

GÉNÉRATION D'ANIMAUX GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS EN AMÉRIQUE DU SUD

GENERATION OF GENETICALLY MODIFIED ANIMAL MODELS IN SOUTHAMERICA

Par Martina CRISPO¹, Alejo MENCHACA^{2,3}, Geraldine SCHLAPP¹ et María Noel MEIKLE¹

(Communication présentée le 10 Juin 2021, manuscrit accepté le 30 septembre 2021)

RÉSUMÉ

La création d'animaux génétiquement modifiés a permis de réaliser de grandes avancées scientifiques dans des domaines variés. En 2006 nous avons mis en place à l'Institut Pasteur de Montevideo une Unité Technologique capable de conduire un programme de recherche propre et de fournir aux chercheurs d'Uruguay et de la région des modèles de souris génétiquement modifiés. En 2014, nous avons mis en œuvre le système CRISPR/Cas9, ce qui nous a permis d'élargir le cadre de notre activité et de développer d'autres projets impliquant la souris et le mouton, nous positionnant ainsi comme plateforme technologique de référence en Amérique du Sud. La législation relative aux Organismes Génétiquement Modifiés (OGMs) dans plusieurs pays d'Amérique du Sud ne prend en compte que les modifications comportant l'addition d'ADN exogène et en exclut donc l'édition génomique. Cette situation procure un avantage régional favorisant le développement rapide de modèles génétiquement édités y compris dans des espèces animales de rentes.

Mots-Clés : CRISPR, édition génomique, rongeurs, mouton.

ABSTRACT

The generation of genetically modified animals has made possible to achieve great scientific advances in several fields. In 2006 we set up a Technological Unit at Institut Pasteur of Montevideo capable of conducting our own research program and provide researchers of Uruguay and the region with genetically modified mouse models. In 2014, we implemented the CRISPR/Cas9 system, which allowed us to broaden the scope of our activity and develop other projects involving mice and sheep, thus positioning this laboratory as a reference technological platform in South America. The legislation on Genetically Modified Organisms (GMOs) in several South American countries only considers modifications involving the addition of exogenous DNA, while legislation for genome editing involves a more appropriate regulation for this technology. This situation provides a regional advantage favoring the rapid development of genetically edited models including large animal species.

Keywords: CRISPR, gene editing, rodents, sheep.

1- Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE), Institut Pasteur de Montevideo, Matajojo 2020 CP 11400, Montevideo, Uruguay. crispo@pasteur.edu.uy

2- Fundación IRAUy, Cno. Cruz del Sur 2350, Montevideo, Uruguay. menchaca.alejo@gmail.com

3- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Av. Italia 6201, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCTION

Les animaux de la sous-espèce *Mus musculus domesticus*, les souris de laboratoire, sont les animaux les plus utilisés en expérimentation animale et dont la génétique est la mieux connue (Panthier *et al.* 2003). C'est dans cette espèce que les techniques de modification du génome ont été mises au point à partir des années 1980. La première d'entre elle, la micro-injection d'ADN dans des pro-noyaux, consiste à introduire un ADN exogène, au hasard, dans l'ADN cellulaire. Cette technique a permis la production de souris transgéniques, un terme proposé par Gordon et Ruddle en 1981, et a été essentiellement utilisée pour étudier les effets de l'ajout d'un gène donné (une modification "gain de fonction") (Gordon & Ruddle, 1981). Chez les rongeurs, la micro-injection est peu efficace puisque seul 1,5-3,2% des embryons injectés donnent naissance à des souris transgéniques, avec un niveau d'expression du transgène très variable. Chez les animaux de rente, la même technique de micro-injection a également été utilisée et le rendement s'est révélé encore plus faible car le cytoplasme des ovocytes est opaque et les embryons doivent être préalablement centrifugés pour pouvoir distinguer les pronoyaux, ce qui contribue au faible rendement. Les divers inconvénients de la technique de micro-injection telles que la faible efficacité, l'intégration aléatoire, le mosaïcisme et l'expression variable du transgène, ont conduit au développement de méthodologies alternatives dans lesquelles le transgène est introduit par des lentivirus ou des transposons (Menchaca *et al.* 2017). Les vecteurs lentiviraux sont des rétrovirus complexes utilisés pour l'insertion de gènes exogènes et dont le génome viral est réparti en plusieurs fragments pour éviter la formation de virus répliquatifs compétents (Park, 2007). Cette technique a permis de produire des souris (Lois *et al.* 2002), des vaches (Hofmann *et al.* 2004) et des moutons transgéniques (Crispo *et al.* 2015a). La transgénèse à l'aide de transposons d'ADN utilise leur capacité de "couper-coller", qui conduit à l'insertion d'un transgène dans le génome de l'hôte en une seule étape. Un ARN messager codant la transposase, est généralement co-injecté pour catalyser l'intégration du gène d'intérêt (Menchaca *et al.* 2017). Cette technique a permis d'obtenir des souris, des rats, des porcs et des poissons zèbres transgéniques (Geurts *et al.* 2011).

