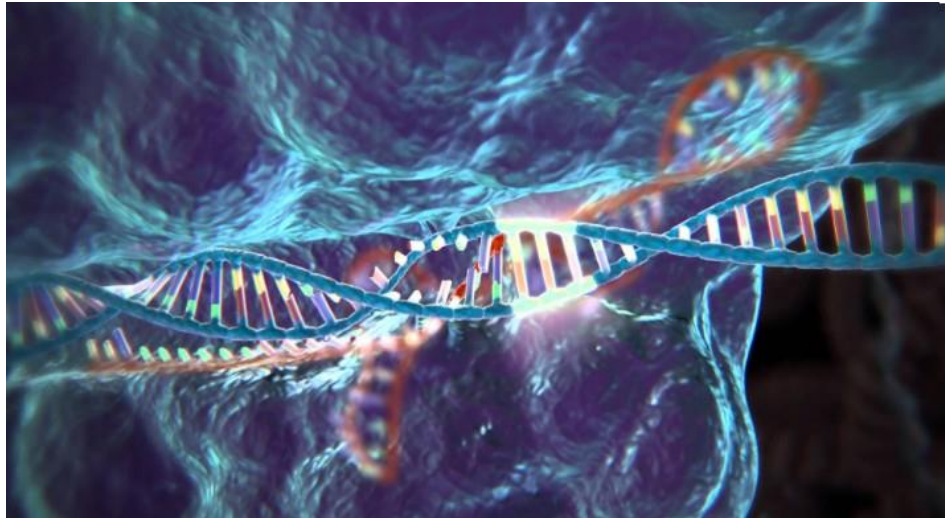


Modifications ciblées des génomes animaux

(CRISPR/Cas9 &co = « designer nucleases »)

Applications actuelles et potentielles



Alain Ducos

a.ducos@envt.fr

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
UMR INRA-ENVT-ENSAT 1388 GENPHYSE



Pour toute utilisation du contenu de cette présentation, veuillez citer l'auteur, son organisme d'appartenance, le volet 2 des ateliers « Modifications ciblées des génomes et enjeux éthiques » de la Plateforme « génétique et société » de Toulouse, le titre du document ainsi que la date. Merci



Sommaire

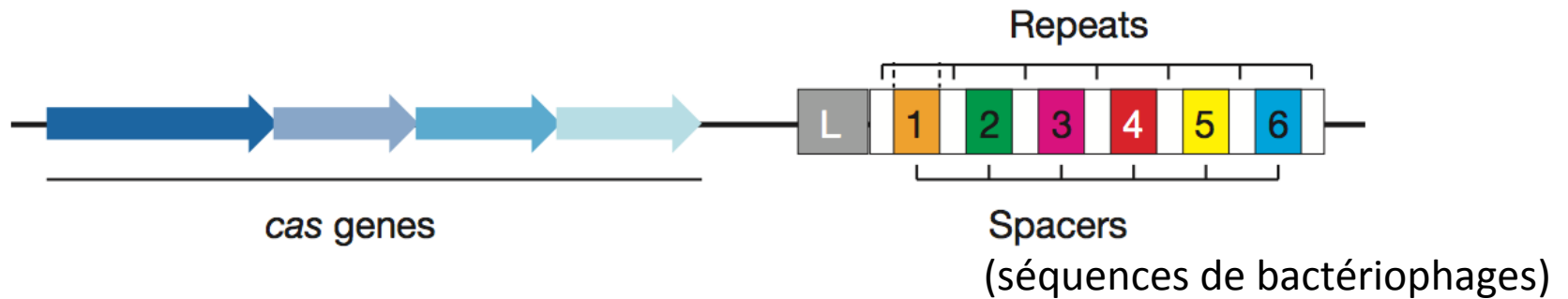
- CRISPR/Cas9 : quèsaco ?
- CRISPR/Cas9 (&co) : comment ça marche ?
- CRISPR/Cas9 (&co) : applications passées et/ou envisagées dans les espèces animales d'élevage
- CRISPR/Cas9 : limites et questions générales

Sommaire

- **CRISPR/Cas9 : quèsaco ?**
- CRISPR/Cas9 (&co) : comment ça marche ?
- CRISPR/Cas9 (&co) : applications passées et/ou envisagées dans les espèces animales d'élevage
- CRISPR/Cas9 : limites et questions générales

CRISPR : Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats

Bactéries
Archées



Marraffini (2015) Nature 526: 55-61

CRISPR est le « carnet de vaccination » des bactéries ...

CRISPR–Cas immunity in prokaryotes

Luciano A. Marraffini¹

Figure 1 | Stages of CRISPR-Cas immunity. CRISPR loci are a cluster of short DNA repeats (white boxes) separated by equally short spacer sequences of phage and plasmid origin (coloured, numbered boxes). This repeat/spacer array is flanked by an operon of CRISPR-associated (*cas*) genes (blue-tone arrows) that encode the machinery for the immunization and immunity stages of the system. The CRISPR array is preceded by a leader sequence (grey box) containing the promoter for its expression. **a**, In the immunization stage, spacer sequences are captured upon entry of the foreign DNA into the cell and integrated into the first position of the CRISPR array. **b**, In the immunity stage the spacer is used to target invading DNA that carries a cognate sequence for destruction. Spacers are transcribed and processed into small CRISPR RNAs (crRNAs) in the ‘crRNA biogenesis’ phase. These small RNAs act as antisense guides for Cas RNA-guided nucleases (which usually form a complex) that locate and cleave the target sequence (black arrowhead) in the invader’s genome during the ‘targeting’ phase.

Science, vol 337 (17 August 2012): 816–821

A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

Martin Jinek,^{1,2*} Krzysztof Chylinski,^{3,4*} Ines Fonfara,⁴ Michael Hauer,^{2,†}
Jennifer A. Doudna,^{1,2,5,6‡} Emmanuelle Charpentier^{4‡}

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems provide bacteria and archaea with adaptive immunity against viruses and plasmids by using CRISPR RNAs (crRNAs) to guide the silencing of invading nucleic acids. We show here that in a subset of these systems, the mature crRNA that is base-paired to trans-activating crRNA (tracrRNA) forms a two-RNA structure that directs the CRISPR-associated protein Cas9 to introduce double-stranded (ds) breaks in target DNA. At sites complementary to the crRNA-guide sequence, the Cas9 HNH nuclease domain cleaves the complementary strand, whereas the Cas9 RuvC-like domain cleaves the noncomplementary strand. The dual-tracrRNA:crRNA, when engineered as a single RNA chimera, also directs sequence-specific Cas9 dsDNA cleavage. Our study reveals a family of endonucleases that use dual-RNAs for site-specific DNA cleavage and highlights the potential to exploit the system for RNA-programmable genome editing.



Article cité 1214 fois (interrogation du 10 mai 2016)

Sommaire

- CRISPR/Cas9 : quèsaco ?
- **CRISPR/Cas9 (&co) : comment ça marche ?**
- CRISPR/Cas9 (&co) : applications passées et/ou envisagées dans les espèces animales
- CRISPR/Cas9 : limites et questions générales

CRISPR : outil de « genome editing » (GE) → modification (ingénierie) ciblée du génome

Rapport du chantier Agro-Ecologie, DOCUMENT DE TRAVAIL, 1^{er} JUIN 2012

1. CONTEXTE ET ENJEUX DU CHANTIER AGRO-ECOLOGIE

1.1. Introduction

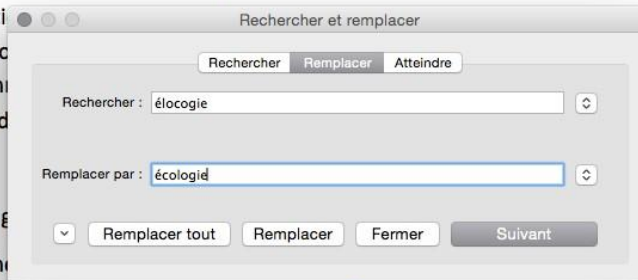
En Septembre 2003, Jean-Baptiste Bergé et Pierre Stengel ont présenté au Conseil Scientifique de l'INRA un rapport sur les recherches en Ecologie, visant à mieux positionner l'INRA dans ce domaine scientifique, en étant acteur de : « l'évolution des interactions vivant-milieu, ...), de l'acquisition de connaissances en **écologie** évolutive, et en **écologie** des communautés, et en représentation des dynamiques évolutives de ces systèmes ».

