

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

4
5 *GENOME EDITING IN FARM ANIMALS: WHERE WE ARE IN FRANCE AND*
6 *IN EUROPE?*

7 *Eric PAILHOUX⁽¹⁾ & Jean-Luc VILOTTE⁽²⁾*

8 (Communication présentée le 26 Janvier 2023)

9
10
11
12
13
14 **RÉSUMÉ**

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

28
29

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

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

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

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 in 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.

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

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

1 INTRODUCTION

2 La découverte et la maîtrise des nouveaux outils que sont les nucléases spécifiques permet, au
3 moins en théorie, de modifier le génome de beaucoup d'espèces de façon ciblée : c'est à dire à
4 un endroit précis et défini dudit génome. L'utilisation de ces nucléases a été qualifiée de
5 « genome editing » (GE) en anglais et maladroitement traduit par « édition du génome » en
6 français. Ces nucléases sont, dans l'ordre chronologique de développement : (i) les
7 méganucléases, (ii) les nucléases à doigts de zinc (ZFN: *Zinc Finger Nuclease*) et (iii) les
8 TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*). À cela est venu plus récemment
9 s'ajouter le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic*
10 *Repeats - CRISPR-associated gene 9*) (Razzaq *et al.*, 2019). Ce dernier outil, qualifié de
11 « ciseaux moléculaires » semble tellement prometteur dans ses différentes applications que
12 leurs découvreuses Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier ont reçu le prix Nobel de
13 chimie en 2020 (Wang and Doudna, 2023). Les champs d'application où ces outils pourraient
14 être utiles sont très variés et couvrent de nombreux domaines de la génétique : de la thérapie
15 génique en clinique humaine à la sélection génétique des plantes et des animaux, sans oublier
16 les micro-organismes et la biologie de synthèse (Wang and Doudna, 2023).

17 Concernant les animaux de rente, les applications envisagées peuvent se classer dans trois
18 grandes perspectives: (i) les projets à visée de recherche fondamentale, principalement
19 lorsque les autres modèles plus classiquement utilisés (souris, poisson zèbre, ..) s'avèrent soit
20 physiologiquement divergents (cas de la différenciation des gonades), soit inappropriés
21 (études du développement des cornes ou de la saisonnalité, à titre d'exemples) ; (ii) les projets
22 à visée biomédicale pour créer des animaux modèles de pathologies humaines là où à nouveau
23 les autres espèces ne satisfont pas (Kleinert *et al.*, 2018) ou également, plus spécifiquement
24 chez le porc, pour modifier le génome des animaux afin que leurs organes soient utilisables en
25 xéno-transplantation chez l'Homme (Cooper and Pierson, 2023); et (iii) les projets à visée
26 agronomique soit pour apporter un caractère favorable (déjà décrit dans une espèce ou une
27 race) à une espèce ou une race ne possédant pas ce caractère (alternative à l'introgression,
28 création d'un nouveau génotype, abolition de la barrière d'espèce), soit pour corriger des
29 mutations délétères apparues dans des génotypes par ailleurs performants. En agronomie, ces
30 technologies sont actuellement envisagées pour accroître l'efficacité de la sélection
31 génomique, mise en place dans les principales races bovines depuis une dizaine d'années, et
32 qui est susceptible de s'étendre à d'autres races et espèces dans le futur. Les caractères ciblés
33 sont liés à la production animale mais également au bien-être et à la santé des animaux telle
34 que les résistances à certaines pathologies (Van Eenennaam, 2017).

