



Modifications ciblées du génom (GE) chez les mammifères domestiques

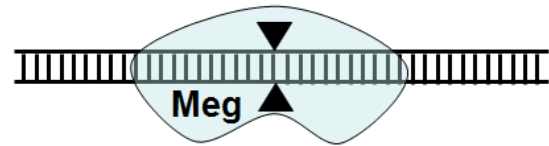
Eric PAILHOX
INRAE, JOUY EN JOSAS

Paris, AAF, le 13 Juin 2023



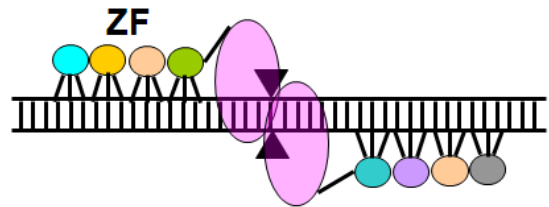
Genome Editing: Les outils = nucléases spécifiques

« Ciseaux moléculaires »



Meganuclease

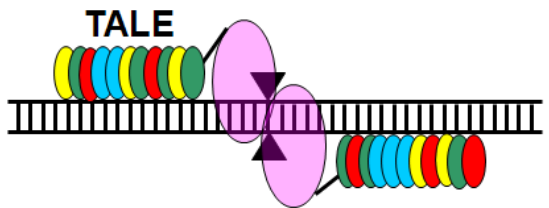
20-40 bp/Enzyme **1994** : Cellules de souris



ZFN

3 bp/Finger

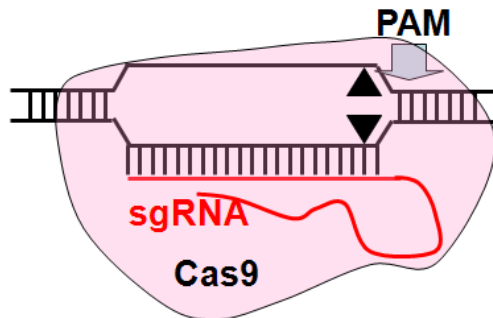
2005 : Cellules humaines
2009 : Animaux



TALEN

1 bp/Module

2009 : Code des TALE
2011 : Cellules humaines



CRISPR-Cas

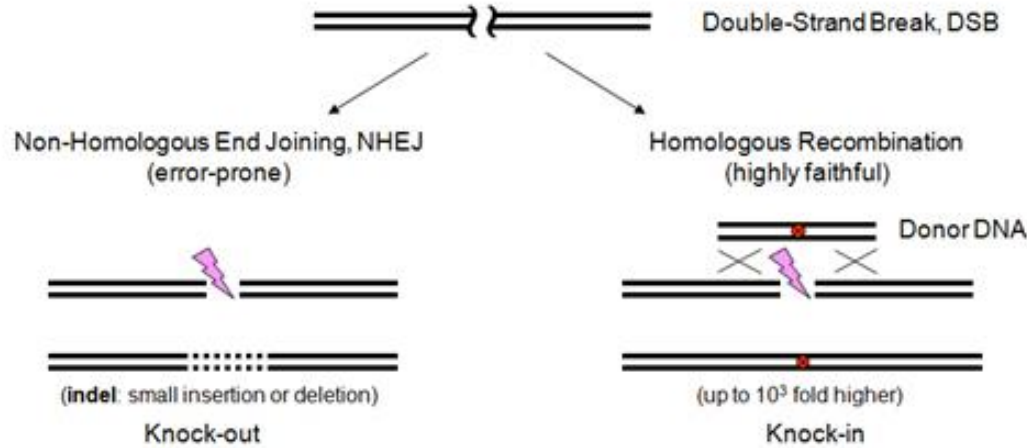
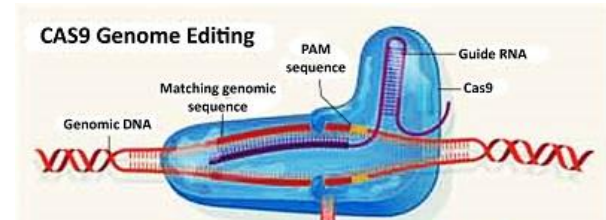
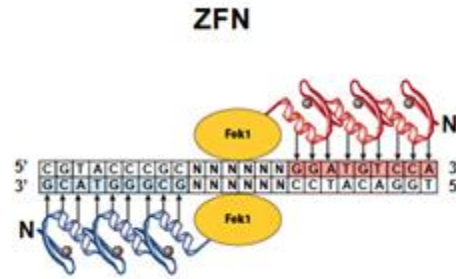
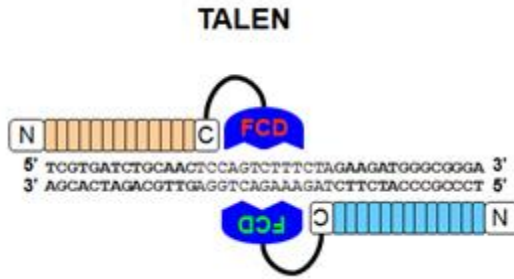
1 bp/Base

2012 : Reconstruction *in vitro*
2013 : Cellules humaines

Nature Protocols 11,1573–1578 (2016)

