



HAL
open science

Édition des génomes animaux : état des lieux des applications, des évaluations éthiques, de la réglementation et des controverses

Marie Zarader

► **To cite this version:**

Marie Zarader. Édition des génomes animaux : état des lieux des applications, des évaluations éthiques, de la réglementation et des controverses. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04771655

HAL Id: dumas-04771655

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04771655v1>

Submitted on 7 Nov 2024

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.

ÉDITION DES GÉNOMES ANIMAUX : ÉTAT DES LIEUX DES APPLICATIONS, DES ÉVALUATIONS ÉTHIQUES, DE LA RÉGLEMENTATION ET DES CONTROVERSES

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par*

ZARADER Marie, Sarah, Esther

Directeur de thèse : M. Alain DUCOS

JURY

PRESIDENTE :

Mme Christelle CAMUS

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Alain DUCOS

M. Hervé CASSARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ÉDITION DES GÉNOMES ANIMAUX : ÉTAT DES LIEUX DES APPLICATIONS, DES ÉVALUATIONS ÉTHIQUES, DE LA RÉGLEMENTATION ET DES CONTROVERSES

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par*

ZARADER Marie, Sarah, Esther

Née le 14/03/1997 à MOULINS (03)

Directeur de thèse : M. Alain DUCOS

JURY

PRESIDENTE :

Mme Christelle CAMUS

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Alain DUCOS

M. Hervé CASSARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ingénieur de recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **FUSADE-BOYER**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury de cette thèse,

À Madame la Professeure Christelle CAMUS,

Professeure à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Biologie moléculaire*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Mes hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur Alain DUCOS,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Zootchnie*

Pour avoir encadré ce travail de thèse. Je suis ravie d'avoir pu partager votre passion pour ce sujet important. Ma plus profonde gratitude.

À Monsieur Hervé CASSARD,

Ingénieur de recherche à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, *Pathologie des ruminants*

Qui a aimablement accepté de participer à ce jury de thèse. Mes sincères remerciements.

À mes proches,

Que je remercie pour leur soutien précieux.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| Liste des abréviations | 11 |
| Table des illustrations | 13 |
| Table des tableaux | 17 |
| Introduction | 19 |
| I. Techniques de modification des génomes | 21 |
| 1. Outils précurseurs de modification génomique : la transgénèse | 21 |
| <i>a. Micro-injection pronucléaire</i> | 21 |
| <i>b. Infection virale</i> | 23 |
| <i>c. Utilisation des cellules souches embryonnaires</i> | 25 |
| <i>d. Applications de la transgénèse</i> | 26 |
| <i>e. Limites de la transgénèse</i> | 31 |
| 2. Nouvelles techniques de modifications ciblées des génomes | 34 |
| 2.1. Nucléases programmables | 34 |
| <i>a. Dispositifs de guidage</i> | 34 |
| <i>i. Nucléases à doigts de zinc</i> | 34 |
| <i>ii. Transcription Activator Like Effector Nuclease</i> | 36 |
| <i>iii. CRISPR-Cas9</i> | 37 |
| <i>b. Réparation des cassures double brin</i> | 40 |
| 2.2. Autres approches | 42 |
| <i>a. Base editing</i> | 42 |
| <i>b. Prime editing</i> | 45 |
| 2.3. Mise en œuvre des techniques de modifications ciblées | 47 |
| II. Applications sur le génome animal | 53 |
| 1. Applications en agriculture | 53 |
| <i>a. Résistance aux maladies d'élevage</i> | 53 |
| i. Élevages porcins | 55 |
| Syndrome dysgénésique respiratoire porcin | 55 |
| Peste porcine africaine | 65 |
| ii. Élevages bovins | 84 |
| Mammites | 84 |
| Tuberculose bovine | 96 |

| | |
|--|-----|
| iii. Élevages avicoles : <i>exemple de l'influenza aviaire</i> | 106 |
| b. <i>Amélioration des productions animales</i> | 114 |
| i. Croissance musculaire | 115 |
| ii. Thermotolérance | 121 |
| c. <i>Promotion du bien-être animal</i> | 127 |
| i. Écornage des bovins | 131 |
| ii. Broyage des poussins | 145 |
| d. <i>Impacts environnementaux des élevages</i> | 152 |
| 2. Applications pour la santé humaine | 162 |
| a. <i>Xénotransplantations d'organes</i> | 162 |
| i. Histocompatibilité du greffon | 164 |
| ii. Risques infectieux | 169 |
| b. <i>Aliments hypoallergéniques</i> | 172 |
| c. <i>Modèles de recherche</i> | 181 |
| 3. Cas particuliers des animaux jugés nuisibles : <i>gene drive</i> | 186 |
| 4. Applications sur les animaux de compagnie | 195 |
| III. Évaluation éthique et controverses | 201 |
| 1. L'édition du génome, un outil supplémentaire pour la domestication des animaux | 204 |
| 2. Recevabilité des animaux génétiquement modifiés | 207 |
| 3. Enjeux autour du forçage génétique par mutagenèse ciblée, ou « <i>gene drive</i> » | 212 |
| 4. Statut et brevetabilité de l'animal génétiquement modifié | 214 |
| 5. L'édition du génome animal, une réponse aux défis agroécologiques actuels et futurs ? | 216 |
| IV. Réglementation | 219 |
| 1. État des lieux de la réglementation dans le monde | 221 |
| 2. Génomes végétaux : évolution de la réglementation | 226 |
| 3. Une réglementation sous pression des lobbies | 228 |
| 4. Avis de la société vétérinaire de France | 233 |
| Conclusion | 235 |
| Références bibliographiques | 237 |
| Annexe : Rapport de l'Espace de Réflexion Éthique Occitanie | 265 |

Liste des abréviations

| Abréviation | Définition |
|--------------------|---|
| ABEs | <i>Adenine Base Editors</i> |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ANSES | Agence Nationale de Sécurité Sanitaire pour l'alimentation, l'environnement et le travail |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BE | <i>Base Editors</i> |
| Cas9 | <i>CRISPR-associated protein 9</i> |
| CBEs | <i>Cytosine Base Editors</i> |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i> |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| FLASH | <i>Fast Ligation-based Automatable Solide-phase High-throughput</i> |
| HDR | <i>Homologous Directed Repair</i> |
| HEG | <i>Homing Endonuclease Genes</i> |
| IAFP | Influenza Aviaire Faiblement Pathogène |
| IAHP | Influenza Aviaire Hautement Pathogène |
| LIC | <i>Ligation-independent cloning</i> |
| MPF | Facteur pro-méiotique |
| MSTN | Gène codant pour la myostatine |
| NGT | <i>New genomic techniques</i> |
| nCas9 | <i>CRISPR-associated protein 9 nickase</i> |
| NHEJ | <i>Non-Homologous End Joining</i> |
| NLS | <i>Nuclear Localization Sequence</i> |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PAM | <i>Protospacer Adjacent Motif</i> |
| PE | <i>Prime editors</i> |
| PRRSV | <i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus</i> |
| RT | <i>Reverse transcriptase</i> ou transcriptase inverse |
| SNCT | <i>Somatic Nuclear Cell Transfer</i> |
| TALEN | <i>Transcription Activator Like Effector Nuclease</i> |
| ZFN | <i>Zinc Finger Nuclease</i> |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|----|
| Figure n°1 : Technique de micro-injection pronucléaire et sélection d'individus transgéniques | 22 |
| Figure n°2 : Infection virale de cellules embryonnaires | 24 |
| Figure n°3 : Obtention de souris transgéniques par l'emploi de cellules embryonnaires multipotentes | 25 |
| Figure n°4 : Photographie du saumon AquAdvantage® | 28 |
| Figure n°5 : Poids d'un saumon sauvage et d'un saumon AquAdvantage® | 29 |
| Figure n°6A : Conception d'une souris KO par système Cre/LoxP | 32 |
| Figure n°6B : Conception d'une souris KI par système Cre/LoxP | 33 |
| Figure n°7 : Exemple de fixation de l'homodimère ZFN sur l'ADN | 35 |
| Figure n°8 : Schéma de la ligation des monomères formant le système TALEN | 37 |
| Figure n°9 : Système CRISPR-Cas9 bactérien | 39 |
| Figure n°10 : Deux mécanismes de réparation cellulaires | 41 |
| Figure n°11 : Construction du système de <i>base editing</i> | 43 |
| Figure n°12 : Mécanismes moléculaires de conversion de nucléotides | 43 |
| Figure n°13 : Représentation du <i>prime editing</i> | 46 |
| Figure n°14 : Protocole CRISPR-Cas9 pour la modification du génome animal | 49 |
| Figure n°15 : Synthèse de sgRNA sans clonage pour CRISPR-EZ | 50 |
| Figure n°16 : Obtention d'embryons génétiquement modifiés au génotype unique | 52 |
| Figure n°17 : Impact détaillé du SDRP sur les coûts de production | 58 |
| Figure n°18 : Analyse en Western-Blot de l'expression de la protéine CD163 | 62 |
| Figure n°19 : Épreuve au HP-PRRSV des porcs CD163KO | 64 |
| Figure n°20 : Distribution des foyers d'épidémie de peste porcine africaine parmi les populations de porcs domestiques | 67 |
| Figure n°21 : Distribution des foyers d'épidémie de peste porcine africaine parmi les populations de sangliers | 68 |
| Figure n°22 : Évolution de la proportion d'élevages porcins de grande échelle | 69 |
| Figure n°23 : Distribution des foyers émergents de peste porcine africaine sur le continent asiatique | 69 |
| Figure n°24 : Modélisation de l'impact de la peste porcine africaine sur la demande, l'offre et les prix en viande | 70 |
| Figure n°25 : Moyenne des scores cliniques, des températures corporelles et des valeurs Ct issues de la PCR en temps réel des groupes de l'étude de Barasona et al. | 75 |
| Figure n°26 : Représentation du gène RelA | 77 |
| Figure n°27 : Impact des altérations du gène RelA sur la virémie et l'excrétion virale | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figure n°28 : Images de cellules pulmonaires modifiées sur leur gène RelA obtenues par microscopie à fluorescence | 79 |
| Figure n°29 : Construction de l'ADN codant pour les 6 ARN guides | 80 |
| Figure n°30 : Répartition des groupes pour l'épreuve à l'ASFV | 81 |
| Figure n°31 : Survie des porcs lors de l'épreuve virale direct et indirecte, et titre de l'ASFV dans les échantillons de sang | 82 |
| Figure n°32 : Effet de l'alimentation avec <i>Bacillus subtilis</i> sur le nombre de cellules somatiques dans le lait des vaches laitières | 88 |
| Figure n°33 : Effet prophylactique de l'alimentation avec <i>Bacillus subtilis</i> sur le risque de mammite chez les vaches laitières | 89 |
| Figure n°34 : Comparaison entre les groupes transgéniques et non transgéniques de la cellularité du lait, de la température corporelle, de la concentration sérique en LBP et de la concentration sérique en SAA | 92 |
| Figure n°35 : Phénotypes antibiotiques β -lactamines d' <i>E.coli</i> | 95 |
| Figure n°36 : Mesure de la multiplication de <i>M. bovis</i> dans des macrophages de bovins témoins ou transgéniques | 98 |
| Figure n°37 : Mesure de la quantité d'interféron gamma produite chez les bovins témoins ou transgéniques | 99 |
| Figure n°38 : Mesure de la multiplication de <i>M. bovis</i> dans les macrophages provenant de bovins témoins, de descendants témoins ou de descendants hétérozygotes | 100 |
| Figure n°39 : Analyse par cytométrie en flux de mécanisme de mort cellulaire des macrophages transgéniques infectés par <i>M. bovis</i> | 101 |
| Figure n°40 : Analyse par cytométrie en flux de mécanisme de mort cellulaire des macrophages descendants transgéniques infectés par <i>M. bovis</i> | 102 |
| Figure n°41 : Analyse par cytométrie en flux de mécanisme de mort cellulaire des macrophages de bovins génétiquement modifiés, infectés par <i>M. bovis</i> | 104 |
| Figure n°42 : Évaluation <i>in vitro</i> de la multiplication de <i>M. bovis</i> dans les macrophages provenant des bovins contrôles ou génétiquement modifiés | 104 |
| Figure n°43 : Quantités d'interférons gamma produites chez les bovins témoins et transgéniques | 105 |
| Figure n°44 : Mesure de l'activité de la polymérase aviaire reconstituée et de son isoforme humain | 108 |
| Figure n°45 : Charge virale par écouvillon journalier chez les groupes sauvages, sentinelles parmi les sauvages, modifiés, sentinelles parmi les modifiés | 110 |
| Figure n°46 : Infection de lignées de fibroblastes issus d'oiseaux sauvages ou modifiés sur le gène ANP32 | 112 |

| | |
|---|-----|
| Figure n°47 : Hypertrophie musculaire chez les souris n'exprimant pas la myostatine | 115 |
| Figure n°48 : Taureau de race Bleu Blanc Belge exhibant le phénotype culard | 116 |
| Figure n°49 : Photographie d'un bovin témoin et d'un bovin modifié | 118 |
| Figure n°50 : Mesures en centimètres de la largeur des épaules, de la largeur de la hanche et de la largeur de la croupe chez les individus sauvages et mutés | 118 |
| Figure n°51 : Mesures en centimètres de la longueur du corps, de la circonférence thoracique et de la circonférence abdominale chez les individus sauvages et mutés | 119 |
| Figure n°52 : Photographies d'un bovin muté sur le gène PRLR et d'un contrôle | 122 |
| Figure n°53 : Différences dans la régulation de température corporelle des animaux <i>slick</i> et <i>non-slick</i> | 122 |
| Figure n°54 : Différence dans la section transversale moyenne du muscle <i>longissimus thoracis</i> chez les taureaux et génisses, <i>slick</i> et <i>non-slick</i> | 123 |
| Figure n°55 : Phénotype de dilution de couleur du veau génétiquement modifié | 125 |
| Figure n°56 : Acceptabilité publique de l'utilisation de l'édition génomique pour l'amélioration de la croissance musculaire, la résistance à la chaleur, ou l'absence de cornes | 129 |
| Figure n°57 : Moyenne des scores d'intensité du mouvement des membres par groupe durant l'écornage | 134 |
| Figure n°58 : Moyennes géométriques des différences entre les valeurs maximales et les valeurs de base du cortisol exprimées en nmol/L | 135 |
| Figure n°59 : Fréquences cardiaques avant et après l'écornage dans les cinq groupes expérimentaux | 136 |
| Figure n°60 : Analyse par PCR et Southern-Blot de l'introgession de l'allèle Pc chez les bovins génétiquement modifiés | 138 |
| Figure n°61 : Phénotype Polled obtenu chez des veaux Prim Holstein | 139 |
| Figure n°62 : Nature et localisation des mutations identifiées au locus POLLED | 139 |
| Figure n°63 : Représentation schématique du locus POLLED | 141 |
| Figure n°64 : Analyse des fœtus bovins non modifiés et génétiquement modifiés sur le locus Polled | 142 |
| Figure n°65 : Photographie du veau génétiquement modifié né par extraction | 143 |
| Figure n°66 : Expression de la GFP dans les cellules germinales primordiales de poulet sept jours après transfection du plasmide CRISPR-Cas9 | 147 |
| Figure n°67 : Détection de l'expression de la protéine GFP chez des poussins à l'aide d'une lampe à fluorescence | 147 |
| Figure n°68A : Méthode d'édition du génome médiée par CRISPR-Cas9-NHEJ pour le développement de modèles aviaires | 148 |

| | |
|--|-----|
| Figure n°68B : Développement du modèle de sexage des poulets mutés pour exprimer la GFP | 149 |
| Figure n°69 : Détection de la GFP chez les embryons modifiés sur leur chromosome Z et les embryons contrôles | 150 |
| Figure n°70 : Teneur totale en phosphore des matières fécales des porcs transgéniques et non transgéniques | 158 |
| Figure n°71 : Comparaison des valeurs de digestibilité totales des nutriments dans le tractus digestif et les rejets fécaux de porcs transgéniques et non transgéniques | 160 |
| Figure n°72 : Analyse des profils d'expression de α -Gal, Neu5Gc et Sd chez les porcs sauvages ou transgéniques, sur les reins et le cœur | 167 |
| Figure n°73 : Analyse des profils d'expression de α -Gal, Neu5Gc et Sd chez les porcs sauvages ou transgéniques, sur les poumons et le foie | 168 |
| Figure n°74 : Profils d'inactivation des PERV au niveau de l'ARNm | 171 |
| Figure n°75 : Nature des mutants induits par les ZFN dans les fibroblastes de foetus bovin | 173 |
| Figure n°76 : Détection des mutations dans une colonie de cellules uniques par séquençage des produits de PCR et analyse des séquences des clones BLG-KO | 174 |
| Figure n°77 : Concentration des principales protéines dans le lait de contrôle et le lait sans BLG | 175 |
| Figure n°78 : Analyse des protéines du lactosérum | 177 |
| Figure n°79 : Caractéristiques des œufs de poules OVM ^{-/-} | 179 |
| Figure n°80 : Poussin obtenu à partir d'œufs de poules OVM ^{-/-} | 180 |
| Figure n°81 : Dynamique de la propagation de l'allèle <i>dsxF^{CRISPRh}</i> et effet sur la capacité reproductive de la population | 189 |
| Figure n°82 : Distorsion du <i>sex-ratio</i> par <i>X-poisoning</i> ou <i>X-shredding</i> | 191 |
| Figure n°83 : <i>Homing-based gene drive</i> | 193 |
| Figure n°84 : Photographies des chats d'expérimentation de l'étude de Lee et al. | 196 |
| Figure n°85 : Expression salivaire de la protéines FelD1 | 197 |
| Figure n°86 : Quantification de la protéine FelD1 sur le pelage | 198 |
| Figure n°87 : Statut de la réglementation concernant les animaux génétiquement dans le monde | 221 |
| Figure n°88 : Six principes de gouvernance des produits génétiquement édités | 229 |