1 Malgré l'engouement international autour de ces nouvelles technologies et du potentiel offert
2 par leur utilisation pour proposer de nouvelles plantes et de nouveaux animaux dans le
3 domaine agronomique, l'Europe a mis un frein (voire « un coup d'arrêt » concernant le
4 monde animal) dans ce domaine, en décrétant que les organismes ainsi obtenus sont
5 considérés comme « génétiquement modifiés » et classés OGM (décret de la cour de justice
6 européenne (CJUE) du 25 Juillet 2018, (affaire C528/16)). Suite à cette décision de la CJUE,
7 les entreprises européennes de sélection en génétique animale n'investissent pas (ou peu)
8 dans les applications potentielles de ces technologies, ce qui entraîne également un frein
9 conséquent dans les recherches publiques institutionnelles dans ce domaine. Pour illustrer cet
10 aspect, il faut noter qu'à notre connaissance, au niveau européen un seul appel d'offre à
11 projets de recherche évoquant l'utilisation des techniques de GE chez les animaux d'élevage a
12 été proposé ces dernières années (H2020 – SFS13). Deux projets, coordonnés par INRAE ont
13 été obtenus et financés suite à cet appel d'offre, (i) le projet GEroNIMO qui concerne les
14 espèces monogastriques (porc et volaille) et le projet RUMIGEN qui s'intéresse aux
15 ruminants et plus spécifiquement aux races bovines.

16
17

18 **LE PROJET RUMIGEN ET LA PLACE DU « GENOME EDITING » DANS CE** 19 **PROJET**

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

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

1 De plus, le projet RUMIGEN comporte un important volet en sciences humaines et sociales
2 qui vise à évaluer l'acceptabilité sociétale des différentes technologies d'élevage. Il s'agira ici
3 de construire un « champ d'acceptabilité » délimitant ce qui pourrait être envisagé
4 L'ensemble de ces approches devra *in fine* permettre au consortium de proposer de nouveaux
5 schémas de sélection acceptables par les citoyens européens.
6 La part du GE dans le projet RUMIGEN reste exploratoire (Figure 1). Le travail comprend
7 des études théoriques sur l'utilisation potentielle du GE dans les schémas de sélection et pour
8 la préservation de la biodiversité au sein de races locales et des aspects plus appliqués, scindés
9 en quatre différentes parties. Une première activité consiste à réaliser et à publier un état des
10 lieux des exemples d'utilisation du GE chez les ruminants d'élevage. Un deuxième aspect va
11 s'attacher à quantifier l'impact que pourrait avoir l'utilisation du système CRISPR/Cas9 sur la
12 génération de mutation *de novo* aux premiers stades de l'embryogénèse, et de comparer cet
13 impact à celui de culture *in vitro* d'embryons bovins. Enfin deux exemples d'application du
14 GE chez les petits ruminants vont être développés au cours du projet. Un exemple chez le
15 mouton qui vise à illustrer la possibilité de reproduire une mutation d'une espèce dans une
16 autre (mutation SLICK) ; et le second chez la chèvre qui ambitionne de comparer la
17 transmission d'une mutation par croisements naturels versus par GE (mutation
18 *PRNP/PRION*). Brièvement pour le premier exemple chez l'ovine, le travail est mené à
19 l'institut Roslin d'Edinburgh où un variant du gène *PRLR* (mutations SLICK apparues
20 naturellement en races bovines), codant pour le récepteur de la prolactine, va être introduit
21 chez des moutons de race Suffolk. Ces mutations particulières du gène *PRLR* raccourcissent
22 la protéine correspondante et induisent un pelage à poils courts, lisses et moins denses chez
23 les animaux mutants qui, par conséquent, sont plus résistants aux stress thermiques.
24 D'ailleurs, les mutations naturelles sont apparues dans des régions tropicales, chez des races
25 bovines très exposées aux fortes températures (Porto-Neto *et al.*, 2018).

26
27

28 **MUTATION DU GENE *PRNP* CHEZ LA CHEVRE CONFÉRANT UNE** 29 **RÉSISTANCE AUX MALADIES À PRION : ILLUSTRATION DU PARADOXE** 30 **JURIDIQUE EUROPEEN**

31 Il est démontré, notamment chez la souris, que l'inactivation du gène *Prnp*, codant la protéine
32 PrP, entraîne une résistance complète aux maladies à Prion. Ces pathologies résultent d'un
33 repliement anormal de la protéine PrP entraînant des atteintes neurologiques appelées
34 protéinopathies. De telles affections se retrouvent chez de nombreuses espèces animales dont

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

24

- 25 - En résumé, la chèvre Alpine GE présente un génome plus proche d'une autre chèvre
26 Alpine que celui obtenu par introgression et ;
- 27 - un génome indistinguable de celui d'une chèvre Alpine chez qui une mutation serait
28 apparue naturellement au locus *PRNP* comme cela a été le cas dans la race
29 Norvégienne.