Induit une coupure double brin de l'ADN à un endroit défini/choisi du génome

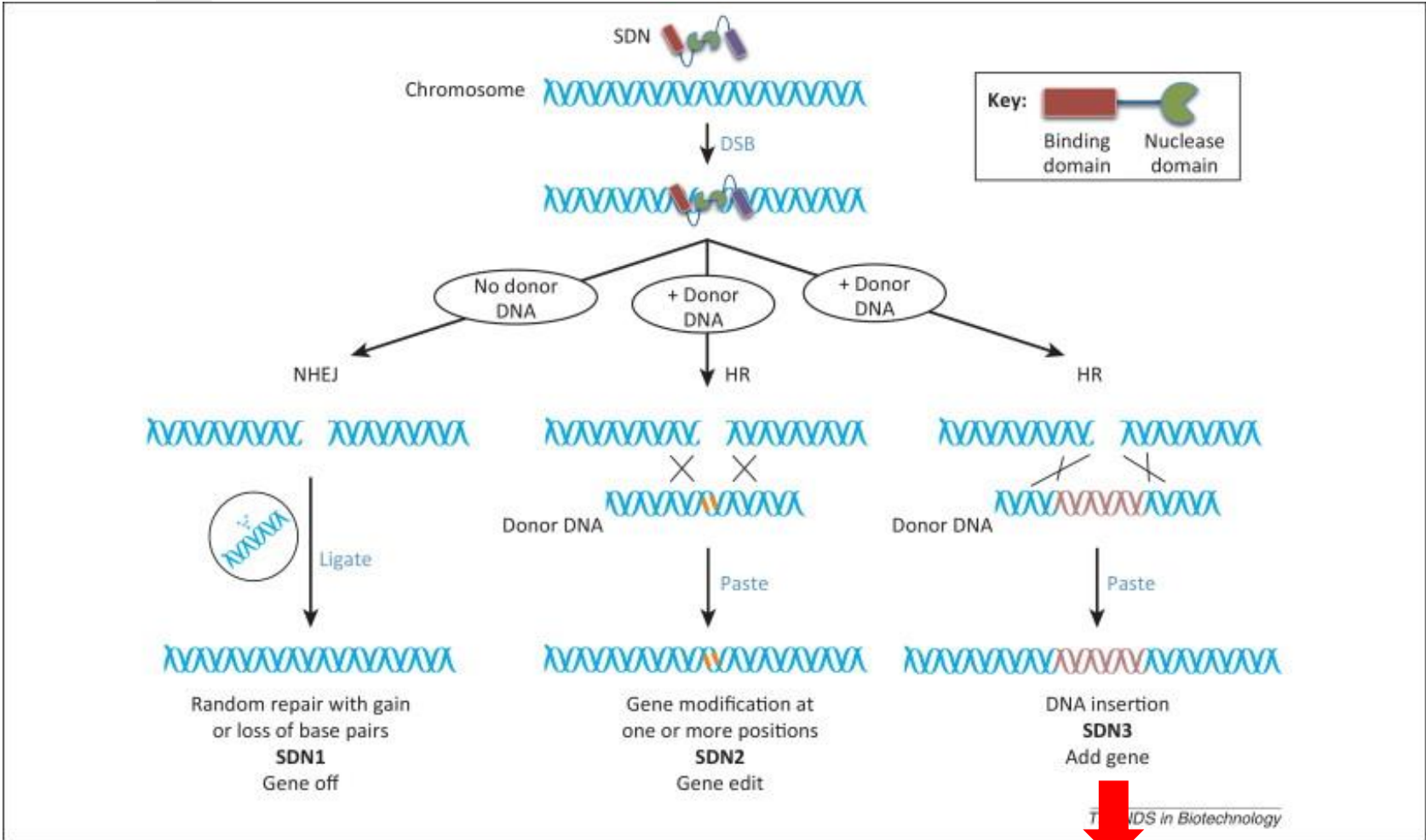
Genome editing: Après la coupure, la réparation...



Détruit un gène
(mutation / insertion-délétion)

Change la séquence d'un gène
(mutation/réparation)

Genome editing: Site Directed Nuclease, SDN1, 2, 3...



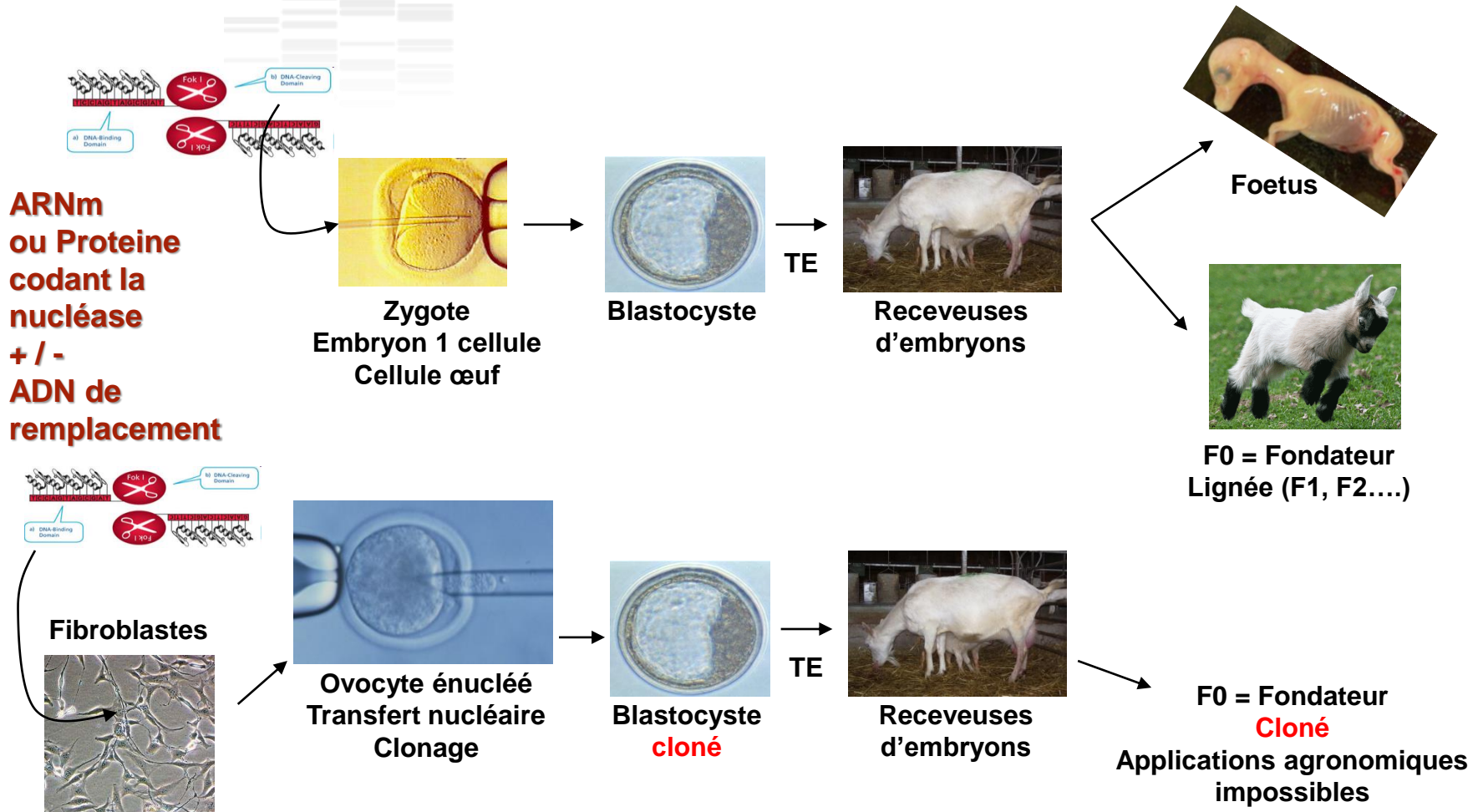
Podevin et al. (2013) *Trends in Biotechnology* 31:375-383

Trends in Biotechnology

OGM

Genome editing: où induire la modification?

(cellule œuf *versus* lignée cellulaire)



Maîtrise des biotechnologies de la reproduction indispensable!