Ce rapport indiquait que :

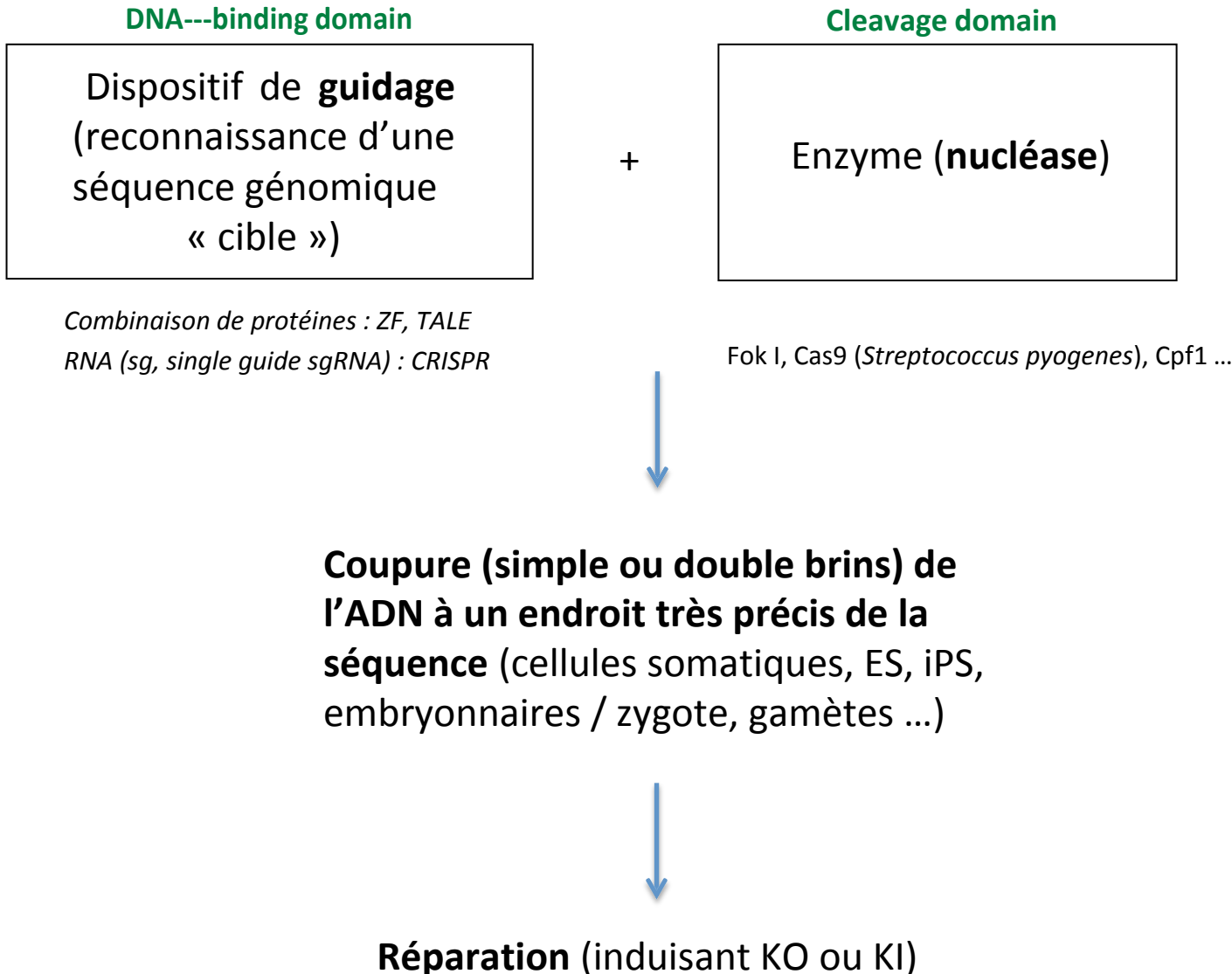
- > l'**écologie** «académique» s'était longtemps limitée à la description et à la modélisation de la dynamique des populations et des communautés ;
- > le contenu **écologique** des recherches a été largement délaissé au profit d'une application au détriment de leur contenu conceptuel ou théorique ;
- > la dispersion structurelle et la diversité des objets limitaient les ambitions génériques.

L'INRA n'était finalement pas suffisamment visible en **écologie**, malgré sa connaissance approfondie, multidisciplinaire et à différents niveaux d'organisation d'agro-écosystèmes qui présentent plusieurs avantages pour les études en **écologie** : caractère «extrémisé» et maîtrisé pour la compréhension et la modélisation des mécanismes; espèces d'intérêt économique, source de modèles pour des espèces moins connues; analyse des relations pressions -> adaptations.

Il avait été proposé de structurer les communautés de l'**écologie** autour de deux grandes catégories d'objets : écosystèmes cultivés et écosystèmes moins anthropisés. Cette structuration a conduit à la création du département 'Ecologie des Forêts, Prairies et Milieux Naturels' en 2004. A l'époque, un enjeu majeur d'articulation entre **écologie** des interactions entre organismes, des populations et communautés (SPE), d'une part, et **écologie** fonctionnelle, écophysologie (EA), d'autre part, avait déjà été identifié. Ce rapport notait également la nécessité de surmonter le clivage cultivé / non cultivé, grâce à des opérations structurantes communes à développer : unités partagées ; constitution de pôles en lien avec écoles doctorales; prise en charge partagée de questions relatives aux interfaces. Un programme d'**écologie** portant en particulier sur l'impact des pressions anthropiques et sur les structures et dynamiques paysagères avait été préconisé, puis lancé en 2004 (ECOSER), avec un colloque de clôture en 2009.



« Designer nucleases » (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) : principes généraux

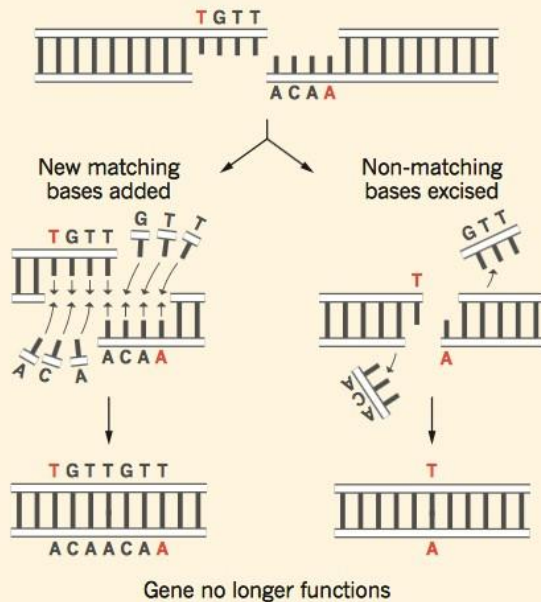


Deux façons de réparer la cassure double-brins (DSB)

NHEJ

Non-homologous end joining for gene knock out

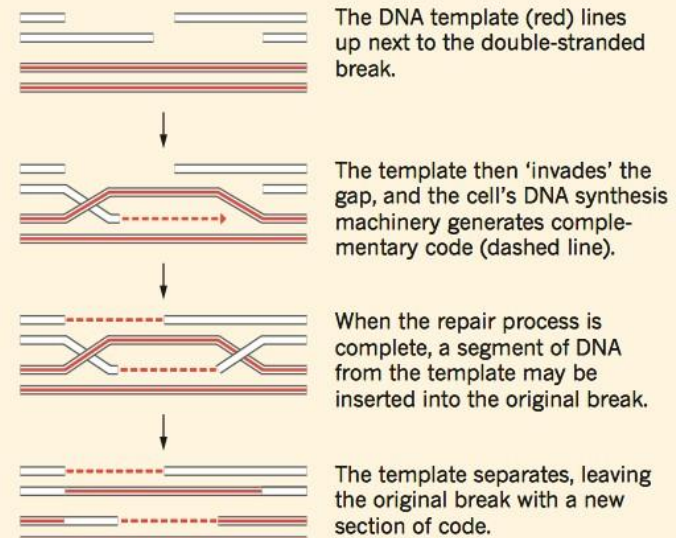
DNA is repaired in an error-prone manner — by either adding or removing bases — so that the gene can no longer be translated.



HDR

Homology-directed repair for gene knock in

A DNA template, or 'homologous sequence', accompanies the DNA-cutting enzyme so that the repair results in an altered or an inserted gene.

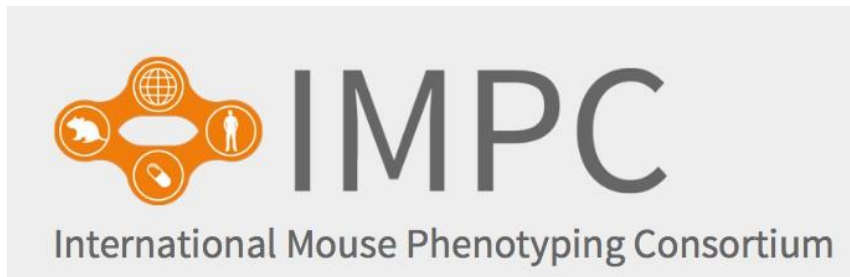


Indel → → **KO** (mutations « frameshift »)

KI

« Designer nucleases » : qu'est---ce que ça change ?

On sait faire des modifications ciblées depuis longtemps chez la souris
(recombinaison homologe dans les **cellules embryonnaires souches = ESC**)



The goal of the International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC) is to discover functional insight for every gene by generating and systematically phenotyping 20,000 knockout mouse strains.

<http://www.mousephenotype.org>

Pour les espèces sans « ESC technology », les « designer nucleases » permettent de s'affranchir des principales limites des techniques plus anciennes

- Rétrovirus (vecteurs lentiviraux ...)
- Micro-injection pronucléaire – zygote 1 cellule (1980 →→)
- Recombinaison homologue conventionnelle dans des cellules somatiques en culture + SCNT (2000 →→)
- ...