30 Pourtant, la législation Européenne actuelle classe la chèvre obtenue par la technique de GE
31 comme génétiquement modifiée (OGM). Ceci illustre parfaitement le paradoxe de la
32 classification OGM en Europe qui repose sur la « technologie utilisée » et non sur
33 « l'organisme obtenu » comme dans d'autres pays du globe. En effet, un OGM est défini par
34 la directive 2001/18/CE comme « un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le

1 matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par
2 multiplication et/ou par recombinaison naturelle » (source : [https://agriculture.gouv.fr/quest-](https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-quun-ogm)
3 [ce-quun-ogm](https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-quun-ogm)). Ainsi, cette définition repose sur des notions qui ont plus attiré à la
4 philosophie et la théologie qu'à la génétique et aux pratiques d'élevage actuelles. Elle revient
5 à classer différemment deux objets pourtant indistinguables sans connaissance préalable de
6 leur origine. Le différentiel induit avec d'autres nations entraîne une forte diminution, voire
7 un arrêt des recherches scientifiques utilisant ces outils, en dehors des domaines purement
8 cognitifs ou à visée thérapeutiques humaines, et des pertes de compétences rapides et
9 drastiques dans le domaine des biotechnologies de la reproduction chez les animaux
10 d'élevage.

11
12

13 **LES APPORTS POTENTIELS DU « GE » EN ÉLEVAGE**

14 Comme énoncé précédemment, la technique de GE est envisagée pour améliorer la valeur
15 génétique des animaux par deux stratégies, (i) d'une part l'apport d'allèles « favorables » liés,
16 dans la plupart des cas, à des mutations qui vont changer ou annuler la fonction d'un gène (à
17 titre d'exemples, mutations *GDF8/myostatine* ; *PRLR/SLICK* ; *PRNP/PRION*) ou, d'autre
18 part, (ii) la correction et donc l'élimination d'allèles « défavorables » conduisant à des
19 maladies génétiques des animaux et par conséquent des pertes économiques (exemple de
20 l'ataxie progressive du Charolais sur lequel nous reviendrons). Des scénarii d'amélioration
21 génétique de différents animaux d'élevage utilisant le GE à grande échelle sont d'ores et déjà
22 envisagés outre-Atlantique (pour revue, [Bishop and Van Eenennaam., 2020](#)). Ces scénarii
23 imaginent des modifications génétiques multiples (multiplexage), plus envisageables
24 actuellement sur des cellules embryonnaires souches, et donc l'utilisation des techniques de
25 transfert nucléaire des cellules somatiques modifiées dans des ovocytes énucléés (clonage
26 animal) afin de produire les animaux désirés. Ces scénarii « futuristes » parlent « d'élevage *in*
27 *vitro* » et utiliseraient à grande échelle toutes les biotechnologies de la reproduction
28 actuellement maîtrisées (clonage animal, transfert d'embryons, insémination artificielle,
29 fécondation *in vitro*, différents types de cellules embryonnaires souches). Ne sachant pas si le
30 futur verra le développement de ce type de scénarii « d'élevage *in vitro* » ou la production de
31 viandes artificielles sans l'utilisation d'animaux (qui sont déjà sur le marché), il faut d'ores et
32 déjà constater que de nombreux animaux produits par GE ont été obtenus (voire
33 commercialisés) dans différents pays hors de l'union Européenne ([Bishop and Van](#)
34 [Eenennaam., 2020](#)). La plupart des exemples publiés concernent des caractères de production

1 avec en « tête de liste » la mutation *GDF8/MSTN*/myostatine qui confère une hypertrophie
2 musculaire (caractère dit « culard ») et qui a été reproduite dans différentes espèces de
3 ruminants d'élevage, mais également chez le porc, le lapin et certains poissons d'élevage. Par
4 ailleurs, plusieurs exemples sont liés à des caractères de santé et bien-être animal et visent à
5 conférer des résistances à certaines maladies infectieuses problématiques en élevage, à
6 améliorer l'adaptation des espèces de rente aux changements climatiques (mutation *SLICK*),
7 ou à proposer des alternatives à certaines pratiques d'élevage en passe de devenir
8 « inacceptables » dans nos sociétés actuelles (écornage des ruminants, castration des porcelets
9 ([Bishop and Van Eenennaam., 2020](#) ; [Florez et al., 2023](#))).