Genome editing: les applications

- ❑ **Cognitif: Etudes de gènes clés (Génomique fonctionnelle) //**
N'importe quelle fonction biologique // plus limité à la souris! (FOXL2)
- ❑ **Biomédical: Création d'animaux modèles de pathologies humaines**
(Alzheimer, Parkinson, Myopathie, Mucoviscidose...// **Elevage difficile**) // **Confirmation / infirmation de mutations « morbides » // thérapie cellulaire**
- ❑ **Agronomique : Outils participant à la sélection / l'introggression (nécessite souvent une connaissance approfondie du caractère = cognitif) // « multiplexing » // Pas de barrière d'espèce**
A l'heure actuelle: Agronomique = Cognitif (législation)

GE chez les animaux de rente

Table 2

Examples of successful gene edited agricultural applications in food animal species.

Species	Target	Publication	Trait/Goal
Cattle	Intraspecies <i>POLLED</i> allele substitution	Tan <i>et al.</i> [22]; Carlson <i>et al.</i> [13**]	No horns
	Myostatin KO	Proudfoot <i>et al.</i> [23] Luo <i>et al.</i> [24]	Increased muscle yield
	Beta-lactoglobulin KO	Yu <i>et al.</i> [25]	Elimination of milk allergen
	Lysostaphin transgene	Liu <i>et al.</i> [15]	Disease resistance
	Lysozyme transgene	Liu <i>et al.</i> [16]	Disease resistance
Chicken	SP110 transgene	Wu <i>et al.</i> [17]	Resistance to tuberculosis
	Ovalbumin KO	Park <i>et al.</i> [26]	Elimination of ovalbumin in egg
Goat	Immunoglobulin heavy chain locus	Dimitrov <i>et al.</i> [27]	Germline gene editing
	Myostatin	Ni <i>et al.</i> [28]	Increased muscle growth
Pig	Prion protein KO		Elimination of prion protein
	Beta-lactoglobulin KO		Elimination of milk allergen
	CD163 KO	Whitworth <i>et al.</i> [29*]	PRRS Virus Resistance
Sheep	RELA interspecies substitution	Lillico <i>et al.</i> [14**]	African Swine Fever Resistance
	Myostatin KO	Wang <i>et al.</i> [30] Qian <i>et al.</i> [31]	Increased muscle yield
		Proudfoot <i>et al.</i> [23]	
		Crispo <i>et al.</i> [32] Han <i>et al.</i> [33]	Increased muscle yield

KO: knock out or inactivation of gene function.

Van Eenennaam (2017) *Current Opinion in Biotechnology* 44:27-34

Comme chez les plantes: plus d'exemples de KO que de substitutions

GE chez les mammifères de rente

❑ Caractères de production :

GDF-8/Myostatine/MSTN/Culard;
Contrôle du sex-ratio...

❑ Caractères de résistance :

CD18/Pneumonies;
PrnP/Prion;
RELA/fièvre porcine africaine...

❑ Bien-être animal:

Mutation sans cornes chez les bovidés;
Mutation SLICK (PRLR – Stress thermique)
Alternative à la castration chez le porc...



Blanc Bleu Belge
Bos taurus



Nélоре / Zébu brésiliens
Bos indicus

TALEN, NHEJ=KO in zygote
Proudfoot et al. (2015) *Transgenic Res* **24**:147-53



Holstein, TALEN, HR in fibroblast,
Animal cloning....

Carlson et al. (2016) *Nat Biotech* **34**:479-81

Alternative à l'introggression, cas PrnP (Prion)

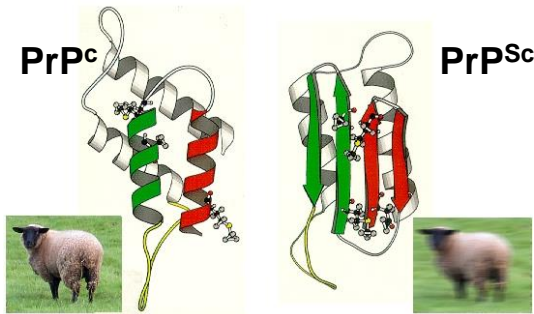
Prion = agent infectieux unique (repliement protéique « morbide »)

Homme (maladie de Creutzfeldt-Jakob, syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker , insomnie fatale familiale)

Chat (ESF = Encéphalite Spongiforme Féline)

Bovin (ESB = Encéphalite Spongiforme Bovine / maladie de la vache folle)

Caprin/Ovin (treublante / gratte / scrapie)



Acides aminés 136 / 154 / 171 : Ala-Arg-Arg (ARR) versus Ala-Arg-Glu (ARQ)

Génotype observé	Conséquence du génotype observé
ARR/ARR	Mouton qui est génétiquement le plus résistant à la scrapie
ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	Mouton que est génétiquement résistant à la scrapie mais qui nécessite une attention particulière pour son utilisation dans les programmes de sélection
ARQ/ARH ARQ/AHQ AHQ/AHQ ARH/ARH AHQ/ARH ARQ/ARQ	Mouton qui génétiquement présente une faible résistance à la scrapie. Son utilisation dans les schémas de sélection doit être évitée sinon proscrite
ARR/VRQ	Mouton qui est sensible à la scrapie
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	Mouton très sensible à la scrapie. Il doit être au moins castré sinon abattu.

Héritabilité de la sensibilité aux maladies à prion essentiellement lié au locus PRNP

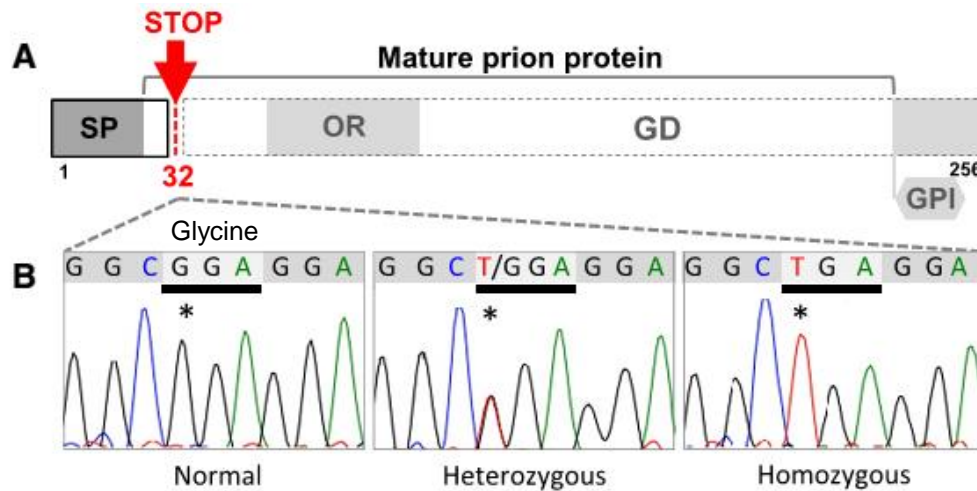


Allèle de résistance (ARR) très peu fréquent dans la population caprine Française

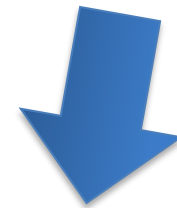
Alternative à l'introggression, cas PrnP (Prion)

