



HAL
open science

Modifications ciblées des génomes : Apports et impacts potentiels des nouvelles technologies pour les espèces aviaires

Alain Ducos, Bertrand B. Bed'Hom, Hervé Acloque, Bertrand Pain

► To cite this version:

Alain Ducos, Bertrand B. Bed'Hom, Hervé Acloque, Bertrand Pain. Modifications ciblées des génomes : Apports et impacts potentiels des nouvelles technologies pour les espèces aviaires. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, 2020, 173 (1), pp.140-150. 10.3406/bavf.2020.70900 . hal-02912741v2

HAL Id: hal-02912741

<https://hal.inrae.fr/hal-02912741v2>

Submitted on 22 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

MODIFICATIONS CIBLÉES DES GÉNOMES : APPORTS ET IMPACTS POTENTIELS DES NOUVELLES TECHNOLOGIES POUR LES ESPÈCES AVIAIRES

GENOME EDITING: WHAT IMPACTS FOR POULTRY SPECIES?

Par Alain DUCOS⁽¹⁾, Bertrand BED'HOM⁽²⁾, Hervé ACLOQUE^(1,2), Bertrand PAIN⁽³⁾
(Communication présentée le 21 Juin 2018,
Manuscrit accepté le 11 Novembre 2018)

RÉSUMÉ

L'avènement des nucléases programmables, notamment de CRISPR-Cas9, constitue une rupture technologique dans le domaine de l'ingénierie génétique. Le principe de ces méthodes est simple : il consiste à générer des cassures au niveau de séquences d'ADN cibles dans des cellules d'intérêt. Ces cassures sont ensuite réparées par un mécanisme de ligation non-homologue des extrémités pouvant conduire à l'inactivation d'un gène de la région modifiée, ou par recombinaison homologue permettant l'insertion d'un fragment de séquence apporté aux cellules. Les domaines d'application sont très nombreux : recherche fondamentale, thérapie génique, ingénierie écologique, biotechnologies, agriculture... Des exemples d'applications visant à améliorer la santé des animaux, à améliorer le bien-être animal ou l'éthique de la production, ou à modifier les produits pour une meilleure valeur santé ou nutritionnelle, sont présentés. L'utilisation de ces méthodes soulève de multiples questions (techniques, réglementaires, économiques, éthiques...) qui sont discutées.

Mots-clés : CRISPR, modification de génome, volailles.

ABSTRACT

The advent of designer nucleases, especially CRISPR-Cas9, is providing a real breakthrough in genome editing technology. The principle is simple : Double-strand breaks (DSB) are accurately produced on selected target DNA sequences in specific cells. These DSB are then repaired by non-homologous end-joining, resulting in inactivation of the targeted gene(s), or by inserting a specific DNA fragment (template) through homologous recombination. These technologies can be used in multiple domains, including fundamental research, gene therapy, ecological engineering, biotechnologies or agriculture. Examples are presented of research projects aiming at improving animal health, avoiding controversial breeding practices, or improving the health impact and/or nutritional values of animal products. Numerous questions raised by the use of these technologies (techniques, regulation, economics, ethics...) are discussed.

Key words : CRISPR, genome editing, poultry.

INTRODUCTION

Les premières souris transgéniques ont été produites dès le début des années 1980 par micro-injection de matériel génétique exogène dans l'un des pronoyaux d'œufs fécondés (Gordon & Ruddle, 1981). La même technique a été utilisée, quelques

années plus tard, pour produire les premiers mammifères et poissons d'élevage génétiquement modifiés. Les spécificités de l'œuf et de l'embryon des espèces aviaires ont nécessité le recours à d'autres techniques, comme l'infection rétro- et lentivirale

(1) GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, INPT, ENVT, Castanet Tolosan, France.

(2) Auteur correspondant. GABI, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy en Josas, France. Courriel : bertrand.bedhom@mnhn.fr

(3) Université Lyon 1, INSERM, INRAE, Stem Cell and Brain Research Institute, U1208, CSC USC1361, Bron, France.

d'embryons à des stades précoces du développement, pour obtenir les premiers poulets transgéniques à la fin des années 1980 (Bosselman *et al.* 1989). Entre autres limites, ces méthodes « historiques » de transgénèse présentent l'inconvénient majeur de ne maîtriser ni les sites d'insertion des transgènes, ni le nombre de copies effectivement intégrées dans le génome des cellules ciblées, rendant les profils d'expression des transgènes généralement peu prédictibles. Chez la souris, la possibilité de modifier le génome de façon précise par recombinaison homologue (RH) dans des cellules embryonnaires souches (ES), a été démontrée dès 1989 (Capecchi, 1989) et a constitué une avancée scientifique majeure pour la recherche en biologie. La manipulation des cellules ES reste cependant impossible dans la plupart des espèces de mammifères d'élevage, et non pertinente chez le poulet car elle ne permet pas la transmission des modifications génétiques à la lignée germinale (Nishijima & Iijima, 2013). Des approches alternatives ont donc été recherchées et proposées. Chez les mammifères, des modifications ciblées de cellules somatiques en culture par RH, suivies de clonage par transfert de noyaux (*somatic cell nuclear transfer*, ou SCNT) ont été réalisées. Cependant, cette approche demeure longue, fastidieuse, et d'une efficacité limitée. Chez le poulet, l'utilisation de la RH dans des cellules germinales primordiales en culture (PGC) a permis de produire les premiers animaux recombinants pour un locus défini d'immunoglobuline, mais avec une efficacité là encore très limitée (1 clone cellulaire modifié pour 10^7 cellules transfectées : Schusser *et al.* 2013). Une possibilité d'améliorer cette efficacité de façon importante est apparue avec le concept de « nucléases programmables », permettant de générer des cassures double-brin au niveau de régions précises de la séquence d'ADN. Les premières techniques basées sur ce concept (*Zinc Finger Nucleases*, ou ZFN ; *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, ou TALEN), ont été respectivement développées à la fin des années 1990 et 2000. Malgré leur efficacité avérée, elles sont toutefois d'utilisation délicate, du fait notamment de la complexité de leur élaboration et de leur coût élevé. Une avancée décisive a eu lieu avec le développement de la technique CRISPR-Cas9 (Jinek *et al.* 2012), beaucoup plus simple en termes de conception et d'utilisation, moins coûteuse, et, de ce fait, bien plus accessible. Son efficacité a été démontrée dans de très nombreuses espèces (Haeussler & Concordet, 2016), et ses perspectives d'utilisation sont considérables (Hsu *et al.* 2014). Dans la suite de cet article, nous présenterons les principes généraux de cette méthode d'ingénierie ciblée des génomes, considérée par d'aucuns comme une révolution dans le monde de la biologie (Lander, 2016). Ses applications en recherche fondamentale et médicale, en ingénierie écologique ou dans certains domaines industriels particuliers (pharmacie, biotechnologies blanches...) seront évoquées brièvement, avant de présenter plus longuement son utilisation à des fins agronomiques (filères de productions animales, avicoles en particulier). Les limites de cette technique, les questions qu'elle soulève (aspects éthiques, réglementaires, économiques...) seront également présentées et discutées.