TABLE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau n°1 : Espèces cibles de transgénèse de 1980 à 2009 | 27 |
| Tableau n°2 : Poids des saumons sauvages et AquAdvantage® | 30 |
| Tableau n°3 : Mutations permises par les éditeurs de base | 44 |
| Tableau n°4 : Applications des outils d'édition génomique sur les animaux de rente et d'aquaculture pour la résilience ou la résistance aux maladies d'élevage | 54 |
| Tableau n°5 : Moyenne du coût du SDRP par truie et par an | 56 |
| Tableau n°6 : Perte annuelle médiane attribuable au SDRP par truie | 57 |
| Tableau n°7 : Épreuve au PRRSV de type I et II d'animaux sauvages ou génétiquement modifiés sur le gène codant la protéine CD163 | 63 |
| Tableau n°8 : Estimation des coûts directs de la PPA sur la production par pays | 70 |
| Tableau n°9 : Modélisation des prix du marché chinois en viande | 71 |
| Tableau n°10 : Publications parues dans la littérature scientifique sur les vaccins contre la PPA de 2013 à 2023 | 74 |
| Tableau n°11 : Répartition du coût estimé par cas de mammite clinique | 85 |
| Tableau n°12 : Coûts des mammites cliniques et subcliniques et parts de chaque pathogène dans les pertes par cas | 86 |
| Tableau n°13 : Taux d'infection pour trois espèces bactériennes après inoculation intra-mammaire de vaches transgéniques ou non transgéniques | 93 |
| Tableau n°14 : Pourcentage et nombre de cultures bactériennes résistantes à différentes bêta-lactamines | 95 |
| Tableau n°15 : Applications de CRISPR-Cas9 dans l'augmentation de la croissance musculaire chez les animaux de rente | 117 |
| Tableau n°16 : Effet du système de production sur la prévalence de l'écornage et les méthodes utilisées dans l'Union européenne | 132 |
| Tableau n°17 : Personne responsable de l'écornage et utilisation de médicaments | 132 |
| Tableau n°18 : Effet de la région géographique sur la prévalence de l'écornage et les méthodes utilisées dans l'Union européenne | 133 |
| Tableau n°19 : Distribution de l'activité de la phytase dans les tissus des porcs non transgéniques et transgéniques | 157 |
| Tableau n°20 : Avantages et inconvénients comparés entre le porc et le babouin en tant que source potentielle d'organes et cellules pour l'homme | 163 |
| Tableau n°21 : Élaboration de porcs « <i>mini-pigs</i> » génétiquement modifiés comme modèle de recherche en médecine humaine à l'aide des nouveaux outils d'édition génomique ZFN, TALEN ou CRISPR-Cas9 | 182 |

| | |
|---|-----|
| Tableau n°22 : État des lieux des applications CRISPR en cours d'essai clinique en 2024 dans la recherche en médecine humaine, préalablement testées sur modèles animaux | 183 |
| Tableau n°23 : Nombre de cas des principales maladies à transmission vectorielle par les moustiques d'importance mondiale pour la santé par an | 187 |
| Tableau n°24 : Liste des produits animaux édités par génome, ayant reçu une évaluation réglementaire | 224 |

INTRODUCTION

Depuis la révolution néolithique, que l'on estime remonter à une dizaine de milliers d'années environ, et caractérisée par la sédentarisation de l'espèce humaine et l'avènement de l'agriculture et de l'élevage, l'Homme s'évertue à maîtriser les espèces animales et végétales dans son propre intérêt.

Devant les enjeux du monde moderne que représente l'accroissement de la population mondiale dans un contexte de déclin des surfaces agricoles et de changements climatiques, la modification génomique des espèces animales et végétales pourrait se révéler une solution attirante et relativement facile à mettre en œuvre, faisant dans le même temps atteindre son paroxysme à l'utilisation de la Nature par l'Homme.

Avec ses travaux fondateurs sur l'ADN recombinant, le biologiste moléculaire Paul Berg est le premier à avoir donné naissance à un organisme génétiquement modifié, par intégration d'une séquence d'ADN viral dans un plasmide d'origine bactérienne en 1972 (Jackson et al., 1972), lui valant le Prix Nobel de chimie en 1980.

Depuis les recherches de Berg, de nombreuses techniques de modification du génome ont été mises au point, certaines s'inspirant de découvertes des systèmes d'édition déjà existants chez les bactéries. Citons notamment les systèmes faisant intervenir des nucléases à doigts de zinc, des nucléases TALE (*Transcription Activator Like Effector*) ou plus récemment l'association CRISPR-Cas9 (motif génomique *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* associé à la nucléase Cas9).

Cette dernière technique, popularisée en 2012 par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, leur valant le prix Nobel de chimie en 2020, se démarque des autres techniques par sa simplicité de construction et d'utilisation et en fait l'outil d'édition génomique le plus utilisé actuellement. Les applications de cette découverte sont nombreuses. Elles concernent non seulement la santé humaine mais aussi la santé et les productions animales et végétales, soulevant dans le même temps des questionnements éthiques nécessaires à l'élaboration d'une réglementation adaptée.

Ce travail a pour but de fournir un état des lieux des applications, des évaluations éthiques, des controverses, et de la réglementation liées à l'édition du génome animal et plus particulièrement par le biais de la méthode CRISPR-Cas9. Un point rapide sur les différentes technologies d'édition du génome sera fait en amont.

I. TECHNIQUES DE MODIFICATION DES GÉNOMES

Les nouvelles techniques d'édition génomique, comprenant la famille des nucléases programmables (ZFN, TALEN et CRISPR-Cas9), s'inscrivent dans la continuité des travaux initiés par la transgénèse.

En effet, les premières études visant la modification des génomes débutent dans les années 1980 avec l'avènement de la transgénèse additionnelle, c'est-à-dire l'ajout d'un matériel génétique, appelé transgène, dans une cellule.

Pour ce faire, plusieurs approches ont été développées, comme la micro-injection pronucléaire, l'infection virale, le transfert de noyaux de cellules somatiques ou encore l'utilisation de cellules souches embryonnaires. Elles représentent des outils précurseurs en matière d'édition génomique et ont ouvert la voie au développement des nucléases programmables.

Ces différentes techniques d'obtention d'individus transgéniques sont abordées dans ce premier paragraphe.

1. Outils précurseurs de modification génomique : la transgénèse

a. Micro-injection pronucléaire

La micro-injection pronucléaire, pour la première fois présentée en 1981 par l'équipe de Gordon et Ruddle, consiste en l'injection de plasmides porteurs du transgène directement dans un pronucleus mâle (Gordon, Ruddle 1981).

Pour ce faire, tel qu'illustré dans la figure n°1, une femelle est traitée avec des hormones gonadotropes afin de stimuler l'ovogenèse et donc la production de nombreux ovocytes. Elle est ensuite mise en contact avec le mâle. Les ovocytes fécondés, contenant donc le pronucléus mâle et le pronucléus femelle, sont prélevés. Les plasmides porteurs du transgène sont injectés *in vitro* dans les pronucléi mâles.

Les embryons sont ensuite transférés dans une femelle receveuse (Haruyama, Cho, Kulkarni 2009).

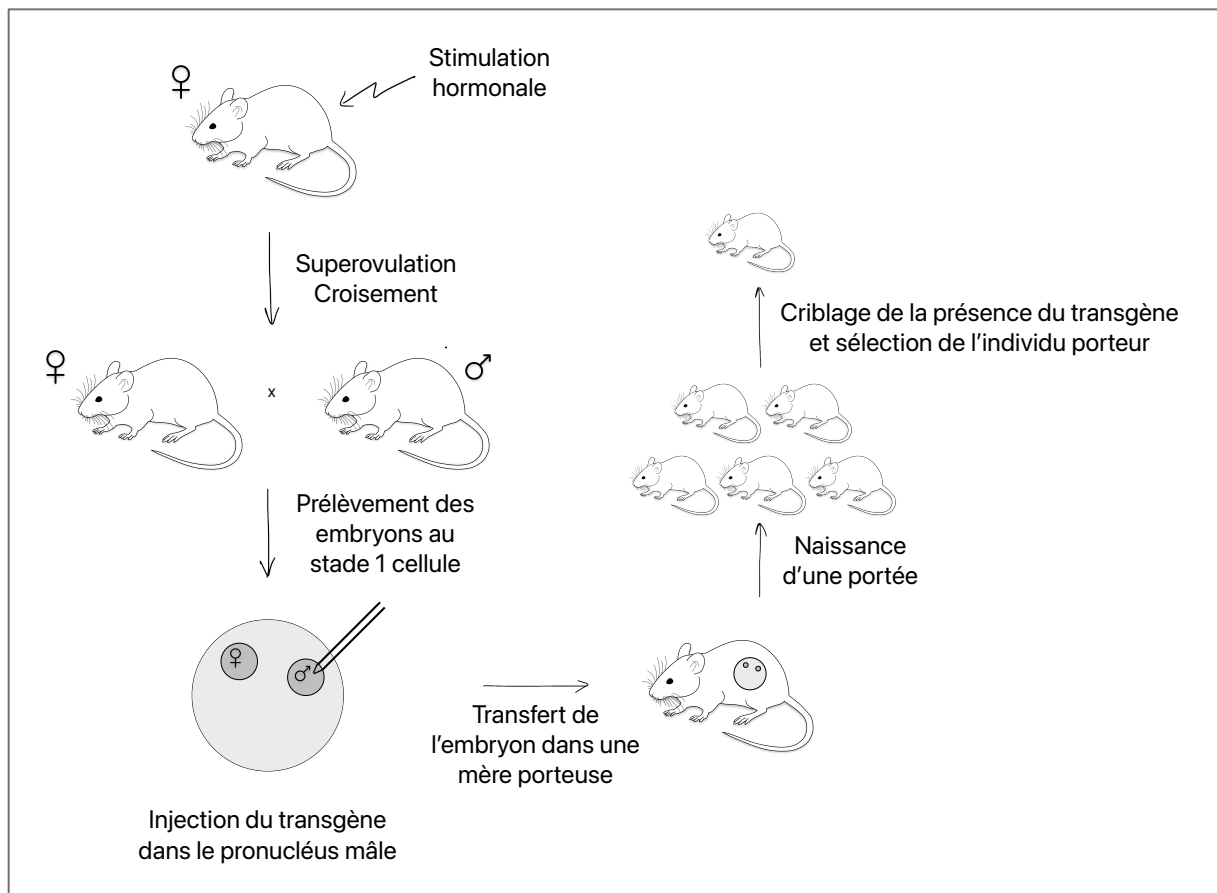


Figure n°1 : Illustration de la technique de micro-injection pronucléaire et la sélection d'individus transgéniques d'après Wong et al. 2000

Le nombre de copies du transgène injectées influence le succès de la technique. Un nombre insuffisant ne garantit pas l'intégration de l'ADN étranger dans le génome ciblé. À l'inverse, un nombre trop important de copies augmente la viscosité du matériel injecté et conduit à la mort embryonnaire. Un millier de copies s'avère être un compromis satisfaisant (Gordon, Ruddle 1981).

Le gène étranger est intégré et devient un élément définitif du patrimoine de l'animal transgénique.

Toutefois, il est nécessaire d'obtenir l'intégration du transgène au niveau de la lignée germinale pour une transmission du nouveau patrimoine à la descendance et donc l'élaboration d'une lignée transgénique.

La création d'une telle lignée repose sur l'identification des individus transgéniques par génotypage et leur croisement avec des souris sauvages pour sélectionner des fondateurs, c'est-à-dire des individus ayant intégré le transgène dans leur lignée germinale. Ainsi, au sein d'une lignée transgénique, tous les individus sont porteurs du transgène et le transmettront à leur descendance.

L'objectif de ces manipulations génomiques s'est porté sur l'élaboration d'individus transgéniques ayant des caractéristiques physiologiques ou physiques plus intéressantes que les individus sauvages, jusqu'à pouvoir transposer ces modifications avantageuses aux espèces d'élevage (Gordon, Ruddle 1981).

Ainsi, en 1982, Palmiter et son équipe sont parvenus à produire des souris transgéniques présentant une croissance musculaire et osseuse augmentée.

Pour ce faire, ces derniers ont couplé le gène codant pour la métallo-thionine I, comprenant de multiples facteurs de régulation de l'expression génique, au gène codant pour un facteur de croissance chez le rat. Ils ont ensuite injecté cette construction dans des pronucléi murins et ont observé chez 7 des 8 animaux transgéniques obtenus une croissance significativement supérieure à celle des individus de même portée (Palmiter et al. 1982).

Cette étude a confirmé l'intégration du transgène au patrimoine génétique de la souris et son expression pour exercer une activité biologique.

b. Infection virale

L'expérience pionnière utilisant des virus pour faire de la modification de génome a été celle de Rudolf Jaenisch. Ce dernier a infecté des embryons au stade de 4 à 8 cellules avec un rétrovirus exogène de type M-MuLV (transcriptase inverse) et a observé l'introduction avec succès de cet ADN viral dans le génome des embryons, y compris dans la lignée germinale. L'addition était de fait transmissible à la descendance (Jaenisch 1976). Cette technique est illustrée en figure n°2.

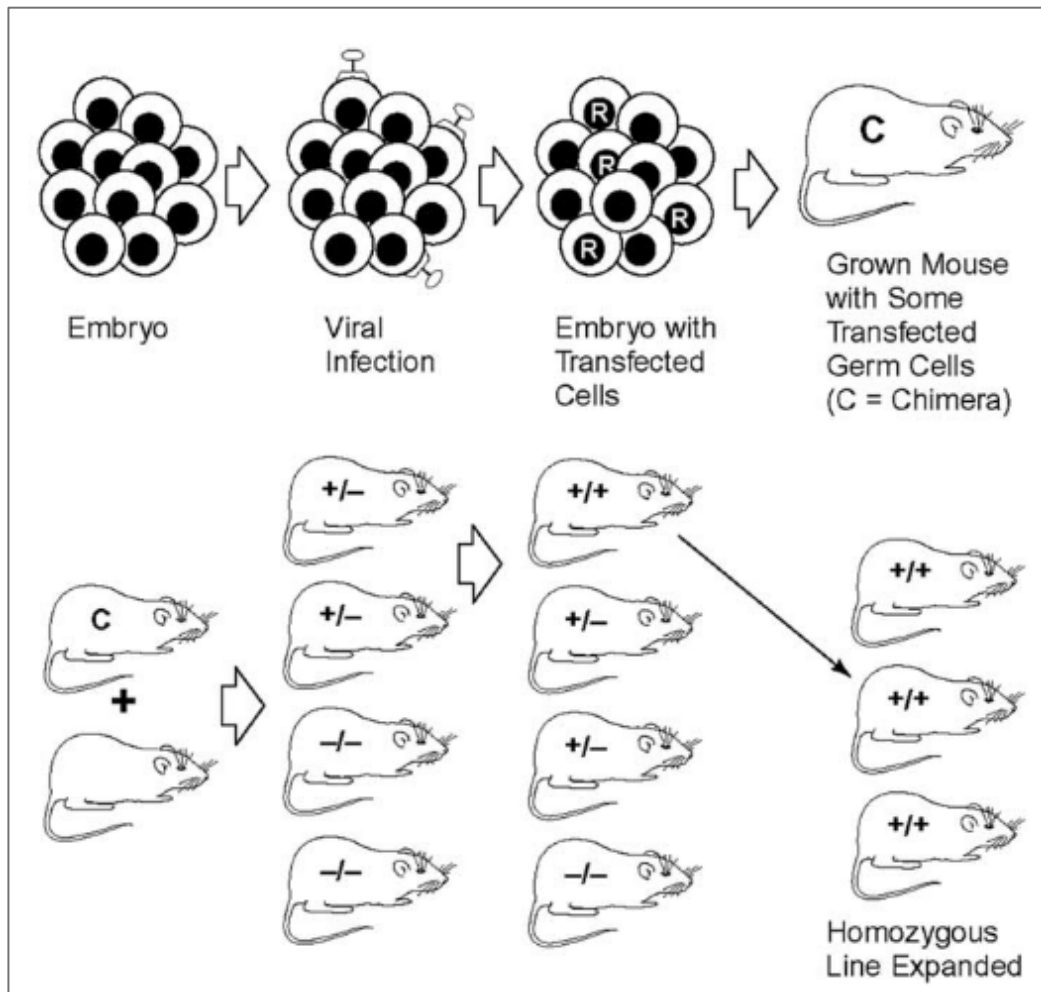


Figure n°2 : Illustration de l'infection virale de cellules embryonnaires précoces et des croisements jusqu'à obtention d'une lignée homozygote porteuse du transgène (ADN viral). Source : Jaenish et al. 1976

En effet, la mise en contact avec l'ADN viral permet l'infection de certaines cellules et donc l'intégration de cet ADN dans leur génome, notamment les cellules de la lignée germinale. Les individus obtenus sont des chimères (répartition de l'ADN viral hétérocellulaire).