- **Très faible efficacité** (rendement de transformation) ; transformation mono-allélique
- **Nécessité d'une sélection →→ Laisse des « traces »** (gènes de résistance aux antibiotiques ...)
- **Coût élevé** (250.000 \$ pour développer une lignée de bovins GE : Ward et al, 1997, cité par Murray et Maga, 2016, *Transgenic Res* DOI 10.1007/s11248-016-9927-7)
- **Intégration aléatoire** des **transgènes** (localisation, nombre de copies)
 - Faible expression des transgènes
 - Faible reproductibilité
 - Effets pléiotropiques (disruption de gènes aux sites d'intégration des transgènes)
- **SCNT (clonage) nécessaire**
- **Risques pour la santé (utilisation de vecteurs viraux)**

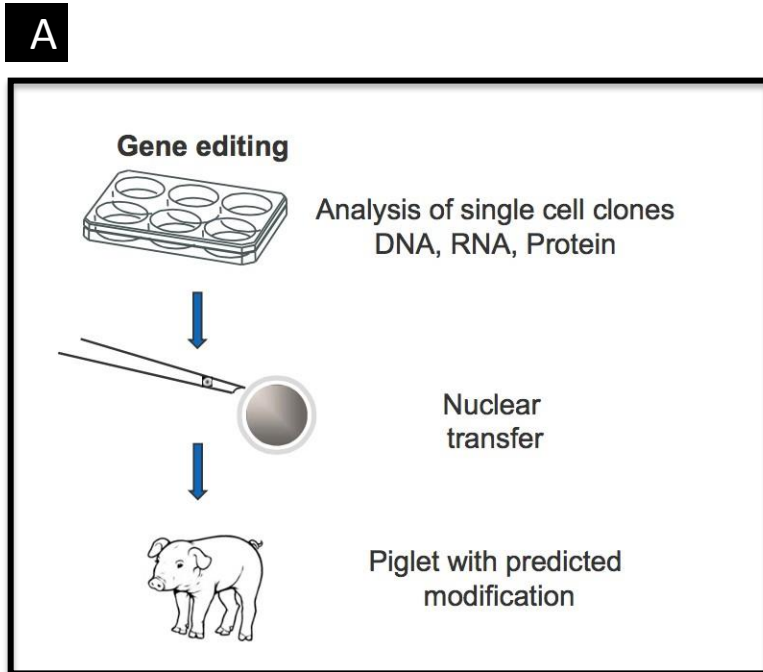
« Tout étudiant en biologie de niveau master qui dispose des équipements standards d'un laboratoire est à même de manipuler le système Crispr---Cas9 pour éliminer un gène » *(Emmanuelle Charpentier)*

En savoir plus sur <http://www.lesechos.fr/week-end/business-story/enquetes/021837069995-crispr-la-decouverte-qui-met-la-genetique-en-ebullition-1214210.php?FABTKJdavXoZBKJF.99#>

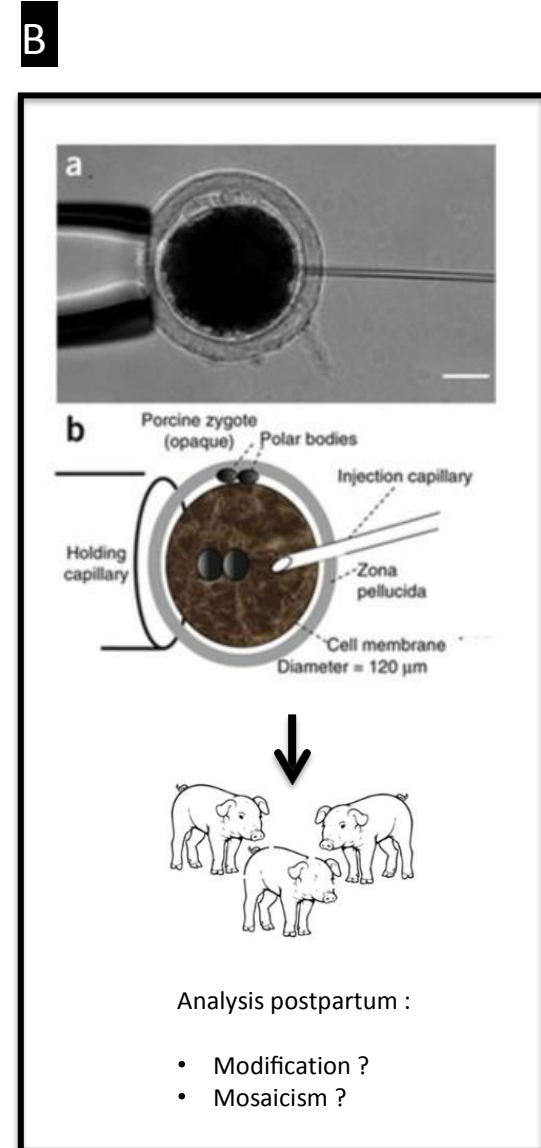
Approches expérimentales : 1) chez les mammifères

Modification(s) ciblée(s) :

- A. de cellules somatiques en culture, suivie(s) de SCNT
- B. de zygotes (œuf fécondé, 1 cellule)



(Schnieke, 2015: ILAR Roundtable)



Approches expérimentales : 2) dans les espèces aviaires

Modifications ciblées des PGC = Primordial Germ Cells

Les PGC (précurseurs des gamètes) migrent, via la circulation sanguine, du croissant germinal jusqu'aux crêtes génitales et colonisent les gonades en formation (*relatively high germline transmission efficiency when introduced into the bloodstream of recipient embryos*).

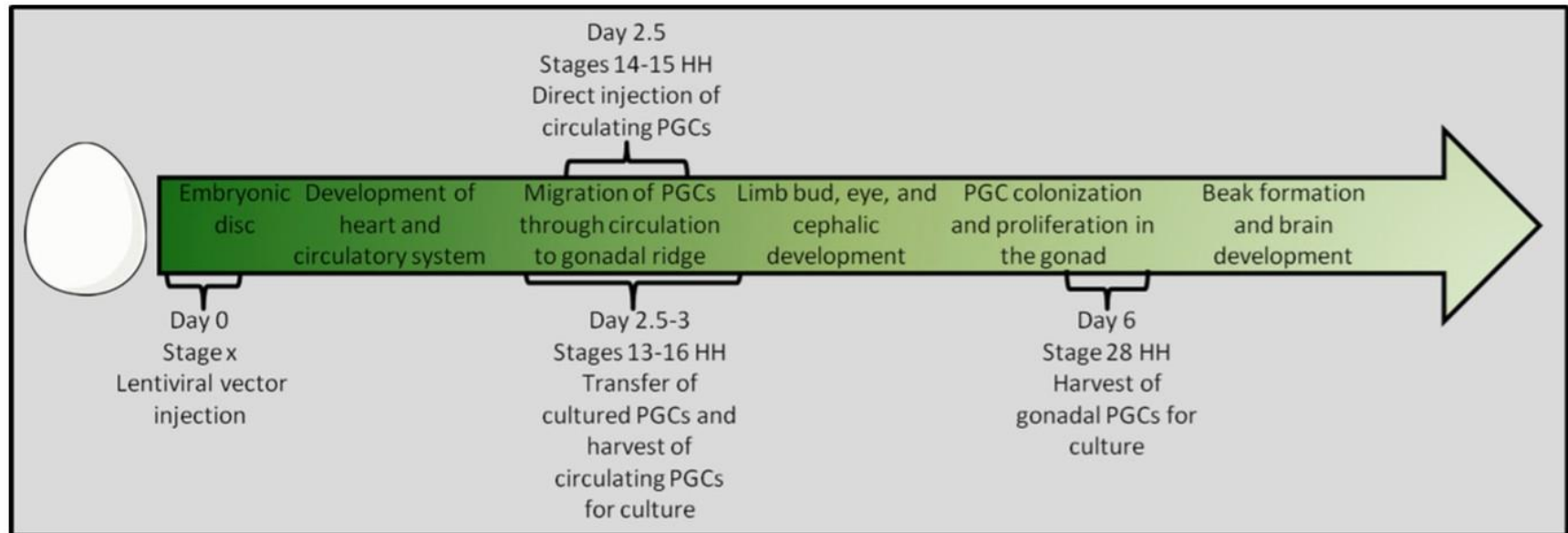


Fig. 1 Schematic of common time points during embryogenesis when genetic manipulations are performed

Tyack et al (2013) *Transgenic Res* 22: 1257---1264

Doran et al (2016) *Transgenic Res* DOI 10.1007/s11248-016-9926-8

Dans les espèces aviaires (poulet) : modifications ciblées par **transfection directe *in vivo*** des **PGC** (primordial germ cells)