Pour la production de modifications génétiques plus précises, la recombinaison homologe d'ADN exogène dans les cellules souches embryonnaires (cellules ES) (Thomas & Capecchi, 1987) suivie de la réinsertion des cellules ES ainsi modifiées dans la cavité d'un blastocyste a permis de produire des souris chimériques (Doetschman *et al.* 1988) capables de transmettre le transgène dans la lignée germinale et de produire ainsi des lignées mutantes (Zijlstra *et al.* 1989; Cohen-Tannoudji & Babinet, 1998). Bien qu'il s'agisse d'une technique de référence pour divers types de modifications génétiques et qu'elle ait rendu possible le développement de modèles murins pour l'étude des fonctions des gènes et des maladies génétiques humaines, elle est très laborieuse, coûteuse et demande beaucoup de temps. De plus, cette stratégie expérimentale ne peut pas être appliquée chez les animaux de production dans lesquels des cellules souches embryonnaires n'ont pas été établies.

Au cours des dix dernières années, diverses technologies basées

sur des nucléases bactériennes modifiées ont été développées à un rythme très rapide et se sont avérées utiles dans divers domaines, de la recherche fondamentale aux biotechnologies appliquées.

L'ÉDITION GÉNOMIQUE

L'édition génomique est une nouvelle technologie avec un fort potentiel d'application qui permet l'introduction de modifications génétiques à des sites spécifiques du génome. Elle peut être appliquée *in vitro* ou *in vivo* grâce à des stratégies d'édition *in situ*, qui permettent d'ajouter, de supprimer ou de modifier des gènes, ainsi que de réaliser d'autres modifications génétiques très précises (Smith *et al.* 2006). Ces stratégies sont basées sur l'utilisation de nucléases qui produisent des coupures double brin (DBS) à un locus génomique d'intérêt. Parmi ces nucléases figurent les méganucléases (Smith *et al.* 2006), les *zinc finger nucleases* (ZFN) (Geurts *et al.* 2009), et les *Transcription activator-like effector nuclease* (TALEN) (Christian *et al.* 2010). Les plus récentes et les plus connues sont les Cas qui coupent l'ADN au niveau de séquences CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (Jinek *et al.* 2012 ; Cong *et al.* 2013). Le système CRISPR/Cas est dérivé d'un mécanisme des procaryotes de type immunitaire adaptatif qui fournit une protection spécifique contre les virus et les plasmides. Ce système est codé dans l'ADN et médié par une molécule d'ARN, et il a été exploité pour développer de puissants outils de manipulation génomique chez les animaux, les plantes et les micro-organismes (Barrangou & Doudna, 2016). Parmi les endonucléases programmables utilisables, CRISPR/Cas9 s'est avérée être un outil simple et efficace pour manipuler le génome d'une grande variété d'organismes. Cet outil se compose de la nucléase Cas9, d'un ARN CRISPR (crRNA) complémentaire de la séquence ciblée et d'un ARN trans-activateur de Cas9 (tracrRNA) (Chandrasekaran *et al.* 2018). Pour l'utilisation de ce système en génie génétique, le crRNA et le tracrRNA sont combinés en un seul ARN guide (sgRNA) capable de guider l'endonucléase Cas9 vers la séquence cible et d'induire la coupure par Cas9. Cette coupure nécessite la présence d'une séquence particulière de 2 à 6 nucléotides dans l'ADN cible, appelée *protospacer adjacent motif* (PAM) à proximité immédiate de la séquence cible (Mojica *et al.* 2009). Avec ce système à deux composants, sgRNA et Cas9, on peut cibler spécifiquement n'importe quel locus génomique et y produire des coupures double brin. Ces coupures sont réparées par la machinerie cellulaire endogène selon deux mécanismes. Le mécanisme de recollage non homologue (*non-homologous end-joining* ou NHEJ), qui est imprécis, tend à insérer ou éliminer un ou quelques nucléotides (formation d'*indel*), conduisant souvent à une modification du cadre de lecture et à l'inactivation des gènes. Ce mécanisme permet de générer des modèles *knock-out* (KO). La coupure double brin peut également être réparée grâce au mécanisme de réparation dirigée par homologie (*homology-directed repair* ou HDR) lorsque l'on fournit une matrice d'ADN qui présente une homologie avec les séquences flanquantes du site ciblé. Cette stratégie permet l'introduction de nouvelles séquences exogènes dans le gène d'intérêt, créant des modèles *knock-in* (KI).