10 La technique de GE est également envisagée pour la correction d'allèles défavorables au sein
11 d'haplotypes par ailleurs d'intérêt. Dans ce cas, cette technique devient une alternative à la
12 contre-sélection de caractères non désirés avec un avantage certain au niveau du maintien de
13 la diversité génétique de l'espèce concernée. En effet, l'utilisation du GE n'élimine pas
14 l'haplotype porteur de la mutation à supprimer mais uniquement la mutation. Pour illustrer cet
15 aspect, prenons l'exemple « simple » de l'ataxie progressive du Charolais. Cette pathologie
16 est une anomalie neurodégénérative décrite chez les bovins de race Charolaise depuis les
17 années 1970. Elle porte atteinte au bien-être des animaux atteints et elle engendre des pertes
18 économiques du fait de son expression tardive. En effet, vers l'âge de 18 mois, les jeunes
19 bovins manifestent une paralysie progressive des membres postérieurs conduisant à la mort.
20 Des travaux menés par INRAE ont confirmé le déterminisme récessif de cette affection et ont
21 permis d'identifier la mutation responsable dans le gène *KIF1C* ([Duchesne et al., 2018](#)). Il
22 s'agit d'un changement d'une seule base de la partie codante du gène qui entraîne le
23 changement d'un seul acide aminé très conservé qui induit un défaut du fonctionnement de la
24 protéine. Depuis que cette mutation est connue, les animaux reproducteurs sont testés
25 (génotypés) pour déterminer s'ils sont porteurs ou non de l'allèle mutant afin de les écarter et
26 ainsi de diminuer la fréquence de cette mutation dans la race. En faisant cela, si cette
27 fréquence va diminuer, celle des allèles des gènes physiquement liés à *KIF1C* et associés à la
28 mutation vont suivre la même tendance. Or, il faut noter que la fréquence de la mutation est
29 actuellement de 13% dans la population Charolaise. Ce chiffre élevé est lié au fait que
30 l'haplotype porteur est aussi associé à un caractère de masse musculaire plus élevée et a donc
31 été sélectionné au fil du temps. L'utilisation du GE pour corriger la mutation dans cet
32 haplotype permettrait de maintenir sa fréquence dans la population Charolaise tout en
33 éliminant son caractère morbide et éventuellement de conserver son intérêt zootechnique si la

1 mutation du gène *KIF1C* n'est pas directement responsable du caractère de masse musculaire
2 plus élevée.

3 Grâce aux données génomiques de plus en plus fournies dans différentes races d'animaux
4 d'élevage, plusieurs haplotypes morbides ont été identifiés dans chaque race tout simplement
5 du fait que ces haplotypes ne sont jamais retrouvés à l'état homozygote (on parle de déficit
6 d'homozygotie). L'utilisation du GE, notamment en multiplexage, permettrait de corriger un
7 grand nombre de ces haplotypes morbides, potentiellement associés à des caractères d'intérêt,
8 et ainsi d'espérer accroître la valeur génétique des animaux de la race.

9

10

11 **LES LIMITES DU « GE » EN ÉLEVAGE**

12 Si ces technologies de GE suscitent un engouement et sont présentées par certains comme
13 révolutionnaires pour l'amélioration des animaux d'élevage, il faut néanmoins être conscient
14 des nombreuses limites actuelles à leur utilisation (sans revenir sur les limites législatives).

15 Ces technologies ne doivent donc être vues que comme de possibles outils supplémentaires
16 s'ajoutant à ceux déjà disponibles en sélection animale. Certaines de ces limites vont être
17 discutées dans ce paragraphe.