Le croisement d'une chimère et d'individu sauvage génère une descendance (F1) hétérozygote pour l'ADN viral (+/-) ou homozygote sauvage (-/-). Le croisement de deux descendants hétérozygotes permet l'obtention d'une descendance (F2) ayant une plus grande représentation de l'ADN viral, dont des individus homozygotes pour l'ADN viral (+/+). Le croisement de deux F2 homozygotes crée la lignée transgénique.

c. *Utilisation des cellules souches embryonnaires*

Une autre technique, comparable à la micro-injection pronucléaire, consiste à prélever des cellules souches embryonnaires au sein des blastocystes et à les mettre en culture. Durant cette dernière, les cellules peuvent être la cible de transgénèse additionnelle, par exemple par infection virale comme décrite dans le paragraphe précédent (Robertson et al. 1986). Il est également possible d'introduire de façon plus précise au sein du génome des séquences d'intérêt par injection de plasmides et recombinaison homologue ciblée (Wolf, Woodside 2005).

Les cellules modifiées sont ensuite micro-injectées dans un nouveau blastocyste et implantées dans une mère receveuse. Cette dernière donne naissance à des souris chimériques. Les croisements nécessaires à l'obtention d'une lignée transgénique sont similaires à ceux qui ont été décrits aux points précédents, et à nouveau présentés sur la figure 3.

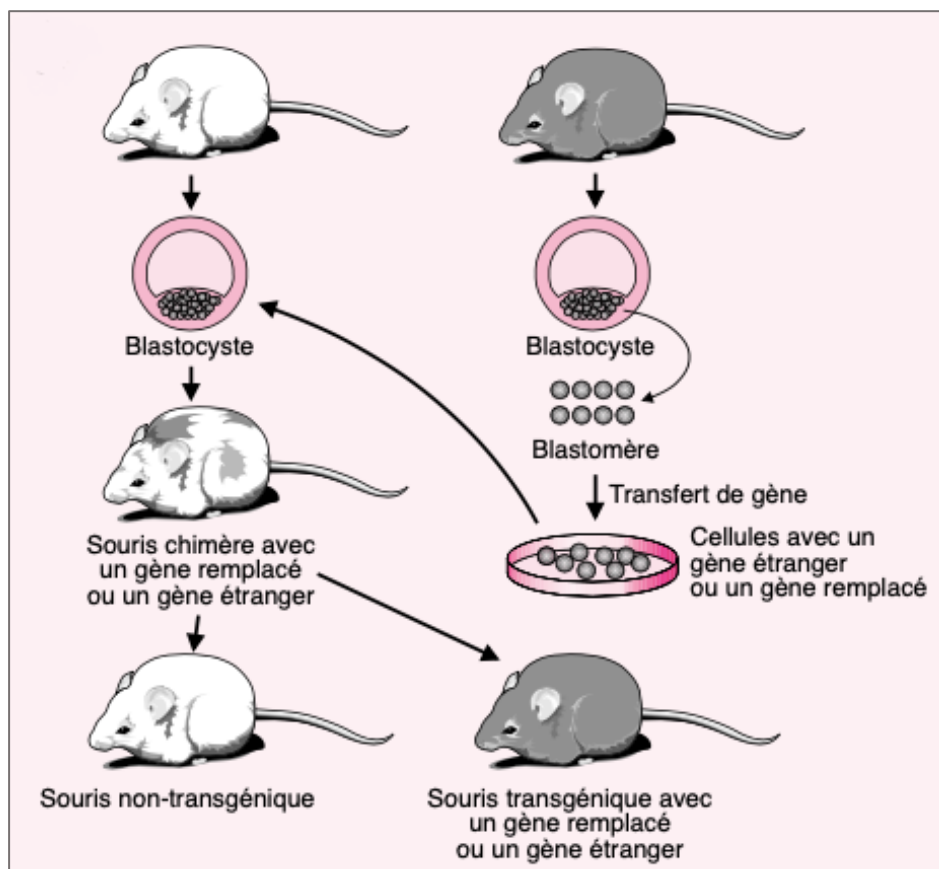


Figure n°3 : Obtention de souris transgéniques par l'emploi de cellules embryonnaires multipotentes. Source : Houdebine 2000

L'avantage de cette technique par rapport à la micro-injection pronucléaire est qu'elle permet de vérifier l'intégration du transgène dès le stade *in vitro*, avant ré-implantation de l'embryon dans la mère receveuse.

La limite de cette technique est qu'elle nécessite la réalisation de nombreuses répétitions jusqu'à l'obtention d'une lignée transgénique intéressante, si bien qu'elle n'est utilisée qu'en recherche pour l'étude de l'expression ou de la fonction d'un gène. En outre, les seules lignées transgéniques stables obtenues l'ont été dans l'espèce murine (Houdebine 2000).

D'autre part, sa réalisation plus laborieuse et son faible rendement en lignées transgéniques d'intérêt en fait une technique moins utilisée que la micro-injection pronucléaire (Ledermann 2000).

d. Applications de la transgénèse

De nombreuses espèces ont été la cible de modifications transgéniques réalisées à l'aide de ces techniques. Les lignées ainsi créées de 1980 à 2009 sont présentées dans le tableau ci-dessous (Gama Sosa, De Gasperi, Elder 2010).

Table 1 Some species in which transgenic animals have been produced

| | References |
|--|--|
| Mammals | |
| Mice (<i>Mus musculus</i>) | Gordon et al. (1980), Joyner and Sedivy (2000) |
| Rats (<i>Rattus rattus</i>) | Hamra et al. (2002), Kato et al. (2004), Hirabayashi et al. (2005), Agca et al. (2008) |
| Rabbits (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) | Fan and Watanabe (2003) |
| Sheep (<i>Ovis aries</i>) | McCreath et al. (2000), Denning and Priddle (2003), Wheeler (2003) |
| Pigs (<i>Sus domestica</i>) | Lai et al. (2002), Houdebine (2009), Kragh et al. (2009) |
| Cattle (<i>Bos taurus</i>) | Donovan et al. (2005), Richt et al. (2007), Houdebine (2009) |
| Goats (<i>Capra hircus</i>) | Wheeler (2003), Houdebine (2009) |
| Dogs (<i>Canis familiaris</i>) | Hong et al. (2009) |
| Marmosets (<i>Callithrix jacchus</i>) | Sasaki et al. (2009) |
| Rhesus monkeys (<i>Macaca mulatta</i>) | Yang et al. (2008) |
| Birds | |
| Chickens (<i>Gallus gallus</i>) | Mozdziak and Petite (2004) |
| Japanese quail (<i>Coturnix japonica</i>) | Huss et al. (2008) |
| Amphibians | |
| Frogs (<i>Xenopus laevis</i> and <i>Xenopus tropicalis</i>) | Macha et al. (1997), Sinzelle et al. (2006), Ishibashi et al. (2008) |
| Fish | |
| Zebra fish (<i>Danio rerio</i>) | Zelenin et al. (1991), Davidson et al. (2003), Huang et al. (2008) |
| Goldfish (<i>Carassius auratus</i>) | Houdebine and Chourrout (1991), Wang et al. (1995) |
| Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) | Martinez et al. (2000), Maclean et al. (2002), Hrytsenko et al. (2009) |
| Carp (<i>Cyprinus carpio</i>) | Yoshizaki et al. (1991) |
| Channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>) | Dunham et al. (2002) |
| Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) | Sin et al. (2000), Houdebine (1997) |
| Invertebrates | |
| Arthropod fruit fly (<i>Drosophila melanogaster</i>) | Rubin and Spradling (1982), Fujioka et al. (2000) |
| Nematode (<i>Caenorhabditis elegans</i>) | Fire (1986), Mello et al. (1991) |
| Mollusk Japanese abalone (<i>Haliotis diversicolor suportexta</i>) | Tsai et al. (1997) |
| Mollusk Eastern oyster (<i>Crassostrea virginica</i>) | Cadoret et al. (1997) |
| Mollusk dwarf surfclam (<i>Mulinia lateralis</i>) | Lu et al. (1996) |

Tableau n°1 : Espèces pour lesquelles des individus transgéniques ont déjà été produits. Source : *Animal transgenesis : an overview* (Gama Sosa, De Gasperi, Elder 2010)

L'application des techniques de transgénèse la plus médiatisée sur les animaux d'élevage a été la modification du saumon AquAdvantage®. Une photographie de ce saumon est présentée en figure n°4.



Figure n°4 : Photographie du saumon AquAdvantage® (en haut) et d'un saumon d'élevage non modifié (en bas)

Ce saumon modifié à partir de l'espèce *Salmo salar* a été élaboré par la société AquaBounty. La première génération de ce poisson présente la particularité de porter une séquence codant une hormone de croissance retrouvée chez le saumon *Chinook* (Du et al. 1992). Les individus obtenus présentent alors une croissance accélérée et peuvent atteindre des poids près de quatre fois supérieurs aux saumons classiques pour une même durée d'élevage.

Plus tard, la même espèce de saumon s'est vue ajouter, en plus de la séquence codant l'hormone de croissance du *Chinook*, un gène de résistance au froid provenant de la lotte d'Amérique (*Macrozoarces americanus*). Cet ajout permettait alors un élevage des salmonidés modifiés à des températures proches de 0°C (Hobbs, Fletcher 2008).

La *Food and Drug Administration* s'est prononcée le 15 novembre 2015 en faveur de la commercialisation à des fins alimentaires du saumon AquAdvantage aux États-Unis après une étude concluant à l'innocuité du produit pour le consommateur et à l'absence d'impact environnemental en cas d'échappement des saumons transgéniques et donc de dissémination incontrôlée dans la nature.

Comme illustré dans le rapport de la FDA (cf. Figure n°5 ci-dessous), la croissance du saumon AquAdvantage® est supérieure à celle d'un saumon sauvage pour une même durée d'élevage.

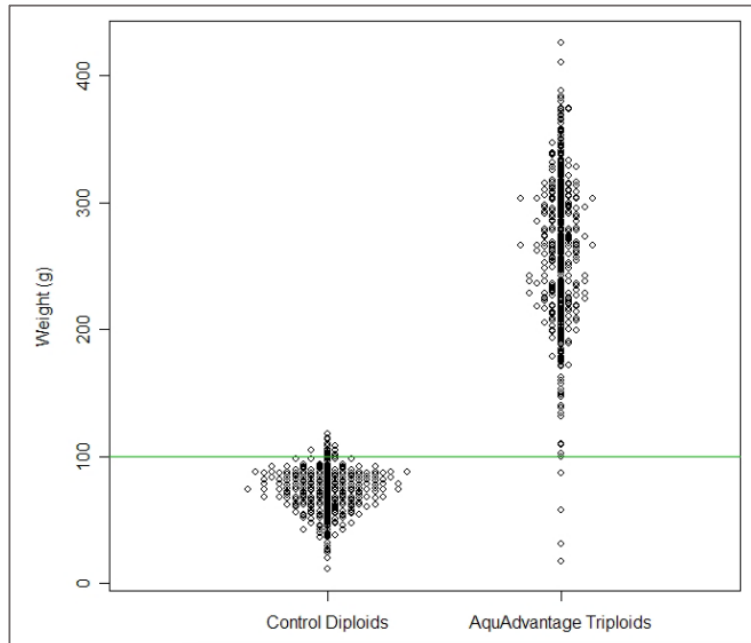


Figure n°5 : Poids d'un saumon sauvage (à gauche) et d'un saumon AquAdvantage (à droite) après 2700 degrés-jours¹. Source : Food and Drug Administration, 2015

¹ Le degré-jour est une unité de mesure utilisée dans l'étude de la croissance et du développement des organismes. Elle combine deux variables que sont le temps et la température et renseigne de l'accumulation de chaleur nécessaire au développement d'un organisme. Dans le cas du saumon AquAdvantage, elle est calculée par multiplication de la différence de température moyenne quotidienne et de la température de base pour la croissance de cette espèce de poisson par le nombre de jours. Ainsi, elle permet de s'affranchir des biais de différences de températures d'élevage des deux populations étudiées (sauvage et AquAdvantage).

Les valeurs chiffrées et statistiques sont également répertoriées dans ce rapport (cf. Tableau n°2) :

| | Effectif | Poids moyen (g) | Erreur de pesée standard (g) | Effectif > 100 grammes |
|---------------------|----------|-----------------|------------------------------|------------------------|
| Saumons sauvages | 306 | 72,6 | 1,02 | 15 (4.9%) |
| Saumon AquAdvantage | 369 | 261,0 | 3,29 | 364 (98.6%) |

Tableau n°2 : Comparaison des poids des saumons sauvages et AquAdvantage à 2700 degrés-jours. Les saumon AquAdvantage, ou « AAS », ont un poids significativement supérieur (261,0 g versus 72,6 g respectivement ; $p < 0,0001$). Le pourcentage d'AAS surpassant le seuil de 100 grammes est aussi significativement supérieur (98.6% versus 4.9% respectivement ; $p < 0,0001$).

En réponse à ce rapport de la FDA, l'association *Greenpeace* a publié un rapport sur les risques d'échappement des saumons transgéniques (Jan Van Aken 2000) s'articulant autour de trois axes : le potentiel métissage génétique par croisement avec les espèces sauvages ; la concurrence pour les ressources alimentaires liées aux besoins supérieurs des saumons transgéniques par rapport aux saumons sauvages et la potentielle invasion de ces individus génétiquement modifiés dans des milieux nouveaux pour l'espèce par leur plus grande tolérance au froid, apportant alors un déséquilibre à l'écosystème déjà en place.

La société AquaBounty a ensuite entrepris les mêmes travaux sur le tilapia (*Oreochromis niloticus*), une autre espèce de poisson largement consommée mondialement (Caelers et al. 2005) et a vu sa mise en marché autorisée en 2018 en Argentine par la Commission nationale de conseil pour la biotechnologie agricole (Lujan 2018).

Aujourd'hui, ces deux poissons pourraient être générés par l'emploi des nouveaux outils d'édition génomique de façon plus simple, plus fine, et plus rapide, en considérant d'autres caractères avantageux pour la filière tels que des qualités organoleptiques supérieures.

e. Limites de la transgénèse

La difficulté majeure rencontrée lors de transgénèse additionnelle repose sur l'effet de position du transgène. En effet, le site d'intégration de cette nouvelle séquence par transgénèse est aléatoire et non prévisible. Ainsi, la mutation introduite peut donc être silencieuse en cas d'intégration dans des régions non codantes du génome, et si la construction du transgène ne comprend pas des séquences promotrices permettant son expression.

Elle peut aussi induire des *knock-out* de gènes si l'intégration a lieu dans des régions codantes. La nouvelle séquence peut aussi s'intégrer dans des séquences régulatrices d'autres gènes, provoquant une augmentation ou une diminution de leur expression de façon indésirable. De plus, le transgène peut s'introduire dans des gènes homéotiques et ainsi perturber le développement de l'individu modifié. L'effet de position peut également interférer dans les fonctions de reproduction, empêchant alors l'établissement d'une lignée transgénique à partir de cet individu (Wolf, Woodside 2005).

Ces limites expliquent le rendement généralement faible des différentes techniques de transgénèse (peu d'individus porteurs de la mutation désirée au regard du nombre de cellules traitées) (Gama Sosa, De Gasperi, Elder 2010).

Pour s'affranchir de ces limites, une technique explorée a été l'utilisation du système Cre/LoxP pour une expression du transgène spatio-temporellement contrôlée (Miao 2013). La recombinase Cre (pour « *Causes recombination* ») est une enzyme dérivée de bactériophages qui reconnaît des séquences ADN spécifiques appelées sites LoxP et catalyse une recombinaison entre elles. Ces séquences LoxP sont des séquences de 34 paires de bases composées de deux répétitions palindromiques de 13 paires de bases espacées de 8 paires de bases (Miao 2013).

Selon l'orientation des sites LoxP, la recombinaison peut entraîner :

- Une délétion : si les sites LoxP sont dans la même orientation, Cre excise le segment d'ADN entre les sites, menant à une délétion. Si un gène est placé entre les deux LoxP, alors ce mécanisme peut permettre d'induire un *knock-out*

de ce gène (cf. Figure 6A). Si un codon stop est placé entre les deux LoxP et est donc excisé, cela peut générer un *knock-in*, c'est-à-dire activer l'expression d'un gène en aval (cf. Figure 6B).

- Une inversion : si les sites LoxP sont dans une orientation opposée, Cre inverse le segment d'ADN entre les sites.
- Une translocation : si les sites LoxP sont situés sur des chromosomes différents, Cre peut faciliter un évènement de translocation.