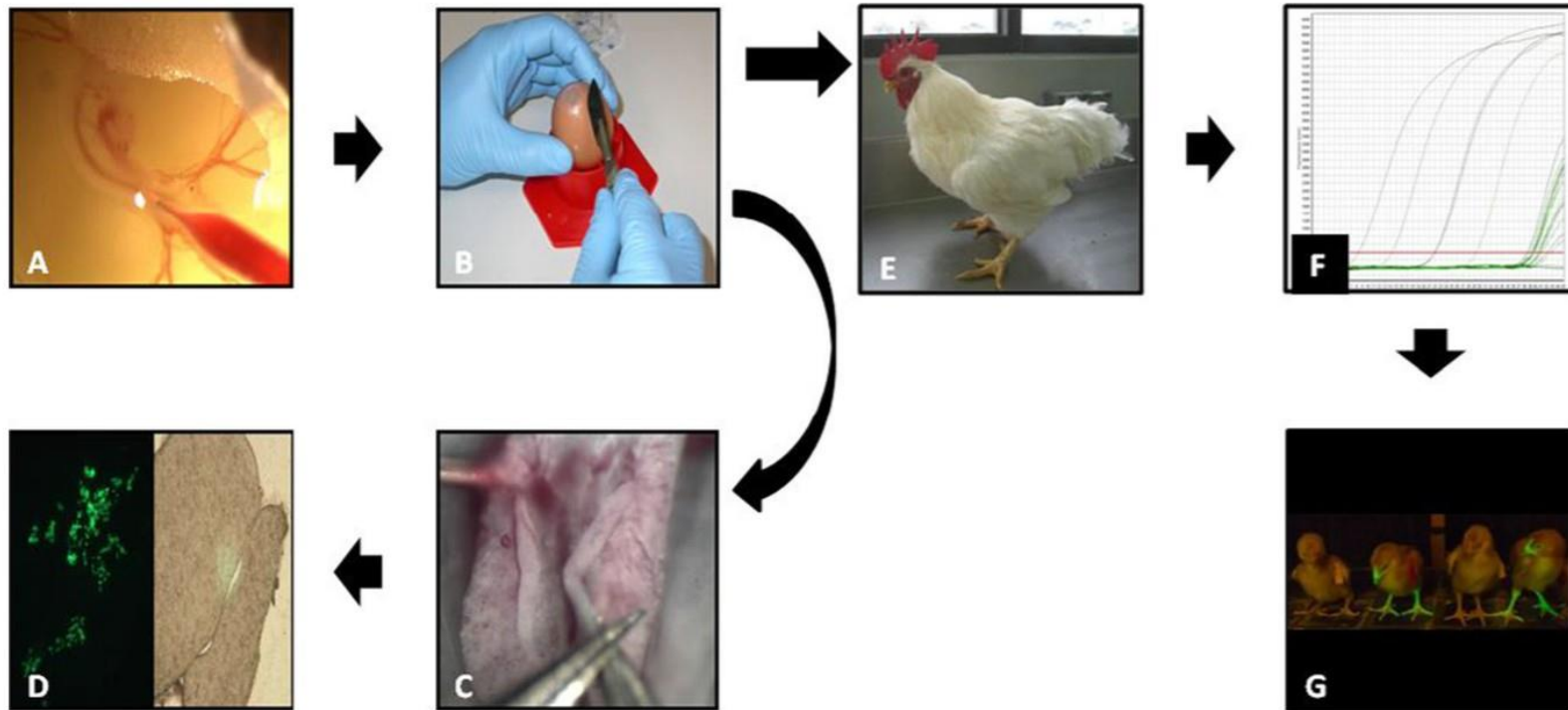


Fig. 2 Production of transgenic chickens via direct *in vivo* transfection of primordial germ cells (PGCs). **a** Direct injection of lipofectamine and DNA constructs (which can include a marker gene such as GFP) into the circulatory system of day 2 embryos (stage 14 HH) to target PGCs as they migrate to the developing gonads. **b** Reseal eggs and incubate. **c** A proportion of day 12 embryos are dissected and the gonads are removed.

d Gonads are examined to access integration of the transgene into the germ cells. **e** The remaining embryos are incubated till hatch and males are kept until they reach sexual maturity. **f** Semen is collected and screened for presence of the transgene through qPCR. **g** Males with high levels of transgenic sperm are bred to hens and offspring are screened visually for presence of the marker gene

Tyack et al (2013) Transgenic Res 22: 1257---1264

Doran et al (2016) Transgenic Res DOI 10.1007/s11248-016-9926-8

Sommaire

- CRISPR/Cas9 : quèsaco ?
- CRISPR/Cas9 (&co) : comment ça marche ?
- **CRISPR/Cas9 (&co) : applications passées et/ou envisagées dans les espèces animales**
- CRISPR/Cas9 : limites et questions générales

Les champs d'application sont très nombreux

- Recherche fondamentale



- **Applications biomédicales** : thérapies humaines (maladies génétiques et infectieuses, lutte contre les agents pathogènes en modifiant leur génome) ; possibilité de modifier la lignée germinale humaine ...



- **Ingénierie écologique** (e.g. gene drive / mutagenic chain reaction)



- **Applications « agronomiques »** (produire plus, mieux, avec moins ...)

- Création de **modèles animaux** de pathologies humaines
- Productions d'animaux modifiés pour produire des « **services bio-médicaux** » (organes pour xénogreffes, production de protéines recombinantes dans la glande mammaire)

- ...



Applications « agronomiques » : objectifs généraux

1. **Améliorer l'efficacité des élevages, tout en protégeant (préservant, respectant) l'environnement (produire plus et mieux, avec moins)**
2. **Améliorer la santé et le bien être des animaux**
3. **Améliorer la nutrition et la santé de l'Homme, la sécurité alimentaire**

Cas publiés : ZFN et TALEN principalement, pour l'instant ...

Applications « agronomiques » : objectifs généraux

- 1. Améliorer l'efficacité des élevages, tout en protégeant (préservant, respectant) l'environnement (produire plus et mieux, avec moins)**
2. Améliorer la santé et le bien être des animaux
3. Améliorer la nutrition et la santé de l'Homme, la sécurité alimentaire



Taureaux de race BBB (type « viandeux ») --- Thèse Arnaud Sartelet, Liège, 2013

Des mutations naturelles du gène MSTN sont connues chez les bovins depuis ≈ 20 ans

Une stratégie «gène candidat positionnel» a permis de déterminer que le caractère culard est dû à une mutation dans le gène de la **myostatine (GDF---8)**, membre de la superfamille des TGF β (ce gène est un facteur de régulation de la multiplication cellulaire dans les premiers stades de développement de l'embryon). BTA2

Grobet et al., 1997, Nat. Genet. 17, 71-4

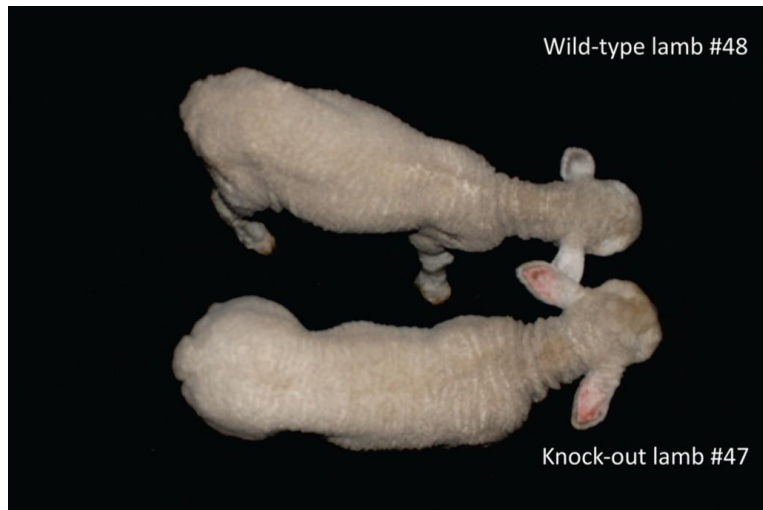
Identification de **5 mutations** induisant des **pertes de fonction** dans **8 races européennes**
Les animaux culards sont homozygotes pour une mutation ou hétérozygotes composites

Grobet et al., 1998, Mamm. Genome 9, 210---3



KO du gène MSTN chez le mouton

- **CRISPR/Cas9**
- Microinjection de sgRNA (ciblant l'exon 1 du gène) et Cas9 mRNA dans le cytoplasme de 216 zygotes
- 20 embryons séquencés (Sanger) → → 10 mutants hétérozygotes et mosaïques
- 53 embryons transplantés dans 29 receveuses, 19 gestantes, 22 agneaux nés
- 10 agneaux avec des mutations indel, dont 5 homozygotes out-of-frame, hypermusclés
- 1 seul site muté « off-target » chez les deux animaux séquencés



Crispo et al (2015) PLoS One 0136690

(Uruguay + France)

Applications « agronomiques » : objectifs généraux

1. Améliorer l'efficacité des élevages, tout en protégeant (préservant, respectant) l'environnement (produire plus et mieux, avec moins)
2. Améliorer la santé et le bien être des animaux (1)
3. Améliorer la nutrition et la santé de l'Homme, la sécurité alimentaire

Les mammites constituent la pathologie n°1 des élevages laitiers en France. Elles touchent plus de **40 % des vaches en production** et coûtent de l'ordre de **30 € par 1000 litres de lait** (230 € / vache / an). La lutte contre ces infections constitue donc un enjeu technico-économique majeur pour les éleveurs.

<http://idele.fr/rss/publication/idelesolr/recommends/mammmites-cliniques-en-elevage-bovin-lait-deux-eleveurs-temoignent.html>



ÉCOANTIBIO

RÉDUIRE L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES VÉTÉRINAIRES

des objectifs quantitatifs...

La réduction de 25 % de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire en 5 ans : seules les quantités appropriées strictement nécessaires aux animaux doivent être prescrites et administrées.



Intégration (KI) d'un transgène codant une protéine humaine ayant des propriétés antimicrobiennes (lysozyme et/ou lactoferrine)

- Transfection de fibroblastes fœtaux (**ZFN**) (targeting vector pCSN2-hLYZ-Neo-GFP + ZFN-encoding plasmid)
- Intégration du transgène au locus de la β -caséine (CSN2 - intron 2)
- **KI pour 1% des fibroblastes** → → SCNT
- 5 veaux **transgéniques** (femelles)
- Pas de différence de production laitière par rapport aux témoins
- Le lait des vaches transgéniques inhibe *S. aureus*; *E. coli* ...
- Pas d'infection mammaire suite à une infection expérimentale

group	mammary glands treated	mammary glands infected ^a	number of bacteria ($\times 10^3$ CFU ml ⁻¹)			
			0 h	12 h	24 h	48 h
TG	5 (<i>Sta. aureus</i>)	0	0	0	0	0
TG	5 (<i>Str. agalactiae</i>)	0	0	0	0	
TG	5 (<i>E. coli</i>)	0	0	0	0	
TG	5 (PBS)	0	0	0	0	
WT	5 (<i>Sta. aureus</i>)	5	0	1.9 \pm 0.4	3.2 \pm 0.7	4.8 \pm 0.5
WT	5 (<i>Str. agalactiae</i>)	4	0	1.4 \pm 0.3	5.9 \pm 0.8	5.7 \pm 0.7
WT	5 (<i>E. coli</i>)	5	0	1.6 \pm 0.2	4.5 \pm 0.6	4.1 \pm 0.8
WT	5 (PBS)	0	0	0	0	0

^aInfection was defined as bacterium growth in two consecutive milk samples collected 12–24 h apart.