PRÉSENTATION DE LA TECHNIQUE CRISPR-CAS9

CRISPR-Cas9 : un système immunitaire bactérien

CRISPR est l'acronyme de *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats* : séquences répétées palindromiques courtes (30 bases) regroupées et régulièrement intercalées avec d'autres séquences qualifiées de *spacers*, vestiges de séquences de bactériophages ou de plasmides, d'environ 36 bases. Ce type particulier de motif a été observé dès la fin des années 1980 dans le génome d'*Escherichia coli*, puis, rapidement, dans de nombreuses autres espèces de bactéries et d'archées. L'évolution des connaissances dans ce domaine est bien résumée par Lander (2016). Des gènes codant des protéines aux fonctions variées (hélicases, nucléases...) ont été identifiés à proximité de ces séquences CRISPR. Ces gènes « Cas », pour *CRISPR-associated genes*, dont le gène Cas9 (codant pour une endonucléase générant des cassures double-brin de l'ADN), sont directement liés à la fonction de ces systèmes CRISPR dans une forme d'immunité adaptative chez les procaryotes (voir la synthèse de Marraffini (2015).

CRISPR-Cas9 : un outil révolutionnaire d'ingénierie ciblée des génomes

Les travaux de microbiologie moléculaire ont permis des progrès importants dans notre compréhension du fonctionnement de ces systèmes. Cependant, si CRISPR-Cas9 induit une telle effervescence depuis quelques années dans la communauté scientifique, et bien au-delà, c'est en raison de son utilisation possible pour générer des cassures au niveau de régions très précises de l'ADN, dans potentiellement tout type de cellules : animales, végétales, fongiques, microbiennes (Doudna & Charpentier, 2014; Zhang, 2015). Le principe général de l'outil CRISPR-Cas9 est relativement simple, et schématisé sur la **figure 1**. Comme c'était déjà le cas pour ZFN ou TALEN, CRISPR-Cas9 est constitué de deux composants principaux : un dispositif

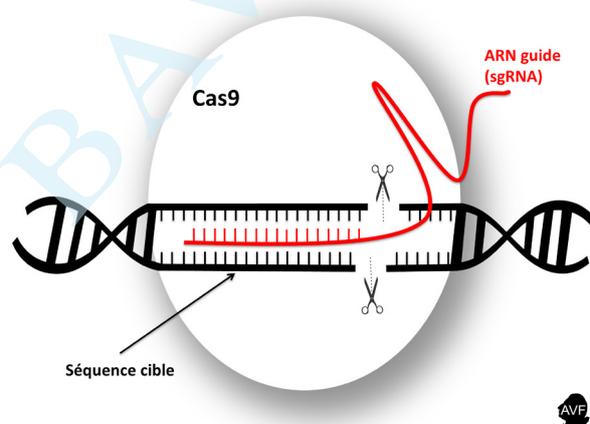


Figure 1 : L'enzyme induisant des cassures double-brin (Cas9) est dirigée vers une séquence très précise de l'ADN cible par l'intermédiaire d'un ARN guide (d'après Maxmen, 2015).

(ou domaine) de « guidage », permettant la reconnaissance par hybridation d'une séquence cible sur le génome de la cellule à modifier, et un domaine de « clivage » enzymatique, générant des cassures double-brin de la molécule d'ADN au niveau de la (ou des) région(s) ciblée(s) (on parle de « ciseaux moléculaires »). L'élément principal qui différencie CRISPR-Cas9 des systèmes antérieurs ZFN et TALEN est la nature du dispositif de guidage. Dans le cas de CRISPR-Cas9, ce dispositif est constitué d'une simple molécule d'ARN guide, ou sgRNA, dont une partie permet l'association à l'enzyme Cas9, et une vingtaine de bases sont complémentaires de la séquence cible. Dans le cas de ZFN ou TALEN, le dispositif de guidage est un complexe protéique, plus difficile, long et coûteux à produire. Les systèmes CRISPR-Cas9 est donc beaucoup plus simple et plus rapide à développer et à tester que ZFN ou TALEN, et plus évolutif, avec de nouvelles fonctions dérivées qui seront abordées ensuite. Comme l'illustrent également certains exemples détaillés plus loin, ils sont aussi sensiblement plus efficaces et offrent la possibilité de « multiplexage » (modification simultanée de plusieurs cibles du génome), ce qui était beaucoup plus difficile à envisager avec ZFN ou TALEN (Bao *et al.* 2015). Dans le processus de modification ciblée par les nucléases programmables, une fois la cassure double-brin générée au niveau de la (des) séquence(s) cible(s), deux voies de réparation par la cellule sont possibles

(Figures 2 et 3). La première (NHEJ, pour *Non Homologous End Joining*, ou ligation non-homologue des extrémités, Figure 2) consiste en un simple ajout ou excision de bases sur chacun des brins à l'endroit de la coupure. Si cette dernière est induite au niveau d'une région codante (exon d'un gène), les courtes insertions/délétions générées par la réparation (un à quelques nucléotides) induisent classiquement un décalage du cadre de lecture (mutation *frameshift*) conduisant à l'inactivation, ou *knock-out* (KO), de ce gène. L'autre voie de réparation (HDR, pour *Homology Directed Repair*, ou réparation par recombinaison homologue, Figure 3) est possible si un modèle d'ADN est apporté à la cellule en même temps que le système CRISPR-Cas9. Il peut s'agir d'un gène de la même espèce, avec, par exemple, une variation de séquence intéressante, ou un gène d'une autre espèce. Ce modèle peut être inséré à l'endroit de la cassure par des mécanismes de recombinaison homologue, et induire une (des) fonction(s) particulière(s) chez la cellule modifiée (modification *knock-in*, ou KI). L'efficacité de CRISPR-Cas9 est supérieure, voire très supérieure, à celle des systèmes antérieurs (Wang *et al.* 2016). Elle est le plus souvent élevée pour générer des KO de gènes (voie de réparation NHEJ). Il demeure toutefois difficile de réaliser des KI, les événements de recombinaison homologue restant assez rares, et pouvant par ailleurs s'accompagner d'insertions/délétions indésirables. Des efforts de recherche importants