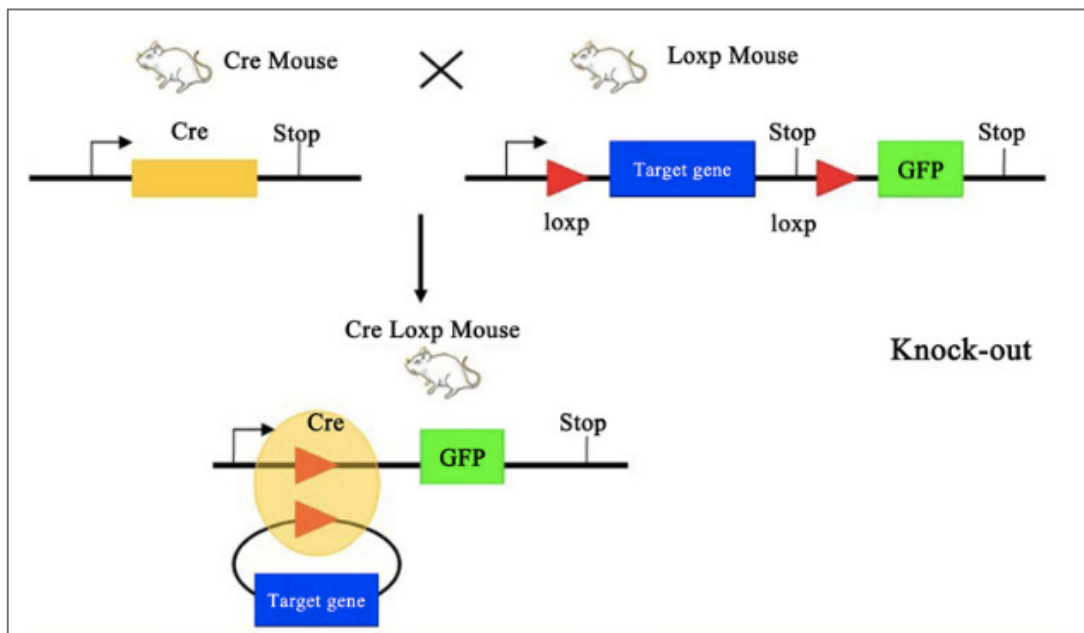


Figure n°6A : Conception d'une souris transgénique *knock-out* pour un gène d'intérêt à partir du système Cre/LoxP. Source : Miao 2013

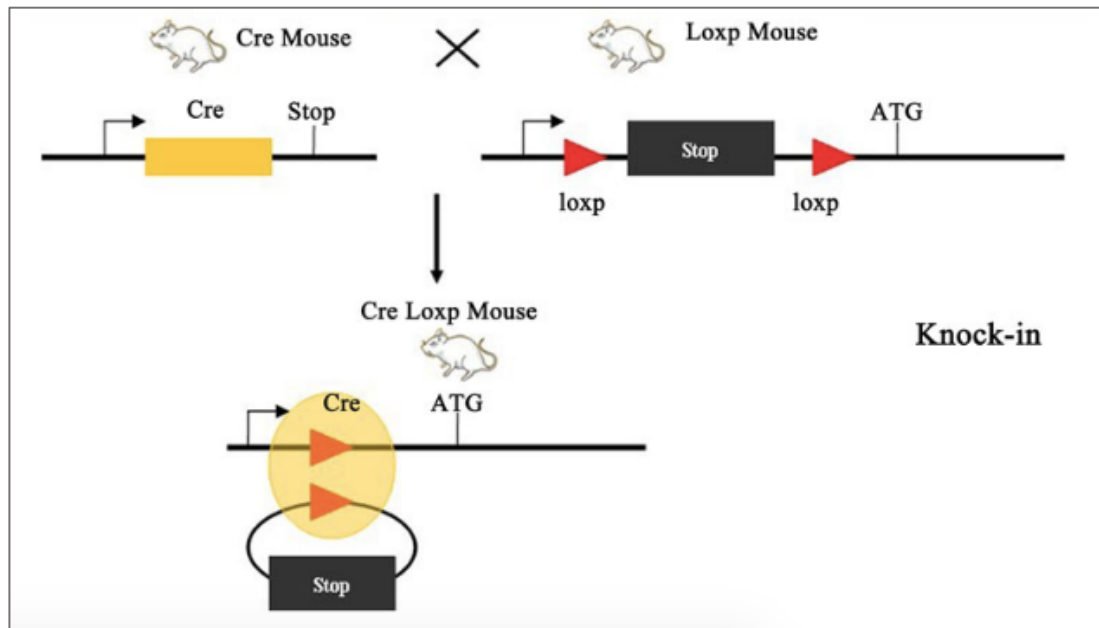


Figure n°6B : Conception d'une souris transgénique *knock-in* pour un gène d'intérêt à partir du système Cre/LoxP. Source : Miao 2013

Il peut être ajouté un promoteur tissu-spécifique pour contrôler l'expression spatiale de la recombinaise Cre. L'expression temporelle de cette protéine peut, quant à elle, être contrôlée par l'emploi d'un promoteur inductible de façon médicamenteuse (Wakita et al. 1998).

Cette technique ne s'affranchit cependant pas des effets hors cibles potentiels, due notamment à l'expression de la construction dans un tissu différent du tissu ciblé (Botterill et al. 2021).

Son efficacité peut également être soumise au niveau d'expression de la recombinaise CRE variable entre les cellules d'un même individu (Araki, Yamamura 2012). La difficulté d'accessibilité des sites LoxP peut également être mentionnée, conséquence de la formation de structures secondaires en tête d'épingles permise par leur configuration palindromique (Kreuger, O'Callaghan 2016) ou par intégration partielle des LoxP dans le génome selon la technique employée pour générer les individus croisés en premier lieu (Bernas et al. 2022).

La transgénèse additionnelle, bien que présentant les limites évoquées ci-dessus, a donc permis de grandes avancées dans la modification des génomes et ouvert la voie au développement des nouvelles techniques d'édition, qui se révèlent, pour les mêmes applications, plus performantes et moins coûteuses. Ces nouvelles techniques sont abordées dans la suite de ce chapitre.

2. Nouvelles techniques de modifications ciblées des génomes

2.1. Nucléases programmables

a. Dispositifs de guidage

i. Nucléases à doigts de zinc

Le système des nucléases à doigts de Zinc a été découvert en 1996 par Srinivasan Chandrasegaran, Yang-Gyun Kim et Jooyeun Cha. Il est obtenu par assemblage de domaines protéiques en doigts de zinc et du domaine de clivage de l'endonucléase *Fok1* issu de la bactérie *Flavobacterium oleanokoites* (Kim et al., 1996).

Chaque doigt de Zinc reconnaît spécifiquement une séquence de 3 nucléotides contigus (Pavletich, et al., 1991).

La cassure induite par le domaine nucléase de *Fok1* au site cible est simple brin, d'où l'utilisation de constructions en homodimères tels qu'illustré à la Figure 7.

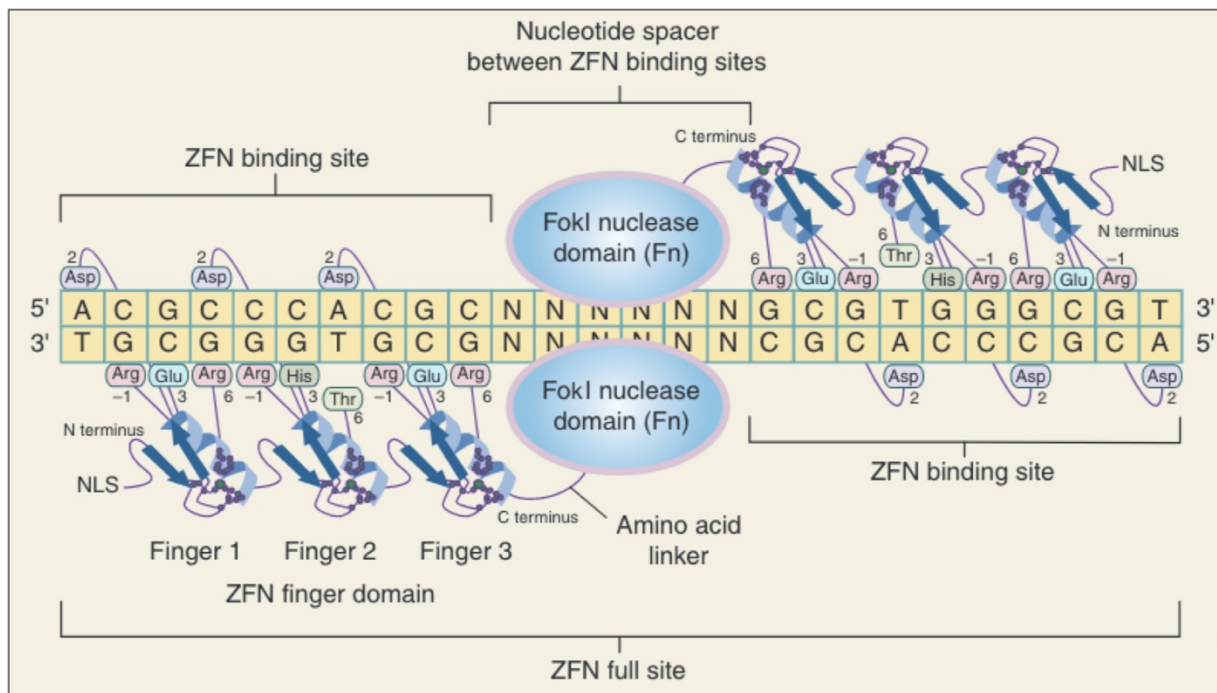


Figure n°7 : Exemple de fixation de l'homodimère ZFN sur l'ADN. Source : *Gene targeting using zinc fingers nucleases* (Porteus et al., 2005)

L'une des limites de l'utilisation de cette technique est que les doigts de Zinc peuvent interférer entre eux et nuire à la stabilité de la fixation à la séquence ADN ciblée (Fairall et al. 1993). De plus, il n'existe pas de doigt de zinc pour tous les triplets possibles de nucléotides. L'ajout de séquences dites « *spacers* » entre les doigts de zinc permet d'élargir le répertoire de séquences cibles. En revanche, plus ces *spacers* comptent un nombre élevé de paires de bases, plus le clivage s'avère inefficace sur le site cible (Wilson et al. 2013).

Enfin, plus le nombre de cellules transfectées avec des ZFN est grand, plus le taux d'apoptose est important. Les ZFN sont en effet cytotoxiques par les nombreux effets *off target* qui conduisent à des clivages excessifs de l'ADN (Porteus 2006).

Toutes ses limites ont encouragé la recherche d'autres systèmes pour l'édition du génome, abordés dans les prochains paragraphes.

ii. *Transcription Activator Like Effector Nuclease*

Les nucléases appartenant à la famille des effecteurs TAL, pour *Transcription Activator Like*, c'est-à-dire des protéines activatrices de la transcription, ont été découvertes chez plusieurs espèces bactériennes du genre *Xanthomonas* comme un système essentiel à leur pathogénie pour les espèces végétales cibles (Bogdanove et al. 2010).

Ces effecteurs sont composés d'un domaine d'activation à l'extrémité C-terminale, d'une séquence de localisation nucléaire ou « NLS » (*Nuclear Localization Sequence*), d'un domaine de liaison et d'un domaine endonucléase qui est le domaine catalytique de Fok1.

Le domaine de liaison comprend :

- des répétitions TALE de 34 acides aminés, présentes en nombre variable et qui varient entre elles sur les acides aminés n°12 et 13 dits « hypervariables ». Chaque répétition reconnaît une paire de bases de l'ADN.
- une demi-répétition qui reconnaît elle aussi une paire de bases spécifique
- un domaine de reconnaissance de la thymidine

Plusieurs techniques permettent de moduler le nombre et l'assemblage des répétitions TALE plus facilement que pour les assemblages de doigts de zinc. On compte notamment parmi elles la technique du Golden Gate (Cermak, Starker, Voytas 2015) ; la FLASH (Reyon et al. 2012), la LIC (Schmid-Burgk et al. 2013) ou encore le Unit assembly (Li et al. 2011).

De la même façon que pour les ZFN, les TALENs sont assemblés en dimères pour induire des cassures double brin. Ainsi, 18 paires de bases ADN sont reconnues par chaque sous-unité du dimère. Les répétitions TALE des deux sous-unités doivent être espacées de plus de 12 paires de bases afin de laisser assez de place pour la fixation des deux domaines catalytiques du dimère. La construction est illustrée sur la figure n°8.

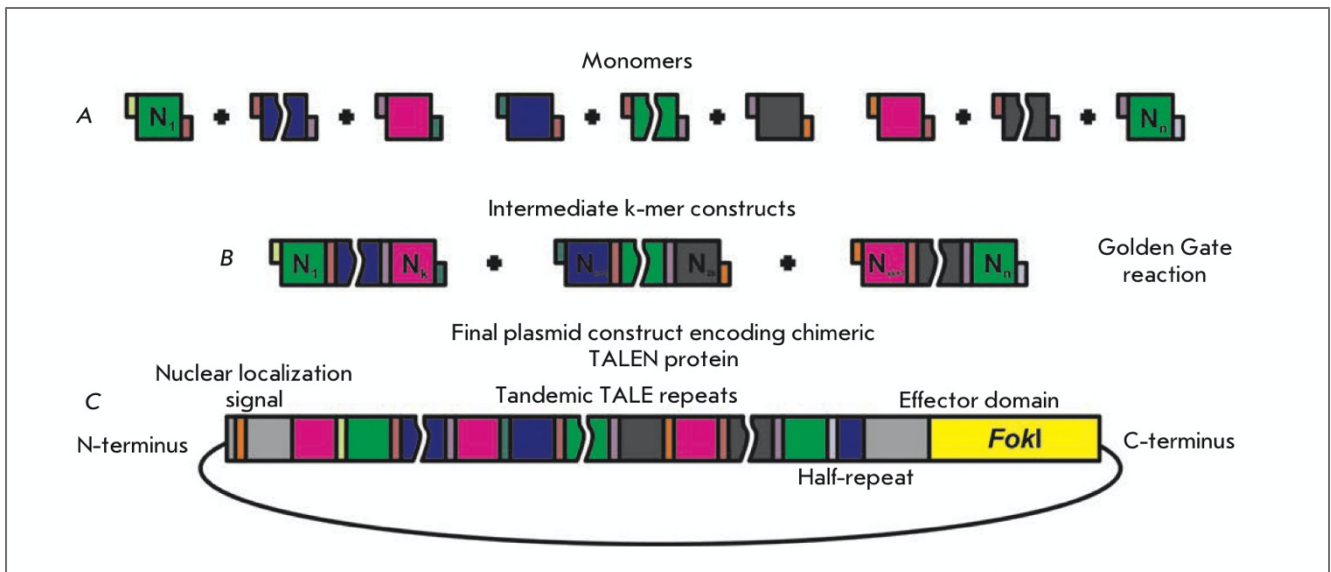


Figure n°8 : Schéma de la ligation des monomères formant le système TALEN sur un plasmide par réaction Golden Gate. Source : (Nemudryi et al. 2014)

Auparavant, les effecteurs TAL étaient tributaires d'une extrémité 5' Thymidine pour reconnaître le site de clivage mais des modifications de ces effecteurs ont permis de s'affranchir de cette obligation. Les TALEN sont donc capables d'intervenir de façon très spécifique sur tout le génome (Lamb et al. 2013).

Leurs limites reposent surtout sur la difficulté de construction des TALEN, et donc son coût d'utilisation plus élevé que celui de CRISPR/Cas9, que nous allons maintenant décrire.

iii. CRISPR-Cas9

Quelques années après la découverte des TALEN, un autre système a été identifié comme système bactérien d'immunité adaptative contre les virus et les plasmides chez *Streptococcus pyogenes* par l'équipe de Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier (Jinek et al., 2012).

Ce système associe un cluster de répétitions palindromiques espacées régulièrement, nommé CRISPR pour *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats* et la protéine Cas9 (*Crispr Associated protein 9*).

Il en existe trois types. Les types I et III impliquent plusieurs protéines de reconnaissance et de clivage de l'ADN étranger et de ce fait, sont plus complexe d'utilisation en génie génétique. Ils ne seront pas évoqués dans ce manuscrit.

Le type II, en revanche, présente une construction plus simple avec une structure ARN guide constituée de deux ARN : un « crRNA » ou ARN CRISPR, qui cible 20 paires de bases sur l'ADN à modifier et un « tracrRNA » ou ARN transactivateur, qui recrute la protéine Cas9 (enzyme de cassure double brin) (Jinek et al. 2012).

En effet, tel qu'illustré sur la figure 9, la première phase d'immunité adaptative bactérienne par le système CRISPR-Cas9 de type II consiste en l'incorporation de séquence d'ADN du phage primo-infectant. Ces séquences de quelques paires de bases sont appelées *spacers*. Elles sont intercalées dans le génome bactérien avec de courtes répétitions palindromiques appelées *repeats*. L'ensemble forme le locus CRISPR. Plus une bactérie a rencontré de phages, plus le nombre de *spacers* différents sera grand.