Healthy goats naturally devoid of prion protein

Sylvie L Benestad^{1*}, Lars Austbø², Michael A Tranulis², Arild Espenes² and Ingrid Olsaker²
(2012) *Veterinary Research* **43**:87



Chèvre Norvégienne
(lait + viande)



Alpine(Lait)

Introgression // Sélection



Chèvre Norvégienne
(race « d'origine »)



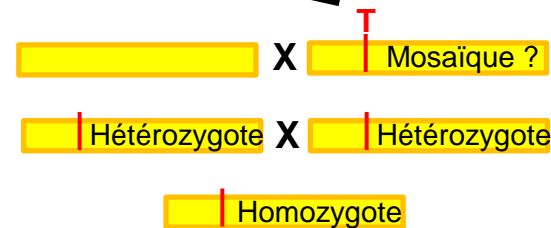
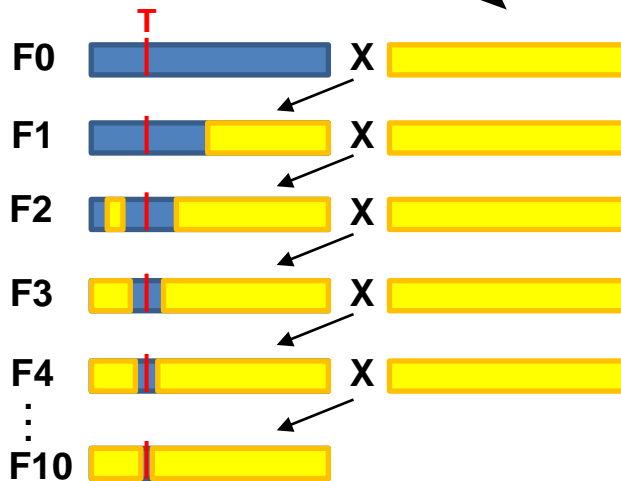
Chèvre Alpine
(race « cible »)



← Génome →

via introgression

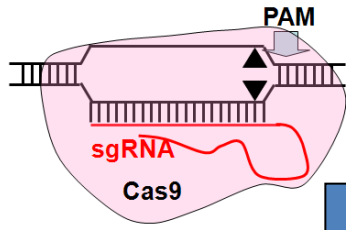
via GE



Genome editing: Obtention en F0 (F1) // Pas de co-sélection // Pas de barrière d'espèce // typiquement l'exemple de *PrnP* (protéine PRION)

GE *PRNP* chez la chèvre: stratégie & résultats 2022

1

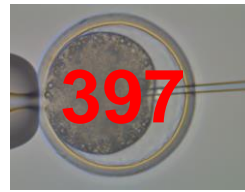


Cas9 Protein + sgRNA (x1)
+ ssDNA homologous to the *PRNP* target region



SuperOv of Donors
n=5

26

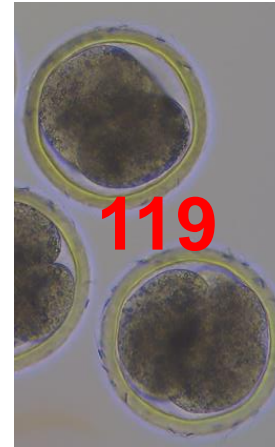


397
Zygote
1 cell embryo
(+ oocytes)

2

366

18 hours
culture



119

Embryo
Transfers
3 max./goat

88

3

31
Synchro of recipient goats
n=6



G21: P4 test

G45: ultrasound scan
(+G75 +G130)

Gestation (5 months)
150 days

3

F0 X WT



F0 = Founder animal
Genotyping
Potentially mosaic

F1 heterozygous
PRNP^{+/-} GE
goat lines

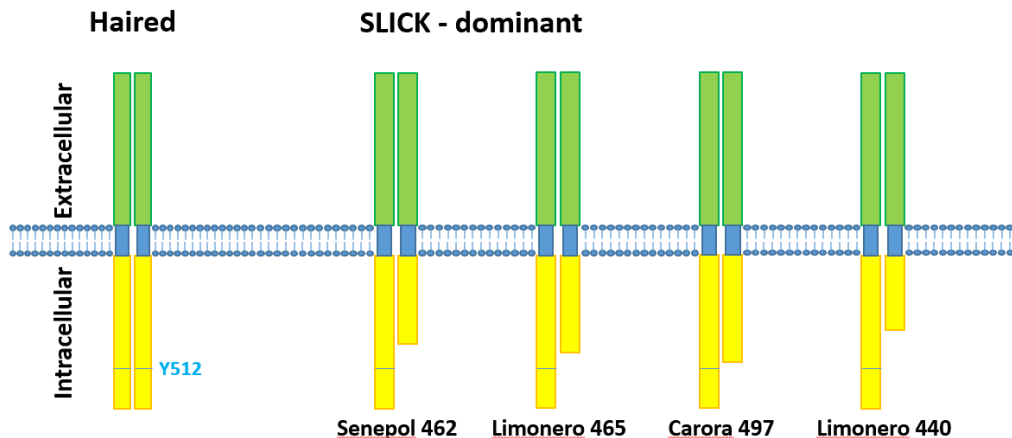


6 chevreaux nés, 4 GE, 1 KO

GE : plus de barrière d'espèce – mutation SLICK

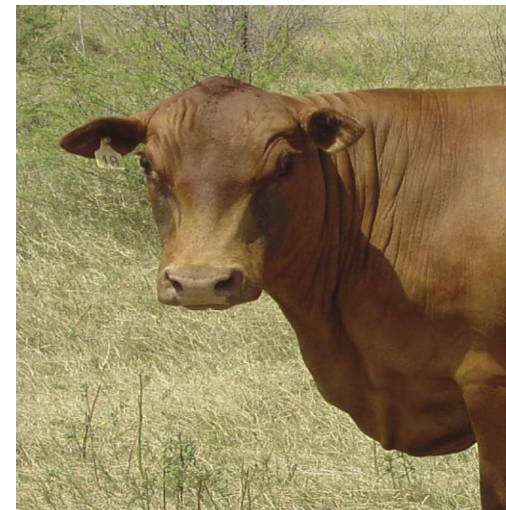
The SLICK trait

- Improved heat tolerance in cattle
- Mutations in PRLR gene



Y512 dimerization required for Jak2/STAT5 activation

(adapted from Porto-Neto et al., 2018)