LA PLATEFORME UATE DE L'INSTITUT PASTEUR DE MONTEVIDEO

La *Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación* (UATE) de l'Institut Pasteur de Montevideo est une plateforme technologique dont la mission principale est de produire des modèles animaux génétiquement modifiés. Cette plateforme se place à l'avant-garde scientifique au niveau national et régional. Depuis 2007, après avoir produit les premiers animaux transgéniques en Uruguay, nous avons produit différents modèles par micro-injection d'ADN dans le pronucléus (Figure 1) (Crispo *et al.* 2013), par ciblage génique dans des cellules souches embryonnaires murines et par utilisation des lentivirus (Crispo *et al.* 2015a). En 2014, des techniques d'édition de gènes impliquant le système CRISPR/Cas ont été implantées à l'UATE alors que les premières souris génétiquement modifiées par cette technique venaient tout juste d'être rapportées dans le monde (Wang *et al.* 2013). De même, des moutons KO et KI édités par

la méthode CRISPR ont été produits en collaboration avec l'*Instituto de Reproducción Animal de Uruguay* (IRAUy) (Crispo *et al.* 2015b ; Menchaca *et al.* 2020). Avec cette technologie, nous avons été parmi les premiers à rapporter la création de moutons KO génétiquement modifiés. Le premier projet dans lequel un modèle KO murin a été produit par la technique CRISPR/Cas9 à l'UATE avait déjà fait l'objet de tentatives par recombinaison homologue dans les cellules ES. Après 20 séances de micro-injection, trois chimères avaient été produites, dont aucune n'avait montré de transmission de la modification génétique par la lignée germinale. En revanche, avec CRISPR, 30 nouveau-nés KO ont été produits en quatre séances de micro-injection traduisant une efficacité globale de 6,9% (Meikle *et al.* 2016). En plus d'améliorer l'efficacité, la technique CRISPR/Cas a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés (femelles donneuses d'embryons, femelles receveuses), contribuant ainsi au principe des 3R de Remplacement, Réduction et Raffinement (Russell & Burch, 1959).

