

Regards croisés sur les modifications ciblées du génome appliquées aux animaux d'élevage

Les modifications ciblées du génome : principe et applications

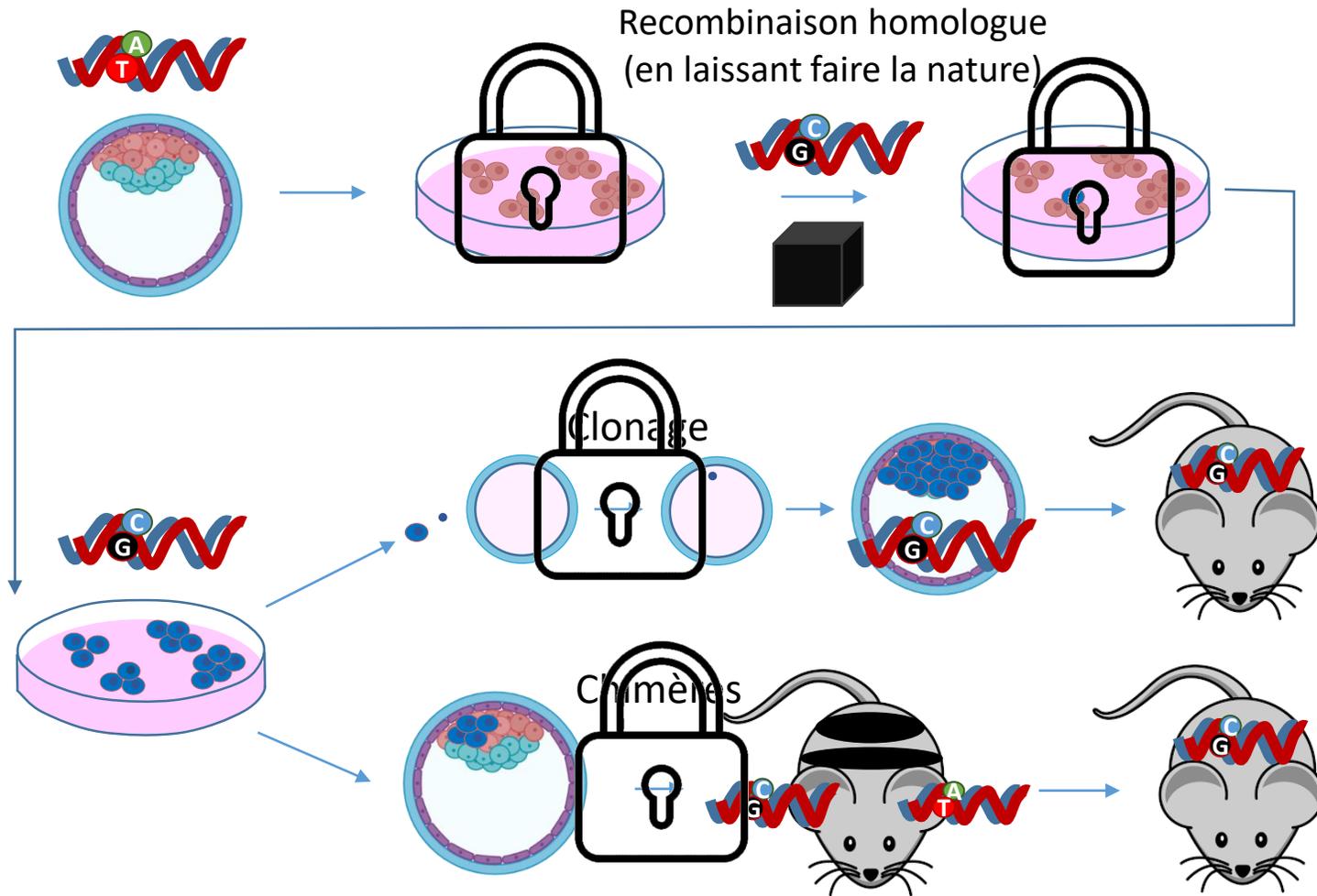
Dr. Hervé Acloque

herve.acloque@inrae.fr

16 novembre 2021: GIS Avenir Elevages

La modification ciblée des génomes animaux: une histoire déjà ancienne

Première modification ciblée chez la souris: 1990



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007



Photo: U. Montan
Mario R. Capecchi
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Sir Martin J. Evans
Prize share: 1/3



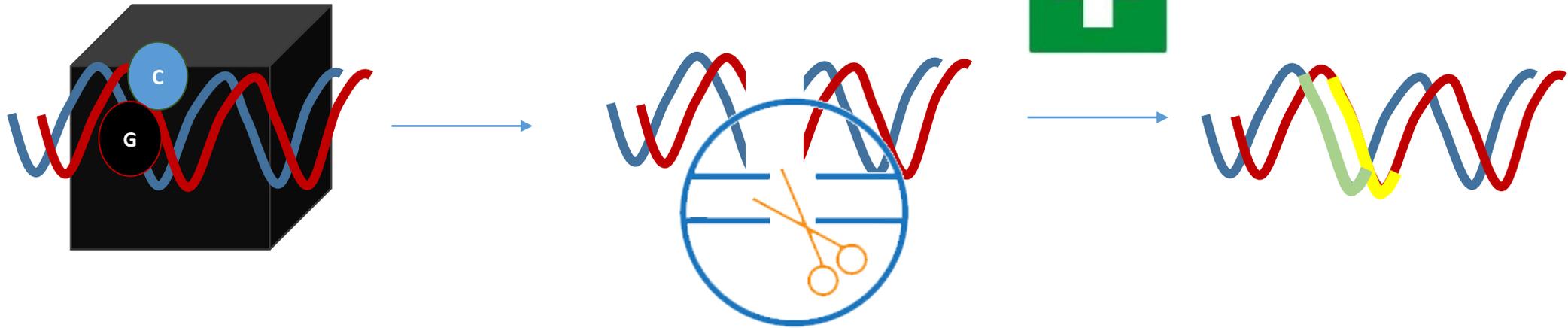
Photo: U. Montan
Oliver Smithies
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007 was awarded jointly to Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans and Oliver Smithies "for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells".