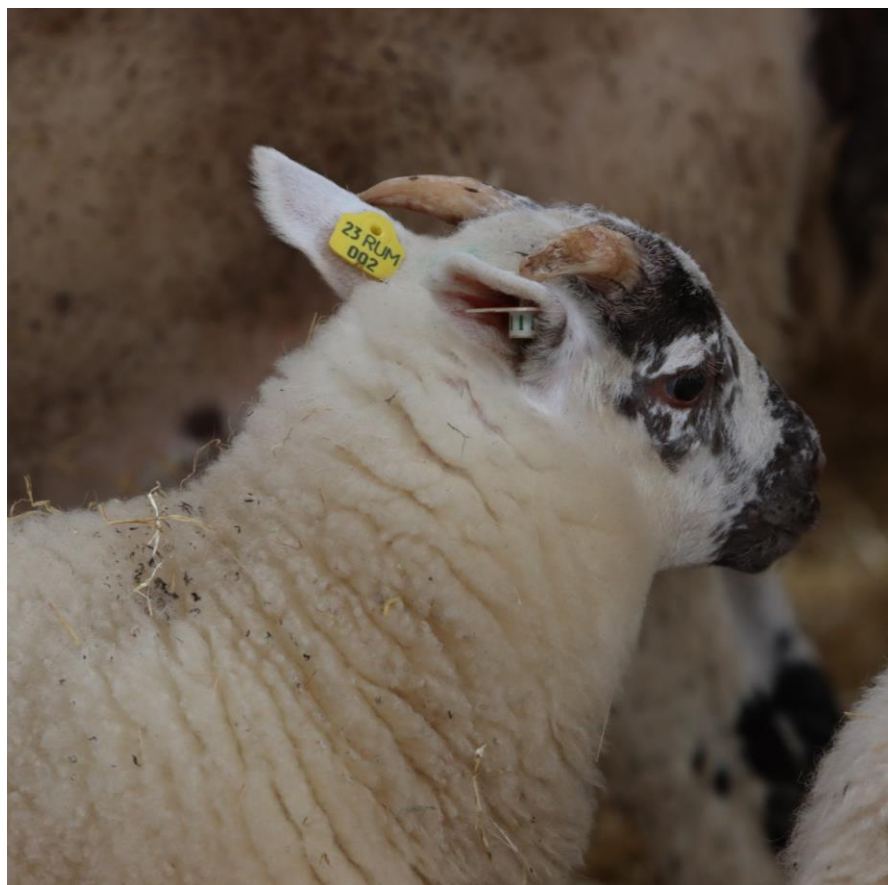


Mutation SLICK : du bovin à l'ovin...

Dr Simon Lillico – Roslin Institute



TOWARDS IMPROVEMENT OF RUMINANT BREEDING THROUGH GENOMIC AND EPIGENOMIC APPROACHES



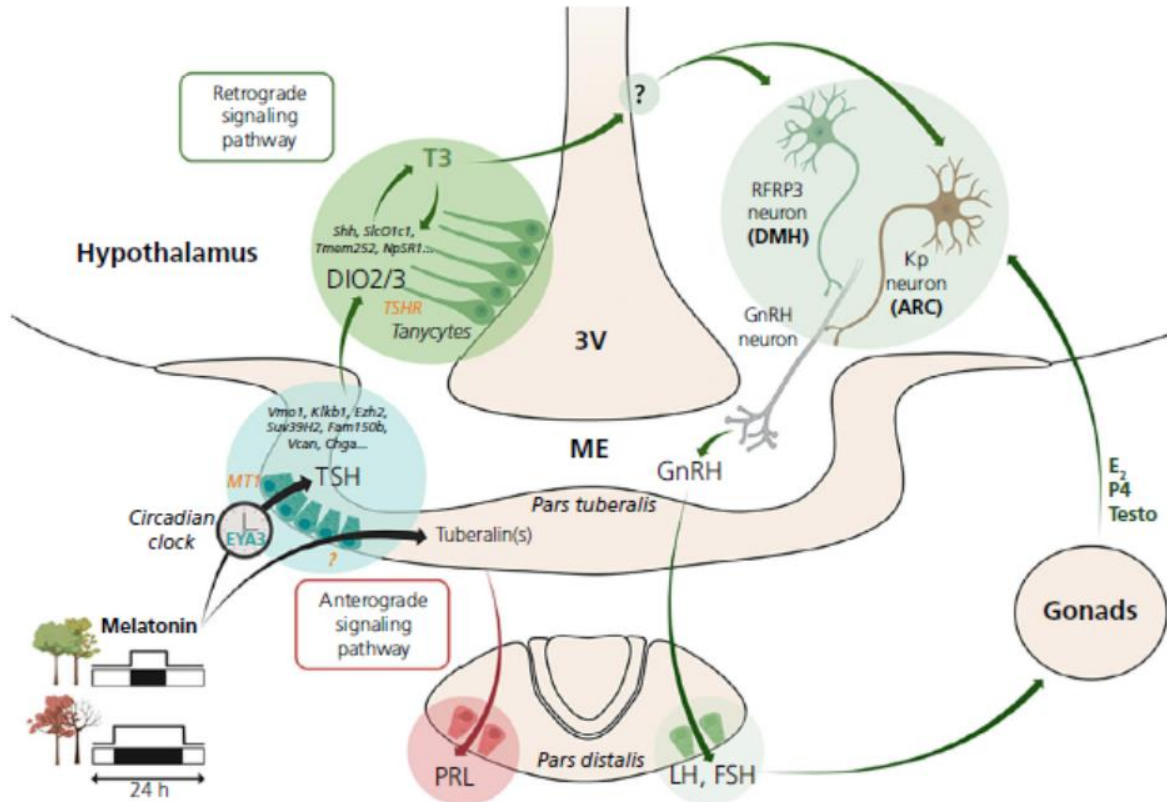
Not edited

Edited

Projets cognitifs souvent liés aux applications

Gène **NPVF** = code pour RFRP3 (peptide soupçonné d'avoir un rôle clé dans les espèces à reproduction saisonnée)

ANR GMO-Phen Hugues Dardente (Mouton) // Valérie Simonneaux (Hamster syrien)



Dardente & Simonneaux. (2022). *J Neuroendocrinol.* 34: e13124

KO du gène *NPVF* chez le mouton

L'exemple du gène *NPVF* (peptide RFRP3) chez le mouton (ANR – GMO-Phen)

En 2022, obtention de 7 agneaux (5 brebis gestantes sur 30 receveuses) dont 3 portent des allèles édités (1M et 2F)...Mutations pas satisfaisantes mais agneaux en cours d'étude.

En 2023, actuellement 9 brebis gestantes sur 30 receveuses...A suivre.

