbides, potentiellement associés à des caractères d'intérêt, et ainsi d'espérer accroître la valeur génétique des animaux de la race.

LES LIMITES DU « GE » EN ÉLEVAGE

Si ces technologies de GE suscitent un engouement et sont présentées par certains comme révolutionnaires pour l'amélioration des animaux d'élevage, il faut néanmoins être conscient des nombreuses limites actuelles à leur utilisation (sans revenir sur les limites législatives). Ces technologies ne doivent donc être vues que comme de possibles outils supplémentaires s'ajoutant à ceux déjà disponibles en sélection animale. Certaines de ces limites vont être discutées dans ce paragraphe.

Complexité de l'utilisation de ces outils

La production d'animaux porteurs d'allèles modifiés par GE reste un processus très long, qui nécessite de maîtriser voire d'optimiser certaines biotechnologies de la reproduction (production/récupération, culture et manipulation d'embryons, taux de gestation après transfert embryonnaire, traitements hormonaux de super-ovulation et de synchronisation des cycles reproductifs des femelles). De ce fait, la grande majorité des exemples actuels s'applique à des modifications d'un seul gène, qui doit exercer un effet majeur sur le caractère désiré. Les modifications

conjointes de différents gènes (multiplexage) sont actuellement plus envisageables en culture de cellules (nécessitant l'utilisation du clonage animal) que directement sur les embryons précoces. Or de nombreux traits (phénotypes) des animaux sont liés à plusieurs gènes (polygénique ou multigénique, voire caractères quantitatifs) sans pour autant que tous ces gènes soient parfaitement connus, identifiés, et qu'individuellement ils exercent un rôle déterminant sur ce caractère. Par ailleurs, l'efficacité des techniques actuelles entraîne la production d'un nombre limité d'animaux fondateurs par GE. Cet aspect a pour conséquence d'induire un goulot d'étranglement génétique si la modification induite doit être propagée dans la population à partir de ce faible noyau. Des modélisations sont réalisées pour optimiser de tels événements, modélisations également applicables par ailleurs pour la gestion des races locales à petit effectif. Cet aspect est aussi développé dans le cadre du projet RUMIGEN. Toutes ces constatations démontrent qu'il faut poursuivre les recherches dans les différents domaines de la génétique animale et des biotechnologies de la reproduction pour espérer utiliser au mieux ces outils de GE pour l'élevage de demain. Ces perspectives ne sont malheureusement pas d'actualité où les tendances actuelles considèrent que l'Homme est déjà allé beaucoup trop loin dans l'utilisation des animaux domestiques et expérimentaux.

Effets hors cible

La plupart des détracteurs de l'utilisation du GE en agronomie, évoquent le fait que les outils utilisés provoquent également, dans certains cas, des effets dits « hors cible », c'est-à-dire des mutations dans des endroits non ciblés du génome. Si ces effets doivent être parfaitement documentés et éliminés en thérapie génique et cellulaire dans le domaine médical, ils doivent au contraire être fortement minimisés en agronomie et en élevage. Ces mutations hors-cible, difficiles à mesurer en élevage, sont quasiment impossibles à distinguer des mutations *de novo* apparaissant à chaque construction d'un nouvel individu. Leur fréquence semble faible, notamment avec le développement d'outils d'édition de plus en plus précis, comme par exemple le « *Prime Editing* » ou l'édition de base. Par ailleurs, ces mutations ont une très forte probabilité de toucher des régions non codantes du génome (représentant environ 98% du génome) et de demeurer silencieuses. Enfin ironiquement, ces mutations hors-cible peuvent être vues positivement car d'une part, elles augmentent la variabilité génétique et d'autre part, elles pourraient être considérées « non OGM » selon la législation Européenne puisqu'elles sont majoritairement imprévisibles !

Effets adverses ou phénotypes non désirés

Ces effets adverses à l'origine de phénotype non désirés devraient être évalués dans chaque exemple d'utilisation du GE visant à reproduire une mutation conférant un caractère d'intérêt (ils ne s'appliquent pas aux exemples de correction d'allèles morbides). Si le gène cible est exprimé dans différents tissus ou organes, sa modification est souvent recherchée dans un tissu ou organe précis, car induisant un phénotype favorable, mais ses effets doivent être documentés et évalués dans les autres tissus/organes non cibles (notion de pléiotropie) et dans différents

contextes environnementaux. Pour illustrer ces aspects, nous pouvons reprendre l'exemple du gène *PRNP* (protéine PrP/PRION) chez la chèvre. Il existe une sorte d'énigme autour de ce gène qui est très fortement conservé chez les vertébrés mais dont l'ablation n'induit pas de phénotype notable, en dehors de la résistance aux pathologies à PRION, dans toutes les espèces testées jusqu'alors. De ce fait, le rôle exact de la protéine PrP, exprimée dans de nombreux tissus et organes des vertébrés, est très loin d'être complètement élucidé. Les études fines des animaux dépourvus de cette protéine (souris, chèvres Norvégiennes) ont permis de révéler un lien entre PrP et le système immunitaire (Salvesen *et al.* 2018). En 2018, une équipe a démontré un rôle de la protéine PrP dans la résistance aux virus de la grippe de type A chez la souris (Chida *et al.* 2018). Les souris dépourvues du gène *PRNP* sont hypersensibles au virus de la grippe de type A et une majorité d'entre elles meurent suite à l'infection par ce type de virus, contrairement à ce qui est observé chez les souris témoins. Toutes ces données démontrent que l'ablation du gène *PRNP* doit être prudemment caractérisée avant de produire des populations de petits ruminants dépourvus de cette protéine. Ces évaluations préalables sont absolument requises pour éviter qu'une apparente bonne idée (résistance aux maladies à PRION) se transforme en une crise sanitaire majeure (hypersensibilité à des infections opportunistes).