La modification ciblée des génomes animaux: une histoire déjà ancienne

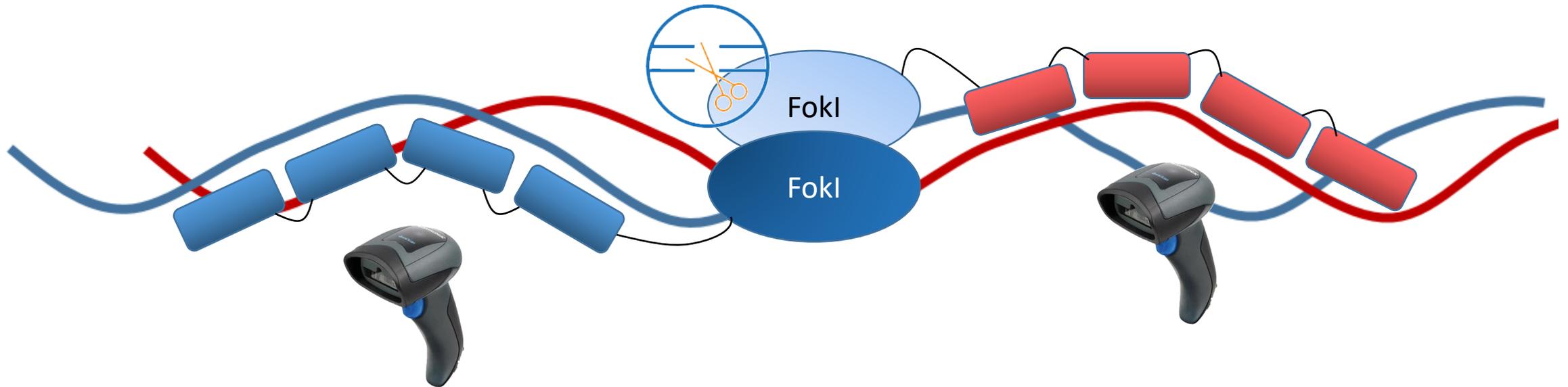
Pour faciliter les modifications ciblées, il faut couper l'ADN à l'endroit où l'on veut faire ces modifications

Recombinaison
homologue



La modification ciblée des génomes animaux: une histoire déjà ancienne

Les premiers ciseaux moléculaires: endonucléases couplées aux doigts de zinc ou au TALEs



Le design des « douchettes » pour scanner l'ADN est très complexe, mais ça marche.

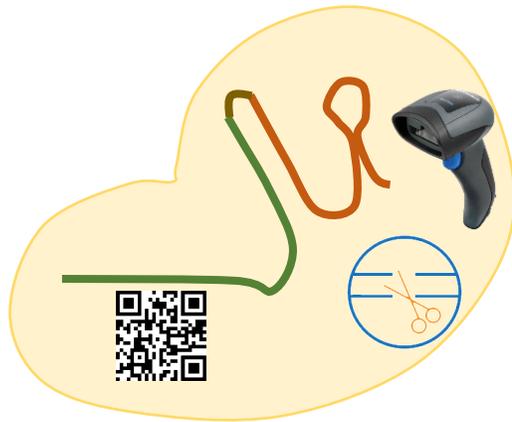
Première preuve de concept chez la drosophile en 2006 (Beumer et al. 2006)

Premiers animaux d'élevage modifiés par ce système: lapin en 2011, porc en 2012, bovin 2013

La modification ciblée des génomes animaux: la révolution CRISPR/Cas9 en 2013

Des ciseaux moléculaires facile à mettre en œuvre:

- 1) La protéine Cas9 (le ciseau+ douchette)
- 2) Deux petites séquences ARNs (le code barre):
trRNA + crRNA > gRNA (ARN guide)



- 3) Le tout à faire rentrer dans une cellule

The Nobel Prize in Chemistry 2020



© Nobel Prize Outreach. Photo:
Bernhard Ludewig
**Emmanuelle
Charpentier**
Prize share: 1/2



© Nobel Prize Outreach. Photo:
Brittany Hosea-Small
Jennifer A. Doudna
Prize share: 1/2

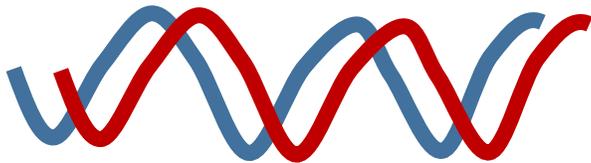
Modification ciblée du génomes

Comment ça marche ?

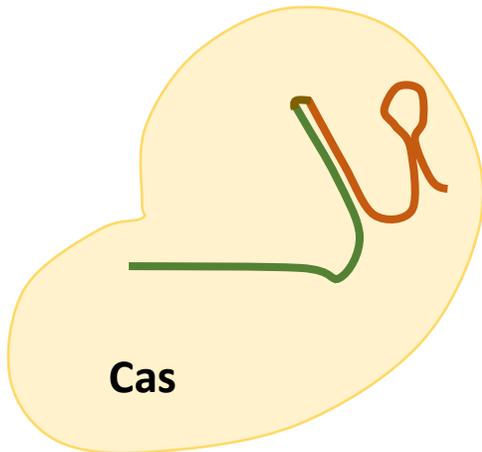
1. Couper et modifier localement

1

ADN à cibler



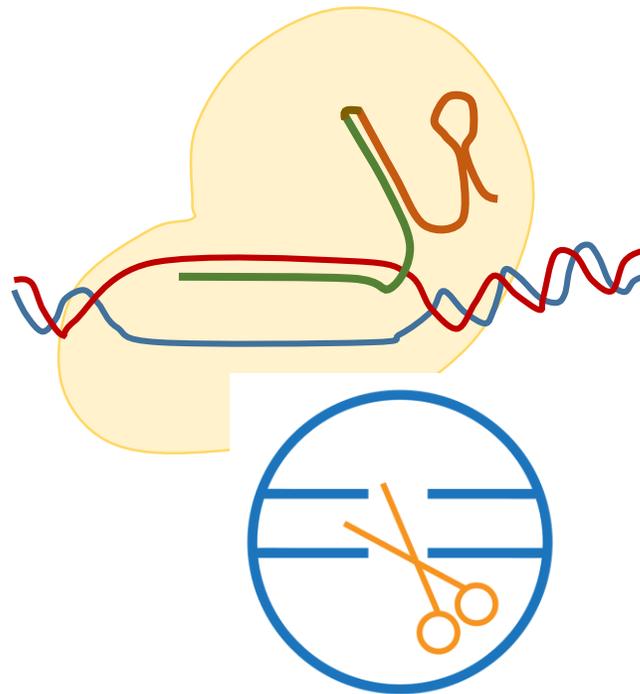
Complexe CRISPR/Cas
avec l'ARN guide pour la
séquence à cibler



Cas

2

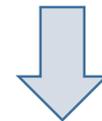
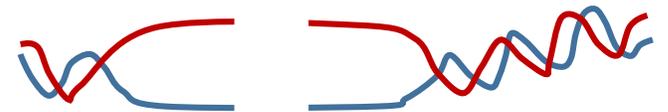
Coupe de l'ADN au
niveau de la séquence cible