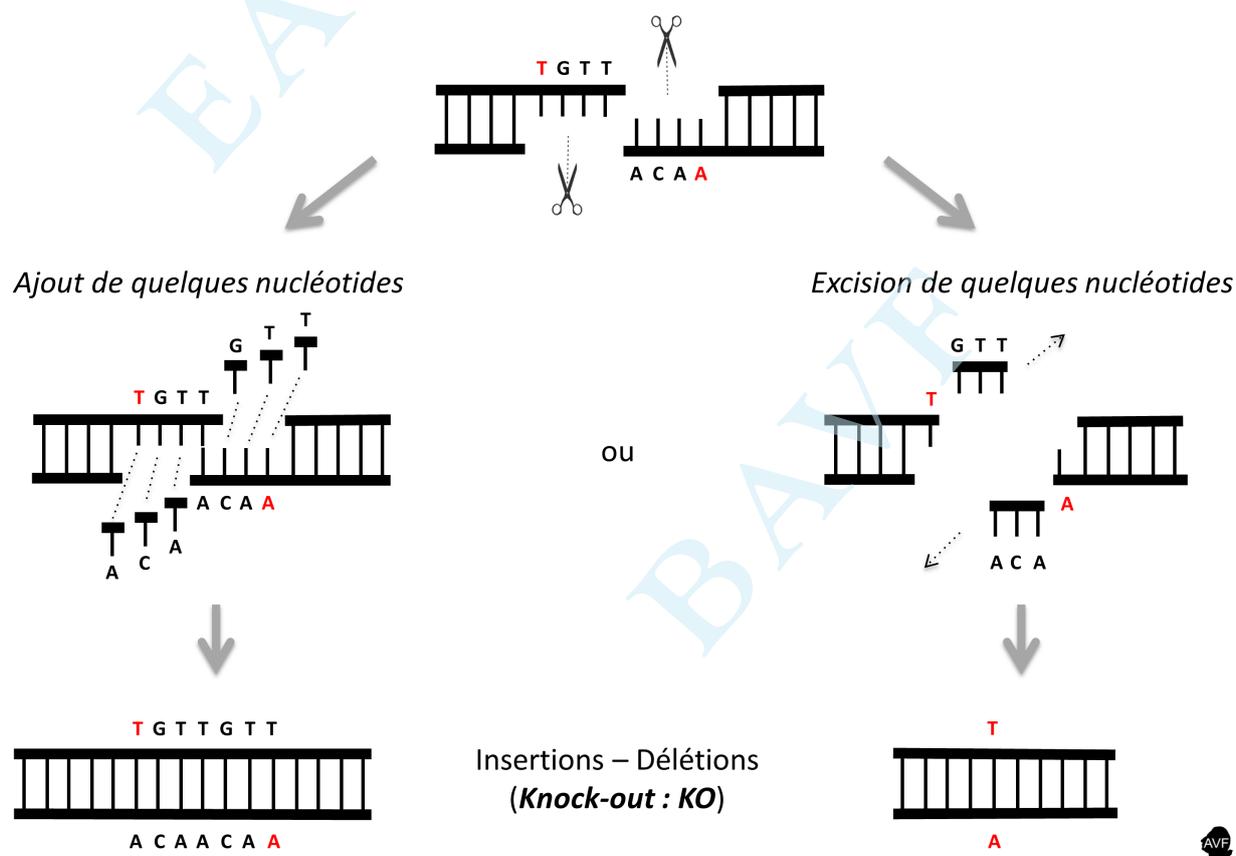


Figure 2 : Réparation de la cassure double-brin de type NHEJ (pour *Non Homologous End Joining*, ou ligation non-homologue des extrémités). Si la cassure est induite au niveau d'un gène, les courtes insertions/délétions générées par la réparation induisent classiquement un décalage du cadre de lecture conduisant à l'inactivation, ou *knock-out* (KO), de ce gène (d'après Maxmen, 2015).

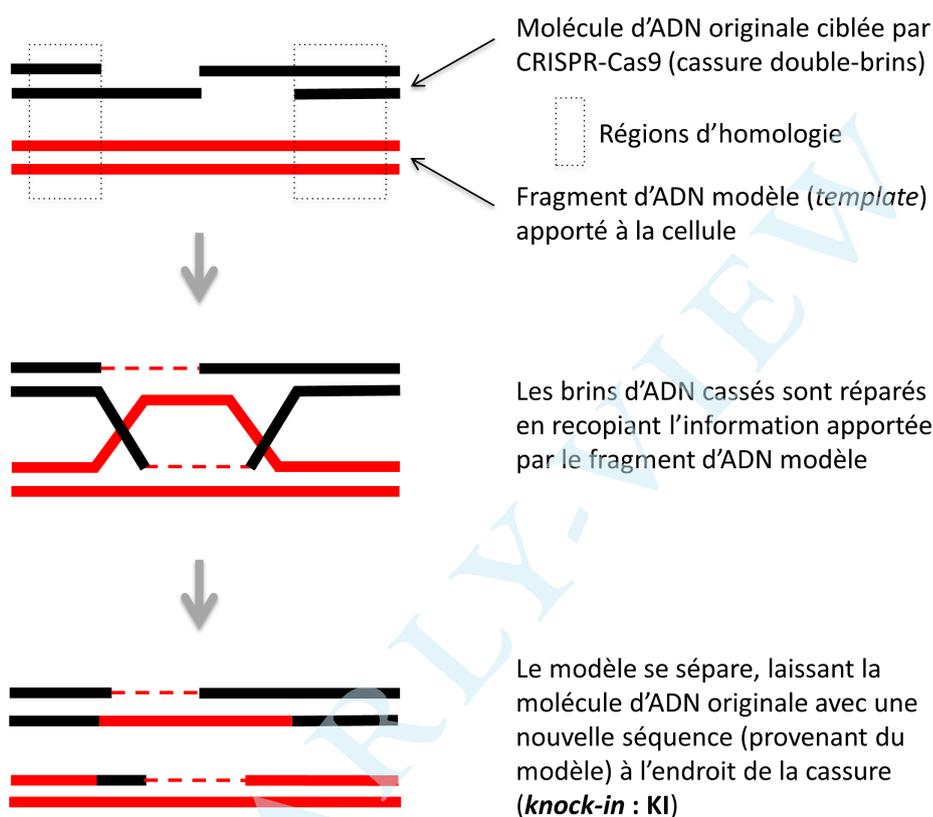


Figure 3 : Réparation de la cassure double-brin de type HDR (pour Homology Directed Repair, ou recombinaison homologue). Si un modèle d'ADN (en rouge sur la figure) est apporté à la cellule en même temps que le système CRISPR-Cas9, ce modèle peut être inséré à l'endroit de la cassure par des mécanismes de recombinaison homologue, et induire une (des) fonction(s) particulière(s) chez la cellule modifiée (modification knock-in, ou KI) (d'après Maxmen, 2015).

sont actuellement réalisés pour tenter d'améliorer l'efficacité (le rendement) des modifications KI (par la voie HDR). L'utilisation d'inhibiteurs de la voie de réparation concurrente (NHEJ) est une piste explorée avec un certain succès par différents groupes de recherche (voir par exemple Chu *et al.* 2015).

Les composants du système CRISPR-Cas9 peuvent être délivrés dans les cellules à modifier (cellules somatiques en culture, cellules souches pluripotentes induites, ou iPS, cellules embryonnaires...) de différentes façons : (i) à l'aide de vecteurs viraux ; (ii) par électroporation ou micro-injection de plasmides d'expression, de transposons ou d'ARN messager ; (iii) à l'aide de systèmes physiques (nanoparticules) ; pour plus de détails, voir par exemple la revue de Jo *et al.* (2015). Les mammifères génétiquement modifiés ont été principalement produits, jusqu'à présent, à l'aide des stratégies suivantes : (i) micro-injection pronucléaire dans des zygotes ou embryons produits par fécondation *in vitro*, suivie du transfert des embryons modifiés dans des femelles receveuses ; (ii) modification de cellules somatiques en culture, sélection (criblage) des clones cellulaires ayant les modifications souhaitées, et production d'animaux modifiés à partir de ces cellules par SCNT (voir pour plus de détails la revue de Menchaca *et al.* 2016). Chez les oiseaux, il est impossible ou très difficile d'intervenir sur le zygote ou l'embryon : les PGC (*primordial germ cells*) constituent donc un matériau de choix pour la procréation d'individus génétiquement modifiés (Schusser *et*

al. 2013). Ces cellules, précurseurs des gamètes, présentent la particularité de migrer, via la circulation sanguine, du croissant germinal jusqu'aux crêtes génitales, et colonisent les gonades en formation (Doran *et al.* 2016). Elles peuvent être collectées, soit à partir du sang circulant d'un embryon de deux jours, soit à partir des gonades embryonnaires (6-8 jours de développement), et utilisées pour initier des cultures cellulaires à long terme. Ces PGC en culture peuvent être génétiquement modifiées, puis réinjectées au troisième jour d'incubation dans la circulation sanguine d'autres embryons. Cette technique permet de générer des individus chimériques (G0) dont une partie des gamètes portera la/les modification(s) réalisée(s). Ces individus seront ensuite utilisés pour produire des descendants (G1, G2...) ayant intégré la (ou les) modification(s) dans l'ensemble de leurs cellules, à l'état hétérozygote (G1) ou homozygote (G2) (van de Lavoie *et al.* 2006; Nishijima & Iijima, 2013). Une approche encore plus directe, consistant à transfecter directement les PGC *in vivo*, a été récemment proposée et validée par Tyack *et al.* 2013. Elle permet de s'affranchir des délicates étapes de culture cellulaire et ouvre des perspectives intéressantes, notamment pour les espèces aviaires autres que le poulet (Doran *et al.* 2016). Cependant, avec ce type d'approche, le contrôle des événements de modification ne peut se faire qu'au niveau de l'animal, comme dans le cas de la micro-injection pronucléaire chez les mammifères. Le criblage des modifications souhaitées est donc plus difficile qu'à partir

d'une culture cellulaire. Dans tous les cas, le rendement de ces techniques est fortement limité par le taux de colonisation gonadique par les PGC modifiées. Une avancée majeure sur ce point a consisté à produire des animaux (femelles) receveurs des PGC modifiées qui étaient stériles par KO du gène DDX4, ce qui bloque le développement de leurs propres follicules (Taylor *et al.* 2017). Ainsi, seuls les follicules issus des PGC modifiées aboutissent à la production d'ovocytes qui comportent exclusivement les modifications réalisées.