L'ensemble du locus CRISPR est transcrit en ARN appelé alors « pré-crRNA ». Des séquences d'ARN complémentaires aux palindromes s'hybrident sur le pré-crRNA. Ces séquences sont appelées « tracrRNA ». Chaque tracrRNA recrute une protéine Cas9.

Le pré-crRNA subit ensuite une phase de maturation : des RNAses III clivent entre les complexes tracrRNA-Cas9, générant ainsi plusieurs structures combinant une partie de la séquence du pré-crRNA, appelée dorénavant crRNA, un tracrRNA et une protéine Cas9.

La deuxième phase est appelée phase d'interférence. Les crRNA produits agissent comme des ARN guides pour les enzymes Cas, facilitant la reconnaissance spécifique du matériel génétique étranger. L'hybridation des crRNA sur ce matériel induit des clivages par les protéines Cas, aboutissant à sa dégradation. Les protéines Cas9 induisent en effet des cassures double brin au niveau des motifs PAM (pour *Protospacer Adjacent Motif*) de la séquence cible (Jinek et al. 2012).

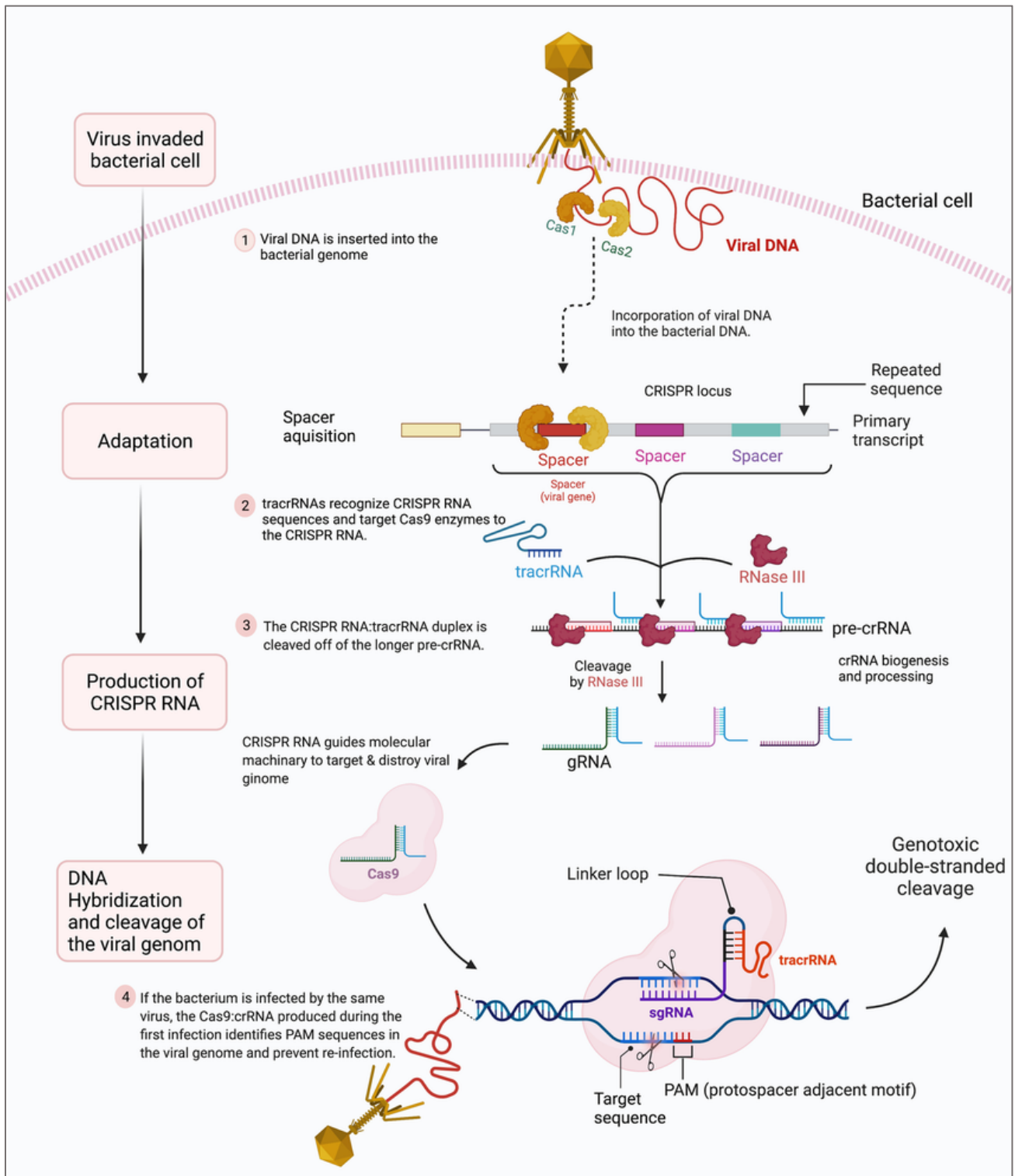


Figure n°9 : Illustration du système CRISPR-Cas9 bactérien. Source : *Strategies to overcome the main challenges of the use of CRISPR/Cas9 as a replacement for cancer therapy* (Rasul et al. 2022)

Depuis sa découverte et son exploitation, la technique CRISPR-Cas9 est au cœur des recherches sur l'édition des génomes et leurs applications.

b. Réparation des cassures double brin

Une fois les cassures double brin générées par les différents systèmes préalablement abordés, deux types de réparation entrent alors en concurrence : la réparation par jonction d'extrémités non homologues et la réparation par recombinaison homologue. Ces deux mécanismes cellulaires sont illustrés en figure 10.

La réparation par jonction d'extrémités non homologues, ou *Non Homologous End Joining (NHEJ)*, rapproche des extrémités clivées et les lie arbitrairement pour restaurer la continuité de l'ADN endommagé par la cassure double brin.

Elle peut donc entraîner des mutations par insertions ou délétions, et donc le *knock-out* d'un gène si la cassure a lieu dans une séquence codante ou nécessaire à l'expression du gène en question. Cette voie de réparation est prédominante dans la cellule, à toutes phases du cycle cellulaire (Heyer, Ehmsen, Liu 2010).

La réparation par recombinaison homologue, ou *Homology Directed Repair (HDR)*, est, quant à elle, restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire (Heyer, Ehmsen, Liu 2010). Ce système de réparation est recherché lorsqu'on emploie des outils d'édition génomique pour l'incorporation d'une nouvelle séquence au site de clivage. La recombinaison homologue est cependant minoritaire par rapport à sa voie concurrente (NHEJ).

Plusieurs stratégies ont été conçues pour freiner la réparation non homologue. Par exemple, les travaux de Chu et son équipe ont porté sur l'élaboration de cellules humaines et murines *knock-down* pour les facteurs KU70, KU80 et l'ADN ligase IV impliqués dans la NHEJ. Ainsi, les cellules porteuses d'un *knock-down* d'au moins un des trois facteurs ont montré une réduction de la réparation par jonction non homologue (Chu et al. 2015), majorée par l'ajout de facteurs de dégradation de l'ADN ligase IV.

Concernant ces mêmes facteurs, l'équipe de Li et al. (2018) a montré que l'ajout d'ARN interférant avec les gènes codant pour KU70 et KU80 entraîne une réduction de cette dernière au profit de la recombinaison homologue sur des cultures de fibroblastes différenciés (Li et al. 2018).

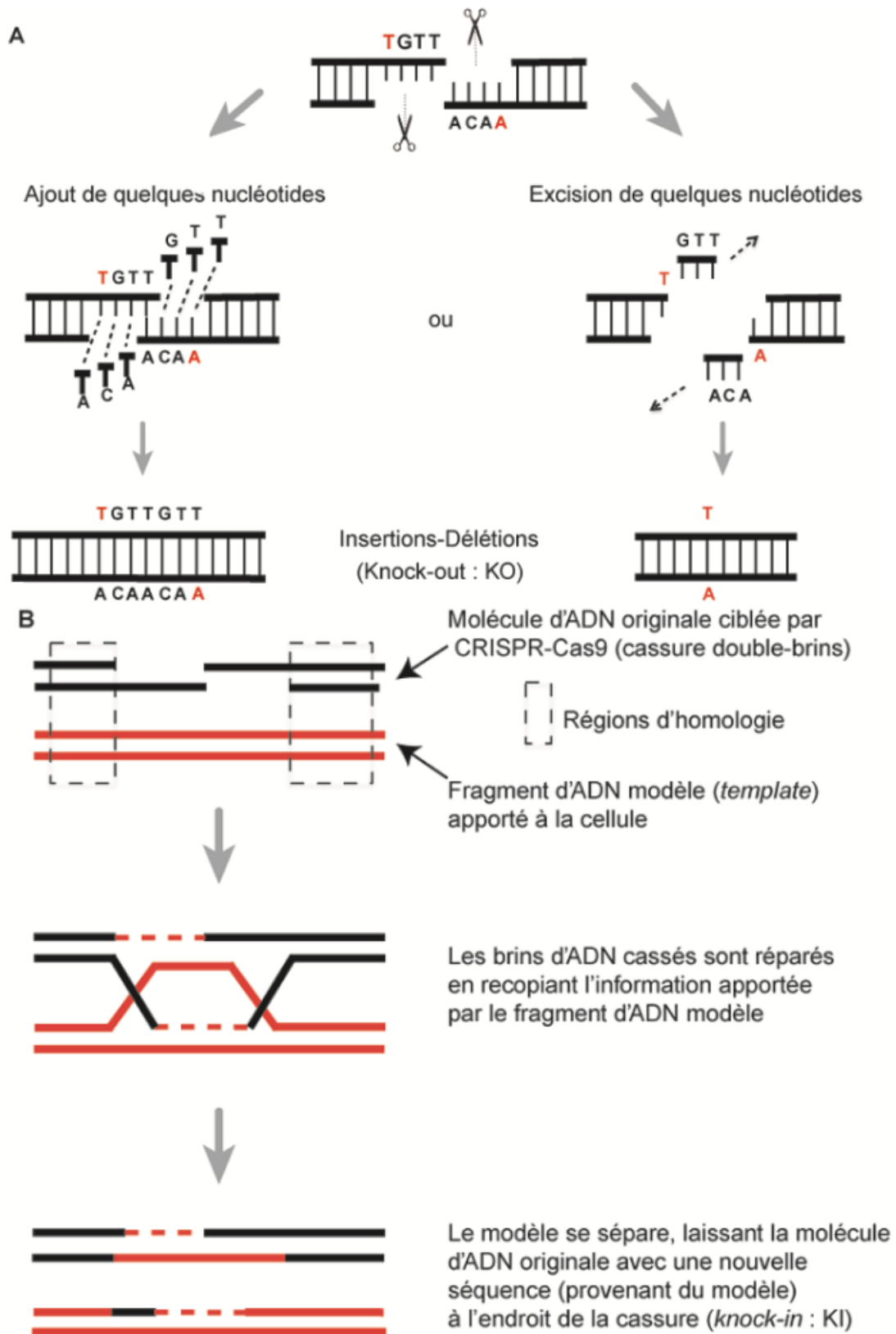


Figure n°10 : Illustration des deux mécanismes de réparation cellulaire. (A) Réparation par jonction d'extrémités non homologues. (B) Réparation par homologie. Source : *Three technologies that changed genetics* (Maxmen 2015)

D'autres stratégies ont permis de favoriser la recombinaison homologue. Les travaux de Marumaya et al. (2015) peuvent être cités. Cette équipe de recherche est parvenue à favoriser la recombinaison par homologie au détriment de la jonction non homologue par ajout de Src7, un inhibiteur de l'ADN ligase IV (Maruyama et al. 2015).

Par ailleurs, il est possible d'ajouter au mélange inoculé des molécules permettant une amélioration du taux de cellules éditées. La molécule RS-1 (pour Rad51 Stimulatory compound-1), comme sa dénomination l'indique, stimule la protéine Rad51 qui est un acteur essentiel de la recombinaison par homologie (Song et al. 2016).

Enfin, la synchronisation des cycles cellulaires et la nucléotransfection de complexes ribonucléoprotéiques prêts à l'emploi dans des cellules humaines ont permis de privilégier la recombinaison homologue en apportant tout le matériel génomique et protéique nécessaire à la réalisation de la technique de CRISPR-Cas9, au moment le plus propice du cycle cellulaire. Des taux de réparation jusqu'à 38% ont été atteints, sans effets hors cibles associés (Lin et al. 2014).

2.2. Autres approches

a. Base editing

Une des limites du système CRISPR-Cas9 est qu'il repose sur une cassure double brin pour effectuer la modification. Cette cassure peut en effet générer des insertions, délétions, translocations ou réarrangements de l'ADN sur le site cible lors de la réparation par les deux mécanismes cellulaires (NHEJ et HDR).

La technique de *base editing*, ou édition de base, s'affranchit de la cassure double brin en permettant une transformation fine d'une paire de base en une autre. Elle se construit par l'association d'une nCas9, ou Cas9 nickase (qui est une Cas9 mutée reconnaissant toujours un motif PAM spécifique mais n'induisant qu'une cassure simple brin au lieu de double brin), et d'une désaminase de nucléoside qu'on nomme alors « éditeur de base » (Li et al. 2023).

La construction est présentée sur la figure n°11.

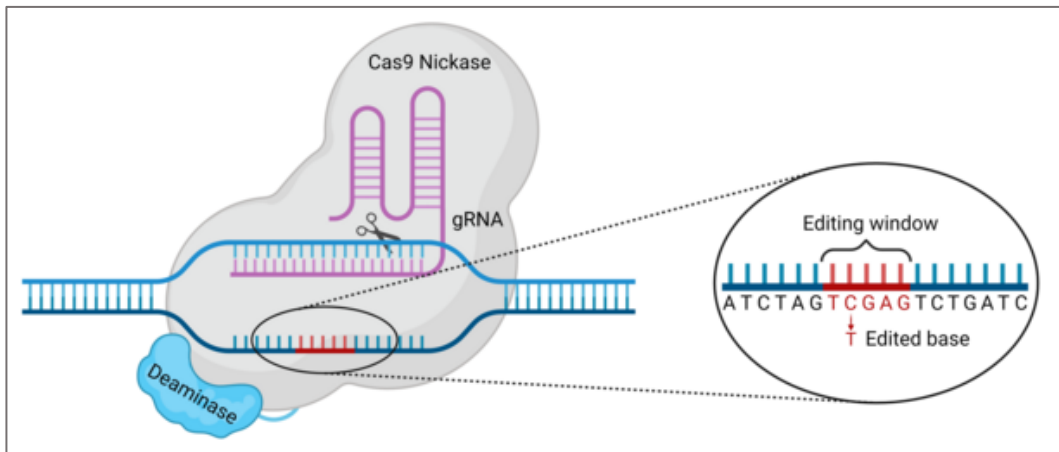


Figure n°11 : Illustration de la construction du système de Base editing. Source : Site web <https://crisprmedicineneews.com/news/explainer-what-are-base-editors-and-how-do-they-work/>

On compte parmi les éditeurs de base disponibles les *cytosine base editors*, ou CBEs, et les *adenine base editors*, ou ABEs. Les CBEs convertissent une base C (Cytosine) en T (Thymine) et une base G (Guanine) en A (Adénine) sur le brin opposé (soit une conversion de C:G à T:A) (Komor et al. 2016). Les ABEs, quant à elles, convertissent une base A en G et une base T en C sur le brin opposé (soit une conversion A:T en G:C) (Gaudelli et al. 2017). Ces derniers sont présentés sur la figure n°12.