« ... The transgene product would be consumed in the milk, but because hLZ is naturally present in saliva, it is thus eaten daily by everyone. Lysozyme from hen egg whites is extensively used in the food industry to prevent spoilage and has a « generally recognized as safe » (GRAS) status ... »

Murray & Maga (2016) PNAS 113(13):3410-3413

(University of California, Davis)



Travaux antérieurs sur le même thème (dès 2002)

Effets positifs de la consommation de lait produit par les animaux transgéniques (h-lysozyme ou h-lactoferrine) dans des modèles expérimentaux (rats, porcs ...) :

- **Réduction de l'inflammation intestinale** (augmentation de la sécrétion de cytokine anti-inflammatoires)
- **effets favorables sur la flore intestinale et promotion de la croissance**
- **Réduction de l'abondance de bactéries associées à des pathologies intestinales** (Salmonella ssp., E. coli, streptocoques, campylobacter)
- **Augmentation de bactéries associées à la santé de l'intestin** (bifidobactéries, lactobacilles),
- Récupération plus rapide suite à une diarrhée EC entérotoxigénique ... (revue par Cooper et al, 2015)

Cooper et al (2015) Transgenic Res (2015) 24:605–614

Applications « agronomiques » : objectifs généraux

1. Améliorer l'efficacité des élevages, tout en protégeant (préservant, respectant) l'environnement (produire plus et mieux, avec moins)
2. **Améliorer la santé et le bien être des animaux (2)**
3. Améliorer la nutrition et la santé de l'Homme, la sécurité alimentaire

Écornage des bovins :

- Praticqué pour **protéger les animaux et les éleveurs** (accessoirement les vétérinaires ...)
- On écorne chaque année des millions de veaux (>10 millions rien qu'aux USA)
- Pratique dénoncée par les associations de protection animale et très mal considérée par les citoyens



- *The wild ancestors of modern cattle used their horns for defense, but on a 21st century farm, few cattle ever see a predator (Carroll et al, 2016)*

Des mutations naturelles « sans corne » sont connues de longue date, et ont été récemment localisées et caractérisées (BTA1)

Medugorac et (2012) PLoS One 7(6): e39477



La sélection « classique » est une option pour augmenter la fréquence des animaux naissant sans corne



AGILITÉ :
CETTE GÉNISSE N'AURA JAMAIS DE CORNES !

GLOR P ISY

BENEDICT X GOLDWYN TB86 X O MAN JUST TB85



HERF. 1004 - OR - SCL 50 134

N°1 SANS CORNES DISPONIBLE ISU +160

- Excellentes Mamelles +2.4
- Sain en Cellules +2.1
- Facile à utiliser dans la population Sans Cornes

ISU	160	CD	69	TP	-0.6	TB	0.5	LAIT	462
MUSPDI	+2.2	MAM	+2.4	CORPS	+0.1	HBRE	+0.6	STMA	+2.1
REPRO	+0.5	LEVY	+2.2	TRAITE	+1.2				

Originaire de la souche Rudolph Lulu, Glor P est ce qui se fait de mieux dans la population sans cornes avec Grapon P ISU +168. Ses qualités de Fonctionnels et de Mamelles sont dignes d'une utilisation qui dépasse la reproduction polaire !

TRANSMISSION DU CARACTÈRE SANS CORNES :



pp x Pp =

Pp x Pp =

PP x PP =

PP x pp =

pp x Pp =

P : Allèle qui exprime le caractère sans cornes
p : Allèle qui exprime le caractère avec cornes

EVOLUTION, LE LEADER DE LA GÉNÉTIQUE SANS CORNES

Une offre sans cornes digne d'une large utilisation

- Près de 10 taureaux disponibles
- Les 5 meilleurs taureaux sans cornes disponibles sur ISU (> 150)

La Diversité des pedigrees

- Glor P, Grapon P, Gecko P ou encore Despard P peuvent être utilisés sur l'origine Lawn Boy fortement présente dans la population sans cornes !

Un gène dominant dont on bénéficie rapidement

- Exprimé dès la 1^{re} génération
- Le gène sans cornes est dominant (le Red Holstein) Si 1 seul des 2 parents transmet le caractère, le veau naîtra naturellement sans cornes.
- Un animal sans cornes peut engendrer un veau avec cornes
- Avec l'effet de dominance, un animal sans cornes peut engendrer un veau avec cornes s'il ne transmet pas l'allèle porteur du caractère.

DASSI P RF

LAWN BOY P - GEMMA 2017 DALL - JACKO BECK EXPS



FILE. 1004 - SACS HER DANES - 22

LE SANS CORNES CONFIRMÉ !

- Production équilibrée
- Des Mamelles solides
- Un des 1^{er} pallid utilisés sur descendance

ISU	147	CD	92	TP	1.0	TB	+1.8	LAIT	631
MUSPDI	+2.0	MAM	+2.3	CORPS	+0.3	HBRE	+0.2	STMA	+0.2
REPRO	+0.7	LEVY	+1.8	TRAITE	+0.7				

Dassid est l'un des premiers taureaux sans cornes testés sur descendance. Petit-fils de Bematina EXPS, il marque particulièrement sa descendance dans les mamelles, le TP et la Fertilité.

GESPARÉD P

DANACOL - STRAWBERRY - LANGAULT 1990



UN RED COMPLET ET SANS CORNES

- Un red très élevé en Matière Protéique
- Bonnes attaches de Mamelles
- Unique fils de DANACOL sur le marché

ISU	144	CD	70	TP	1.2	TB	-0.6	LAIT	870
MUSPDI	+0.8	MAM	+0.7	CORPS	+0.1	HBRE	+0.7	STMA	+0.3
REPRO	+0.1	LEVY	0.0	TRAITE	0.0				

Rare fils de Danacol (Borne + Mascot) sur Oréana (Père P) (Bégon + P) facile à utiliser par son originalité. Il fait parti des meilleurs taureaux Red et sans Cornes pour apporter du TP et du Lait.

Mais :

- **Le niveau génétique des individus porteurs reste bien plus faible en moyenne** → → répercussions économiques
- **Ca peut prendre beaucoup de temps** : >20 ans pour avoir 50% d'animaux sans corne en Holstein
<http://www.progressivedairy.com/topics/a-i-breeding/half-of-holstein-heifer-calves-could-be-polled-by-2034>

Solution beaucoup plus efficace : la modification ciblée des génomes !

Carlson et al (2016) Nature Biotechnol 34(5): 479-481 (mai 2016)



Introgression « non-méiotique » d'allèles intéressants

- Introduction de l'allèle « **sans corne** » d'origine celtique (Pc, origine Angus : duplication de 212 pb qui remplace une délétion de 10 pb) dans des **fibroblastes** d'un animal cornu
- **TALEN** (HDR-mediated), plasmide HDR-template (1594 bp fragment incluant Pc) ou mRNA (mRNA préférable car évite l'intégration des plasmides d'expression)
- TALEN configuré pour cliver l'allèle « horned » (cornu) mais pas l'allèle Pc
- 5 colonies cellulaires / 226 avec l'introgression (soit 2%), dont **3/5 homozygotes** (confirmation par séquençage)
- Ces travaux (présentés avec de nombreux autres dans la publication) n'ont pas été au delà du stade cellulaire

Tan et al (2013) PNAS 110:16526-31

(USA - Minnesota)



Résultats complémentaires dans Carlsson et al (2016) Nature Biotechnol 34(5): 479---481 (mai 2016)

- 5 veaux vivants nés (suite à SCNT)
- 2 veaux homozygotes ont actuellement 10 mois (Spotigy & Bury, cf photo)
- Vérification de l'absence d'introggression off---target par séquençage



Applications « agronomiques » : objectifs généraux

1. Améliorer l'efficacité des élevages, tout en protégeant (préservant, respectant) l'environnement (produire plus et mieux, avec moins)
2. Améliorer la santé et le bien être des animaux (3)
3. Améliorer la nutrition et la santé de l'Homme, la sécurité alimentaire

Bientôt la fin du calvaire des poussins mâles ?