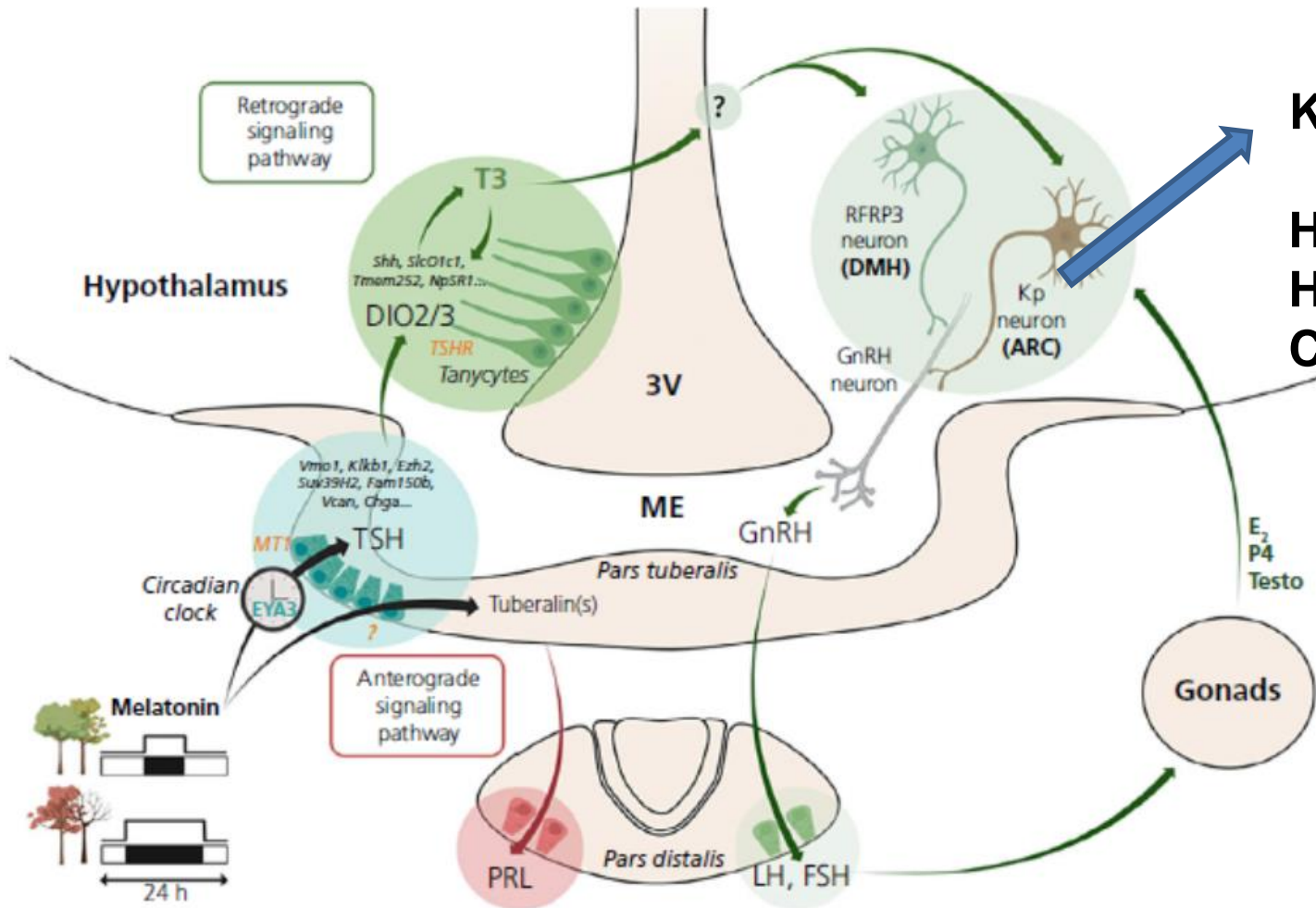
L'exemple du gène *NPVF* (peptide RFRP3) chez le mouton (ANR – GMO-Phen)

- Frontière entre projet cognitif et applications agronomiques est tenue

Le phénotype attendu est imprévisible mais dans le meilleur des cas on pourrait obtenir des moutons qui ne sont plus à reproduction saisonnée!

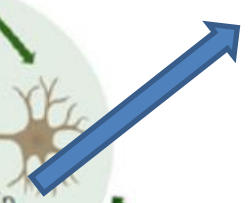
=> Intérêt agronomique évident!

GE et controversé : jusqu'où faut-il aller ?



Kiss1 KO = HHC

**Hypogonadisme
Hypogonadotrope
Congénital**



Porc *KISS1* KO, alternative à la castration ?

Flórez et al., 2023, *Frontiers in Genetics* (Acceligen Inc. & Recombinetics Inc. - USA)



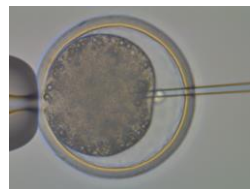
Porcs *KISS1* KO = HHC (M & F)

Travaillent maintenant à la restauration de la fertilité par injection de Kiss peptide!

CONCLUSION

- ❑ **Modifications ciblées du génome = technologie « révolutionnaire » pour progresser dans la connaissance, le biomédical et l'agronomie**
(cognitif et agronomique intimement lié, attention aux effets indésirables vs mutations hors cible)
- ❑ **Chaque projet est un cas particulier = évaluation au cas par cas OBLIGATOIRE**
- ❑ **Acceptabilité sociétale et la législation va impacter les recherches dans ce domaine** (...voir exemples des OGM ou du clonage)
- ❑ **Mutagenèse ciblée = non OGM...voir rapport préliminaire et recommandations de l'OPECST** (Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques)
- ❑ **Absence de décision politique en France et en Europe = déjà plusieurs années de retard...**

Acknowledgements



Embryo μ -manipulations



Embryo recovering, culture, electroporation



Team for embryo transfers



Jean-Luc VILOTTE (INRAE)
Michael TRANULIS (NMBU)

Marjolaine ANDRÉ, Eugénie CANON,
Valérie GELIN, Ludivine LAFFONT,
Gwendoline MORIN, Christophe
RICHARD

3 experimental facilities from INRAE

UE Bourges: Thierry FASSIER & Collaborators

UE SAAJ: Patrice CONGAR, Gwendoline MORIN,
Jean-François ALKOMBRE, Aurélien RAYNAUD,
Alexis BOISSONNADE