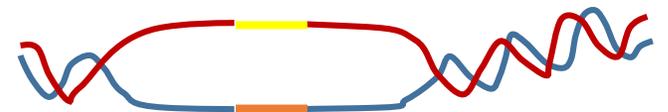
3

Réparation de l'ADN par la
voie NHEJ:

modification locale de l'ADN au
niveau de la séquence cible



Mécanismes
de réparation

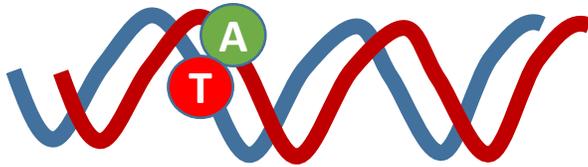


On casse un gène: Knock-Out

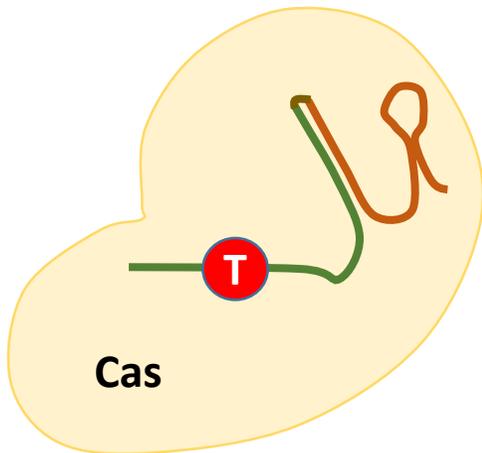
2. Couper et réécrire localement

1

ADN à cibler

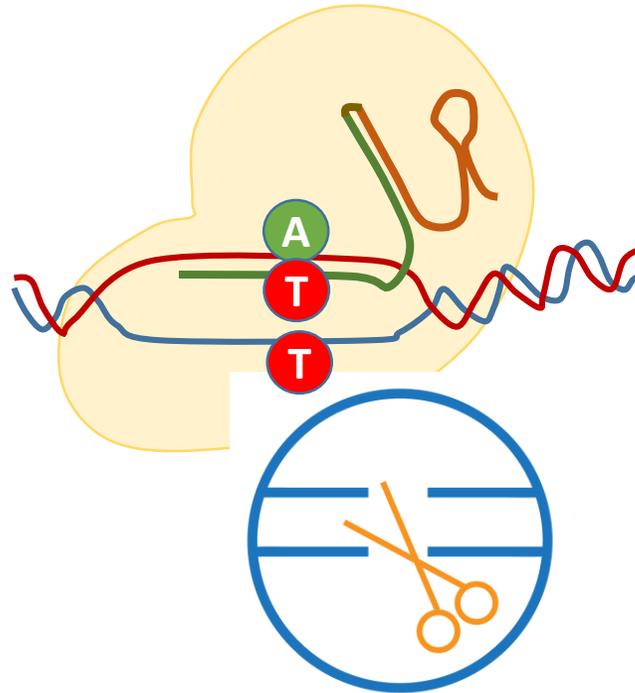


Complexe CRISPR/Cas
avec l'ARN guide pour la
séquence à cibler



2

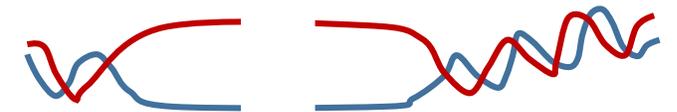
Coupure de l'ADN au
niveau de la séquence cible



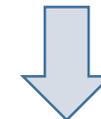
3

Réparation de l'ADN par la
voie RH:

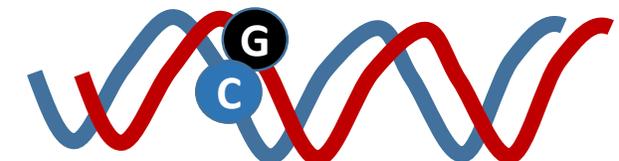
réécriture de l'ADN au niveau de la
séquence cible grâce à une matrice
portant la mutation



Matrice de correction



Mécanismes
de réparation

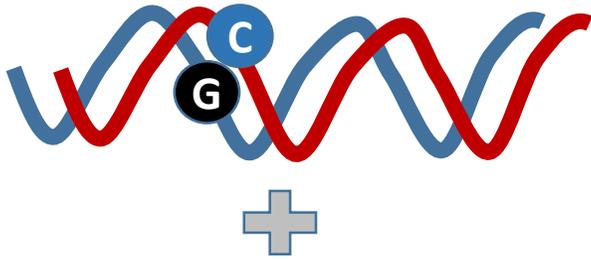


On modifie un gène: Knock-In

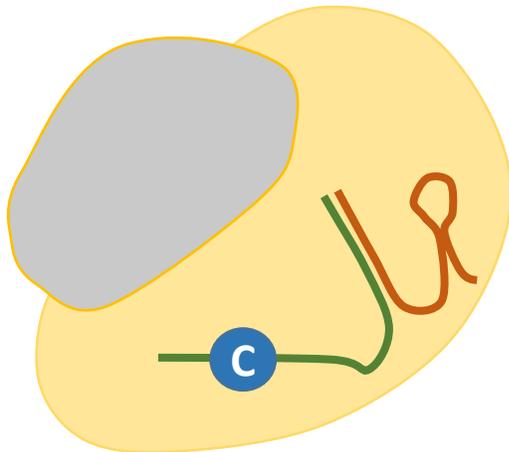
3. Couper et réécrire localement: « Prime editors »

1

ADN à cibler

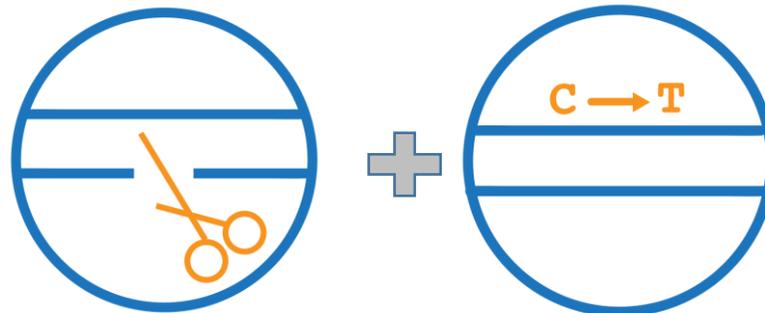
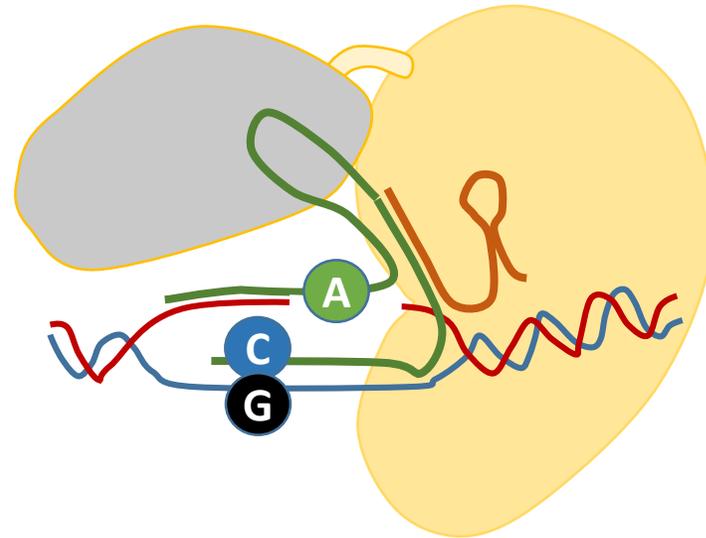