18

19 *Complexité de l'utilisation de ces outils*

20 La production d'animaux porteurs d'allèles modifiés par GE reste un processus très long, qui
21 nécessite de maîtriser voire d'optimiser certaines biotechnologies de la reproduction
22 (production/récupération, culture et manipulation d'embryons, taux de gestation après
23 transfert embryonnaire, traitements hormonaux de super-ovulation et de synchronisation des
24 cycles reproductifs des femelles). De ce fait, la grande majorité des exemples actuels
25 s'applique à des modifications d'un seul gène, qui doit exercer un effet majeur sur le caractère
26 désiré. Les modifications conjointes de différents gènes (multiplexage) sont actuellement plus
27 envisageables en culture de cellules (nécessitant l'utilisation du clonage animal) que
28 directement sur les embryons précoces. Or de nombreux traits (phénotypes) des animaux sont
29 liés à plusieurs gènes (polygénique ou multigénique, voire caractères quantitatifs) sans pour
30 autant que tous ces gènes soient parfaitement connus, identifiés, et qu'individuellement ils
31 exercent un rôle déterminant sur ce caractère. Par ailleurs, l'efficacité des techniques actuelles
32 entraîne la production d'un nombre limité d'animaux fondateurs par GE. Cet aspect a pour
33 conséquence d'induire un goulot d'étranglement génétique si la modification induite doit être
34 propagée dans la population à partir de ce faible noyau. Des modélisations sont réalisées pour

1 optimiser de tels évènements, modélisations également applicables par ailleurs pour la gestion
2 des races locales à petit effectif. Cet aspect est aussi développé dans le cadre du projet
3 RUMIGEN. Toutes ces constatations démontrent qu'il faut poursuivre les recherches dans les
4 différents domaines de la génétique animal et des biotechnologies de la reproduction pour
5 espérer utiliser au mieux ces outils de GE pour l'élevage de demain. Ces perspectives ne sont
6 malheureusement pas d'actualité où les tendances actuelles considèrent que l'Homme est déjà
7 allé beaucoup trop loin dans l'utilisation des animaux domestiques et expérimentaux.

8

9 *Effets hors cible*

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

24

25 *Effets adverses ou phénotypes non désirés*

26 Ces effets adverses à l'origine de phénotype non désirés devraient être évalués dans chaque
27 exemple d'utilisation du GE visant à reproduire une mutation conférant un caractère d'intérêt
28 (ils ne s'appliquent pas aux exemples de correction d'allèles morbides). Si le gène cible est
29 exprimé dans différents tissus ou organes, sa modification est souvent recherchée dans un
30 tissu ou organe précis, car induisant un phénotype favorable, mais ses effets doivent être
31 documentés et évalués dans les autres tissus/organes non cibles (notion de pléiotropie) et dans
32 différents contextes environnementaux. Pour illustrer ces aspects, nous pouvons reprendre
33 l'exemple du gène *PRNP* (protéine PrP/PRION) chez la chèvre. Il existe une sorte d'énigme
34 autour de ce gène qui est très fortement conservé chez les vertébrés mais dont l'ablation

1 n'induit pas de phénotype notable, en dehors de la résistance aux pathologies à PRION, dans
2 toutes les espèces testées jusqu'alors. De ce fait, le rôle exact de la protéine PrP, exprimée
3 dans de nombreux tissus et organes des vertébrés, est très loin d'être complètement élucidé.
4 Les études fines des animaux dépourvus de cette protéine (souris, chèvres norvégiennes) ont
5 permis de révéler un lien entre PrP et le système immunitaire (Salvesen *et al.*, 2018). En 2018,
6 une équipe a démontré un rôle de la protéine PrP dans la résistance aux virus de la grippe de
7 type A, chez la souris (Chida *et al.*, 2018). Les souris dépourvues du gène *Prnp* sont hyper
8 sensibles au virus de la grippe de type A et une majorité d'entre elles meurent suite à
9 l'infection par ce type de virus, contrairement à ce qui est observé chez les souris témoins.
10 Toutes ces données démontrent que l'ablation du gène *PRNP* doit être prudemment
11 caractérisée avant de produire des populations de petits ruminants dépourvus de cette
12 protéine. Ces évaluations préalables sont absolument requises pour éviter qu'une apparente
13 bonne idée (résistance aux maladies à PRION) se transforme en une crise sanitaire majeure
14 (hyper-sensibilité à des infections opportunistes).