Un autre exemple est la reproduction de la mutation « sans cornes » par GE chez les bovins. En l'état actuel des connaissances, nous ne savons toujours pas comment cette mutation fonctionne, quel(s) gène(s) est(sont) dérégulé(s), ni qu'elle est la nature de cette dérégulation et donc les conséquences possibles sur les animaux porteurs. Ainsi, plutôt que de réguler sur l'outil, ces observations plaident pour une législation qui mettrait en exergue l'analyse fine et poussée du produit obtenu (évaluation au cas par cas comme dans de nombreux pays). Néanmoins, pour pallier à cette problématique d'effets adverses

potentiels (issus du GE mais aussi de la sélection), comme nous ne pourrions pas connaître et prévoir parfaitement tous les phénotypes non désirés (notamment en terme de santé animale et résistance aux maladies), il faut s'attacher à conserver voire à augmenter la diversité génétique des animaux d'élevage et limiter l'uniformisation du vivant qui conduit à des impasses écologiques (voir monocultures) et potentiellement économiques à long terme. L'utilisation raisonnée du GE peut contribuer à cet objectif. Il convient donc d'encadrer son utilisation avec une législation adaptée et favoriser les avancées technologiques qui contribuent à accroître sa précision et ses champs d'application.

CONCLUSION

Ces nouveaux outils que sont les nucléases spécifiques permettent désormais de modifier le génome à façon dans de nombreuses espèces. Ils ouvrent des perspectives importantes dans différents domaines des Sciences de la Vie. Ils permettent, pour les espèces d'intérêt agronomique, de passer d'une science descriptive à une science démonstrative où il est maintenant possible d'évaluer le rôle d'un gène directement dans les espèces cibles ; sans modélisation chez un hôte intermédiaire. Il devient maintenant possible d'étudier des traits phénotypiques spécifiques d'espèce (saisonnalité reproductive, cornage, rumination... etc). Malheureusement, pour de nombreuses applications agronomiques, les verrous majeurs actuels se situent au niveau du législateur et du débat « science-société » pour définir les domaines d'application de ces technologies jugées comme acceptables. Différents chemins sont suivis selon les pays considérés. En Europe, le cadre législatif choisi semble inadapté et ces questions suscitent à l'heure actuelle de nombreux débats entraînant peu d'exemples concrets, en regard du très faible nombre de financements spécifiques et un investissement minimal des filières en l'absence actuelle de perspectives de débouchés.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement Xavier Montagutelli et Michel Thibier pour leur invitation et leur avoir donné l'occasion de s'exprimer en séance de l'Académie vétérinaire de France. Ils remercient également l'Agence Nationale pour la Recherche qui au travers de sept projets financés (ANR-06-GenAnimal TEGOD ; ANR-09-GENM-009-03 GENIDOV ; ANR-09-BLAN-0015-01 PRIFAGENE ; ARGONADS ; ARDIGERM ; RNA-SEX ;GMO-Phen) a permis de développer ces technologies de modifications ciblées du génome chez les mammifères de rente, à INRAE. Le projet RUMIGEN est financé par l'Union européenne dans le cadre du programme pour la recherche et l'innovation H2020 (Grant Agreement No. 101000226). RUMIGEN participe également au consortium EuroFAANG (<https://eurofaang.eu>).

BIBLIOGRAPHIE

- Benestad SL, Austbø L, Tranulis MA, Espenes A, Olsaker I. Healthy goats naturally devoid of prion protein. *Vet Res.* 2012; 18: 43-87.
- Bishop TF, Van Eenennaam AL. Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. *J Exp Biol.* 2020; 7: 223(Pt Suppl 1): jeb207159.
- Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E *et al.* Prion protein protects mice from lethal infection with influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2018; 14: e1007049.
- Cooper DKC, Pierson RN 3rd. Milestones on the path to clinical pig organ xenotransplantation. *Am J Transplant.* 2023; 18: S1600-6135(23)00222-8.
- Duchesne A, Vaiman A, Frah M, Floriot S, Legoueix-Rodriguez S, Desmazières A *et al.* Progressive ataxia of Charolais cattle highlights a role of KIF1C in sustainable myelination. *PLoS Genet.* 2018 ; 1: 14(8): e1007550.
- Flórez JM, Martins K, Solin S, Bos-

from JR, Rodríguez-Villamil P, Ongaratto F *et al.* CRISPR/Cas9-editing of KISS1 to generate pigs with hypogonadotropic hypogonadism as a castration free trait. *Front Genet.* 2023; 4: 13: 1078991.

• Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 14: 140-162.

• Porto-Neto LR, Bickhart DM, Landaeta-Hernandez AJ, Utsunomiya YT, Pagan M, Jimenez E *et al.* Convergent

Evolution of Slick Coat in Cattle through Truncation Mutations in the Prolactin Receptor. *Front Genet.* 2018; 23: 9:57.

• Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM *et al.* Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: pii: E4045.

• Salvesen Ø, Espenes A, Reiten MR, Vuong TT, Malachin G, Tran L *et al.* Goats naturally devoid of PrPC are resis-

tant to scrapie. *Vet Res.* 2020; 10: 51(1):1.

• Salvesen Ø, Tatzelt J, Tranulis MA. The prion protein in neuroimmune crosstalk. *Neurochem Int.* 2018; 15: 104335.

• Van Eenennaam AL. Genetic modification of food animals. *Curr Opin Biotechnol.* 2017; 44: 27-34.

• Wang JY, Doudna JA. CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science.* 2023 ; 20: 379(6629): eadd8643.