CRISPR/Cas fusionnée avec
une reverse transcriptase

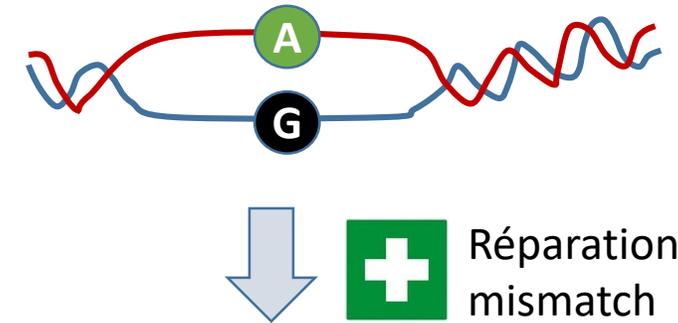


2

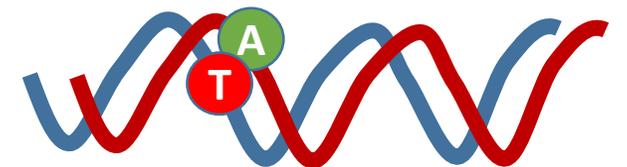
Coupure monobrin de l'ADN
au niveau de la séquence cible



3



Réparation du
mismatch

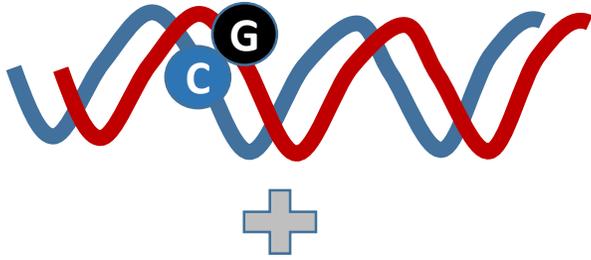


On ré-écrit un gène

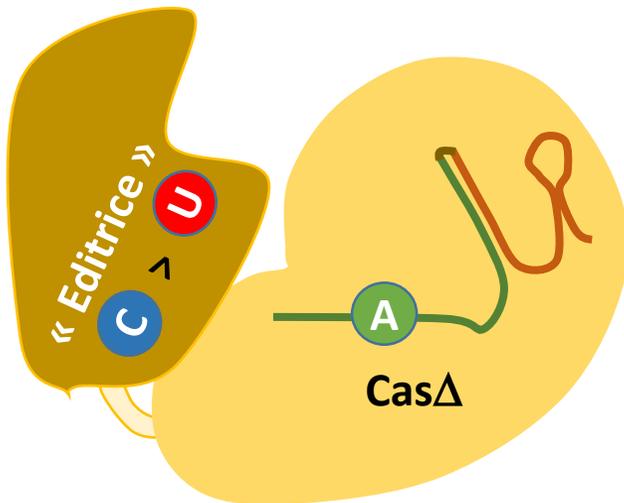
4. Réécrire sans couper: « Base editors »

1

ADN à cibler

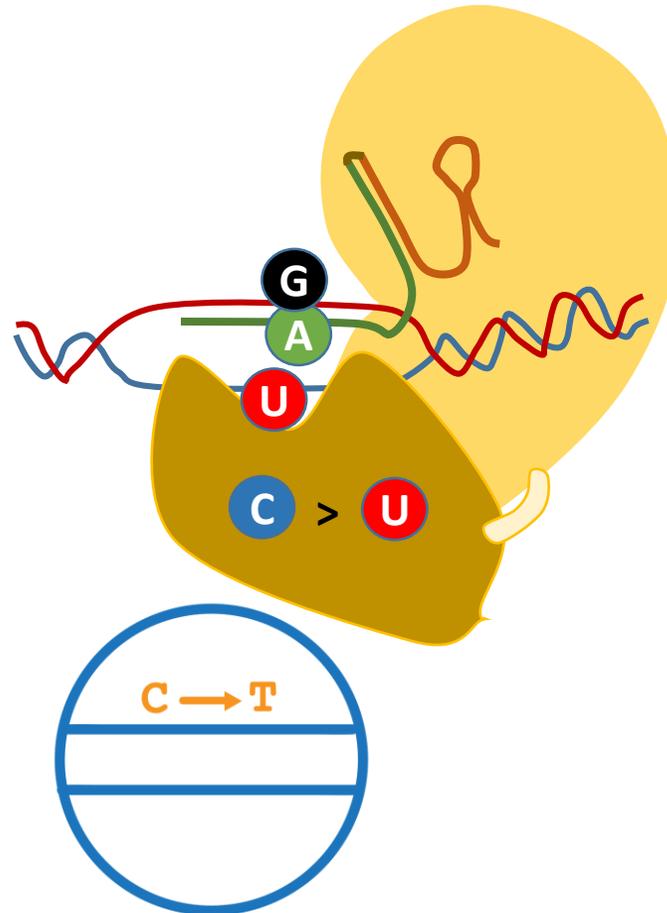


CRISPR/Cas fusionnée avec une enzyme « éditrice C > T »

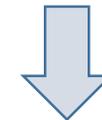
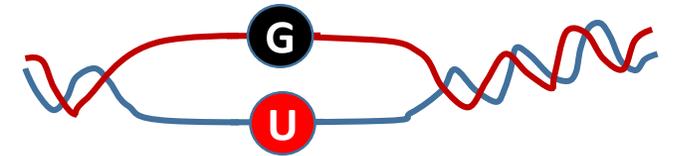


2

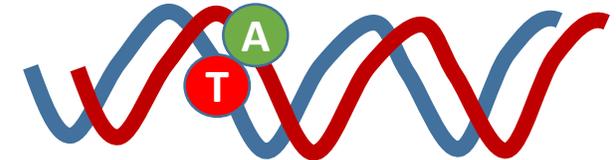
Positionnement sur l'ADN au niveau de la séquence cible