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

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

30
31

32 **CONCLUSION**

33 Ces nouveaux outils que sont les nucléases spécifiques permettent désormais de modifier le
34 génome à façon dans de nombreuses espèces. Ils ouvrent des perspectives importantes dans

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

13

14

15 **REMERCIEMENTS**

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

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 **BIBLIOGRAPHIE**

2 Benestad SL, Austbø L, Tranulis MA, Espenes A, Olsaker I. Healthy goats naturally devoid
3 of prion protein. *Vet Res.* 2012 ; 18: 43-87.

4

5 Bishop TF, Van Eenennaam AL. Genome editing approaches to augment livestock breeding
6 programs. *J Exp Biol.* 2020 ; 7: 223(Pt Suppl 1): jeb207159.

7

8 Chida J, Hara H, Yano M, Uchiyama K, Das NR, Takahashi E *et al.* Prion protein protects
9 mice from lethal infection with influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2018 ; 14: e1007049.

10

11 Cooper DKC, Pierson RN 3rd. Milestones on the path to clinical pig organ
12 xenotransplantation. *Am J Transplant.* 2023 ; 18: S1600-6135(23)00222-8.

13

14 Duchesne A, Vaiman A, Frah M, Floriot S, Legoueix-Rodriguez S, Desmazières A *et al.*
15 Progressive ataxia of Charolais cattle highlights a role of KIF1C in sustainable myelination.
16 *PLoS Genet.* 2018 ; 1: 14(8): e1007550.

17

18 Flórez JM, Martins K, Solin S, Bostrom JR, Rodríguez-Villamil P, Ongaratto F *et al.*
19 CRISPR/Cas9-editing of KISS1 to generate pigs with hypogonadotropic hypogonadism as a
20 castration free trait. *Front Genet.* 2023 ; 4: 13: 1078991.

21

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

24

25 Porto-Neto LR, Bickhart DM, Landaeta-Hernandez AJ, Utsunomiya YT, Pagan M, Jimenez E
26 *et al.* Convergent Evolution of Slick Coat in Cattle through Truncation Mutations in the
27 Prolactin Receptor. *Front Genet.* 2018 ; 23: 9:57.