Par Coralie Schaub — 25 août 2015 à 19:07

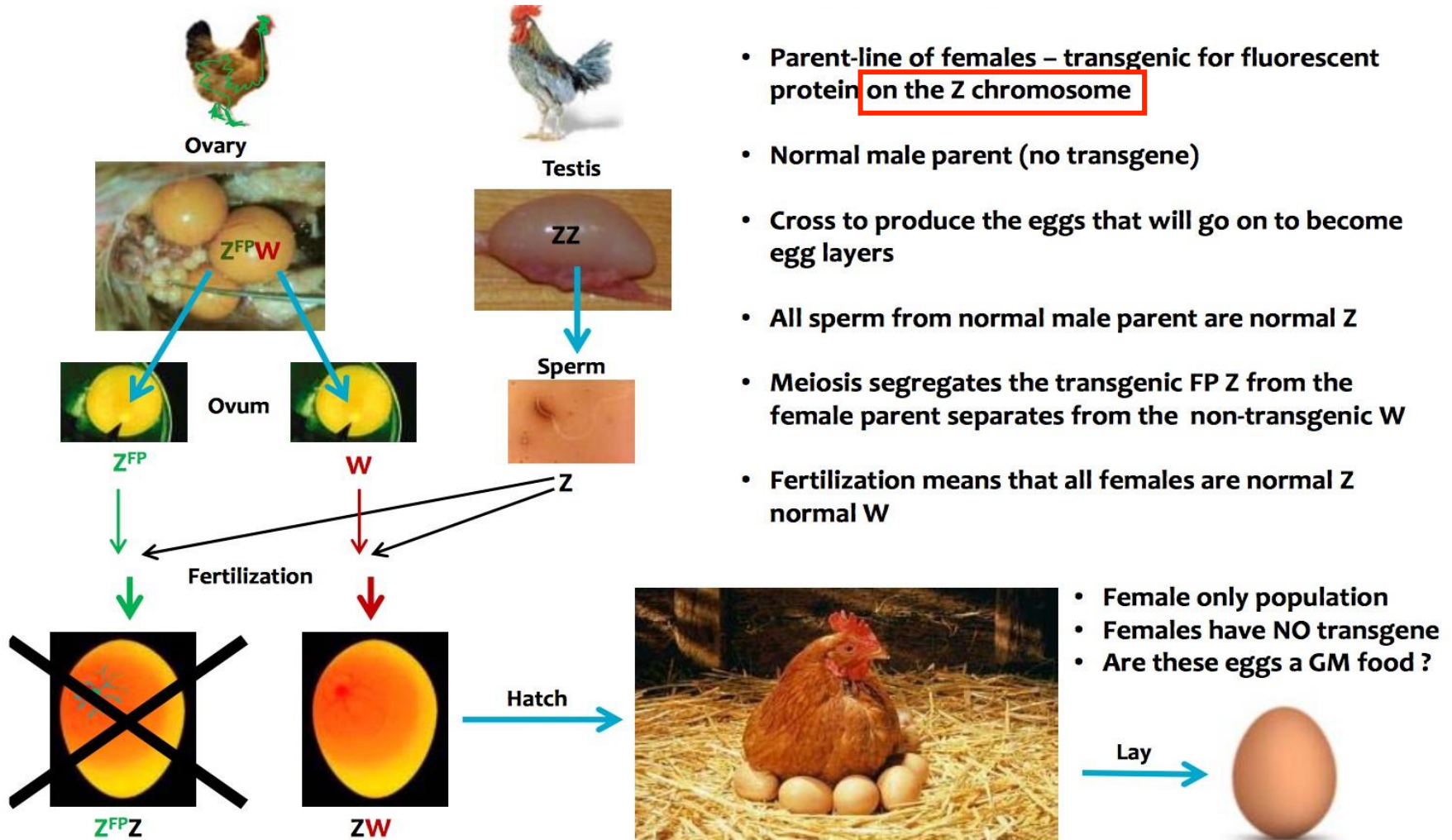


Un sexeur examine des poussins, le 16 juillet 2010 à Willgothem (Bas-Rhin) AFP



Broyés vivants, gazés, étouffés dans des sacs poubelles, les poussins mâles de race «pondeuse» sont traités comme des déchets. Désormais appuyée par 42 parlementaires, l'association L214 fait campagne pour des alternatives à ces pratiques. Elle sera reçue jeudi au ministère de l'Agriculture.

Sélection du sexe avant éclosion pour la production de poules pondeuses (projet)



- Parent-line of females – transgenic for fluorescent protein **on the Z chromosome**
- Normal male parent (no transgene)
- Cross to produce the eggs that will go on to become egg layers
- All sperm from normal male parent are normal Z
- Meiosis segregates the transgenic FP Z from the female parent separates from the non-transgenic W
- Fertilization means that all females are normal Z normal W

- Female only population
- Females have NO transgene
- Are these eggs a GM food ?

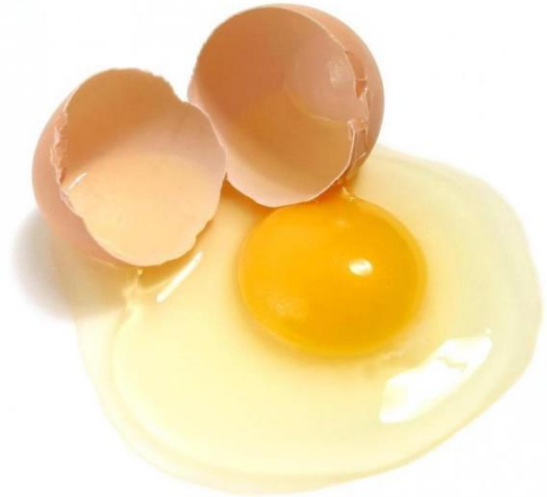
Applications « agronomiques » : objectifs généraux

1. Améliorer l'efficacité des élevages, tout en protégeant (préservant, respectant) l'environnement (produire plus et mieux, avec moins)
2. Améliorer la santé et le bien être des animaux
3. **Améliorer la nutrition et la santé de l'Homme, la sécurité alimentaire**

Allergies d'origine alimentaire : problème de santé publique majeur

Allergènes retrouvés chez l'enfant (*Loscheider et Martens, 2010*) :

- **Blanc d'oeuf** : 34%
- **Lait de vache** : 8% (1^{ère} position avant 1 an)
- ...



Modification de la composition protéique de l'œuf par ingénierie ciblée du génome

1^{ère} application (« designer nuclease ») : publication en 2014

- **Modification de PGC en culture**
- **Technologie TALEN**
- **KO du gène OV (ovalbumine** : 54% des protéines du blanc d'œuf ; allergénique) : séquence cible exon 2 du gène
- Délétions de 6-29 nucléotides (33,3% des PGC mutées)
- Transplantation des PGC mutées dans des embryons receveurs pour générer des individus G0 avec des lignées germinales chimériques (N=2)
- Production de descendants G1 mutés (8%) à partir de ces individus G0 chimériques (accouplés avec des individus normaux → mutation mono-allélique chez les descendants G1)
- Aucune anomalie constatée chez les descendants mutés
- Aucune mutation off-target détectée (séquençage)

Park et al (2014) PNAS vol 111, n°35 (September 2): 12716---12721

(Corée du Sud)

≈ idem en 2016

- **Technologie CRISPR/Cas9 (1^{ère} fois dans une espèce aviaire)**
- 2 gènes mutés (*OVA* = *ovalbumin* & *OVM* = *ovomucoïd* → → protéines allergéniques)
- Efficacité de transformation supérieure (>90% ; combinaison avec une sélection antibiotique)
- Proportion supérieure de descendants G1 mutés (50%)
- Production de **mutants *OVM* homozygotes** (G2 = G1 x G1))

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system

Isao Oishi¹, Kyoko Yoshii¹, Daichi Miyahara², Hiroshi Kagami² & Takahiro Tagami³

Received: 23 October 2015

Accepted: 17 March 2016

Published: 06 April 2016

DOI:10.1038/srep23980

The CRISPR/Cas9 system is a simple and powerful tool for genome editing in various organisms including livestock animals. However, the system has not been applied to poultry because of the difficulty in accessing their zygotes. Here we report the implementation of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in chickens. Two egg white genes, *ovalbumin* and *ovomucoïd*, were efficiently (>90%) mutagenized in cultured chicken primordial germ cells (PGCs) by transfection of circular plasmids encoding Cas9, a single guide RNA, and a gene encoding drug resistance, followed by transient antibiotic selection. We transplanted CRISPR-induced mutant-*ovomucoïd* PGCs into recipient chicken embryos and established three germline chimeric roosters (G0). All of the roosters had donor-derived mutant-*ovomucoïd* spermatozoa, and the two with a high transmission rate of donor-derived gametes produced heterozygous mutant *ovomucoïd* chickens as about half of their donor-derived offspring in the next generation (G1). Furthermore, we generated *ovomucoïd* homozygous mutant offspring (G2) by crossing the G1 mutant chickens. Taken together, these results demonstrate that the CRISPR/Cas9 system is a simple and effective gene-targeting method in chickens.

(Japon)

Autres applications (« pets »)

China's bold push into genetically customized animals

New kinds of dogs, goats, monkeys and pigs are being made quickly, though scientists voice worries about ethics.

Christina Larson

18 November 2015

 Rights & Permissions

\$ 1.600 (!)

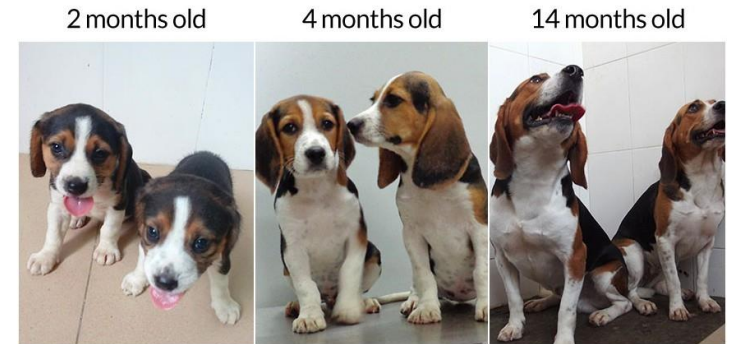


BGI

A technician at the genomics institute BGI in Shenzhen, China, holds a genetically-modified micropig.