UTILISATION DE LA TECHNIQUE CRISPR-CAS9

Panorama général

Le caractère révolutionnaire de la technologie CRISPR-Cas9 tient notamment au spectre extrêmement large de ses applications, déjà testées ou potentielles. Celles-ci sont bien décrites dans Doudna et Charpentier (2014) ou Hsu *et al.* (2014). CRISPR-Cas9 est, avant tout, un outil de plus en plus incontournable en recherche fondamentale, permettant d'aborder de nouvelles questions scientifiques, ou de s'intéresser à d'autres, plus anciennes, de façon plus efficace et/ou approfondie. CRISPR-Cas9 permet, par exemple, d'étudier efficacement les relations génotype-phénotype *via* la réalisation de cribles fonctionnels (perte ou gain de fonction) à haut débit (voir la revue de Shalem *et al.* 2015). L'utilisation de formes désactivées de Cas9 (dCas9, pour *dead Cas9*), ayant perdu la faculté de couper l'ADN, mais pouvant toujours s'associer de manière très spécifique à des régions précises par l'intermédiaire du sgRNA (cet ARN guide est synthétisé de façon à être complémentaire des séquences que l'on veut cibler), est par ailleurs devenue une méthode de choix pour visualiser des régions génomiques particulières au sein de cellules vivantes (dCas9 fusionnée avec des protéines fluorescentes ; Ma *et al.* 2015). Ces formes désactivées dCas9 constituent aussi des outils extrêmement précis et souples pour étudier les mécanismes de régulation de l'expression génique, notamment épigénétiques (dCas9 couplée à des modulateurs épigénétiques, par exemple des enzymes méthyltransférases pour de l'*epigenome editing*, voir la synthèse de Kungulovski et Jeltsch, 2016). Enfin, est apparu récemment le couplage d'une déaminase à une dCas9, permettant de réaliser une conversion directe de certains nucléotides ciblés (de C vers T ou de G vers A) sans coupure double-brin, ce qui est une avancée majeure pour les modifications d'une seule base (*base editing*, Komor *et al.* 2016). CRISPR-Cas9 ouvre également des perspectives extrêmement importantes dans le domaine de la thérapie génique et cellulaire humaine, en facilitant les modifications de cellules somatiques, iPS, voire embryonnaires : élimination ou correction de variations délétères ou pathologiques, addition de gènes thérapeutiques (voir la revue de Maeder & Gerbach, 2016). Des travaux permettant d'améliorer la précision et l'innocuité de ces approches sont néanmoins nécessaires pour ce type d'application. Ceci fait actuellement l'objet de très gros efforts de

recherche. La technique CRISPR-Cas9 peut aussi être employée pour modifier le génome de microorganismes (bactéries, levures) utilisés pour la production industrielle de produits chimiques, pharmaceutiques, de polymères ou de carburants à partir de biomasse, source très importante de carbone renouvelable (biotechnologies blanches ; voir par exemple Estrela & Cate, 2016). Elle permet aussi l'élaboration de systèmes dits de *gene drive* (ou d'hérédité dite « supermendélienne »). Ces derniers permettent de modifier très rapidement, en quelques générations seulement, un ou des gène(s) cible(s) dans des populations entières. Si, par exemple, les gènes inactivés sont indispensables à la reproduction de l'espèce, cela peut conduire à son éradication. Ceci a été testé avec succès pour différentes espèces d'insectes vecteurs de maladies majeures chez l'Homme, dont le paludisme, responsable de plus de 500 000 morts par an (Hammond *et al.* 2016). Les mêmes approches pourraient constituer des moyens de lutte efficaces contre certaines espèces invasives ou devenues résistantes à des biocides (insecticides, herbicides, anthelminthiques, par exemple, voir la revue de Champer *et al.* 2016). CRISPR-Cas9 peut enfin être utilisée pour modifier le génome de plantes, modèles ou cultivées (Khatodia *et al.* 2016), ou celui d'animaux d'élevage, avec des visées biomédicales ou agronomiques. Dans le domaine biomédical, on pense à la création de nouveaux modèles animaux de pathologies humaines potentiellement plus pertinents que la souris (Whitelaw *et al.* 2015) ou à la production de greffons, en particulier porcins, pour la xénotransplantation (Niemann & Petersen, 2016). Les applications agronomiques envisagées, et en particulier celles concernant les filières avicoles, sont présentées plus en détail dans le chapitre suivant.

Applications agronomiques pour les espèces aviaires

Produire des organismes génétiquement modifiés, y compris animaux, pour « nourrir l'humanité », n'est pas une idée récente (Houdebine, 1998, 2005). Mais si la commercialisation de variétés de plantes génétiquement modifiées est chose commune dans certaines régions du monde depuis le milieu des années 1990, la situation est très différente pour les espèces animales. Le saumon AquAdvantage® est actuellement la seule population transgénique à bénéficier d'une autorisation de commercialisation, délivrée fin 2015 par l'administration américaine, après 20 ans de procédures (Ledford, 2015). Les raisons expliquant ce fort contraste entre plantes et animaux sont nombreuses. Certaines sont liées à des questions d'acceptabilité de ce type de produits par les consommateurs. D'autres sont d'ordres scientifique (technique) et/ou économique. Cependant, les avancées spectaculaires en termes de connaissance des génomes, et la rupture technologique que représente CRISPR-Cas9, ont induit une explosion des travaux d'ingénierie des génomes animaux au cours des dernières années (Tan *et al.* 2016). Ceci, accompagné d'une forte mobilisation de certains leaders d'opinion, est probablement de nature à faire évoluer la situation au cours des années à venir. Il serait impossible de citer ici l'ensemble des travaux entrepris à ce jour. Une liste des modifications réalisées

dans les espèces bovine, ovine, caprine et porcine à l'aide des nucléases programmables ZFN, TALEN et CRISPR-Cas9, et publiées avant fin 2015, a été établie par Tan *et al.* (2016). Une synthèse des réalisations et des perspectives concernant les espèces aviaires a été récemment proposée par Doran *et al.* (2016). L'ensemble des applications envisagées pour les espèces animales est également bien résumé et mis en perspective dans le texte de Reardon (2016) : *The CRISPR zoo*. Nous n'évoquerons de façon détaillée dans la suite de ce texte que quelques travaux illustrant bien certains applications régulièrement mises en avant : (i) les modifications ciblées du génome visant à améliorer la santé des animaux d'élevage, (ii) celles permettant de ne plus recourir à des pratiques altérant le bien-être des animaux d'élevage ou soulevant d'évidentes questions éthiques, et (iii) celles visant à modifier les caractéristiques des produits animaux (lait, œufs, viande) dans une perspective d'amélioration de la nutrition et de la santé de l'Homme.