UE-PAO Nouzilly: Tiphaine AGUIRRE-LAVIN,
Olivier LASSERRE & Collaborators



RUMIGEN PARTNERS



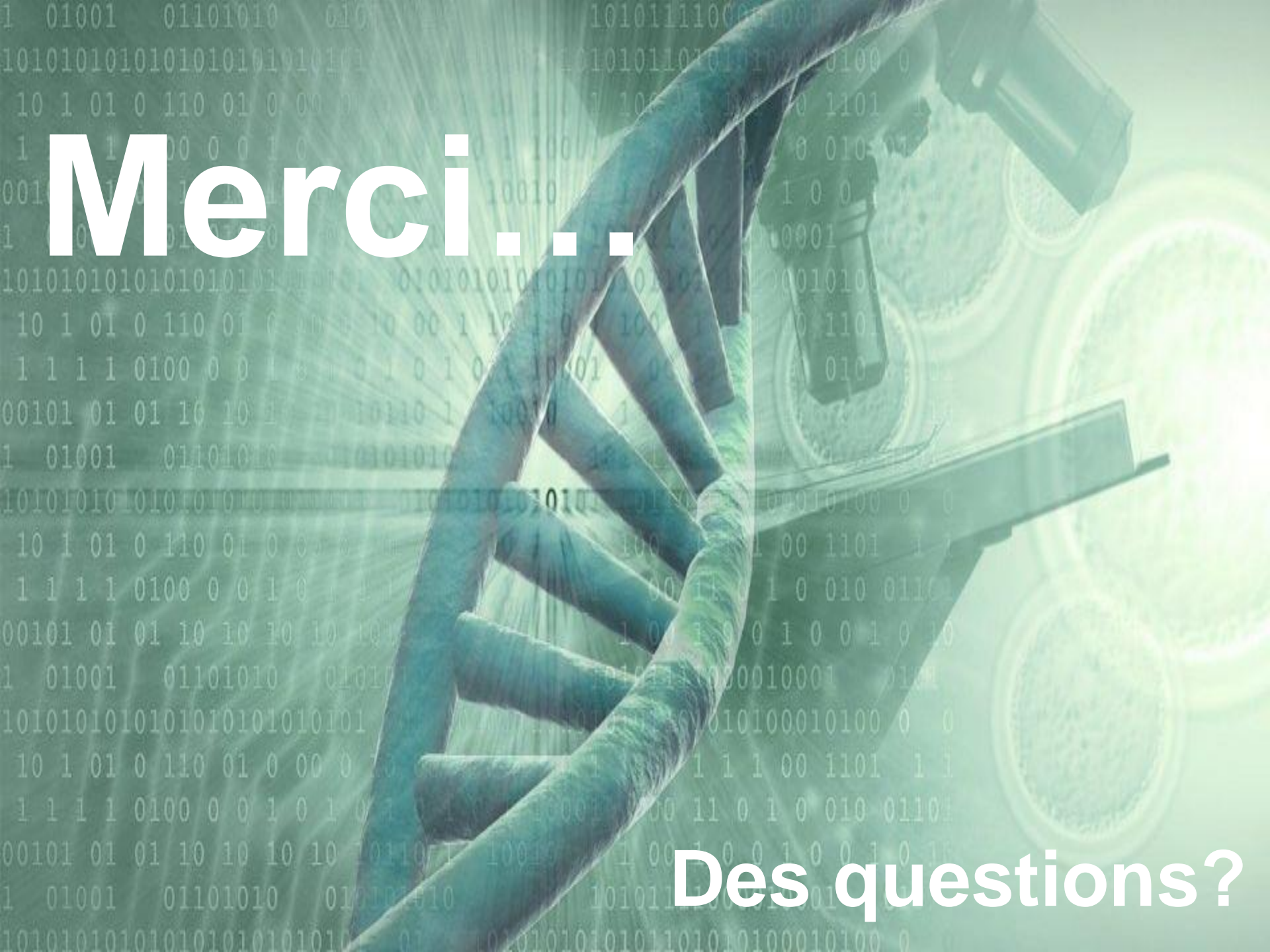
Thank you for your attention

www.rumigen.eu



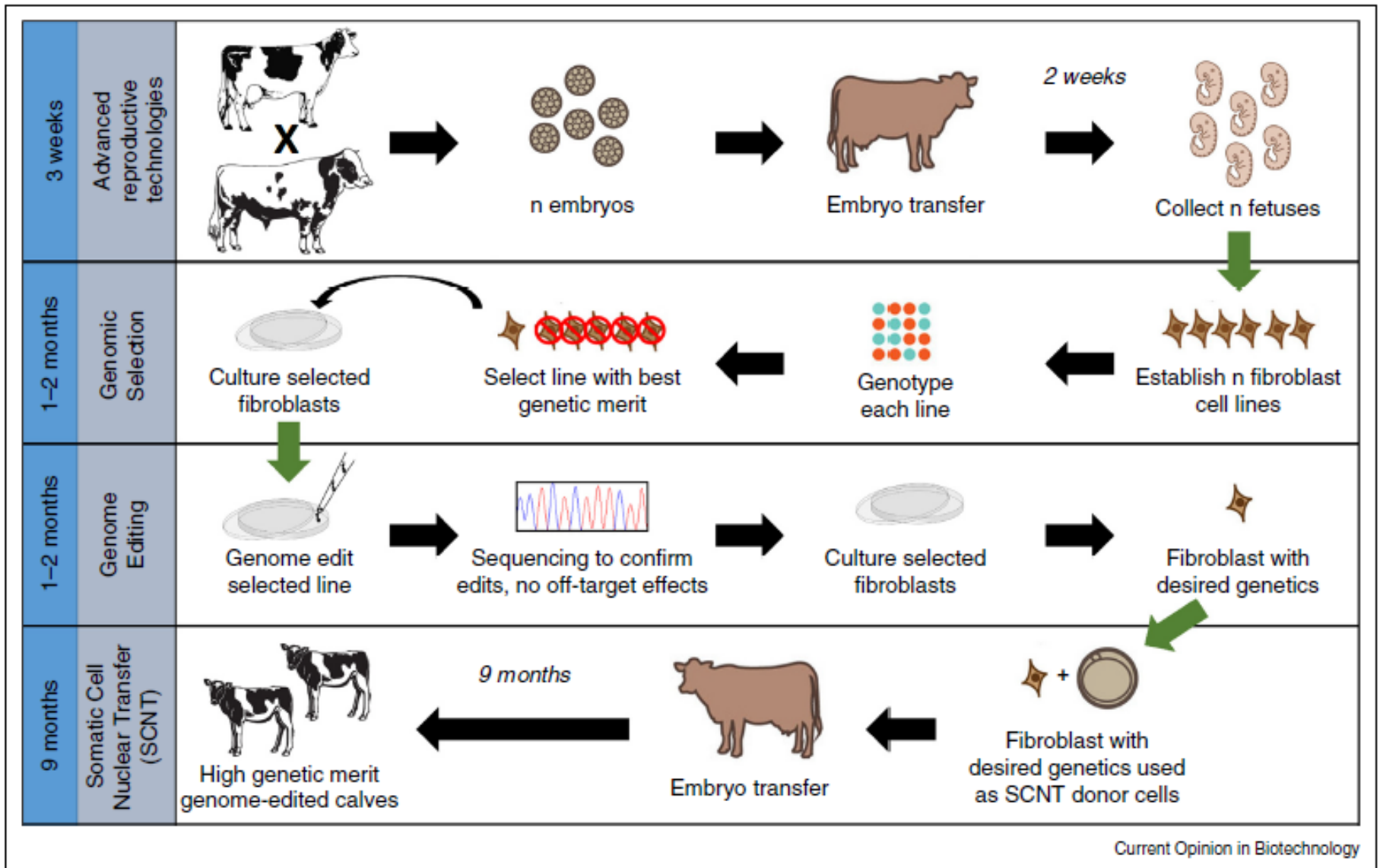
This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 101000226

Disclaimer: the sole responsibility of this presentation lies with the authors. The Research Executive Agency is not responsible for any use that may be made of the information contained therein.