3



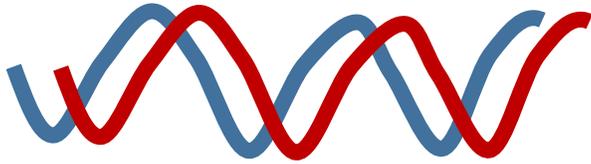
Réparation du mismatch



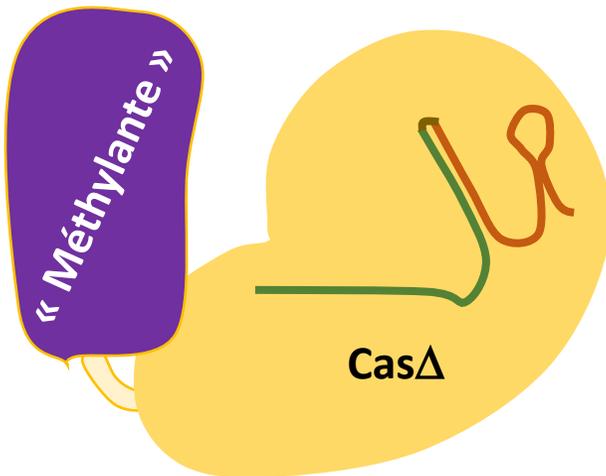
5. Réécrire sans modifier l'ADN: l'épigénome

1

Région à cibler

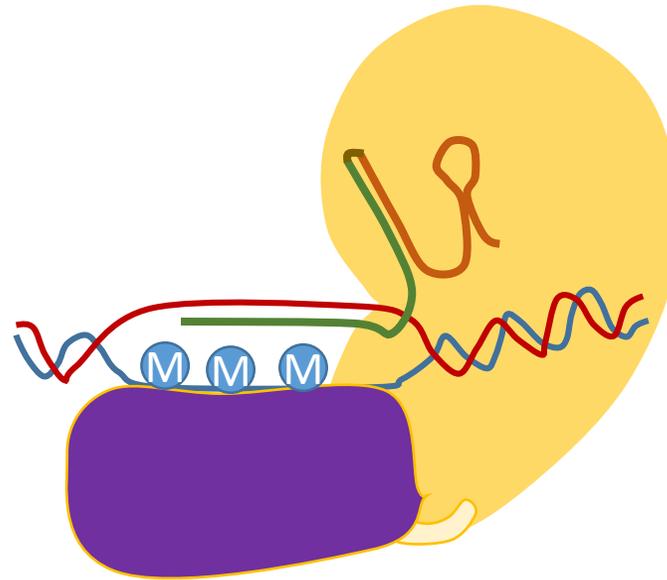


CRISPR/Cas fusionnée avec
une enzyme « méthylante »
ou « déméthylante »

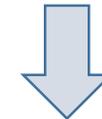
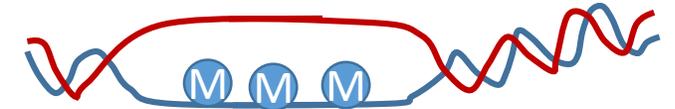


2

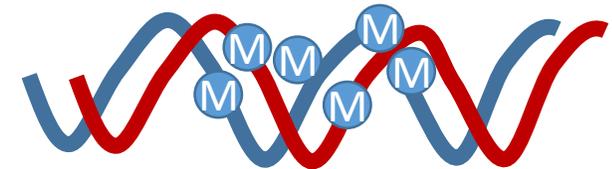
Positionnement sur l'ADN au
niveau de la séquence cible



3



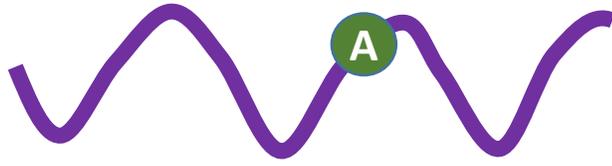
Methylation du brin
complémentaire



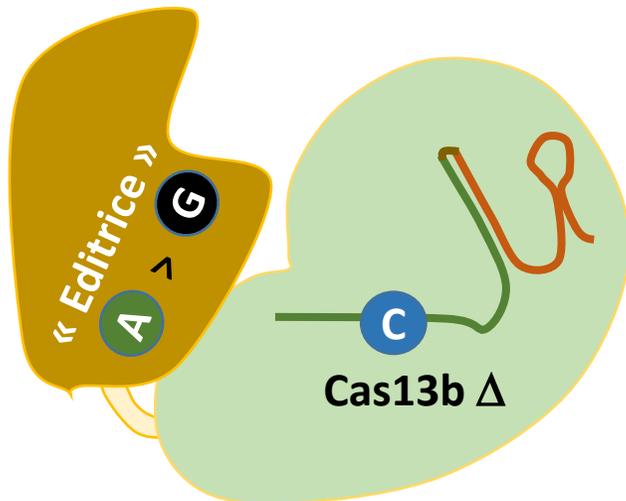
5. Réécrire sans modifier l'ADN: les ARNs

1

Transcrit à modifier

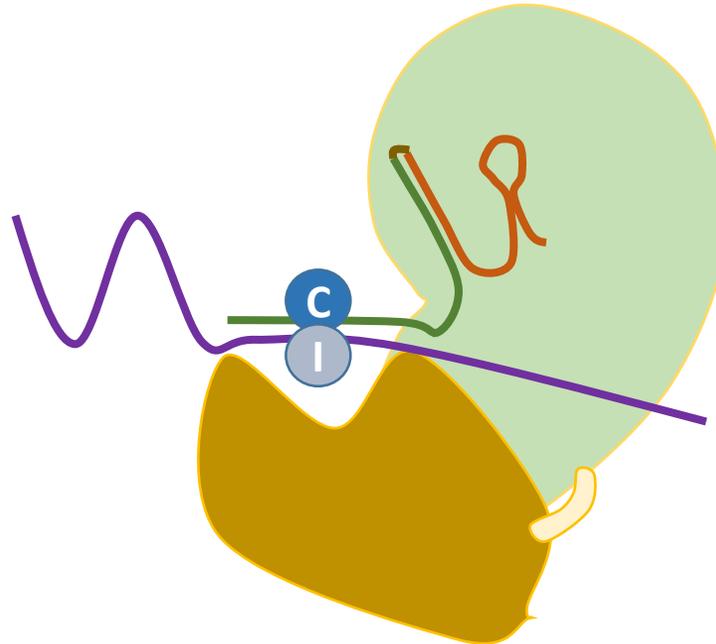


CRISPR/Cas13 fusionnée avec une enzyme éditrice. L'ARN guide cible l'ARN à éditer