28

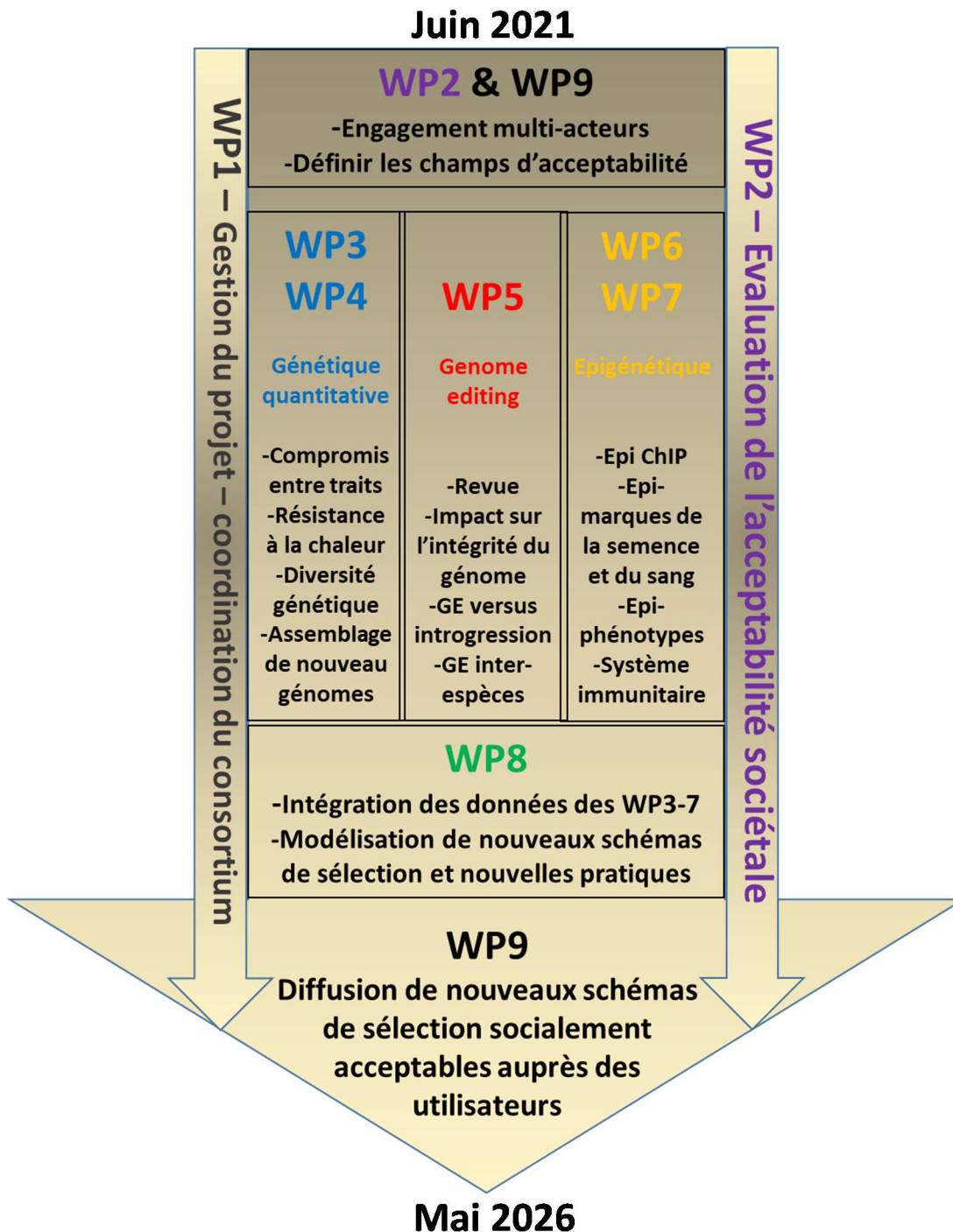
- 1 Razzaq A, Saleem F, Kanwal M, Mustafa G, Yousaf S, Imran Arshad HM *et al.* Modern
2 Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *Int J*
3 *Mol Sci.* 2019 ; 20: pii: E4045.
4
- 5 Salvesen Ø, Espenes A, Reiten MR, Vuong TT, Malachin G, Tran L *et al.* Goats naturally
6 devoid of PrPC are resistant to scrapie. *Vet Res.* 2020 ; 10: 51(1):1.
7
- 8 Salvesen Ø, Tatzelt J, Tranulis MA. The prion protein in neuroimmune crosstalk. *Neurochem*
9 *Int.* 2018 ; 15: 104335.
10
- 11 Van Eenennaam AL. Genetic modification of food animals. *Curr Opin Biotechnol.* 2017 ; 44:
12 27-34.
13
- 14 Wang JY, Doudna JA. CRISPR technology: A decade of genome editing is only the
15 beginning. *Science.* 2023 ; 20: 379(6629): eadd8643.
16
17