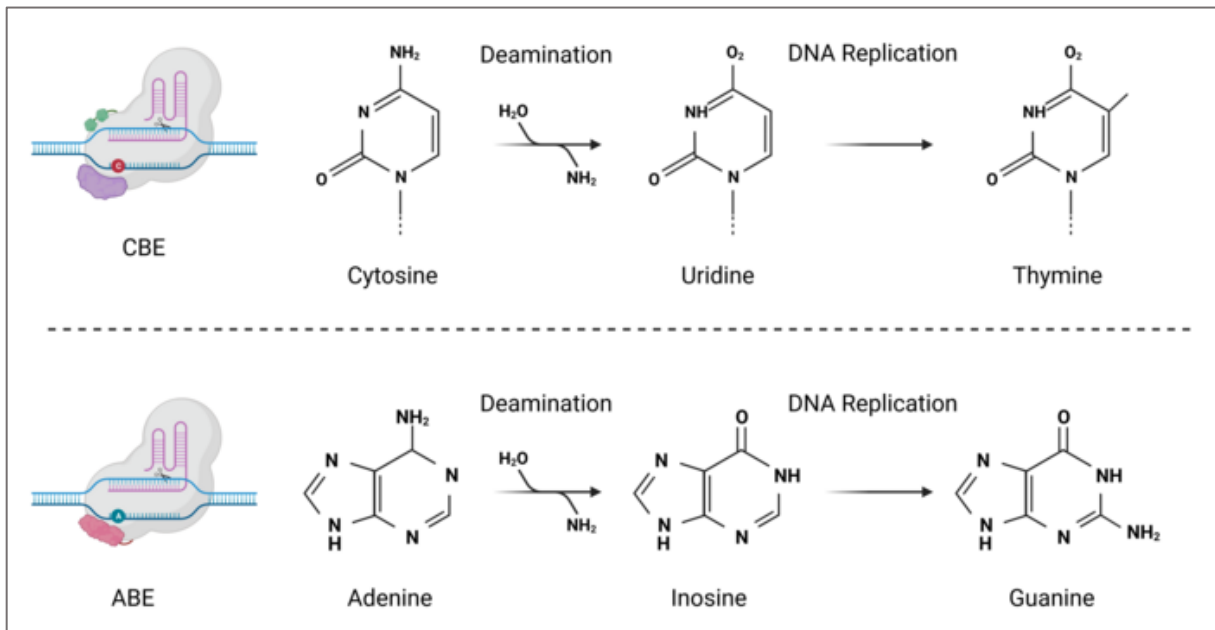


Figure n°12 : Mécanismes moléculaires de conversions de nucléotides par les CBE et ABE. Source : Site web <https://crisprmedicineneews.com/news/explainer-what-are-base-editors-and-how-do-they-work/>

Ainsi, ces deux éditeurs permettent 4 types de mutations ponctuelles sur les 12 combinaisons possibles :

| | | Nucléotide initial | | | |
|-------------------|---|--------------------|-----|-----|-----|
| | | A | T | C | G |
| Nucléotide obtenu | A | | | | CBE |
| | T | | | CBE | |
| | C | | ABE | | |
| | G | ABE | | | |

Tableau n°3 : Mutations permises par les éditeurs de base ; les nucléotides initiaux en colonnes et nucléotides obtenus en lignes. Les cases vides représentent les mutations ponctuelles existantes mais ne pouvant pas être acquises par édition de base.

L'édition de base présente moins d'effets non recherchés, en comparaison avec les techniques d'édition générant une cassure double brin, et une plus grande spécificité de cible. En revanche, ses applications se limitent aux situations pour lesquelles ne sont recherchées que des mutations ponctuelles.

La plupart relèvent du domaine de la biomédecine avec l'élaboration de modèles de recherche pour les maladies humaines (Alzheimer, Duchenne, thalassémies, cholestérolémie, tumeurs, etc.) (Rees, Liu 2018).

L'utilisation d'autres variants Cas dans la construction des éditeurs de base permettrait néanmoins la reconnaissance d'une diversité plus importante de sites cibles sur l'ADN, ouvrant donc le champ d'applications possibles (Li et al. 2023).

b. Prime editing

Le *prime editing* (PE) est la technique d'édition génomique la plus récemment élaborée. Elle a été présentée pour la première fois par l'équipe de Anzalone en 2019 dans une publication de 2019 (Anzalone et al. 2019).

Elle permet, à l'inverse du *base editing*, d'effectuer tous les types de mutations ponctuelles ainsi que des courtes délétions et insertions.

La construction est similaire à celle du *base editing* avec l'emploi d'un complexe appelé « PE » comprenant une nickase Cas9, couplée cette fois-ci à une *reverse transcriptase*. Ce complexe PE est associé à un complexe pegRNA (ou *prime editing guide RNA*) qui permet d'amener la *reverse transcriptase* au site cible.

Ce complexe pegRNA comprend trois éléments : une séquence complémentaire à la séquence cible, un complexe RT regroupant une séquence motif avec la modification souhaitée pour servir de modèle à la *reverse transcriptase* ainsi qu'un site de liaison primaire nécessaire à l'initiation de la *reverse transcription* appelé PBS pour *Primer Binding Site* (Li et al. 2023) (cf. Figure 13.B.).

Pour rappel, la nickase Cas9 (nCas9) est une Cas9 mutée qui n'effectue qu'une cassure simple brin au lieu de double brin. La reconnaissance de motifs PAM spécifiques n'est quant à elle pas altérée par la mutation.

Concernant le déroulement de la modification génomique, le complexe PE reconnaît le motif PAM sur le brin ciblé, s'y lie et y effectue un clivage simple brin (cf. Figure 13C). Le complexe pegRNA s'hybride ensuite par complémentarité sur l'autre brin par sa séquence similaire à la séquence cible (cf. Figure 13D).

La séquence PBS maintenant à proximité de la séquence cible s'hybride à son tour et initie la *reverse transcription* selon le modèle porté par le complexe pegRNA (cf. Figure 14E). Ensuite, le complexe PE se dissocie et les extrémités non jointives ainsi créées sont rassemblées par réparation cellulaire classique, formant un hétéroduplex (un brin édité et un brin non édité) (cf. Figure 13F).

Enfin, une dernière étape à l'aide d'un système classique associant un ARN guide et une nCas9 permet de couper le brin non édité et de le réparer par recombinaison homologue (cf. Figure 13G).

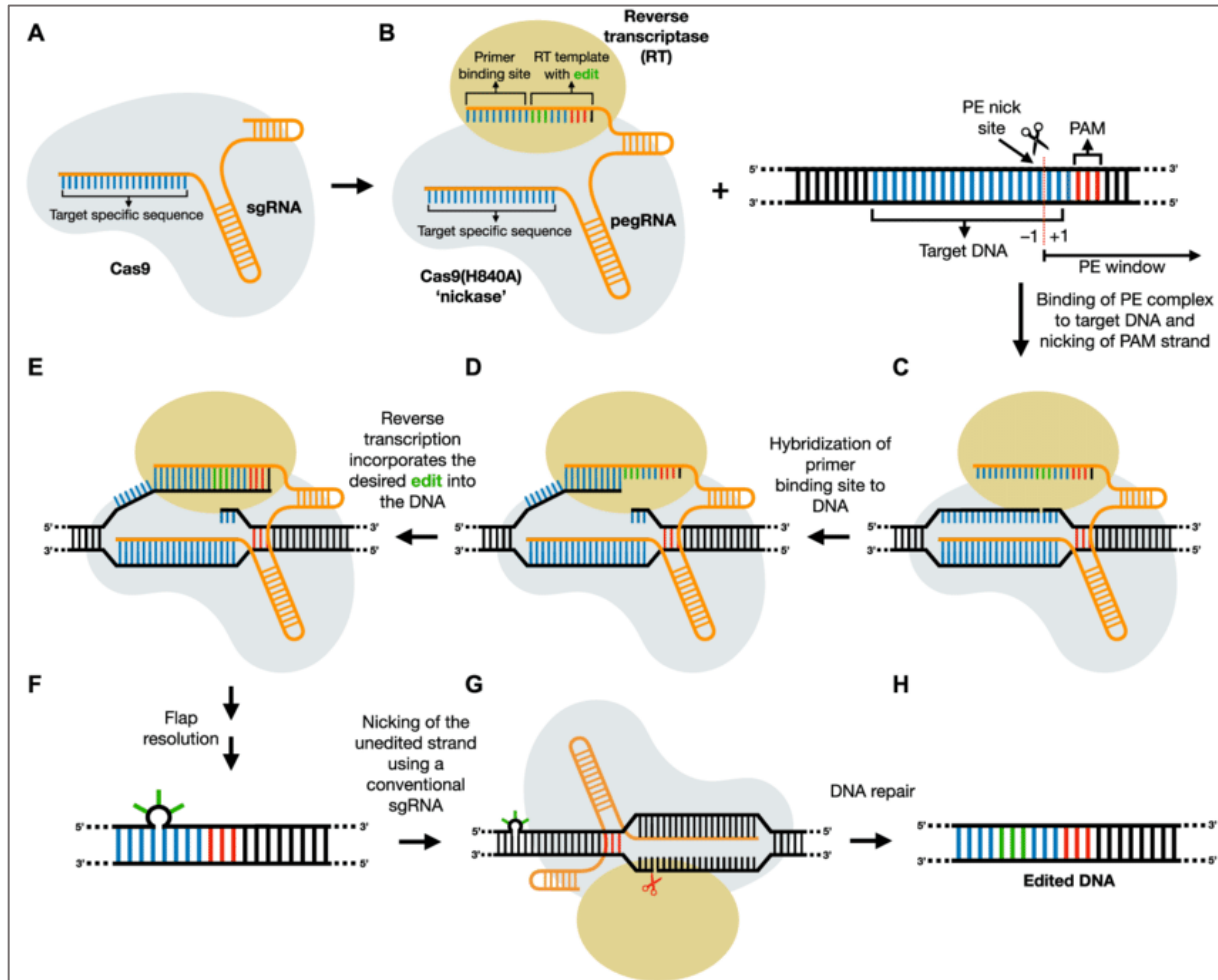


Figure n°13 : Représentation schématique du *prime editing*. (A) Construction du système avec le complexe PE (nickase Cas9 + RT) et du pegRNA (ARN guide pour la séquence cible + séquence modèle pour la RT + séquence PBS). (B) Reconnaissance par la protéine d'édition et cassure simple brin au niveau du motif PAM. (C) Hybridation de la séquence PBS à l'extrémité générée par la cassure. (D) *Reverse transcription* avec le modèle du pegRNA. (E) Dissociation du complexe PE. (F) Résolution du *flap* créé par réparation cellulaire classique, génération d'un hétéroduplex. (G) Édition classique du brin non édité et réparation cellulaire. (H) Obtention du produit fini.

Source : *pegIT - a web-based design tool for prime editing* (Anderson et al. 2021)

Cette méthode permet donc de s'affranchir de la cassure double brin de CRISPR-Cas9 tout en effectuant toutes les modifications de séquence souhaitées, avec la précision mais s'exemptant des limites du *base editing*. Pour les applications sur des mutations ponctuelles, on lui préférera tout de même le *base editing* qui présente très peu d'effets off-target et moins d'insertions ou de délétions.

Une des limites de cette technique est qu'elle peut engendrer des réparations des mésappariements (ou *mismatch repair*) au moment de la réparation du *flap*, générant des insertions ou des délétions non désirées. Par ajout dans la construction d'une séquence codant une protéine inhibitrice de *mismatch repair*, on réduit ce taux de mutations non souhaitées (Chen et al. 2021).

Le *prime editing* est donc une technique d'édition génomique s'inspirant de ses prédécesseuses et ouvrant la voie à de nombreuses applications biomédicales, de santé publique ou agricoles.

2.3. Mise en œuvre des techniques de modifications ciblées

Les techniques permettant la délivrance du système d'édition génomique dans les cellules cibles ne diffèrent pas des techniques employées pour la transgénèse. En effet, le système peut être inoculé par micro-injection nucléaire, transfection (électroporation ou agents chimiques) ou vectorisation virale.

Les substrats sont divers. Le matériel d'édition génomique peut être introduit *in vitro* dans des cellules souches embryonnaires ou des cellules somatiques en culture. Ces manipulations relèvent du domaine de la thérapie cellulaire. Il est également possible de faire de la thérapie génique en administrant le système d'édition *in vivo*. Cette dernière est étudiée dans l'élaboration de thérapie ciblée chez l'homme.

Quant aux modifications ciblées des génomes animaux, le substrat dépend de l'objectif. S'il est d'obtenir des animaux résistants aux maladies d'élevage, ou plus généralement, d'augmenter les productions animales, alors un individu entièrement modifié est souhaité. Les substrats utilisés seront les cellules souches embryonnaires.

En revanche, lorsque les cellules animales sont utilisées à des fins de recherche biomédicale, alors des lignées génétiquement modifiées seront modifiées et mises en culture *in vitro*.

On se propose dans la suite de ce paragraphe d'apporter des précisions quant aux modifications des cellules souches embryonnaires, menant à l'obtention d'un individu dont tout le génome est modifié.

Les trois techniques précédemment citées ont la limite de produire une descendance potentiellement mosaïque, c'est-à-dire des individus constitués de cellules aux génotypes distincts. Chaque cellule porte l'allèle modifié ou l'allèle d'origine (Salvesen, Grupen, McFarlane 2024). La technique de transfert de noyaux de cellules somatiques permet de s'affranchir de ce mosaïsme mais est plus coûteuse et complexe.

Dans l'édition du génome, plusieurs aspects techniques sont à considérer : le format du système éditeur employé, le stade embryonnaire auquel il est délivré et la méthode de délivrance (Salvesen, Grupen, McFarlane 2024).

Par exemple pour le système CRISPR-Cas9, plusieurs variants de la protéine Cas9 peuvent être employés : la protéine Cas9 classique ; la « deadCas9 » ou « dCas9 » qui correspond à une Cas9 inactive fusionnée avec des protéines à activité catalytique différente ; ou à une « nickase Cas9 » ou « nCas9 », utilisée dans le *Prime editing* ou le *Base editing*.

Outre le choix de la Cas9 adaptée à la modification génétique souhaitée, il a été montré que l'inoculation du complexe ribonucléoprotéique (ARN guide, l'ADN simple brin modèle ou « ssDNA », protéine Cas9) plutôt que des constituants isolés (ARN guide, ssDNA, et ARN messenger codant pour Cas9) comme l'illustre la figure n°14 permettait un mosaïsme moindre par électroporation (Chen et al. 2016).

Cette technique de construction du complexe ribonucléoprotéique préalable à l'électroporation dans la cellule cible a été nommée par les chercheurs l'ayant élaborée CRISPR-EZ pour « *CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes* ». La construction du complexe ribonucléoprotéique est illustrée en figure n°15.

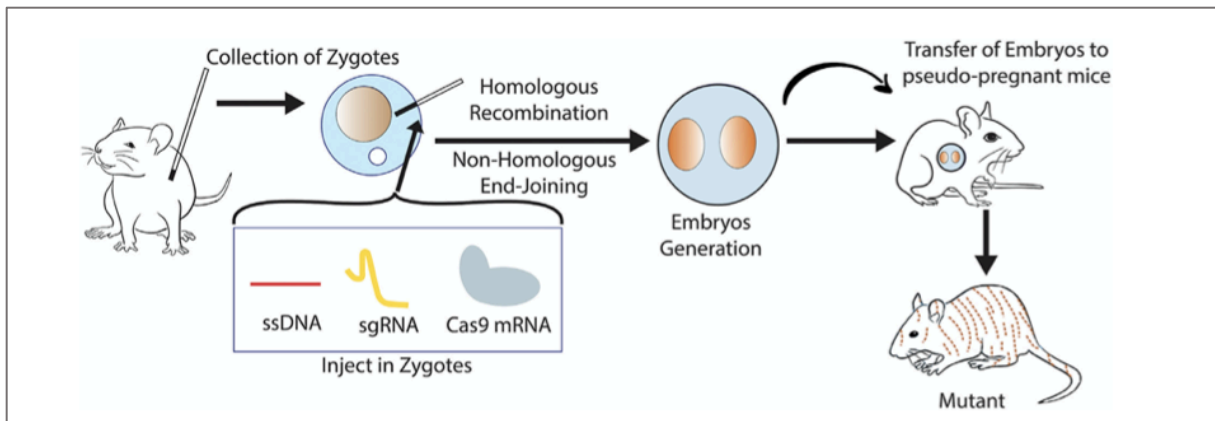


Figure n°14 : Protocole CRISPR Cas9 pour la modification de génome animal. L'ARN messager de Cas9 (Cas9 mRNA), ainsi que l'ADN simple brin modèle (ssDNA) et l'ARN guide (sgRNA), sont injectés dans les zygotes collectés chez des souris. Lors de la réparation de l'ADN utilisant le système de recombinaison homologue ou de jonction d'extrémités non homologues, la modification souhaitée est créée et les embryons sont générés. Ces embryons sont transférés à des souris pseudo-gestantes, qui donnent naissance à des souris mosaïques pour la mutation. Source : Nishu et al. 2020