2

Positionnement sur l'ARN au niveau de la séquence cible



3

Transcrit édité



5. Réécrire sans modifier l'ADN: les ARNs

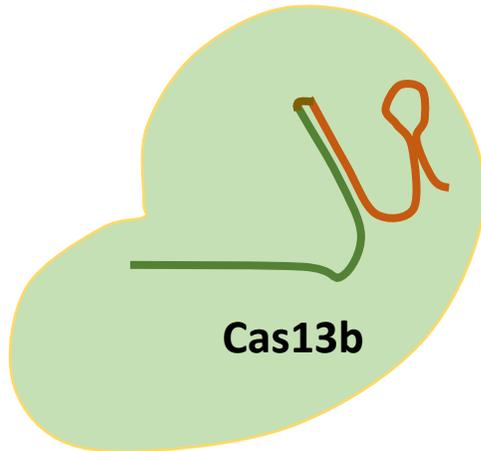
1

Transcrit à détruire



CRISPR/Cas13_{a/d}

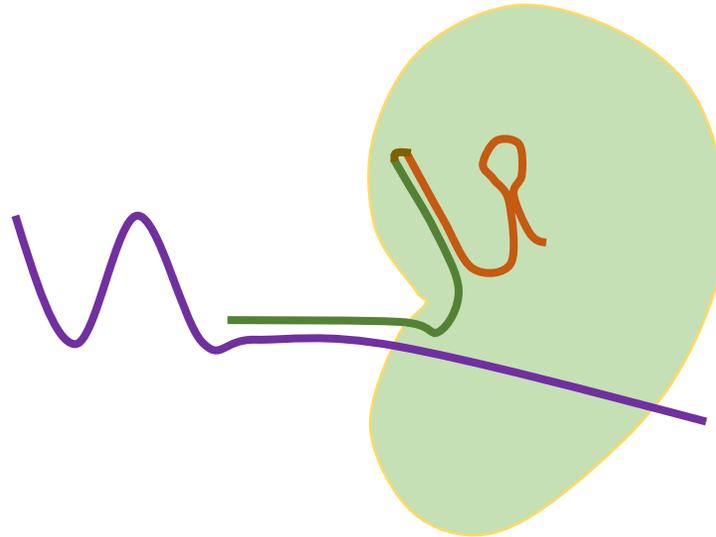
L'ARN guide cible l'ARN à cliver



Cas13b

2

Positionnement sur l'ARN au niveau de la séquence cible



3

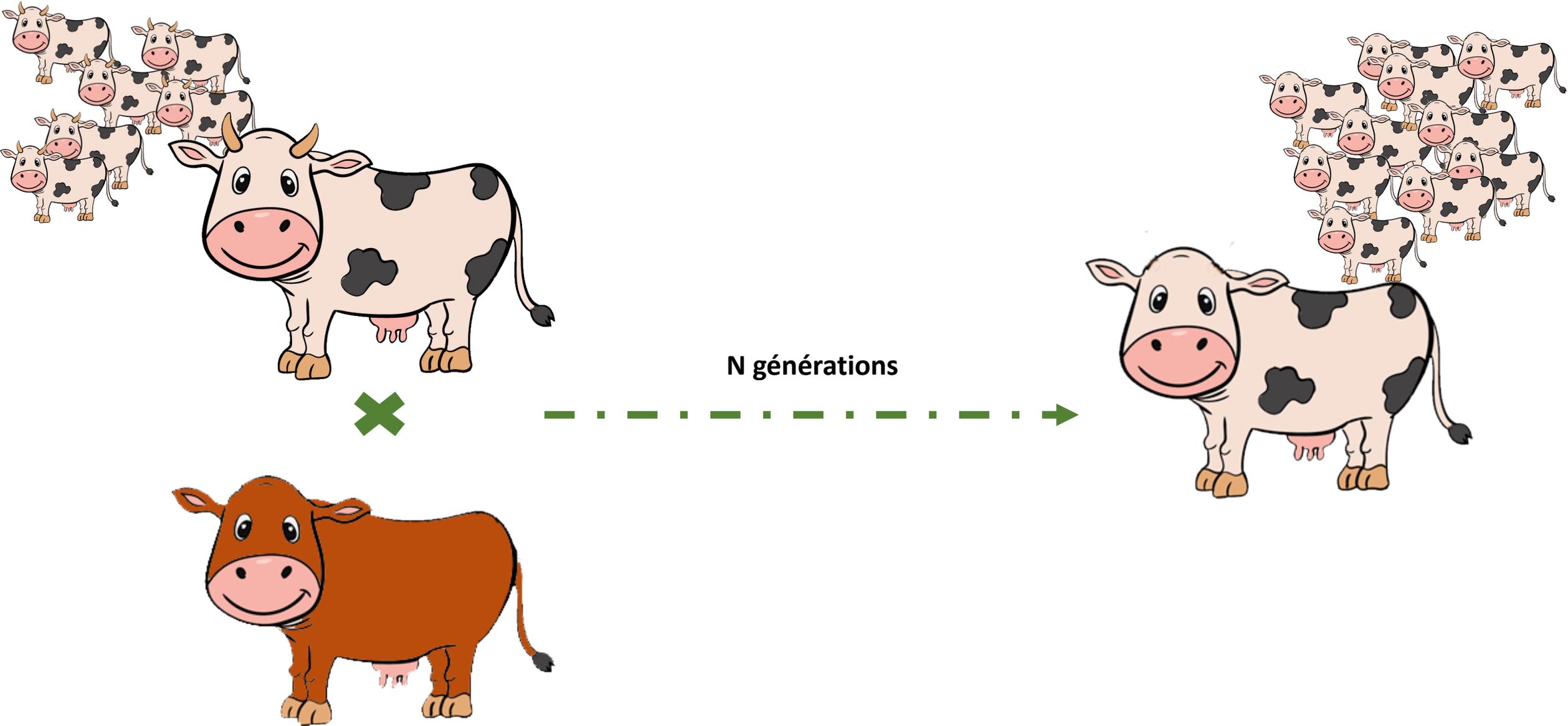
Transcrit clivé puis dégradé



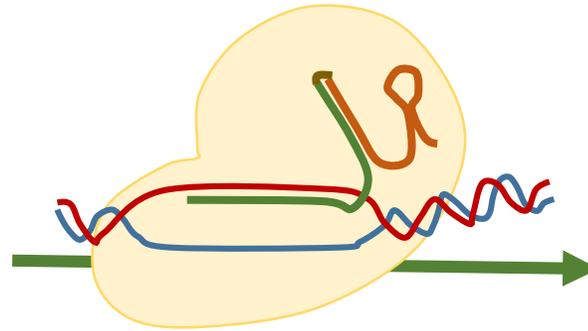
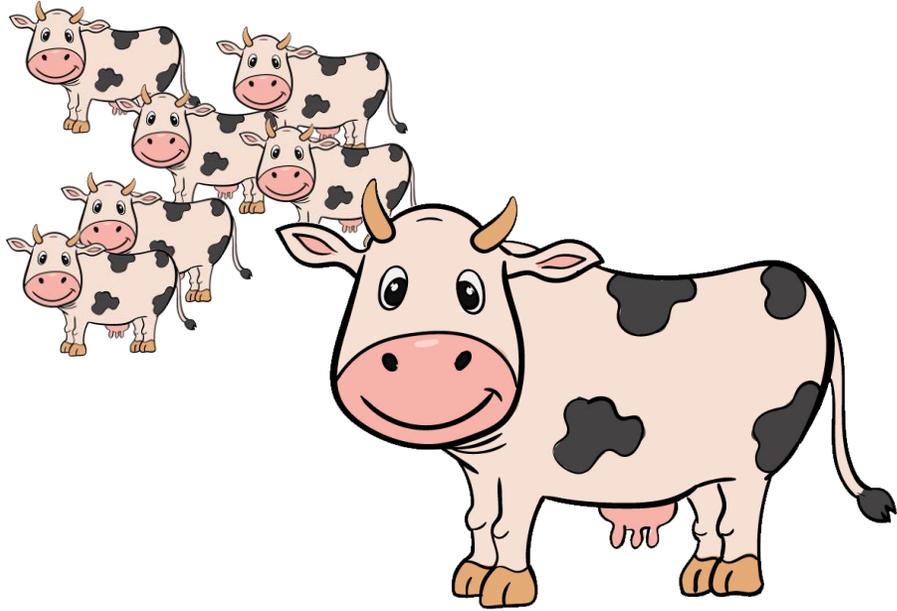
Modification ciblée des génomes

Quelques applications

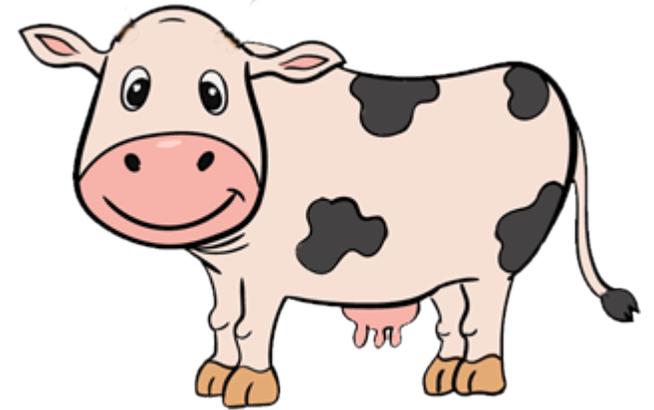
1. Introgresser des mutations causales



1. Introgresser des mutations causales



1 génération



2016: vache sans corne

1. Introgresser des mutations causales

TABLE 1 | CRISPR-mediated gene knockout in livestock: agricultural applications.

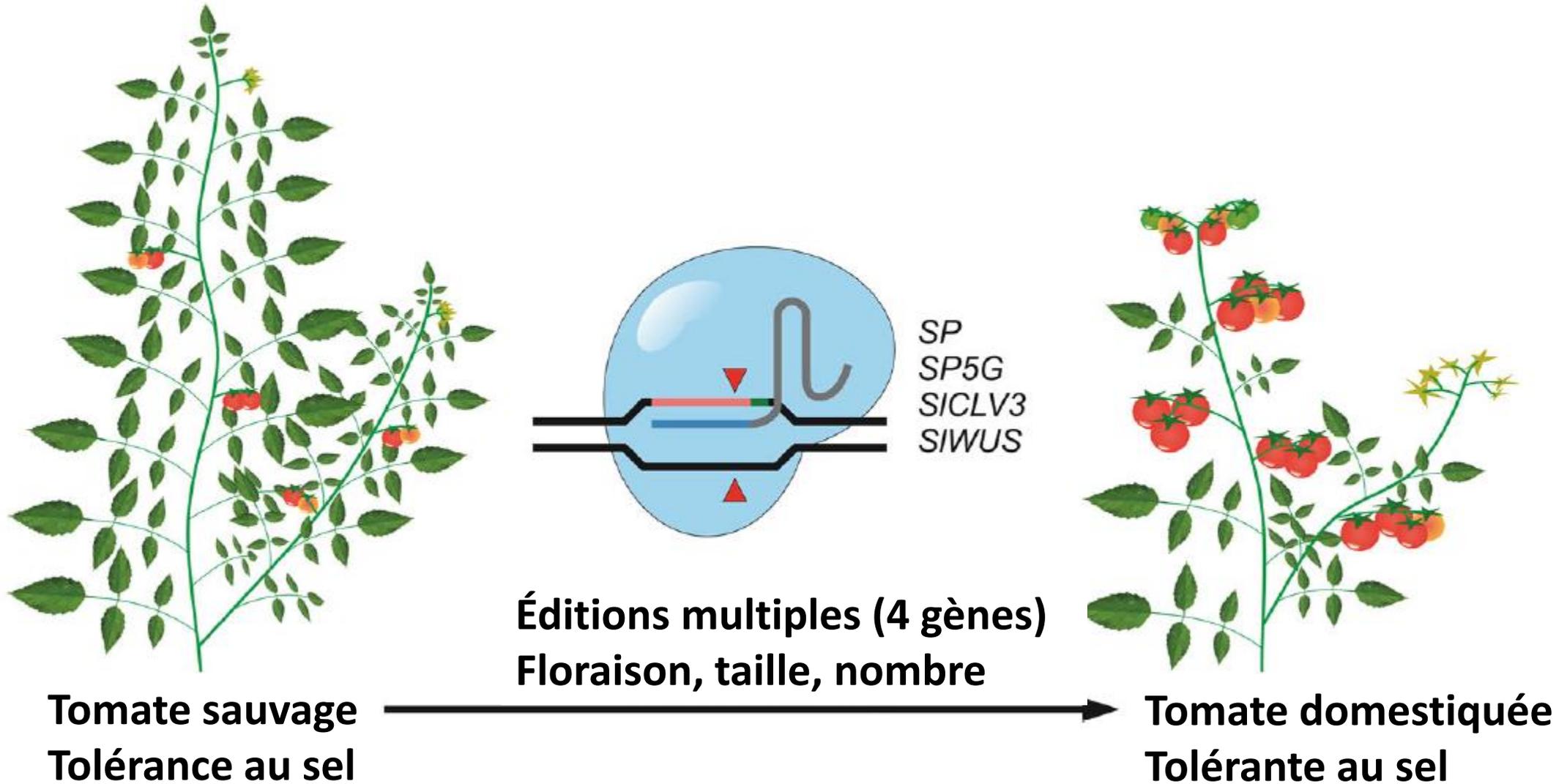
| Species | Gene | Purpose of manipulation | Approach | Mosaicism (%) | References |
|---------|--------------------------------|---|---|---------------|--|
| Sheep | <i>ASIP</i> | Coat color pattern | MI | 2/5 (40.0%) | Zhang X. et al. (2017) |
| | <i>FGF5</i> | Wool growth | MI | (6.3–100%) | Hu et al. (2017), Li W. R. et al. (2017), Zhang R. et al. (2020) |
| | <i>MSTN, ASIP, and BCO2</i> | Economically important traits | MI | 2/2 (100%) | Wang X. et al. (2016b) |
| | <i>MSTN</i> | Meat production | MI or SCNT | (0–100%) | Deng et al. (2014); Crispo et al. (2015), Zhang Y. et al. (2019); Yi et al. (2020) |