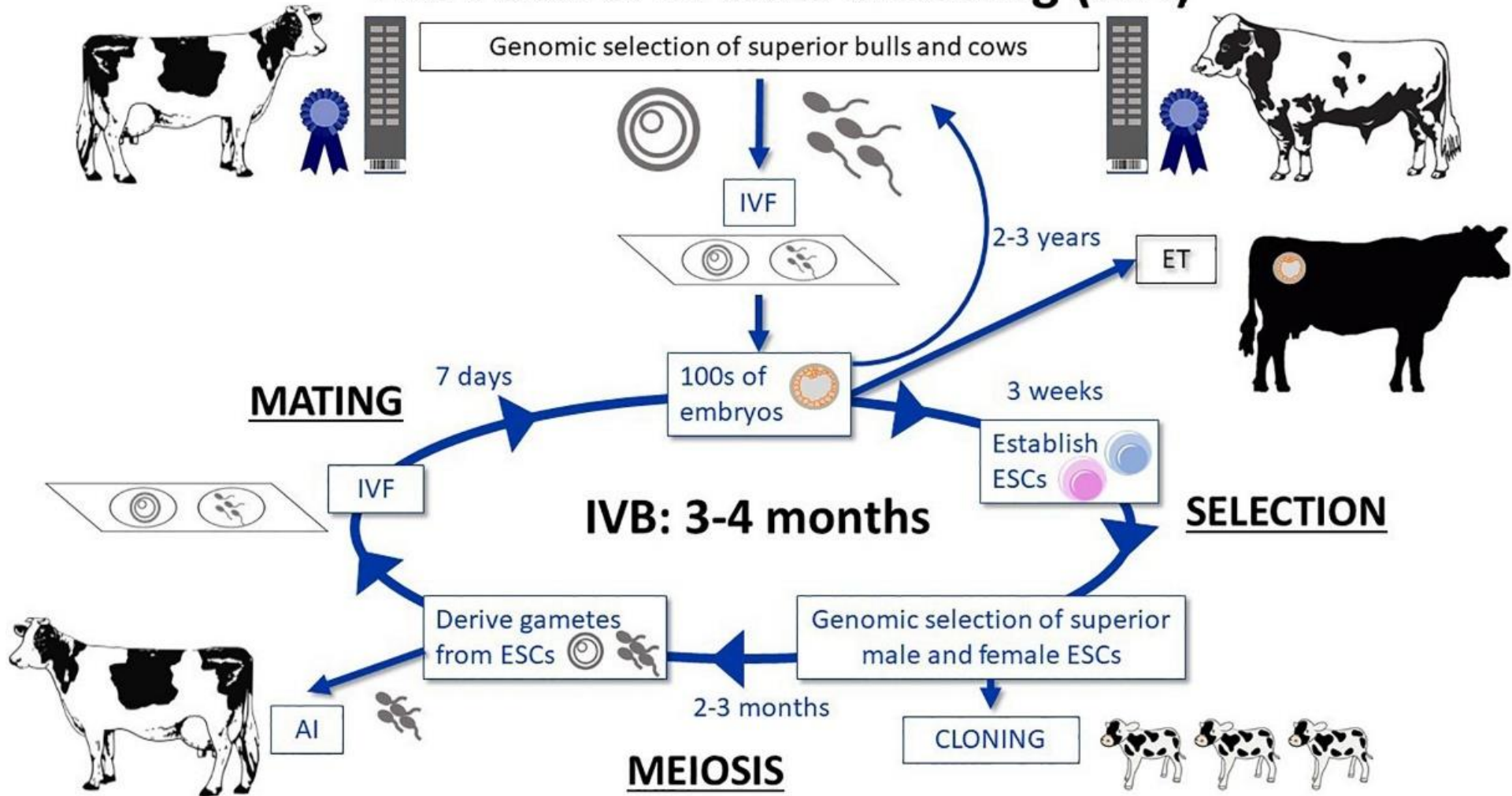
Merci...

Des questions?



Production of high genetic merit calves using a range of biotechnologies and showing where gene editing might fit into the process.

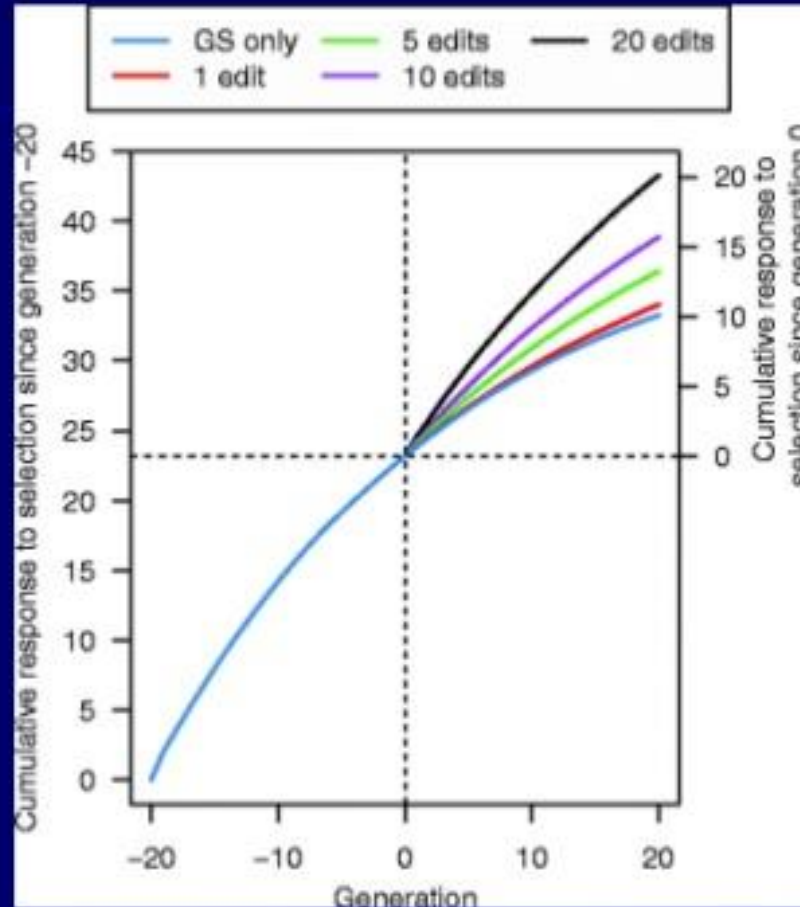
The Future: In vitro breeding (IVB)



Van Eenennaam, A. L. (2018). "Genetic improvement of food animals: past and future," in *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*, ed. R. Birner (Amsterdam: Elsevier).



Accelerated rate of gain when promoting 1-20 genome edits in genomic selection



Jenko, J. et al. 2015. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. *Genetics Selection Evolution* 47: 1-14.

Van Eenennaam 6/28/2018

Animal Genomics and Biotechnology Education