Modifications ciblées du génome visant à améliorer la santé des animaux

La gestion des problèmes de santé en élevage est un sujet complexe. Un consensus assez large existe néanmoins pour considérer que les approches les plus efficaces et durables sont celles mobilisant de façon complémentaire différents leviers d'action : amélioration des conditions d'élevage (logement, alimentation, protections sanitaires...), utilisation raisonnée des vaccins et des médicaments pour éviter l'apparition trop rapide de d'échappements ou de résistances, et sélection d'animaux présentant une robustesse naturelle face aux maladies (concept de gestion intégrée de la santé). Les méthodes de sélection fondées sur l'exploitation de la variabilité génétique existant au sein des populations, incluant donc la sélection assistée par marqueurs ou la sélection génomique, ont d'ores et déjà permis d'obtenir des résultats très probants en matière de résistance génétique à certaines pathologies infectieuses d'importance économique majeure en élevage. Les méthodes d'ingénierie ciblée des génomes, complémentaires, ouvrent cependant d'autres perspectives, qui doivent être considérées.

Des résultats marquants ont été publiés, par exemple chez les bovins et les porcs : production de vaches transgéniques produisant dans leur glande mammaire deux protéines humaines disposant de propriétés anti-microbiennes, les rendant résistantes à plusieurs souches bactériennes responsables de mammites (Liu *et al.* 2014) ; production de porcs dont le gène CD163 a été totalement inactivé (Whitworth *et al.* 2016), ou dont seulement un domaine (SRCR5) a été délété de la protéine correspondante (Burkard *et al.* 2018), les rendant résistants au virus responsable du SDRP (syndrome dysgénésique et respiratoire porcin), maladie virale ayant des répercussions économiques importantes en élevage porcin à l'échelle mondiale. Chez les volailles, d'autres maladies d'origine virale ont un fort potentiel zoonotique. C'est le cas en particulier de l'influenza aviaire, maladie pour laquelle

le contrôle par la vaccination (interdit en France), ou par des méthodes de biosécurité, est également difficile. Rendre les animaux résistants à ce type de virus, en recourant éventuellement à des méthodes d'ingénierie génétique, est donc potentiellement intéressant pour l'économie des filières avicoles, mais également en termes de santé publique. C'est avec cet objectif que Lyall *et al.* (2011) ont imaginé un système de résistance au virus fondé sur l'interférence à ARN : ils ont intégré dans le génome de poulets, à l'aide de vecteurs lentiviraux, des transgènes exprimant une courte séquence d'ARN en épingle à cheveux (shRNA, *short-hairpin RNA*). Cet ARN, transcrit par les cellules des animaux transgéniques, fonctionne comme un leurre, attirant et bloquant la polymérase du virus, perturbant donc la réplication de ce dernier. Dans cette expérimentation, tous les animaux transgéniques infectés expérimentalement par une souche virale hautement pathogène ont succombé à l'infection. Cependant, des animaux, transgéniques ou non, élevés en contact étroit avec les animaux infectés n'ont pas été contaminés. Ce résultat montre la pertinence de ce type d'approche pour limiter et/ou ralentir la propagation de la maladie au sein d'un élevage et/ou d'un territoire. Les animaux transgéniques de Lyall *et al.* 2011, ont été produits à l'aide de méthodes de transgénèse classique, antérieures à CRISPR-Cas9. Un jeune coq ayant intégré une copie unique du transgène sur le chromosome été utilisé pour procréer des descendants. D'autres travaux du même type pourraient être réalisés avec une précision et une efficacité accrue en mobilisant les techniques les plus récentes de modifications ciblées.

Modifications ciblées du génome permettant de ne plus recourir à certaines pratiques d'élevage

Certaines pratiques d'élevage (castration, gavage, écornage, élimination de poussins...) font l'objet de campagnes de dénunciations virulentes organisées par certaines associations défendant la cause animale en raison de leur conséquences éthiques ou sur le bien-être des animaux. Une conséquence de ces campagnes est que le souhait d'abandonner ces pratiques est de plus en plus partagé au sein de la société. Leur abandon peut passer par une évolution des systèmes et des pratiques d'élevage, et/ou par une réorganisation des filières. Cependant, dans ce domaine également, l'ingénierie ciblée des génomes peut être une option *a priori* séduisante. Chez les bovins par exemple, la production par clonage SCNT de taureaux homozygotes pour un allèle préexistant « sans corne », à partir de cellules d'individus homozygotes « cornus » modifiées par les nucléases programmables, est désormais possible. L'utilisation de ces individus génétiquement modifiés permet d'envisager une augmentation rapide de la fréquence des veaux nés sans corne, sans nécessairement pénaliser de façon importante le niveau génétique des populations (races) concernées (Carlson *et al.* 2016). Une autre pratique, ayant fait l'objet d'une cam-

pagne de dénonciation importante au cours des derniers mois, est l'élimination systématique, lors de l'éclosion, et à l'aide de méthodes parfois non appropriées, de poussins d'un sexe donné, par exemple des mâles dans le cas de la production de poussins femelles destinés à la ponte. Ces poussins mâles, issus de souches sélectionnées pour les aptitudes de ponte, sont en effet non adaptés à la production de poulets de chair, en raison d'une croissance, d'une composition corporelle et de comportements inadaptés aux exigences des filières. Pour éviter cette destruction massive de poussins, une équipe du CSIRO (Australie) a imaginé un système de production original utilisant la transgénèse (Doran *et al.* 2017; **Figure 4**). Ce système consiste à produire une lignée d'individus transgéniques dont le chromosome Z, noté Z^{GFP} aurait intégré un transgène codant une protéine fluorescente (GFP). Chez les oiseaux, c'est le sexe femelle qui est hétérogamétique (ZW), les mâles disposant dans chacune de leurs cellules de deux chromosomes Z. Les femelles de la lignée transgénique ($Z^{GFP}W$) seraient inséminées par de la semence de coqs issus d'autres lignées sélectionnées non transgéniques (ZZ). Les produits de ces accouplements seraient des femelles ZW (qui auraient hérité d'un chromosome W non génétiquement modifié de leur mère transgénique, et

d'un chromosome Z de leur père non transgénique), et des mâles $Z^{GFP}Z$, dont l'un des chromosomes Z, celui hérité de leur mère, porte le gène codant la GFP. Seules les femelles ayant un intérêt pour la filière ponte, les mâles doivent être identifiés pour être écartés. Ceux-ci pourraient donc l'être par un mirage des œufs (détection de la fluorescence) réalisé précocement au cours de la phase d'incubation. Les œufs présentant un signal de fluorescence seraient alors orientés vers un autre circuit de valorisation (industrie pharmaceutique, chimie...) bien avant l'éclosion, tandis que les autres seraient gardés en incubation pour la production de poussins femelles (ZW) destinés à devenir des poules pondeuses. Ces femelles seraient issues d'un parent transgénique, mais ne porteraient pas elles-mêmes de transgène, ce qui poserait la question de leur statut. Les promoteurs de ce dispositif, purement théorique jusqu'à maintenant, considèrent que ces animaux ne seraient pas génétiquement modifiés et qu'ils devraient par conséquent échapper à toute réglementation « OGM ». On peut penser qu'avec les techniques actuelles de modification génétique, cette construction génétique pourrait être réalisable à assez court terme. Se poserait alors la question de l'acceptabilité par le consommateur de ce type d'approche.