| Goat | <i>BLG</i> | Milk quality | MI | 3/4 (75.0%) | Zhou et al. (2017) |
| | <i>MSTN and FGF5</i> | Meat and cashmere production | MI | 5/10 (50.0%) | Wang X. et al. (2015a) |
| | <i>MSTN</i> | Meat production | MI or SCNT | (0–100%) | Ni et al. (2014); Guo et al. (2016), He et al. (2018); Zhang Y. et al. (2019) |
| | <i>NANOS2</i> | Surrogate sires for genetic dissemination | SCNT | N/A | Ciccarelli et al. (2020) |
| | <i>EDAR</i> | Cashmere yield | SCNT | N/A | Hao et al. (2018) |
| Pig | <i>IGF2 regulatory element</i> | Meat production | MI (nCas9) | 6/6 (100%) | Xiang et al. (2018) |
| | <i>NANOS2</i> | Surrogate sires for genetic dissemination | MI | 6/18 (33.3%) | Park et al. (2017) |
| | <i>ANPEP</i> | Viral resistance | MI | 1/9 (11.1%) | Whitworth et al. (2019) |
| | <i>CD163</i> | Resistance to PRRS virus | MI, EP, or SCNT | No | Whitworth et al. (2014); Yang et al. (2018), Tanihara et al. (2019) |
| | <i>IRX3</i> | Reduced fat content in Bama minipigs | SCNT | N/A | Zhu et al. (2020) |
| | <i>NANOS2</i> | Surrogate sires for genetic dissemination | SCNT | N/A | Ciccarelli et al. (2020) |
| | <i>MSTN</i> | Meat production | SCNT | N/A | Wang K. et al. (2015), Wang K. et al. (2017), Li R. et al. (2020) |
| | <i>CD163 and pAPN</i> | Viral resistance | SCNT | N/A | Xu et al. (2020) |
| | <i>FBXO40</i> | Meat production | SCNT | N/A | Zou et al. (2018) |
| | Cattle | <i>NANOS2</i> | Surrogate sires for genetic dissemination | MI | 1/3 (33.3%) |