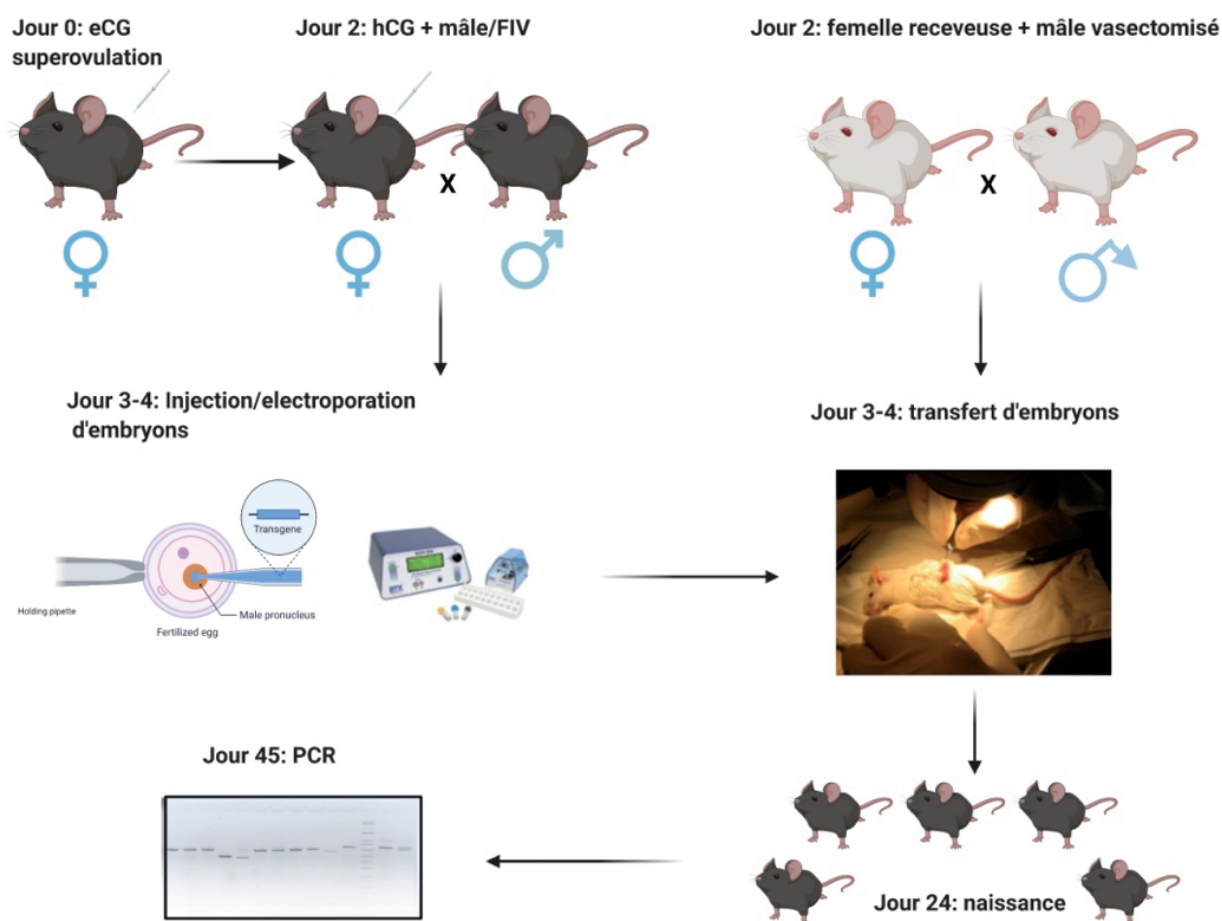


Figure 1 : Méthodologie pour la génération de souris génétiquement modifiées. Pour obtenir un grand nombre de zygotes pour la micro-injection ou l'électroporation, il est nécessaire de superovuler les femelles donneuses avec 5 UI de gonadotrophine chorionique équine (eCG) suivies à 48 heures de 5 UI de gonadotrophine chorionique humaine (hCG). Les femelles superovulées sont immédiatement croisées avec un mâle fertile ou une fertilisation in vitro est réalisée. Au même temps, les femelles receveuses d'embryons sont croisées avec des mâles vasectomisés pour induire une pseudo-gestation. Le lendemain ou 48 heures après, les embryons sont récupérés dans l'oviducte, micro-injectés ou électroporés, puis transférés dans les femelles receveuses. Vingt jours plus tard, les jeunes naissent, ils seront analysés par PCR et séquençage pour déterminer lesquels d'entre eux ont été mutés. Created with BioRender.com.

LES MODÈLES

Les premiers modèles créés à l'UATE ont été produits en utilisant la technologie de micro-injection de fragments d'ADN dans des zygotes de souris pour suivre l'activation de la réponse immunitaire innée à l'aide d'un gène rapporteur (la luciférase) (Crispo *et al.* 2013). D'autre part, des souris surexprimant le gène *Pomc* (*Proiomelanocortin*) ont été produites pour réaliser des études à visée translationnelle sur la consommation alimentaire et de la régulation du poids corporel chez l'homme (Nasif *et al.* 2015).

En 2006 le laboratoire du Dr Salamone en Argentine a rapporté la production de vaches transgéniques clonées produisant de l'hormone de croissance humaine dans leur lait. Cette hormone étant identique à l'hormone produite dans *E. coli*, cela démontrait que ces vaches transgéniques pouvaient avantageusement être utilisées pour la production d'hormone de croissance humaine recombinante (Salamone *et al.* 2006). De même, en 2007, la génération des premières chèvres transgéniques pour la production de *human Granulocyte Colony Stimulating factor* ont été rapportées au Brésil (Freitas *et al.* 2007).