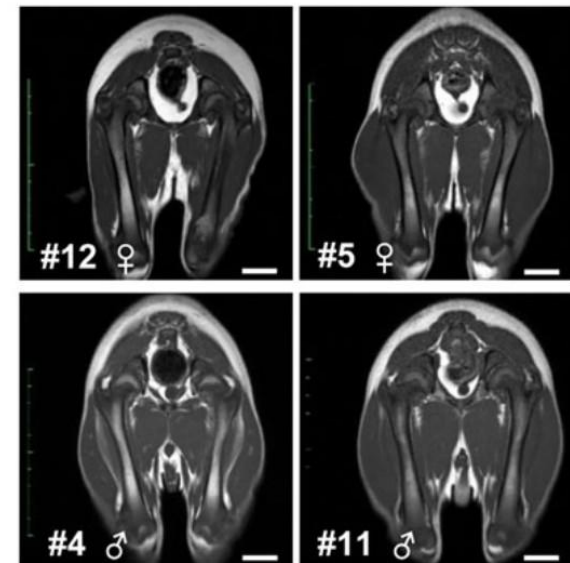
<http://www.nature.com/news/china-s-bold-push-into-genetically-customized-animals-1.18826>

Mutations MSTN chez le chien (Beagle)



Control

GE



Zou et al (2015) *Journal of Molecular Cell Biology* (2015), 7(6), 580–583

Sommaire

- CRISPR/Cas9 : quèsaco ?
- CRISPR/Cas9 (&co) : comment ça marche ?
- CRISPR/Cas9 (&co) : applications passées et/ou envisagées dans les espèces animales
- **CRISPR/Cas9 : limites et questions générales**

Limites techniques

Jo et al. (2015) Biochimica et Biophysica Acta

- Spécificité (réduction des « **off---target** »)
- Efficacité catalytique
- Stabilité et longévité du complexe ARN-Cas9
- Efficacité des méthodes permettant de délivrer Cas9 et sgRNA dans les cellules ou embryons (**delivery**)

Transfection avec des plasmides, mRNA, transduction virale (AAV, LTV), systèmes physiques (nanoparticules) ...

- Cytotoxicité, dommage aux cellules
- Inocuité globale (safety)

« The recent flurry of progress and excitement around genome editing marks only the beginning »

*Edito « Genome editing: the end of the beginning »
Doudna & Gersbach, 2015, Genome Biol 16*

MEETING REPORT

Open Access



Genome engineering using CRISPR/Cas: getting more versatile and more precise at the same time

Holger Puchta

Abstract

A report on the second meeting on 'Genome Engineering and Synthetic Biology: Tools and Technologies', held 28–29 January 2016 in Ghent, Belgium.

> 400 chercheurs !

High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects

Benjamin P. Kleinstiver^{1,2*}, Vikram Pattanayak^{1,2*}, Michelle S. Prew¹, Shengdar Q. Tsai^{1,2}, Nhu T. Nguyen¹, Zongli Zheng³ & J. Keith Joung^{1,2}

CRISPR-Cas9 nucleases are widely used for genome editing but can induce unwanted off-target mutations. Existing strategies for reducing genome-wide off-target effects of the widely used *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) are imperfect, possessing only partial or unproven efficacies and other limitations that constrain their use. Here we describe SpCas9-HF1, a high-fidelity variant harbouring alterations designed to reduce non-specific DNA contacts. SpCas9-HF1 retains on-target activities comparable to wild-type SpCas9 with >85% of single-guide RNAs (sgRNAs) tested in human cells. Notably, with sgRNAs targeted to standard non-repetitive sequences, SpCas9-HF1 rendered all or nearly all off-target events undetectable by genome-wide break capture and targeted sequencing methods. Even for atypical, repetitive target sites, the vast majority of off-target mutations induced by wild-type SpCas9 were not detected with SpCas9-HF1. With its exceptional precision, SpCas9-HF1 provides an alternative to wild-type SpCas9 for research and therapeutic applications. More broadly, our results suggest a general strategy for optimizing genome-wide specificities of other CRISPR-RNA-guided nucleases.

Nature, vol 529, 28 January 2016, 490---496

Risques de la « biologie de garage »

NEWS IN FOCUS

BIOTECHNOLOGY

Biohackers gear up for genome editing

Amateurs are ready and able to try the CRISPR technique for rewriting genes.

BY HEIDI LEDFORD

A complete lack of formal scientific training has not kept Johan Sosa from dabbling with one of the most powerful molecular-biology tools to come along in decades.

Sosa has already used CRISPR, a three-year-old technology that makes targeted modifications to DNA, in test-tube experiments. Next week, he hopes to try the method in yeast and, later, in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Hailed for its simplicity and versatility, CRISPR allows scientists to make specific changes to a gene's sequence more easily than ever before. Researchers have used CRISPR to edit genes in everything from bacteria to human embryos; the technique holds the potential to erase genetic defects from family pedigrees plagued by inherited disease, treat cancer in unprecedented ways or grow human organs in pigs. One researcher has even



Biohackers such as Johan Sosa are exploring the creative potential of molecular biology.

Nature, vol 524, 27 August 2015, p398

Questions d'ordre éthique (au sens large)

- **Edition de la lignée germinale chez l'Homme**
- **Responsabilité vis à vis de l'environnement / de la biodiversité**
(modification d'espèces invasives, d'insectes vecteurs de maladies) ;
question moins sensible pour les animaux que pour les végétaux (?)
- **Modifications de génomes animaux (végétaux, microbiens) : a---t---on le droit de se substituer à la nature pour créer de « nouveaux » organismes vivants ?**

Questions d'ordre réglementaire / légal

- **Propriété intellectuelle** (guerre des brevets ...)

Aspect réglementaires

- KO (NHEJ) : Absence de trace détectables
 - GE mime la variation naturelle
 - donc **GE ≠ transgénèse**
 - **Les règles appliquées aux OGM ne s'appliquent plus ?**
 - Point de vue exprimé par certains scientifiques :
 - GE avec délétion (KO, NHEJ) = pas de régulation
 - GE avec insertion/remplacement (KI, HDR) = cas par cas
- **Discussions en cours dans les différentes Académies ...**

Un certain lobbying est en cours ...

EDITORIAL

nature
genetics

Where genome editing is needed

The journal endorses the principle of transparency in the production of genome-edited crops and livestock as a precondition for the registration of a breed or cultivar, with no further need for regulation or distinction of these goods from the products of traditional breeding.

(27 janvier 2016)

Regulate genome-edited products, not genome editing itself

- On sélectionne les populations d'élevage depuis des siècles
- Cela a produit des résultats spectaculaires et utiles, mais la sélection classique n'en présente pas moins de nombreux défauts (processus lent, co---sélection de gènes indésirables ...)
 - les techniques de modification ciblée (GE) n'ont pas tous ces défauts.
- **La consommation d'ADN ne présente pas de risque. GE peut être utilisé pour produire des mutations analogues aux mutations qui apparaissent naturellement. Il n'y a donc aucune raison scientifique ou logique à obliger les « produits GE » à subir une évaluation longue et coûteuse.**
- Cette technologie a été développée essentiellement avec des fonds publics. Le public devrait pouvoir bénéficier des bienfaits liés à une utilisation raisonnable et intelligente de ces « produits GE ».

 OPINION

A new paradigm for regulating genetically engineered animals that are used as food

J. D. Murray^{a,b,1} and E. A. Maga^{a,1}

Regulating based on the process, in the absence of any scientifically defined risks, is not useful and dilutes the scrutiny required for truly novel GE products designed for use as food.

Biotechnology has an important role to play in the future of agriculture for food security, animal health and welfare, and the improvement of the nutritional benefits of various foods. This can only be realized through appropriate investment and this will only occur when developers have the confidence of an appropriate regulatory process for those animals and food products. With many nations poised to take steps forward and many benefits clearly in sight, the eyes of the world are on the United States to lead the way.



-

Avis du 13 avril 2016, USDA



Un champignon modifié par CRISPR (inactivation d'un gène = *polyphenol oxidase*, pour éviter le brunissement) n'est **pas concerné par la réglementation sur les OGM**.

Arguments sur lesquels se fonde cette décision :

- KO d'un gène (délétions de 1---14 pb), mais aucune introduction d'ADN étranger
- Les plasmides intégrés (gRNA et Cas9) ont été exprimés de façon transitoire
- Pas de système de sélection (gène de résistance aux antibiotiques)

https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-321-01_air_response_signed.pdf

Questions d'ordre « social » / « sociétal »

Par exemple pour les applications agricoles :

- **Technologie utile (nécessaire ?) pour nourrir le monde ?**
- Acceptation par le consommateur ?
- Afflux de variétés GM ? (explosion de l'offre ...)



REVIEW

Role of genetically engineered animals in future food production

KA McColl,* B Clarke and TJ Doran

The global population is approximately 7 billion and continues to grow, mainly in developing countries. It is expected to reach 9 billion by 2050, at which time the current agricultural output will have had to double to meet the global food demand.¹ Meeting this demand will be impossible with conventional agricultural practices and it is highly likely that, eventually, genetically engineered (GE) animals will be one of the innovative solutions to the problem.

Feeding the world: genetically modified crops versus agricultural biodiversity

Sven-Erik Jacobsen · Marten Sørensen ·
Søren Marcus Pedersen · Jacob Weiner

It is agronomically, ecologically, nutritionally and economically risky and unsustainable to rely almost exclusively on a handful of major crops to provide food for the world's population ...

The application of traditional plant breeding methods to minor crops often offers more efficient and economically attractive solutions, frequently well adapted to local agricultural conditions ...

As international aid organizations have learned, « **low-tech** » solutions are often much more effective and less failure-prone. However, they are also less profitable for large international corporations ...

Technology implementation alone is not sufficient to address such complex questions as food security

« Pourquoi faire simple quand on peut faire compliqué »



Merci pour votre attention !