1. Introgresser des mutations ponctuelles

TABLE 3 | CRISPR-mediated gene knockin in livestock.

| Species | Gene | Purpose of manipulation | Type of KI | Approach | SCNT or MI | KI Animals produced | Mosaicism (%) | References |
|---------|---------------|--|----------------|----------------|------------|---------------------------|---------------|-------------------------|
| | | Agriculture: improvements in | | | | | | |
| Sheep | <i>SOCS2</i> | Reproductive traits | Point mutation | Crispr/Cas9 BE | MI | 3/4 (25%) | 3/3 (100%) | Zhou et al. (2019) |
| | <i>BMPR1B</i> | Reproductive traits | Point mutation | Crispr/Cas9 | MI | 5/21 (23.8%) | Not stated | Zhou et al. (2018) |
| Goat | <i>Tβ4</i> | CCR5-targeted KI, cashmere yield | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 1 | N/A | Li X. et al. (2019) |
| | <i>FGF5</i> | Cashmere yield | Point mutation | Crispr/Cas9 BE | MI | 5/5 (100%) | 5/5 (100%) | Li G. et al. (2019) |
| | <i>GDF9</i> | Reproductive traits | Point mutation | Crispr/Cas9 | MI | 4/17 (23.5%) | 2/4 (50.0%) | Niu et al. (2018) |
| | <i>FAT-1</i> | Disease resistance | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 1 from 8 pregnancies | N/A | Zhang J. et al. (2018) |
| Cattle | <i>Pc</i> | Generation of a polled genotype | Gene insertion | Crispr/Cas12a | SCNT | 1, died on D1 after birth | N/A | Schuster et al. (2020) |
| | <i>NRAMP1</i> | Tuberculosis resistance | Gene insertion | Crispr/Cas9n | SCNT | 9 | N/A | Gao et al. (2017) |
| | <i>IARS</i> | Correction of IARS syndrome | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 5 viable fetuses | N/A | Ikeda et al. (2017) |
| Pig | <i>PBD-2</i> | Disease-resistant pigs | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 5 pigs | N/A | Huang et al. (2020) |
| | <i>MSTN</i> | Meat production | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 2 pigs | N/A | Zou Y.-L. et al. (2019) |
| | <i>UCP1</i> | Reproduction traits | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 12 piglets | N/A | Zheng et al. (2017) |
| | <i>MSTN</i> | Meat production | Point mutation | Crispr/Cas9 | SCNT | 1 stillborn piglet | N/A | Wang K. et al. (2016) |
| | <i>MSTN</i> | MSTN-KO without selectable marker | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 2 piglets | No | Bi et al. (2016) |
| | <i>RSAD2</i> | Generation of pigs with viral resistance | Gene insertion | Crispr/Cas9 | SCNT | 1 pig | No | Xie et al. (2020) |

2. Multiplexer l'introggression d'alleles: exemple de la domestication de novo



D'après Wolter et al. BMC Plant Biology 2019

Conclusions

- La modification ciblée des génomes animaux est possible et grandement facilitée par la technologie CRISPR/Cas9
- Elle nécessite d'identifier les régions du génomes à modifier et donc de comprendre la base génétique et épigénétique pour la construction des phénotypes > **une recherche académique est indispensable en amont**
- Elle nécessite des compétences fortes en biologie moléculaire, cellulaire et biotechnologie de la reproduction > **conséquences pour les filières**
- Les modifications ciblées (mutations ponctuelles) seront difficilement détectables en routine > **conséquences pour la traçabilité des produits**