Dans notre laboratoire, la technologie des lentivirus a été appliquée pour la génération d'un modèle de mouton qui exprime la protéine GFP (*Green fluorescent protein*) dans tous ses tissus. L'efficacité de transgénèse à la fois chez les embryons (97,4 %) et chez les animaux nés (100 %) était très élevée, confirmant ce qui avait été rapporté pour cette technique dans d'autres espèces (Park, 2007). En dehors de la fluorescence, les animaux transgéniques étaient phénotypiquement identiques à leurs homologues non transgéniques (Crispo *et al.* 2015a). Des cellules de ces moutons ont été transplantées dans des moutons non-transgéniques pour suivre la persistance de la fluorescence. Avec l'avènement du système CRISPR, les applications de cette technique se sont développées. L'un des premiers modèles que nous avons produits était une souris KO pour le gène *Spats1* (*Spermatogenesis associated serine rich 1*), un gène sous-exprimé ou muté dans des affections humaines telles que l'infertilité masculine et le cancer du testicule. Ce modèle de souris KO n'a présenté aucune différence phénotypique significative par rapport aux individus sauvages, ne permettant pas de confirmer le rôle du gène (Capoano *et al.* 2021). D'autres modèles liés à l'infertilité chez l'homme ont été générés, avec des anomalies morphologiques marquées dans les gonades des souris mutantes (Hernández-López *et al.* 2020). Des modèles murins ont également été générés pour l'étude des cancers (Segovia *et al.* 2019), de l'obésité et des maladies neurodégénératives.

L'édition génomique pourrait également être utile chez les espèces animales de rente et pour contribuer à la production alimentaire humaine (Menchaca, 2021). La consigne est "comment produire plus avec moins", dans le cadre d'un développement durable. L'un des modèles les plus intéressants avec une application directe en production animale a été la production de moutons KO pour le gène de la myostatine, capable de produire une plus grande masse musculaire, dans le fonds génétique de la race *mérino superfine* (Crispo *et al.* 2015b). Les moutons KO ont montré une augmentation de 25% de leur masse corporelle par rapport aux animaux non mutants, en raison de l'augmentation de la masse musculaire, tout en conservant la même finesse de laine que la race d'origine. La produc-

tion de ce modèle à double usage est un exemple de la contribution possible de la méthode CRISPR aux efforts zootechniques permettant de produire plus de nourriture pour l'homme sans augmenter la taille du troupeau.

Un autre modèle produit par notre groupe et publié récemment est un mouton sourd déficient pour le gène de l'otoféline, qui reproduit un type spécifique de surdité non syndromique chez l'homme. La technique utilisée a nécessité une matrice de réparation pour générer la même mutation que chez l'humain. La technique s'est avérée très efficace, avec un total de 73 agneaux nés, dont 13 (17,8%) avaient des mutations indel et huit (61,5%) avaient des mutations KI (Menchaca *et al.* 2020). Cet exemple, qui permettra de tester différentes thérapies géniques, illustre l'application de la technologie CRISPR dans des études biomédicales.

D'autres exemples rapportés chez les animaux d'élevage en Amérique de Sud incluent l'édition dans des embryons bovins du gène prion PRNP, responsable de la maladie de la vache folle (Bevacqua *et al.* 2016), et l'édition du gène OCT4 aussi dans des embryons bovins (Camargo *et al.* 2020).

RÉGULATION

Le Brésil et l'Uruguay sont les deux seuls pays d'Amérique du sud à avoir établi une législation nationale concernant l'utilisation des animaux de laboratoire, au cours des dix dernières années. En Uruguay, la loi #18.611 traite de l'expérimentation animale dans l'enseignement et la recherche scientifique et a permis d'améliorer la prise en compte du bien-être animal, avec une plus grande sensibilisation des chercheurs et au niveau sociétal.

Concernant la réglementation sur la création et l'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés (OGM) pour la recherche, il existe des différences au niveau international. Aux États-Unis, la *Food and Drug Administration* (FDA) applique, dans les instituts de recherche, des exigences strictes uniquement pour les constructions d'ADNs recombinants (considérés comme de nouvelles molécules médicamenteuses administrées à l'animal). Dans l'Union Européenne, l'application de cette technologie est strictement réglementée et il a été établi un cadre juridique étendu sur les OGM depuis 1990 (Plan & Van Den Eede, 2010). Dans un arrêt du 25 juillet 2018, la Cour Européenne de Justice a décidé que les techniques d'édition génomique entraient dans le cadre des OGMs et étaient donc soumises aux mêmes contraintes. Toutefois, cette décision est actuellement largement débattue sur des bases scientifiques et en raison d'enjeux économiques, pour l'agriculture, et sanitaires pour l'élevage (Roger, 2021). La prise en compte réglementaire de l'édition du génome est très récente et diffère largement entre les pays. Certains pays d'Amérique du Sud (comme le Brésil et l'Argentine), ainsi que des pays d'autres régions (Israël, le Japon et l'Australie), ne considèrent pas l'édition génomique comme créant des OGM. Des décisions prises au cas par cas permettraient d'ouvrir des perspectives pour l'application de ces technologies (Schmidt *et al.* 2020). La position de l'Uruguay n'est pas encore arrêtée mais pourrait suivre cette voie.