1 ILLUSTRATIONS

2

3 Figure 1 : Résumé du projet H2020 RUMIGEN (GA N°101000226).

4



5

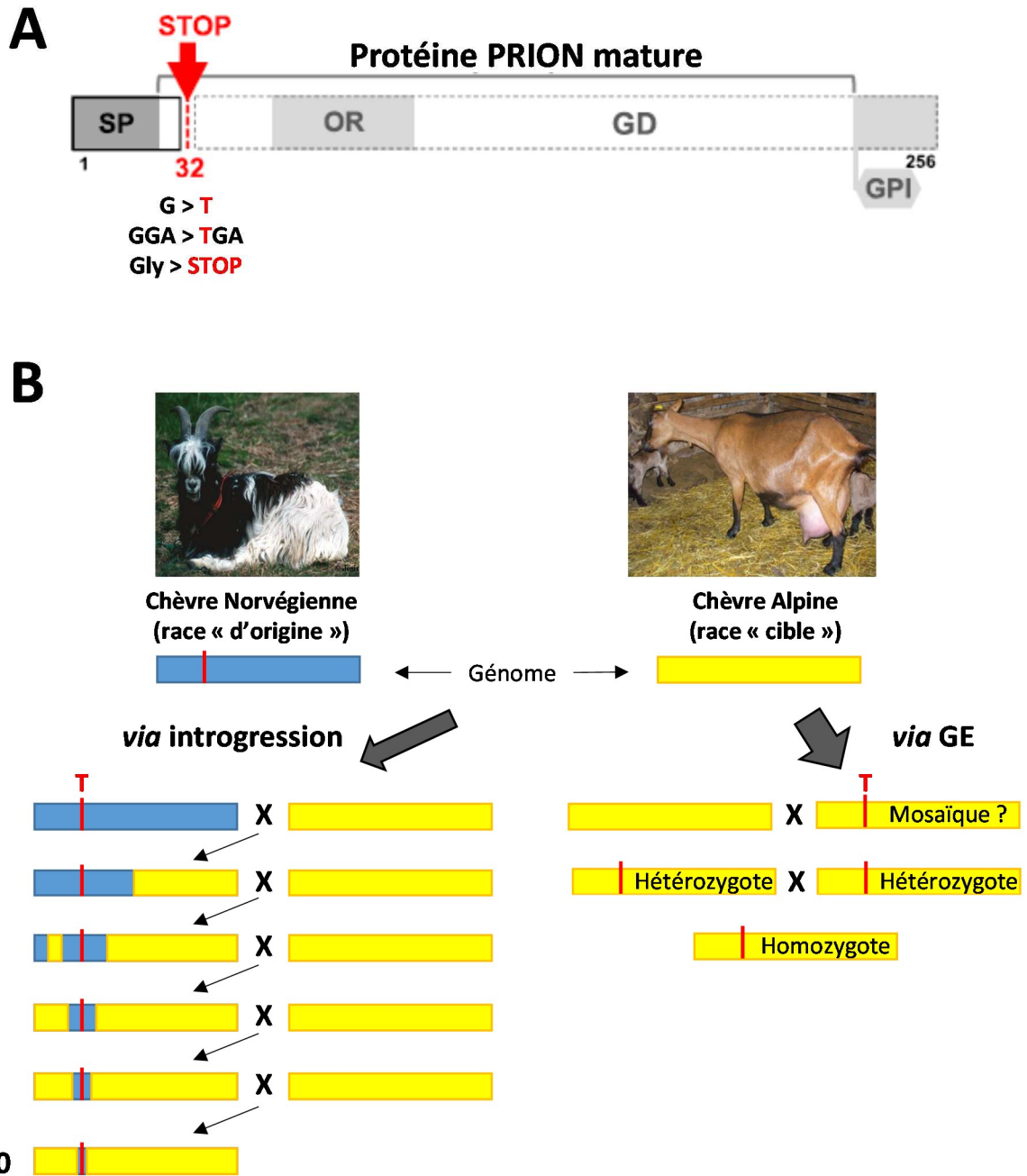
6

7

8

1
2
3
4
5
6

Figure 2 : Mutation du gène *PRNP* décrite chez les chèvres Norvégiennes et stratégies de transfert en race Alpine.



7
8
9
10

1 **Légendes des figures**

2

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

8

9

10 **Figure 2: Mutation du gène *PRNP* décrite chez les chèvres Norvégiennes et stratégies de**
11 **transfert en race Alpine. A:** La mutation apparue dans la race caprine Norvégienne remplace
12 un « G » par un « T » et conduit à un codon STOP « TGA » en lieu et place du codon
13 « GGA » correspondant à une Glycine. Ce codon STOP annihile la synthèse de la protéine
14 PRION chez les animaux homozygotes pour cette mutation. SP: Peptide Signal; OR: cinq
15 Répétitions d'un Octapeptide; GD: Domaine Globulaire; GPI: ancre
16 GlycoPhosphatidylInositol. **B:** Deux stratégies de transfert de cette mutation de la race
17 Norvégienne à la race Alpine sont menées dans le cadre du projet H2020 – RUMIGEN, soit
18 par introgression (à gauche), soit par la technique de « genome editing » (GE, à droite). F0:
19 fondateurs; F1: première génération; F2: deuxième génération...etc. D'après Benestad *et al.*,
20 (2012).

21

22