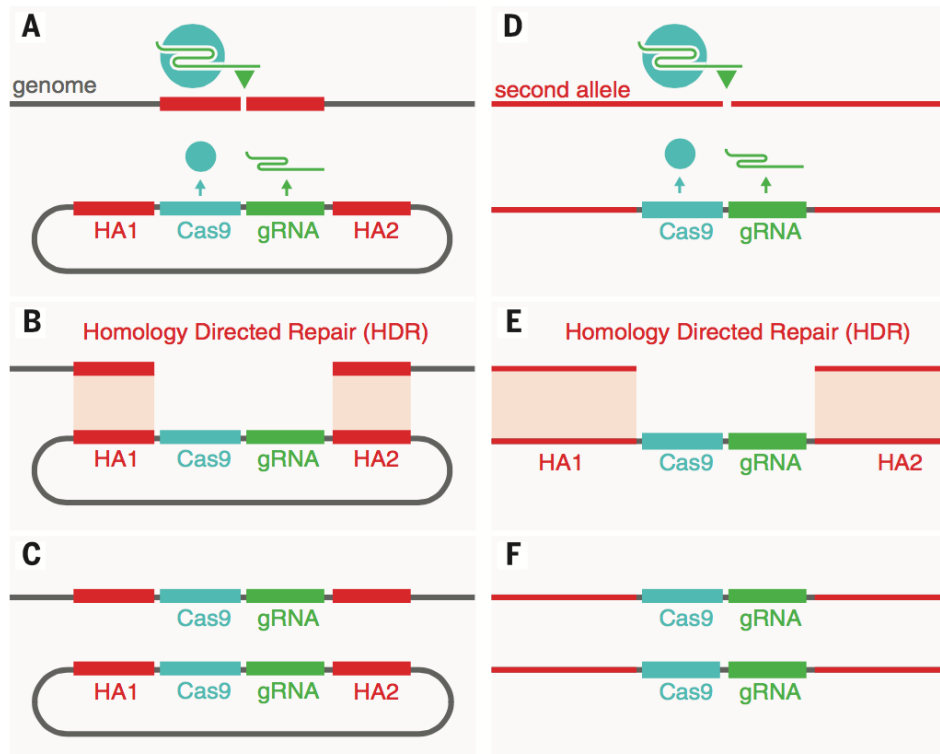


ANNEXES

Ingénierie écologique : « gene drive »

Mutagenic chain reaction

Gantz & Bier, 2015, Science 348 (6233):442-444



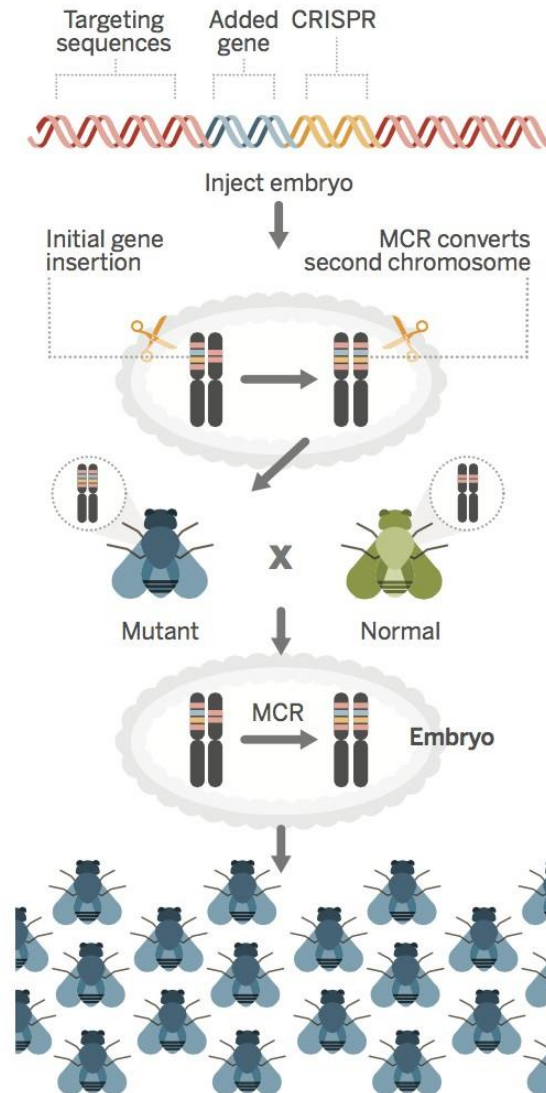
A : on apporte à la cellule une construction (plasmide) contenant i) le gene Cas9 (exprimé dans les cellules somatiques et germinales), ii) un ARN guide, et iii) des séquences (HA1 et HA2) qui sont homologues aux séquences cibles de part et d'autre de la cassure

B et C : Cas9 coupe l'ADN cible, et la cassette Cas9-gRNA est insérée par le mécanisme de HDR (Homology-Directed Repair)

D : Cas9 et gRNA peuvent être exprimés à partir de l'allèle modifié, et Cas9 va cliver l'autre allèle

E et F : la réparation du second allèle clivé se fait aussi par HDR

Hérédité « super---mendélienne » d'un transgène (gene drive)

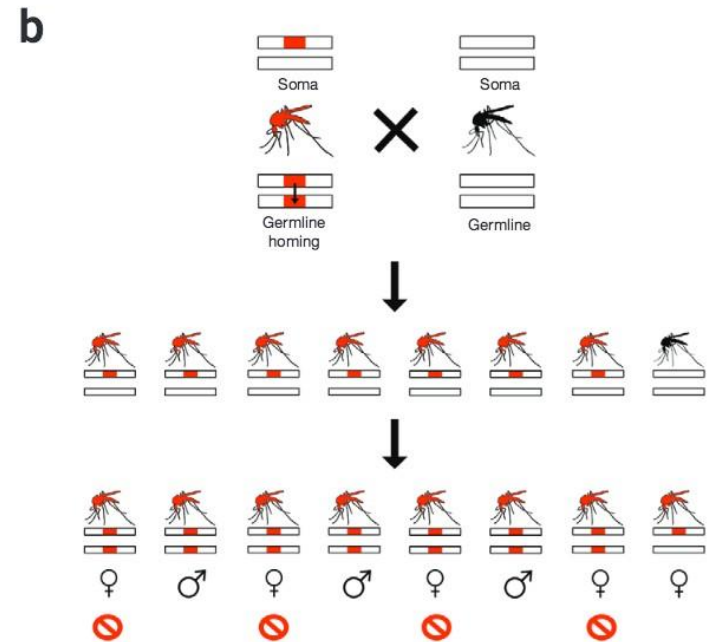


A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*

Andrew Hammond¹, Roberto Galizi¹, Kyros Kyrou¹, Alekos Simoni¹, Carla Siniscalchi², Dimitris Katsanos¹, Matthew Gribble¹, Dean Baker³, Eric Marois⁴, Steven Russell³, Austin Burt¹, Nikolai Windbichler¹, Andrea Crisanti¹ & Tony Nolan¹

Nature Biotechnology 34(1):78---83 (Janvier 2016)

Gene drive systems that enable super-Mendelian inheritance of a transgene have the potential to modify insect populations over a timeframe of a few years. We describe CRISPR-Cas9 endonuclease constructs that function as gene drive systems in *Anopheles gambiae*, the main vector for malaria. We identified three genes (*AGAP005958*, *AGAP011377* and *AGAP007280*) that confer a recessive female-sterility phenotype upon disruption, and inserted into each locus CRISPR-Cas9 gene drive constructs designed to target and edit each gene. For each targeted locus we observed a strong gene drive at the molecular level, with transmission rates to progeny of 91.4 to 99.6%. Population modeling and cage experiments indicate that a CRISPR-Cas9 construct targeting one of these loci, *AGAP007280*, meets the minimum requirement for a gene drive targeting female reproduction in an insect population. These findings could expedite the development of gene drives to suppress mosquito populations to levels that do not support malaria transmission.



Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations

*Jackson Champer**, *Anna Buchman** and *Omar S. Akbari*

Abstract | Engineered gene drives — the process of stimulating the biased inheritance of specific genes — have the potential to enable the spread of desirable genes throughout wild populations or to suppress harmful species, and may be particularly useful for the control of vector-borne diseases such as malaria. Although several types of selfish genetic elements exist in nature, few have been successfully engineered in the laboratory thus far. With the discovery of RNA-guided CRISPR–Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats–CRISPR-associated 9) nucleases, which can be utilized to create, streamline and improve synthetic gene drives, this is rapidly changing. Here, we discuss the different types of engineered gene drives and their potential applications, as well as current policies regarding the safety and regulation of gene drives for the manipulation of wild populations.

Applications :

- Eliminer les maladies à transmission vectorielle
- Eliminer des espèces invasives
- Résoudre des problèmes de résistance génétique (insecticides, herbicides)
- ...

GE chez les animaux d'élevage : améliorer la santé humaine

152 | NATURE | VOL 527 | 12 NOVEMBER 2015



NEW LIFE FOR PIG ORGANS

Gene-editing technologies have breathed life into the languishing field of xenotransplantation.

BY SARA REARDON

Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)

Luhan Yang,^{1,2,3*†} Marc Güell,^{1,2,3†} Dong Niu,^{1,4†} Haydy George,^{1†} Emal Lesha,¹ Dennis Grishin,¹ John Aach,¹ Ellen Shrock,¹ Weihong Xu,⁶ Jürgen Poci,¹ Rebeca Cortazio,¹ Robert A. Wilkinson,⁵ Jay A. Fishman,⁵ George Church^{1,2,3*}

The shortage of organs for transplantation is a major barrier to the treatment of organ failure. Although porcine organs are considered promising, their use has been checked by concerns about the transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) to humans. Here we describe the eradication of all PERVs in a porcine kidney epithelial cell line (PK15). We first determined the PK15 PERV copy number to be 62. Using CRISPR-Cas9, we disrupted all copies of the PERV *pol* gene and demonstrated a >1000-fold reduction in PERV transmission to human cells, using our engineered cells. Our study shows that CRISPR-Cas9 multiplexability can be as high as 62 and demonstrates the possibility that PERVs can be inactivated for clinical application of porcine-to-human xenotransplantation.

Yang et al (2015) Science 350 (6264):1101–1104