La réglementation qui sera appliquée à l'avenir aux organismes génétiquement édités conditionnera plus précisément le développement ou non de ces technologies dans chaque région, et un débat franc entre tous les acteurs impliqués (chercheurs,

grand public, politiques, monde agricole) est indispensable avant de prendre toute décision dans ce domaine.

CONCLUSION

La création de modèles animaux génétiquement modifiés, que ce soit à des fins de recherche biomédicale ou dans le domaine des productions animales, est absolument nécessaire pour faire progresser les connaissances fondamentales ainsi que pour améliorer la santé humaine ou la production d'aliments dans un objectif de développement durable. Les technologies

disponibles jusqu'à présent permettraient de générer divers modèles d'intérêt avec cependant certaines limitations. L'édition de gènes par la technique CRISPR a amélioré le développement de modèles plus précis chez les animaux de laboratoire et de production. Notre laboratoire à l'Institut Pasteur de Montevideo s'est positionné en tant que plateforme technologique de référence dans la région et a produit jusqu'à présent plus de 20 modèles animaux génétiquement modifiés qui sont ou seront utilisés dans divers domaines de recherche. Cette plateforme permettra aux chercheurs y ayant accès de s'adapter en permanence aux technologies de pointe pour atteindre la science du plus haut niveau.

REMERCIEMENTS

Martina Crispo remercie chaleureusement Xavier Montagutelli et Jean-Louis Guenet pour leur invitation et pour l'avoir donné l'occasion de s'exprimer en séance de l'Académie vétérinaire de France. Les auteurs remercient l'ensemble des membres de la UATE de l'Institut Pasteur de Montevideo et de l'IRAUy.

CONFLITS D'INTÉRÊTS

Aucun conflit d'intérêt.

COMITÉ D'ÉTHIQUE

Toutes les procédures expérimentales pour la génération de modèles animaux ont été dûment approuvées par la Commission d'Éthique de l'Utilisation des Animaux (CEUA) de l'Institut Pasteur de Montevideo (# 007-18).

BIBLIOGRAPHIE

- Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology*; 2016;34:933-41. <https://doi.org/10.1038/nbt.3659>.
- Bevacqua RJ, Fernandez-Martin R, Savy V, Canel NG, Gismondi MI, Kues WA, et al. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR/Cas9 system. *Theriogenology*; 2016;86:1886-1896.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.010>.
- Camargo LSA, Owen JR, Van Eenennaam AL, Ross PJ. Efficient One-Step Knockout by Electroporation of Ribonucleoproteins Into Zona-Intact Bovine Embryos. *Front Genet*; 2020;11:570069. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.570069>.
- Capoano CA, Ortiz-Laquintana LA, Rodríguez-Casuriaga R, Schlapp G, Meikle MN, Mulet AP, et al. SPATS1 (spermatogenesis-associated, serine-rich 1) is not essential for spermatogenesis and fertility in mouse. *PLOS ONE*; 2021;16:e0251028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251028>.
- Chandrasekaran AP, Song M, Kim K-S, Ramakrishna S. Different Methods of Delivering CRISPR/Cas9 Into Cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*; 2018;159:157-76. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.05.001>.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*; 2010;186:757-61. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>.
- Cohen-Tannoudji M, Babinet C. Beyond "knock-out" mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *Molecular Human Reproduction*; 1998;4:929-38.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*; 2013;339:819-23. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
- Crispo M, Schlapp G, Cárdenas-Rodríguez M, González-Maciél D, Rumbo M. Optimization of transgenesis conditions for the generation of CXCL2-luciferase reporter mice line. *Electronic Journal of Biotechnology* 2013;16:14-14. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue6-fulltext-3>.
- Crispo M, Vilariño M, dos Santos-Neto PC, Núñez-Oliviera R, Cuadro F, Barrera N, et al. Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res*; 2015a; 24:31-41. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9816-x>.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, et al. Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PloS One*; 2015b;10:e0136690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136690>.
- Doetschman T, Maeda N, Smithies O. Targeted mutation of the Hprt gene in