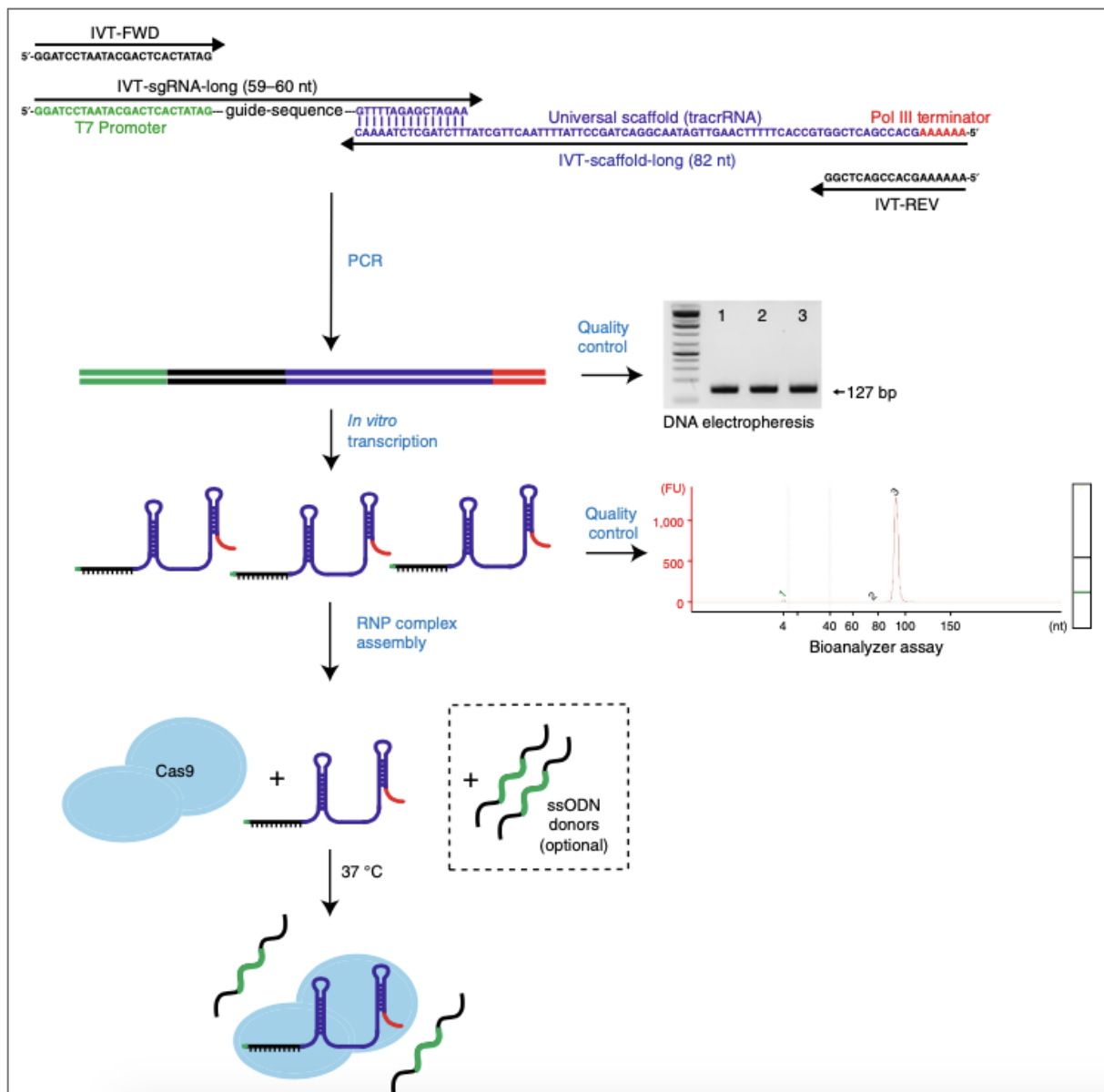


Figure n°15 : Synthèse de sgRNA sans clonage pour CRISPR-EZ par l'équipe de Modzelewski et al. 2018. Le mélange comprend une paire d'amorces PCR (IVT-FWD et IVT-REV), une séquence sgRNA unique (IVT-sgRNA-long) contenant un promoteur T7 en 5' et une séquence commune de matrice inverse (bleu/rouge : tracrRNA et terminateur de transcription « Pol III terminator »). La séquence matrice tracrRNA et la séquence guide sgRNA comportent quelques nucléotides s'hybridant entre eux afin de diriger l'enchaînement de séquences des futurs amplicons. Ainsi, la PCR permet l'obtention d'un amplicon unique de 127 paires de bases. La pureté du produit est vérifiée par électrophorèse sur gel. Les amplicons sont ensuite soumis à une transcription *in vitro* débutant au niveau du promoteur T7. La qualité et la quantité du sgRNA nouvellement synthétisé peuvent être déterminées en soumettant l'échantillon à un test sur Bioanalyzer. La protéine Cas9 recombinante, les sgRNA purifiés et les ssODN (ADN simple brin modèle lors d'édition de séquence cible) sont assemblés en complexe ribonucléoprotéique (RNP) *in vitro* avec un tampon stabilisant à 37 °C pendant 10 minutes. Source : Modzelewski et al. 2018

De plus, le stade embryonnaire d'inoculation du système CRISPR-Cas9 est crucial pour la réduction du mosaïsme. De fait, l'électroporation de Cas9 et de l'ARN guide dans les 5 heures suivant la fécondation chez l'espèce murine ont permis la genèse d'individus non mosaïques (Hashimoto, Yamashita, Takemoto 2016). Cette fenêtre post-fécondation est allongée : entre 12 et 15 heures chez l'espèce porcine, entre 10 et 12 heures chez l'espèce ovine et 18 heures chez l'espèce bovine (Lin, Van Eenennaam 2021). Ce délai correspond en réalité à la durée de mise en place de la première réplication de l'ADN du zygote au stade unicellulaire pour devenir bicellulaire.

Par ailleurs, le choix de la technique employée pour la délivrance du matériel CRISPR-Cas9 dans la cellule à son importance. Une étude publiée en 2016 a montré une diminution de 11% de l'incidence du mosaïsme lorsque le matériel est délivré par électroporation, par rapport à une inoculation par micro-injection pronucléaire (Chen et al. 2016). De plus, l'électroporation est une technique offrant une rapidité et une simplicité d'exécution sur un grand nombre de zygotes que la micro-injection n'a pas (Salvesen, Grupen, McFarlane 2024).

En recherche sur les embryons humains, plusieurs techniques pré-implantatoires peuvent s'appliquer pour l'élaboration d'embryons édités non mosaïques.

Premièrement, les cellules souches spermatogoniales (SSCs) peuvent être modifiées par édition génomique *in vitro* et les populations clonales obtenues peuvent être criblées pour confirmer les résultats de la modification génétique. Les SSCs éditées de façon attendue peuvent ensuite être différenciées en spermatozoïdes et subir une injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) pour fertiliser des ovocytes. Cette technique a déjà été réalisée avec succès sur des spermatogonies porcines par édition génomique à l'aide de TALEN (Tang et al. 2018). Elle est illustrée en figure 16A.

D'autre part, une perspective envisagée pour les animaux de rente, bien qu'encore cantonnée à la recherche sur les embryons humains, reposerait sur l'application directe de la technique CRISPR-Cas9 sur l'embryon et l'individualisation des blastomères obtenus. Ces derniers sont remis en culture et produisent ainsi des

embryons au génotype unique (Salvesen, Grupen, McFarlane 2024). Cette méthode est illustrée en figure 16B.

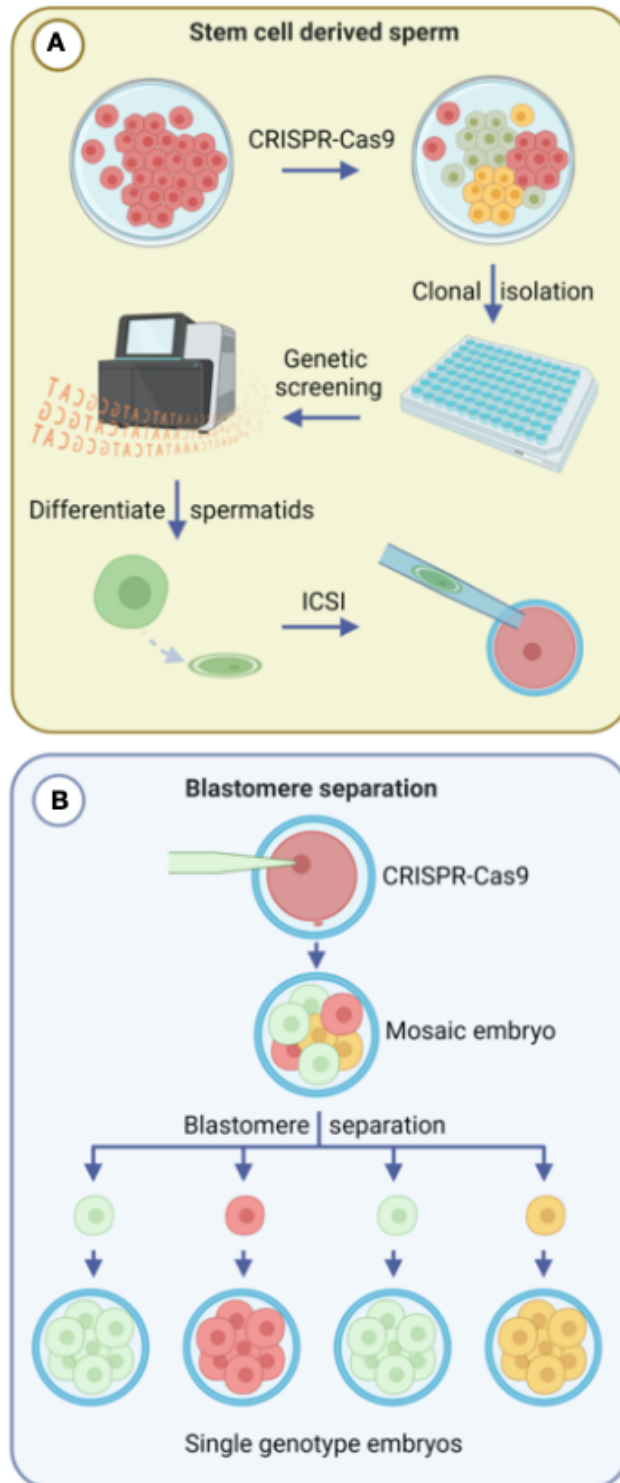


Figure n°16 : Obtention d'embryons génétiquement modifiés au génotype unique (A) à partir de cellules souches spermatogoniales, le criblage intervenant avant implantation dans l'ovocyte (B) à partir de blastomères individualisés et criblés ultérieurement par biopsie au stade blastocyste. Source : Salvesen, Grupen, McFarlane 2024

II. APPLICATIONS SUR LE GÉNOME ANIMAL

1. Applications en agriculture

L'ensemble des applications des nouveaux outils d'édition génomique pour l'amélioration des caractéristiques zootechniques ne pourrait être cité dans ce travail de thèse. Néanmoins, plusieurs publications dressent un tableau plus exhaustif de ces applications, avec notamment les publications de Nishu et al. 2020 et Khwatenge, Nahashon 2021 pour l'espèce aviaire. Pour les espèces bovine, porcine, ovine et caprine, la publication de Tan et al. 2016 ainsi que le rapport de l'EFSA (*European Food Safety Authority*) datant du mois de septembre 2023 (Van Eenennaam 2023) mentionnent de nombreuses applications. Elles sont également citées pour une partie d'entre elles dans la publication de Ducos et al. 2018 et plus récemment, celle de Ledesma et Van Eenennaam (2024).

a. Résistance aux maladies d'élevage

L'ensemble des applications des nouveaux outils d'édition génomique sur les animaux de rente pour la résistance ou la résilience à des maladies d'élevage diverses est recensé dans le tableau n°4 ci-dessous par Ledesma, Van Eenennaam 2024. Certaines de ces applications seront abordées dans ce paragraphe sous le prisme de leur impact sur l'économie agricole et sur la santé publique.

| Targeted animal | Editing System | SDN | Clone? | Methodology | Gene targeted | Targeted Disease | Reference |
|------------------------------|-----------------------------|-----|---|---|---|---|----------------------------|
| Cattle | TALEN | 3 | Yes | Knockin | <i>SP110</i> | Tuberculosis resilience | Wu et al., 2015 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | Yes | Knockin | <i>NRAMP1</i> | Tuberculosis resilience | Yuan et al., 2021 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | Yes | Knockin | <i>NRAMP1</i> | Tuberculosis resilience | Gao et al., 2017 |
| | ZFN | 3 | Yes | Amino acid substitution | <i>CD18</i> | <i>Mannheimia haemolytica</i> leukotoxin resilience | Shanthalingam et al., 2016 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | Yes | Amino acid substitution | <i>CD46</i> | Bovine viral diarrhea virus (BVDV) resilience | Workman et al., 2023 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockin | <i>PRNP</i> | Prion diseases resilience | Park et al., 2020 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | Yes | Nucleotide substitution | <i>Isoleucyl-tRNA synthetase</i> | Prevention of isoleucyl-tRNA synthetase syndrome | Ikeda et al., 2017 |
| | ZFN nickase | 3 | Yes | Knockin | <i>Lysozyme</i> | Mastitis resilience | Liu et al., 2013 |
| Pig | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>ANPEP</i> | Transmissible gastroenteritis virus (TGEV), & porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) resilience | Whitworth et al., 2019 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Whitworth et al., 2016 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1,3 | Yes | Replacement of cysteine-rich domain 5 | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Wells et al., 2017 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | Yes | Replacement of exon 7 with hCD163L1 | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Chen et al., 2019 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | Yes | Knockout | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Yang et al., 2018 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | Yes | Double knockout | <i>CD163</i> and <i>ANPEP</i> | PRRS virus and TGEV resilience | Xu et al., 2020 |
| | CRISPR/Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Tanihara et al., 2021 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Hung et al., 2022 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>CD163/CD1D</i> | PRRS virus resilience | Whitworth et al., 2014 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Burkard et al., 2017 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | Yes | Knockout | <i>CD163</i> | PRRS virus resilience | Wang et al., 2019 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | Yes | Knockin | <i>shRNAs</i> | Classical swine fever virus (CSFV) resilience | Xie et al., 2018 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | Yes | Knockout | <i>PCBP1</i> | CSFV resilience | Qi et al., 2022 |
| | CRISPR/ Cas9 | 2 | Yes | Knockin | <i>RSAD2</i> | African swine fever (ASFV) & pseudorabies virus (PRV) resilience | Xie et al., 2020 |
| | ZFN | 2 | No | Interspecies allele substitution | <i>RELA</i> | ASFV resilience | Lillico et al., 2016 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | Yes | Knockout | <i>PCBP1</i> | CSFV resilience | Qi et al., 2022 |
| | CRISPR/ Cas9 | 2 | Yes | Knockin | <i>ANPEP</i> | Enteric coronaviruses resilience | Liu et al., 2023 |
| CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>glycolylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)</i> | Reduced severity and delayed appearance of PEDV | Tu et al., 2019 | |
| CRISPR/ Cas9 | 1 | Yes | Double gene modification | <i>CD163</i> and <i>MSTN</i> | PRRS virus resilience and increased muscle growth | Zhang et al., 2022 | |
| Cytidine base editors | 1 | Yes | Single-nucleotide replacement at multiple sites | <i>MSTN</i> , <i>IGF2</i> and <i>CD163</i> | Improved growth performance and PRRS virus resilience | Song et al., 2022 | |
| Chicken | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | Tva cell surface receptor | Avian leukosis virus resilience | Koslová et al., 2021 |
| | CRISPR/ Cas9 | 2 | No | Amino acid deletion | <i>chNHE1</i> | Avian leukosis virus resilience | Hellmich et al., 2020 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>chNHE1</i> | Avian leukosis virus resilience | Koslová et al., 2020 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | No | Expression of CRISPR/ Cas9 to target a virus | <i>ICP4</i> of Marek's disease virus | Marek's disease resilience | Challagulla et al., 2021 |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | No | Two ANP32A amino acid substitutions | <i>ANP32A</i> | Avian influenza | Idoko-Akoh et al., 2023 |
| Blue catfish Channel catfish | CRISPR/ Cas9 | 3 | No | Knockin | Alligator <i>CATH</i> | Increased bacterial resistance | Wang et al., 2023a |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | No | Knockin | Alligator <i>CATH</i> | Antimicrobial activity | Simora et al., 2020 |
| | CRISPR/ Cas9 | 1 | No | Knockout | <i>TICAM 1</i> and <i>RBL</i> | Innate immune related genes | Elaswad et al., 2018 |
| Labeo rohita carp (Rohu) | CRISPR/ Cas9 | 3 | No | Knockin | <i>CEC</i> and <i>CATH</i> | Increased bacterial resistance | Wang et al., 2023b |
| | CRISPR/ Cas9 | 3 | No | Knockin | <i>TLR22</i> | Immunity model | Chakrapani et al., 2016 |
| Silkworm | CRISPR/ Cas9/CRISPR/ Cas12a | 3 | No | Knockin | Lines expressing Cas & guide sequences | Nucleopolyhedrovirus resilience | (Dong et al., 2020) |

Tableau n°4 : Applications des outils d'édition génomique sur les animaux de rente et d'aquaculture pour la résilience ou la résistance aux maladies d'élevage. Certaines sont d'ores-et-déjà commercialisées et mentionnées dans le tableau n°24 (Ledesma, Van Eenennaam 2024).

i. Élevages porcins

Parmi les maladies d'élevages porcins présentant des enjeux économiques et de santé publique considérables, peuvent être cités le syndrome dysgénésique respiratoire porcin et la peste porcine africaine. Il est alors logique de trouver dans la littérature scientifique de nombreux articles sur des applications d'édition génomique concernant ces affections (Ledesma, Van Eenennaam 2024).

SYNDROME DYSGÉNÉSIQUE RESPIRATOIRE PORCIN

Le syndrome dysgénésique respiratoire porcin (ou « SDRP ») est une maladie virale se manifestant par des troubles de la reproduction (avortements tardifs, mises bas prématurées ou encore syndromes févriques et anorexiques chez les mères, responsables d'une mortalité élevée des porcelets) et des troubles respiratoires et retards de croissance chez les porcelets et porcs à l'engraissement (respiration pénible, fièvre, perte d'appétit, apathie) (Loza-Rubio, Rojas-Anaya 2018).