Lignée 1 (transgénique) Lignée 2 (conventionnelle)

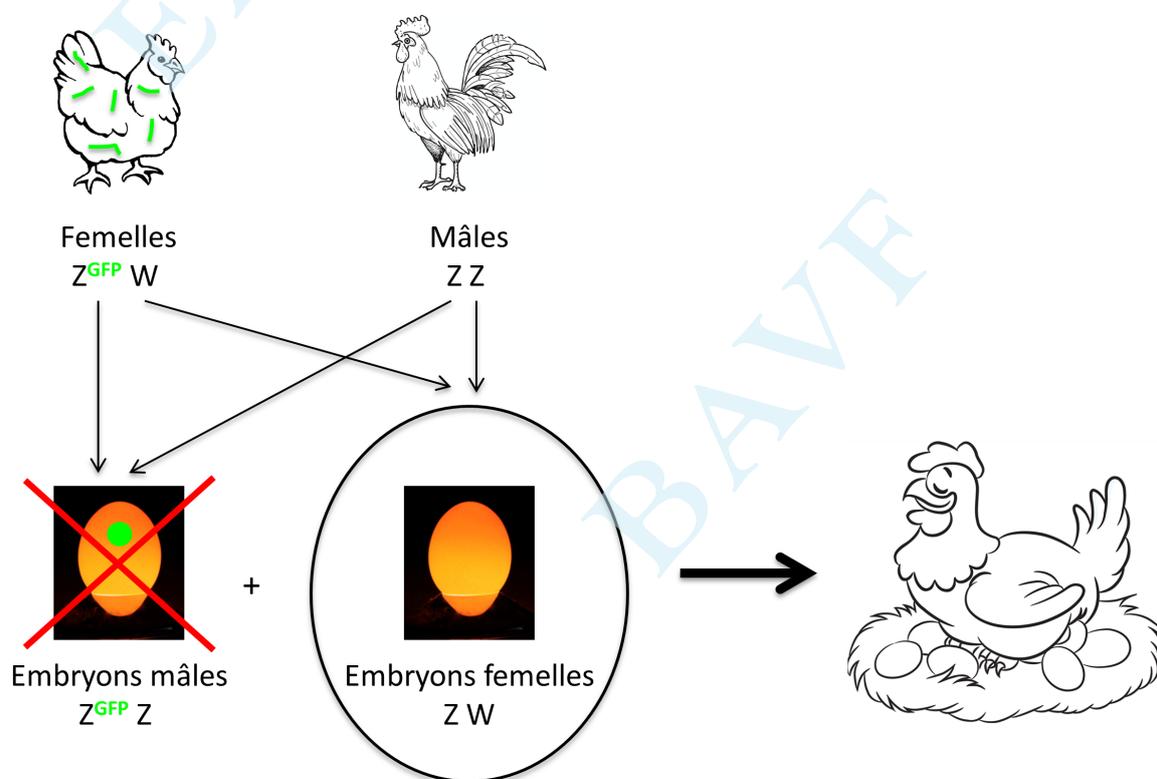


Figure 4 : Dispositif théorique permettant de trier les œufs contenant les embryons mâles avant éclosion (production de poussins femelles destinées à la ponte). Ce dispositif valorise une lignée transgénique (animaux ayant intégré le gène codant la protéine GFP sur leur chromosome Z), mais les animaux issus de ce dispositif, destinés à l'élevage, ne portent pas le transgène (d'après Doran *et al.* 2017).

Modifications ciblées du génome visant à améliorer la nutrition et la santé de l'Homme

Parmi les nombreuses questions que l'Homme se pose actuellement concernant son alimentation, celle des allergies alimentaires fait partie des plus importantes. Les allergies au lait de vache ou à l'œuf comptent parmi les plus fréquentes chez le jeune enfant, et sont difficiles à gérer pour les individus concernés dans la mesure où ces produits sont utilisés pour l'élaboration de très nombreuses préparations alimentaires ou non-alimentaires (protéines d'œuf présentes dans certains vaccins par exemple). L'élimination de ces aliments, sans substitution appropriée, peut par ailleurs être à l'origine de carences ou de malnutrition très préjudiciables durant la croissance de l'enfant. Les principales molécules allergisantes sont des protéines : caséines, lactalbumine, lactoglobuline pour le lait, ovalbumine, ovomucoïde pour le blanc d'œuf. Ces protéines, comme toutes les autres, sont le produit de gènes particuliers. L'inactivation de ces gènes, ou la modification de leurs séquences codantes pour diminuer l'allergénicité des protéines correspondantes, pourraient donc être envisagées, dans des filières d'élevage spécialisées, pour la production d'aliments adaptés aux régimes de personnes allergiques, ou, plus globalement, pour atténuer la fréquence de ces allergies chez l'enfant. C'est avec cet objectif qu'ont été réalisés les premiers travaux utilisant des nucléases programmables chez le poulet (Park *et al.* 2014). À l'aide de la technologie TALEN, des cassures ont été générées dans l'exon 2 du gène codant l'ovalbumine au sein de PGC en culture. Des délétions de 6 à 29 nucléotides, inactivant le gène, ont été constatées dans 33% des cellules analysées. Ces cellules ont été réinjectées dans des embryons de poulets pour donner naissance à des individus chimériques. Ces derniers ont été accouplés à des individus non modifiés pour procréer plusieurs descendants G1 portant une copie du gène muté dans chacune de leurs cellules. Aucune anomalie n'a été détectée chez ces animaux. Le séquençage de leur génome n'a révélé aucune modification hors cible. Le même type de travaux a été entrepris plus récemment par une équipe japonaise, mais, cette fois, et pour la première fois chez le poulet, à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 (Oishi *et al.* 2016). Deux gènes étaient ciblés dans ces travaux (ovalbumine et ovomucoïde), qui sont allés jusqu'à l'obtention d'individus G2 mutés sur les deux copies du gène de l'ovomucoïde. Les résultats obtenus démontrent une nouvelle fois la grande efficacité et la précision de cette technique : taux de transformation cellulaire >90%, pas de modification hors-cible détectée dans les trois régions candidates analysées. L'impact à long terme (sur toute la durée de vie productive des animaux) de l'absence d'une protéine aussi importante que l'ovalbumine pour le développement et la croissance embryonnaire devrait toutefois être évalué avant d'envisager une application commerciale de ce genre de travaux. D'autres programmes de recherche du même type ont été conduits avec succès pour modifier la composition protéique du lait de différentes espèces de ruminants (Yu *et al.* 2011 ; Song *et al.* 2015).

DISCUSSION

Implémentation et limites des modifications ciblées dans les schémas de sélection