- mouse embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 1988;85:8583-7.
- Freitas VJF, Serova IA, Andreeva LE, Dvoryanchikov GA, Lopes ES, Teixeira DIA, et al. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. *An Acad Bras Cienc*; 2007;79:585-92. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652007000400003>.
 - Geurts A, Balciunas D, Mates L. Vertebrate Transgenesis by Transposition. In: Pease S, Saunders TL, editors. *Advanced Protocols for Animal Transgenesis: An ISTT Manual*, Berlin, Heidelberg: Springer; 2011, p. 213-36. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20792-1_11.
 - Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*; 2009;325:433. <https://doi.org/10.1126/science.1172447>.
 - Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science (New York, NY)* 1981; 214:1244-6.
 - Hernández-López D, Geisinger A, Trovero MF, Santiñaque FF, Brauer M, Folle GA, et al. Familial primary ovarian insufficiency associated with an SYCE1 point mutation: defective meiosis elucidated in humanized mice. *Molecular Human Reproduction*; 2020; 26:485-97. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa032>.
 - Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, et al. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod*; 2004;71:405-9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028472>.
 - 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;337:816-21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
 - Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*; 2002;295:868-72.
 - Meikle MN, Schlapp G, Mulet AP, Geisinger A, Capoano CA. CRISPR system improves the overall efficiency in small transgenic mouse facilities. *Transgenic Research; Program and Abstracts of the 13 Th Transgenic Technology Meeting (TT2016)* 2016;25: 195-270.
 - Menchaca A. Sustainable Food Production: The Contribution of Genome Editing in Livestock. *Sustainability*; 2021;13:6788. <https://doi.org/10.3390/su13126788>.
 - Menchaca A, Dos Santos-Neto PC, Souza-Neves M, Cuadro F, Mulet AP, Tesson L, et al. Otoferrin gene editing in sheep via CRISPR-assisted ssODN-mediated Homology Directed Repair. *Sci Rep*; 2020;10:5995. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62879-y>.
 - Menchaca A, Schlapp G, Meikle MN, Crispo M. *Transgenesis and Gene Edition in Mammals. Reference Module in Life Sciences.*, Elsevier; 2017.
 - Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*; 2009;155:733-40. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>.
 - Nasif S, Souza FSJ de, González LE, Yamashita M, Orquera DP, Low MJ, et al. Islet 1 specifies the identity of hypothalamic melanocortin neurons and is critical for normal food intake and adiposity in adulthood. *PNAS*; 2015; 112:E1861-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500672112>.
 - Panthier JJ, Montagutelli X, Guénet JL. *Les organismes modèles - Génétique de la Souris*. Belin; 2003.
 - Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological Genomics* 2007;31:159-73.
 - Plan D, Van Den Eede G. *The EU Legislation on GMOs - An Overview*. Publications Office of the European Union EUR 24279 2010;JRC57223.
 - Roger DCR. Nouvelles techniques génomiques (NGT): ouverture de la Commission européenne. Un défi historique pour la présidence française de l'UE. *European Scientist* 2021. <https://www.europeanscientist.com/fr/opinion/nouvelles-techniques-genomiques-ngt-ouverture-de-la-commission-europeenne-un-defi-historique-pour-la-presidence-francaise-de-lue/> (accessed July 15, 2021).
 - Russell W, Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959.
 - Salamone D, Baranao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *Journal of Biotechnology*; 2006;124: 469-72.
 - Schmidt SM, Belisle M, Frommer WB. The evolving landscape around genome editing in agriculture. *EMBO Rep*; 2020;21:e50680. <https://doi.org/10.15252/embr.202050680>.
 - Segovia M, Russo S, Jeldres M, Mahmoud YD, Perez V, Duhalde M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammation Activation. *Cancer Cell*; 2019;35: 767-781.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.003>.
 - Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat J-C, Chames P, et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res*; 2006; 34:e149. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl720>.
 - Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*; 1987;51:503-12.
 - Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*; 2013;153:910-8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>.
 - Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, Subramani S, Jaenisch R. Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*; 1989;342:435-8. <https://doi.org/10.1038/342435a0>.