Les quelques exemples développés dans la partie précédente illustrent l'efficacité et le potentiel des nucléases programmables, et de CRISPR-Cas9 en particulier, pour la production de nouvelles lignées d'animaux génétiquement modifiés. Ces méthodes représentent, dans le domaine de l'ingénierie génétique, une réelle rupture technologique. Des raffinements méthodologiques visant à améliorer la précision (éviter les modifications hors-cible), le potentiel de multiplexage (modification simultanée de plusieurs régions du génome), ou l'innocuité des méthodes (modification sans coupure double brin par une dCas9 couplée à une déaminase), par exemple, doivent encore être apportés. Toutefois, des efforts de recherche très importants sont actuellement en cours, accompagnés de moyens financiers considérables. Cela permet de penser que les améliorations techniques nécessaires seront opérationnelles rapidement. Le déploiement de ces méthodes pour l'obtention d'animaux génétiquement modifiés dépendra étroitement de l'évolution des connaissances en matière de déterminisme et de variabilité génétique des caractères d'intérêt. Dans ce domaine, deux points de vue assez symétriques peuvent être défendus. Le premier consiste à considérer que de nombreux gènes majeurs (polymorphismes génétiques expliquant une part importante de la variabilité d'un ou de plusieurs caractères importants en sélection) ont été identifiés dans le passé dans les espèces d'élevage. Une partie de ces gènes pourraient d'ores et déjà être candidats à des modifications ciblées, pour introduire certains allèles dans des populations particulières, en supprimer ou en corriger d'autres... Ce pourrait aussi être le cas de nombreuses autres régions du génome où des variants responsables d'affections héréditaires sont identifiés. Les progrès très importants des connaissances permis par l'évolution spectaculaire des techniques d'analyse des génomes peuvent par ailleurs laisser penser que de nouvelles régions candidates à modification(s) par CRISPR-Cas9 pourraient être identifiées très régulièrement. Cependant, les caractères quantitatifs sélectionnés sont essentiellement polygéniques. Les analyses d'associations à l'échelle du génome entier réalisées jusqu'à présent montrent que, sauf exception, les régions génomiques contribuant le plus à la variation des caractères (QTL) n'expliquent individuellement qu'une faible part de cette variation, et les variants nucléotidiques responsables de cet effet restent souvent non identifiés. Affecter notablement les caractères quantitatifs pourrait donc impliquer la modification simultanée ou successive de nombreuses cibles génomiques encore inconnues. Par conséquent, si quelques régions du génome peuvent effectivement faire l'objet de modifications ciblées, l'essentiel des progrès génétiques à venir devrait être le résultat des programmes actuels de sélection, avec ou sans information génomique. L'utilisation de CRISPR-Cas9 dans les populations d'élevage pose par ailleurs différentes questions dont les sélectionneurs devront s'emparer. La durabilité des améliorations produites en est une, tout particulièrement dans le cas des modifications visant à induire une résistance de l'hôte à

des agents pathogènes. La dynamique évolutive de ces derniers, pouvant être à l'origine de contournements de résistance rapides, et la complexité de la réponse immunitaire, rendent à l'exception de quelques cas particuliers, potentiellement peu pertinents et relativement vains, voire risqués, tout effort de lutte basé sur la modification d'un ou de quelques gènes de l'hôte seulement.

Politique des filières et contexte légal

La politique à adopter par les organisations raciales et de producteurs vis-à-vis des nouvelles technologies est un autre aspect qu'il sera important de considérer. On peut imaginer, dans ce domaine, différents positionnements. Dans certaines populations, celles sur lesquelles s'adosent certains signes officiels de qualité par exemple, on pourrait envisager l'interdiction de toute intervention : un « variant CRISPR » particulier pourrait être formellement exclu de certains cahiers des charges. À l'inverse, on peut aussi envisager que certains sélectionneurs s'engagent dans la différenciation de nouvelles populations (races) sur la base de « variants CRISPR » originaux. La question de la brevetabilité de tels animaux pourrait par ailleurs se poser : la modification d'une seule (ou de quelques) régions du génome serait-elle suffisante pour qu'une entreprise s'approprie une génétique façonnée au cours du temps par des générations d'éleveurs ? Les modifications ciblées des génomes sont aussi susceptibles de poser des questions spécifiques en matière de gestion de la diversité génétique des populations : certains reproducteurs disposant de caractéristiques intéressantes induites par ingénierie ciblée pourraient en effet être utilisés massivement, créant de nouveaux goulets d'étranglement au sein des populations. Ce problème est généralement négligé dans les discussions des publications présentant des modifications de génome chez des animaux de production. De même, la gestion des programmes de sélection génomique pourrait être affectée par la nécessité d'estimer et de prendre en compte l'effet des nouveaux « variants CRISPR » dans les équations de prédiction génomique. L'utilisation de ces nouvelles techniques fait également émerger d'autres types de questionnements, plus généraux, auxquels il sera parfois difficile de répondre. Un premier type de questionnement concerne la nature juridique de ces innovations. La définition légale d'un OGM figure dans la directive 2001/18/CE : « un OGM est un organisme, à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ». Jusqu'à présent, et sur la base de cette définition, c'était la méthode d'obtention qui déterminait la nécessité ou non d'une évaluation préalable à une éventuelle autorisation. Quelques techniques seulement, comme la mutagenèse, étaient exclues du champ d'application de la directive. Désormais, avec le déploiement des nucléases programmables, qui facilitent la réalisation de modifications ciblées qui, pour certaines, miment des processus cellulaires s'effectuant naturellement, les cartes sont susceptibles d'être rebattues. Un lobbying important est organisé actuellement, visant à faire évoluer la réglementation dans le sens d'une évaluation des produits eux-mêmes, sur la base de leurs caractéristiques propres, et non plus sur la seule

base des méthodes ayant permis leur obtention (voir par exemple Murray & Maga, 2016). L'arrêt récent de la Cour Européenne de Justice (affaire C-528-16 du 25 juillet 2018) concernant les plantes considère que les organismes obtenus par ces nouvelles nucléases sont soumis aux obligations de la directive OGM. Par ailleurs, les techniques de modification ciblées sont susceptibles de ne laisser aucune trace détectable sur les génomes : la mutation « naturelle » d'un gène, et la reproduction à la base près de cette modification par CRISPR, pourraient ne pas être distinguables. Se pose alors la question de la diffusion « cachée », délibérée (parce que cela pourrait procurer un avantage commercial temporaire) ou involontaire d'individus issus de ces techniques sur des territoires (ou dans des populations) qui continueraient pourtant à les réglementer ou les interdire. La gestion de ce type de situation pourrait être particulièrement difficile.

Controverses et éthique

D'autres questionnements sont d'ordre éthique. A-t-on le droit de se substituer à la nature pour introduire des modifications au sein de génomes d'espèces domestiques, même si, d'un point de vue moléculaire, certaines de ces modifications peuvent être de même nature que celles apparaissant naturellement par mutation ? Nombre de travaux, plus ou moins récents, illustrent bien la très grande complexité des mécanismes de régulation des phénomènes biologiques. Peut-on raisonnablement penser évaluer et maîtriser l'ensemble des conséquences que peut induire, chez un animal, la modification d'une (ou plusieurs) région(s) de son génome ? La réponse à ces questions implique nécessairement la prise en compte de considérations qui dépassent largement le seul cadre scientifique. L'acceptabilité (la recevabilité par le citoyen-consommateur) des animaux issus de ce type de techniques est aussi une question très difficile à appréhender. Les questions concernant les OGM végétaux sont d'une grande complexité elles aussi, et les débats parfois d'une grande violence. Il y a fort à parier que les débats que susciteront les perspectives de commercialisation d'animaux génétiquement modifiés seront au moins aussi difficiles. Une des difficultés tient au fait que le nombre de dimensions à considérer pour évaluer l'intérêt ou non de ces innovations est très important. Les questions relatives aux risques éventuels liés (i) à la consommation de produits OGM pour la santé humaine, ou (ii) à la dissémination de variétés ou d'individus OGM pour la biodiversité, par exemple, font partie des controverses. Mais d'autres dimensions sont tout aussi importantes à considérer dans une perspective de gestion des risques, et font aussi l'objet d'appréciations parfois contradictoires. C'est le cas de l'évaluation des conséquences économiques, sociales, ou environnementales de l'utilisation de variétés OGM, qui, toutes, sont fonction de nombreux paramètres : la région considérée, le terme envisagé, la nature des modifications proposées... Une argumentation classiquement développée par certains chercheurs (voir par exemple McColl *et al.* 2013 ou Tizard *et al.* 2016) est la suivante : une croissance très importante de la population humaine est attendue d'ici 2050 ; le chiffre de 9 milliards d'humains en 2050 est généralement avancé. Cette croissance démographique, accompagnée d'une

augmentation de la consommation individuelle de produits animaux dans certaines régions (Chine notamment), induira une forte hausse de la demande alimentaire mondiale au cours des 30 prochaines années. La production alimentaire mondiale devra donc augmenter fortement elle aussi (de +70% à +100% selon les auteurs), et la seule façon de faire face à ce très important défi est de recourir aux biotechnologies (sous-entendu : les pratiques agricoles « conventionnelles » ne le permettront pas). D'autres avis, contradictoires, sont exprimés. Jacobsen *et al.* 2013, par exemple, considèrent que, dans la mesure où c'est dans les pays du Sud que le besoin d'accroître la production agricole sera particulièrement crucial dans les années à venir, et tout particulièrement en Afrique, des solutions *low-tech* doivent être privilégiées, parce qu'elles sont souvent plus efficaces et moins sujettes à l'échec, et ne mettraient pas les pays concernés sous la dépendance technologique des compagnies qui mettraient

en place ces biotechnologies. Ces controverses rejoignent celles relatives au(x) modèle(s) d'agriculture(s) à promouvoir. C'est un euphémisme de dire que cette question fait toujours débat en France, ou en Europe. Encore plus à l'échelle mondiale, entre l'Union Européenne (UE) et les USA ou la Chine, notamment.

CONCLUSION

Les méthodes permettant la procréation d'animaux génétiquement modifiés (AGM) ont considérablement évolué ces dernières années. Le développement de lignées commerciales d'AGM dans certaines espèces d'élevage, pour la production de lait, d'œuf ou de viande destinés à la consommation humaine, pourrait être une réalité à assez court terme. Cela pose de multiples questions dont la communauté scientifique, et, plus largement, la société, devraient rapidement s'emparer.

BIBLIOGRAPHIE

- Bao Z, Cobb RE, Zhao H. Accelerated genome engineering through multiplexing. Wiley Interdiscip. Rev.-Syst. Biol 2016; 8: 5-21
- Bosselman R, Hsu R, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, Ou S *et al.* Germline transmission of exogenous genes in the chicken. Science 1989; 243: 533-535
- Burkard C, Opriessnig T, Mileham AJ, Stadejek T, Ait-Ali T, Lillico SG *et al.* Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. J Virol. 2018; 92:e00415-18
- Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination. Science 1989; 244: 1288-1292
- Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D *et al.* Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. Nat. Biotechnol. 2016; 34: 479-481
- Champer J, Buchman A, Akbari OS. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. Nat. Rev. Genet. 2016; 17: 146-159
- Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K *et al.* Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nat. Biotechnol. 2015; 33: 543-548
- Doran TJ, Cooper CA, Jenkins KA, Tizard ML. Advances in genetic engineering of the avian genome: "Realising the promise." Transgenic Res. 2016; 25: 307-319
- Doran TJ, Morris KR, Wise TG, O'Neil TE, Cooper CA, Jenkins KA *et al.* Sex selection in layer chickens. Animal Production Science 2017; 58: 476-480
- Doudna JA & Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 2014; 346: 1258096
- Estrela R & Cate JHD. Energy biotechnology in the CRISPR-Cas9 era. Curr. Opin. Biotechnol. 2016; 8: 79-84
- Gordon J & Ruddle F. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. Science 1981; 214: 1244-1246
- Haeussler M & Concordet JP. Genome editing with CRISPR-Cas9, can it get any better? J. Genet. Genomics 2016; 43: 239-250
- Hammond A, Galizi R, Kyrrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D *et al.* A CRISPR-Cas9 gene drive system-targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. Nat. Biotechnol. 2016; 34: 78-83
- Houdebine LM. La transgénèse animale et ses applications. In: Numéro spécial « Biotechnologies ». INRA Prod. Anim. 1998; 11: 81-94
- Houdebine LM. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. Reprod. Domest. Anim. 2005; 40: 269-281
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 2014; 157: 1262-1278
- Jacobsen SE, Sorensen M, Pedersen SM, Weiner J. Feeding the world, genetically modified crops versus agricultural biodiversity. Agron. Sustain. Dev. 2013; 33, 651-662
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012; 337: 816-821
- Jo YI, Suresh B, Kim H, Ramakrishna S. CRISPR/Cas9 system as an innovative genetic engineering tool: Enhancements in sequence specificity and delivery methods. Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer 2015; 1856: 234-243
- Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SMP, Tuteja N. The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. Front. Plant Sci. 2016; 7: 506
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 2016; 533: 420-424
- Kungulovski G, Jeltsch A. Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. Trends Genet. 2016; 32: 101-113
- Lander ES. The heroes of CRISPR. Cell 2016; 164: 18-28
- van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R *et al.* Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. Nature 2006; 441: 766-769
- Ledford H. Transgenic salmon leaps to the dinner table. Nature 2015; 527: 417-418
- Liu X, Wang Y, Tian Y, Yu Y, Gao M, Hu G *et al.* Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. Proc. R. Soc. B-Biol. Sci. 2014; 281: 20133368
- Lyall J, Irvine RM, Sherman A, McKinley TJ, Nunez A, Purdie A *et al.* Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens. Science 2011; 331: 223-226
- Ma H, Naseri A, Reyes-Gutierrez P, Wolfe SA, Zhang S, Pederson T. Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015; 112: 3002-3007
- Maeder ML & Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. Mol. Ther. 2016; 24: 430-446
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 2013; 339: 823-826

- Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 2015; 526: 55-61
- Maxmen A. Three technologies that changed genetics. *Nature* 2015; 528: S2-S3
- McColl KA, Clarke B, Doran TJ. Role of genetically engineered animals in future food production. *Aust. Vet. J.* 2013; 91: 113-117
- Menchaca A, Anegón I, Whitelaw CBA, Baldassarre H, Crispo M. New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology* 2016; 86: 160-169
- Murray JD & Maga EA. A new paradigm for regulating genetically engineered animals that are used as food. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016; 113: 3410-3413
- Niemann H & Petersen B. The production of multi-transgenic pigs, update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res.* 2016; 25: 361-374
- Nishijima K & Iijima S. Transgenic chickens. *Dev. Growth Diff.* 2013; 55: 207-216
- Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, Kagami H, Tagami T. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2016; 6: 23980
- Park TS, Lee HJ, Kim KH, Kim JS, Han JY. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111: 12716-12721
- Reardon S. The Crispr Zoo. *Nature* 2016; 531: 160-163
- Schusser B, Collarini EJ, Yi H, Izquierdo SM, Fesler J, Pedersen D *et al.* Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110: 20170-20175
- Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 2015; 16: 299-311
- Song Y, Cui C, Zhu H, Li Q, Zhao F, Jin Y. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene. *Protein Expr. Purif.* 2015; 112: 1-7
- Tan W, Proudfoot C, Lillico SG, Whitelaw CBA. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Res.* 2016; 25: 273-287
- Taylor L, Carlson DF, Nandi S, Sherman A, Fahrenkrug SC, McGrew MJ. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development* 2017; 144: 928-934
- Tizard M, Hallerman E, Fahrenkrug S, Newell-McGloughlin M, Gibson J, de Loos F *et al.* Strategies to enable the adoption of animal biotechnology to sustainably improve global food safety and security. *Transgenic Res.* 2016; 25: 575-595
- Tyack SG, Jenkins KA, O'Neil T, Wise TG, Morris KR, Bruce MP. A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Res.* 2013; 22: 1257-1264
- Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 2016; 85: 227-264
- Whitelaw CBA, Sheets TP, Lillico SG, Telugu BP. Engineering large animal models of human disease. *J. Pathol.* 2016; 238: 247-256
- Whitworth KM, Rowland RRR, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG *et al.* Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.* 2016; 34: 20-22
- Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.* 2011; 21: 1638-1640
- Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome manipulations. *FASEB J.* 2015; 29 (S1): 214.1