Le virus responsable est le PRRSV, un virus enveloppé de la famille des *Arteriviridae* qui se caractérise par un tropisme étroit et strict pour les lignées monocytaires et macrophages, notamment au niveau des poumons et des organes lymphoïdes (Burkard et al. 2017). Il se lie à plusieurs constituants membranaires de ces cellules, et notamment aux récepteurs CD163, pour y pénétrer par endocytose et effectuer son cycle de réplication et relargage des réplicas (Cai et al. 2023).

La réaction immunitaire découlant de l'infection altère les tissus et génère une inflammation locale responsable d'infections secondaires bactériennes ou virales provoquant les signes cliniques évoqués. Ce virus est hautement contagieux, se transmettant par contact direct ou par aérosols.

Il en existe deux génotypes : le PRRSV1 (dit « européen ») et le PRRSV2 (dit « américain »). En 2006, une nouvelle lignée hautement pathogène du génotype 2, appelée HP-PRRSV, a été identifiée en Chine (An et al. 2010). Plus récemment, en 2008, un nouveau variant du génotype 2 nommé NADC30-like a été observé en Chine également (Hewei Zhang et al. 2018; Chang et al. 2023).

Le syndrome dysgénésique respiratoire porcin est responsable de pertes économiques majeures en élevage. Une étude de l'OVS en Bretagne en 2007 (Normand, Lebret 2014) estimait le coût du PRRSV par comparaison des taux de conversion alimentaire² (TCA) et des gains moyens quotidiens³ (GMQ) entre 18 exploitations porcines en conduite en 10 bandes :

- Six d'entre elles présentaient un faible statut d'infection (programme de vaccination chez les truies, aucune circulation du PRRSV chez les porcelets après sevrage, circulation irrégulière du PRRSV chez les porcs en finition).
- Six autres présentaient un statut d'infection élevé (avec ou sans programme de vaccination chez les truies, circulation du PRRSV dans tous les lots testés des porcs en finition, circulation irrégulière du PRRSV chez les porcelets après sevrage).
- Six autres ne présentaient pas d'infection au PRRSV.

Les données suivantes ont été obtenues :

| | Faible infection | | Infection élevée | |
|---------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| | Moyenne | Intervalle de confiance | Moyenne | Intervalle de confiance |
| €/truie/an | 17 | [29,6-60,7] | 62,7 | [18,9-106,6] |
| €/100kg de carcasse | 1,91 | [1,6-3,28] | 3,4 | [1,02-5,77] |

Tableau n°5 : Moyenne du coût du syndrome dysgénésique porcin en élevage rapporté par truie et par an, et par 100 kilogrammes de carcasse, chez 6 exploitations faiblement infectées et 6 exploitations hautement infectées comparées à 6 exploitations non infectées. Source : Normand, Lebret 2014

² Taux de conversion alimentaire (ou TCA) : ratio de la consommation de nourriture et du gain de poids de l'animal. Il mesure l'efficacité avec laquelle les animaux convertissent l'aliment en masse corporelle. Il est un indicateur de rentabilité de la production animale, de la santé et de la gestion efficace de l'élevage et rend compte de l'impact environnemental de ce dernier.

³ Gain moyen quotidien (ou GMQ) : mesure du gain de poids moyen d'un animal par jour sur une période donnée. Il est un indicateur de rentabilité de la production animale, de la santé et de la gestion efficace de l'élevage et rend compte de l'impact environnemental de ce dernier.

Une étude portant sur de plus nombreux paramètres d'élevage a montré les résultats suivants (pertes économiques, en € par an, liées au syndrome dysgénésique respiratoire porcin dans 21 exploitations affectées (Renken et al. 2021)) :

| Farm no. | Loss per year (€) | | | | |
|---------------|-------------------|---------------|---------------|---------------------------|----------------|
| | Per sow | Farm total | Breeding part | Nursery part ^a | Fattening part |
| 1 | 568 | 85,263 | 8952 | - 8480 | 84,791 |
| 2 | 461 | 138,454 | 24,132 | -10,587 | 124,909 |
| 3 | 305 | 54,443 | 8886 | 25,502 | 20,055 |
| 4 | 258 | 84,085 | 19,958 | 10,991 | 53,136 |
| 5 | 375 | 74,181 | 16,375 | - 7003 | 64,809 |
| 6 | 209 | 60,430 | 17,582 | 1199 | 41,649 |
| 7 | 243 | 53,396 | 16,370 | 1912 | 35,113 |
| 8 | 265 | 135,225 | 48,487 | 10,612 | 76,126 |
| 9 | 220 | 72,661 | 19,289 | 9889 | 43,483 |
| 10 | 225 | 76,447 | 32,409 | 1525 | 42,513 |
| 11 | 298 | 67,246 | 12,093 | - 702 | 55,854 |
| 12 | 255 | 306,395 | 43,142 | 18,011 | 245,243 |
| 13 | 205 | 55,312 | 9945 | 4246 | 41,121 |
| 14 | 178 | 60,586 | 7443 | 16,757 | 36,386 |
| 15 | 286 | 100,211 | 27,314 | - 6462 | 79,360 |
| 16 | 288 | 57,528 | 18,000 | 8853 | 30,674 |
| 17 | 306 | 122,393 | 29,985 | -22,956 | 115,364 |
| 18 | 176 | 70,324 | 22,298 | 6036 | 41,991 |
| 19 | 46 | 16,540 | 7846 | - 680 | 9375 |
| 20 | 202 | 90,503 | 16,679 | 8368 | 65,456 |
| 21 | 221 | 90,371 | 21,618 | - 2253 | 71,006 |
| Median | 255 | 74,181 | 18,000 | 1912 | 53,136 |

^aNegative values mean that the herd did not see a loss but saved costs in the nursery part

Tableau n°6 : Perte annuelle médiane attribuable au SDRP par truie pour chaque troupeau étudié et pour l'ensemble du troupeau, ainsi que dans les parties reproduction, nurserie et engraissement. Les valeurs négatives dans la colonne « *nursery part* » correspondent à une absence de pertes liés au SDRP s'additionnant à un gain sur les coûts de nurserie (moindres par rapport aux valeurs de référence utilisées). Source : Renken et al. 2021

Le calcul des coûts du SDRP a été réalisé en dérivant et en comparant un budget hypothétique d'une exploitation si cette dernière était indemne de PRRSV avec le budget du troupeau étudié. Plusieurs postulats ont dû être faits sur le budget d'une ferme « négative au PRRSV » pour les paramètres de santé et de performance étudiés. Il n'était pas possible de trouver des valeurs moyennes spécifiques à partir de troupeaux confirmés négatifs au PRRSV pour tous les paramètres, des valeurs moyennes provenant de données de performance de production à l'échelle nationale ont donc été utilisées (Renken et al. 2021).

D'après cette étude, la perte annuelle moyenne estimée au sein des 21 exploitations est donc de 255 euros par truie, représentant en moyenne une perte annuelle de 74181 euros par élevage.

La figure n°17 ci-dessous présente la répartition des pertes économiques entre les différentes variables affectées : le rendement (« revenue »), les frais vétérinaires (« veterinarian ») et la main-d'œuvre (« labour ») sont les paramètres modifiés de façon prépondérante. On remarque néanmoins que le coût de l'alimentation est diminué. La perte d'individus au sein du troupeau à cause de la maladie est certainement à incriminer pour justifier ce gain apparent pour l'éleveur.

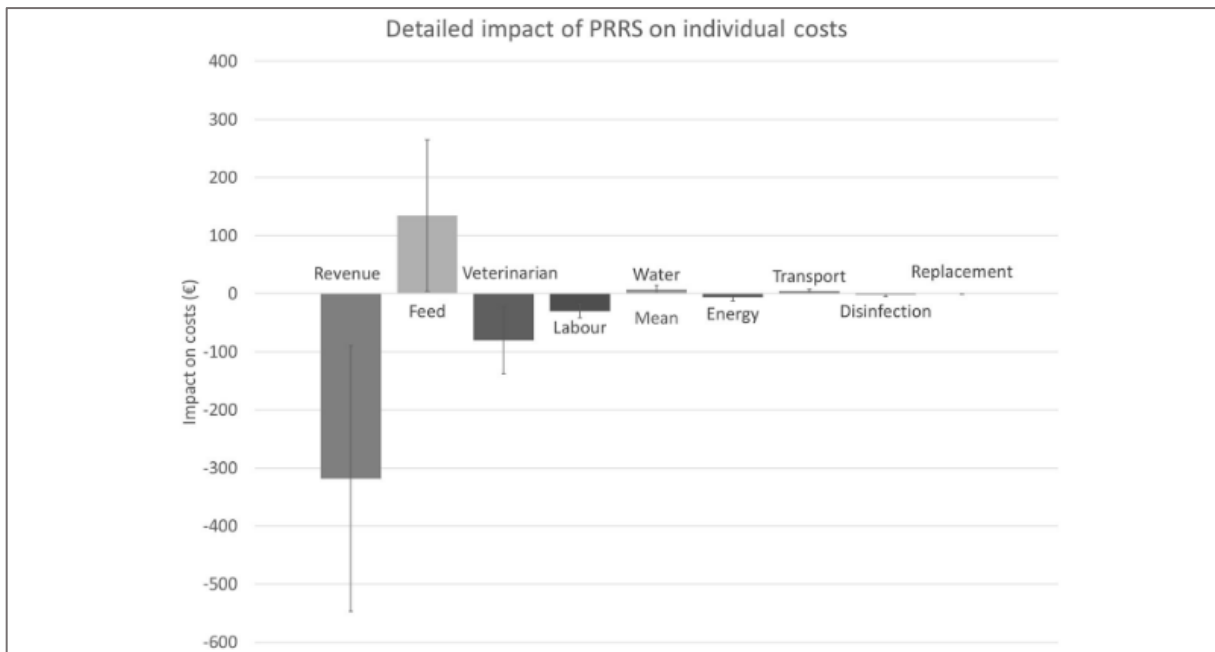


Figure n°17 : Impact détaillé du SDRP sur les coûts de production. Les valeurs négatives indiquent les pertes, les valeurs positives indiquent les dépenses épargnées. Source : Renken et al. 2021

Une autre étude plus récente, se basant sur un modèle épidémiologique et économique comprenant les pertes et dépenses d'un élevage porcin de 1000 porcs à l'engrais, a montré les résultats suivants en termes de pertes annuelles (Nathues et al. 2017) :

- 75 724 € en moyenne, pour un intervalle de confiance à 90 % de [78 885 € - 122 946 €] si l'exploitation était légèrement affectée dans les phases de nurserie et d'engraissement

- 650 090 € en moyenne, pour un intervalle de confiance à 90 % de [603 585 € - 698 379 €] si l'exploitation était gravement affectée à toutes les étapes de production.

En Europe, d'après une revue récente de la Commission Européenne (Commission Européenne 2021), les revenus moyens, calculés à partir du FNVA⁴, d'une exploitation porcine sont de :

- 83 300 euros de bénéfice de production, soit 86% du revenu de l'exploitation
- 13 000 euros de subventions, soit 14% du revenu de l'exploitation

Le syndrome dysgénésique respiratoire porcin peut donc grandement affecter le revenu d'une exploitation.

Une des stratégies de lutte contre le PRRSV actuellement employée repose sur la vaccination des truies et des porcelets. Les vaccins vivants atténués sont les plus utilisés, on compte notamment contre le PRRSV de type 1 : Porcilis PRRS de Merck, Ingelvac PRRSFLEX EU de Boehringer Ingelheim, Amervac-PRRS de Hypra, Pyrsvac-183 de Syva et contre le PRRSV de type 2, Fosterera PRRS de Zoetis, Ingelvac PRRS MLV/Ingelvac PRRSATP de Boehringer Ingelheim (Montaner-Tarbes et al. 2019).

Cependant, ces vaccins vivants atténués ne fournissent pas une protection complète en raison de la grande variabilité des souches de PRRSV et présentent un risque de recombinaison avec les souches sauvages, voire un risque de réversion et donc de virulence pour l'hôte (Pileri, Mateu 2016).

⁴ Le FNVA, ou *Farm Net Value Added*, correspond au revenu brut de l'exploitation agricole moins les coûts de dépréciation. Elle sert à rémunérer les facteurs fixes de production (travail, terre et capital), qu'ils soient externes ou familiaux. Ainsi, les exploitations agricoles peuvent être comparées, qu'elles utilisent des facteurs de production familiaux ou non. La formule est la suivante : bénéfices sur les produits + subventions de l'UE et de la PAC + toutes subventions nationales + solde de TVA – consommation intermédiaire – impôts agricoles (les impôts sur le revenu ne sont pas inclus) – dépréciation.

La valeur est calculée par unité de travail annuel (UTA) afin de tenir compte des différences d'échelle entre les exploitations et d'obtenir une meilleure mesure de la productivité de la main-d'œuvre agricole. La consommation intermédiaire désigne les intrants agricoles (aliments), l'énergie (carburant des machines, électricité, gaz, etc.) ; les produits et services (eau, vétérinaire, maintenance, etc.) et les fournitures (produits de nettoyage, petit outillage, etc.).

Les vaccins inactivés, quant à eux, sont plus fiables mais la réponse immunitaire associée à leur utilisation est moindre comparée à celle provoquée par les vaccins vivants atténués. (Pileri, Mateu 2016).

Devant les problématiques que posent les vaccins disponibles sur le marché, une nouvelle approche par génie génétique, cette fois-ci concentrée sur l'hôte, est explorée. En effet, les nouvelles technologies d'édition génomique ont fait leur preuve dans l'élaboration de porcs résistants au PRSSV. Cela a été rendu possible par la connaissance des mécanismes d'attachement, de pénétration et de réplication du PRSSV dans les macrophages alvéolaires pulmonaires.

Jusqu'à présent, les protéines membranaires que sont l'héparine sulfate, la sialoadhésine, le CD163, le CD151 et la vimentine ont été identifiées comme des récepteurs importants pour l'infection des cellules pulmonaires alvéolaires par le PRSSV (Shi et al. 2015).

Toutefois, toutes ne sont pas essentielles à l'infection virale. Un *knock-out* de la sialoadhésine ne montre par exemple aucune différence sur l'attachement et l'internalisation du virus, l'expression de signes cliniques ou la virémie (Prather et al. 2013).

L'héparine sulfate pourrait représenter une cible de choix pour l'édition génomique car, sans être essentiel, ce glycosaminoglycane de la membrane plasmique cellulaire permet l'attachement du virus aux macrophages alvéolaires. En effet, l'emploi d'héparine pour saturer ce récepteur, ou d'une héparinase I, provoquant une séparation de l'héparine sulfate de son ligand, sur une culture cellulaire de macrophages alvéolaires mis au contact du PRSSV1 ou PRSSV2, induit une résistance supérieure à 88% pour le génotype 1 et 92% pour le génotype 2 (Delputte, Costers, Nauwynck 2005). Extrapoler cette technique testée avec des cellules en culture sur du vivant paraît pour autant complexe.

La vimentine, quant à elle, joue un rôle dans l'attachement et l'endocytose du virus. Cependant, son rôle précis n'est pas encore déterminé, et son expression à la membrane cellulaire des cellules pulmonaires alvéolaires varie au cours du temps (Shi

et al. 2015), ce qui en fait une cible complexe pour l'acquisition de résistance au PRRSV.

Le récepteur CD151 représente un acteur important dans l'infection par le PRRSV. Une étude a montré qu'induire l'expression de cette protéine membranaire dans des cellules qui n'en sont naturellement pas pourvues les rend sensibles à l'infection virale (Shanmukhappa, Kim, Kapil 2007). Toutefois, au même titre que la vimentine, des études supplémentaires pour caractériser l'implication précise de CD151 dans la réplication virale semblent nécessaires avant d'élaborer des stratégies dirigées contre ce récepteur.

En revanche, l'importance du récepteur CD163 dans l'infection virale en a fait une cible de choix pour l'acquisition d'une résistance au PRRSV par génie génétique. En effet, celui-ci est impliqué dans l'attachement et l'internalisation du virus par endocytose induite par les clathrines membranaires et par macropinocytose via les récepteurs transmembranaires TIM (Cai et al. 2023).

La technique CRISPR-Cas9 a été employée pour l'élaboration d'une lignée de porcs résistants aux deux génotypes viraux du SDRP par *knock-out* du gène codant CD163 (délétion de l'exon 7 de CD163) (Burger et al. 2024).

Pour ce faire, des micro-injections nucléaires de cassettes CRISPR-Cas9 comportant l'allèle codant pour CD163 délété de l'exon 7 ont été réalisées dans des zygotes porcins. Ces zygotes ont ensuite été introduits dans les mères porteuses. La première génération a permis d'obtenir des individus mosaïques, c'est-à-dire qu'ils n'expriment pas le transgène dans toutes leurs cellules. Ils sont ensuite croisés avec des individus sauvages. Les individus hétérozygotes issus de ce croisement et qui expriment le transgène dans la région d'intérêt sont ensuite croisés entre eux. Ce dernier croisement permet l'obtention d'individus homozygotes qui seront qualifiés d'individus fondateurs de lignée.

De tels fondateurs ont été obtenus pour quatre races de porcs : *Landrace*, *Duroc*, *Large White* et *White composite line*.

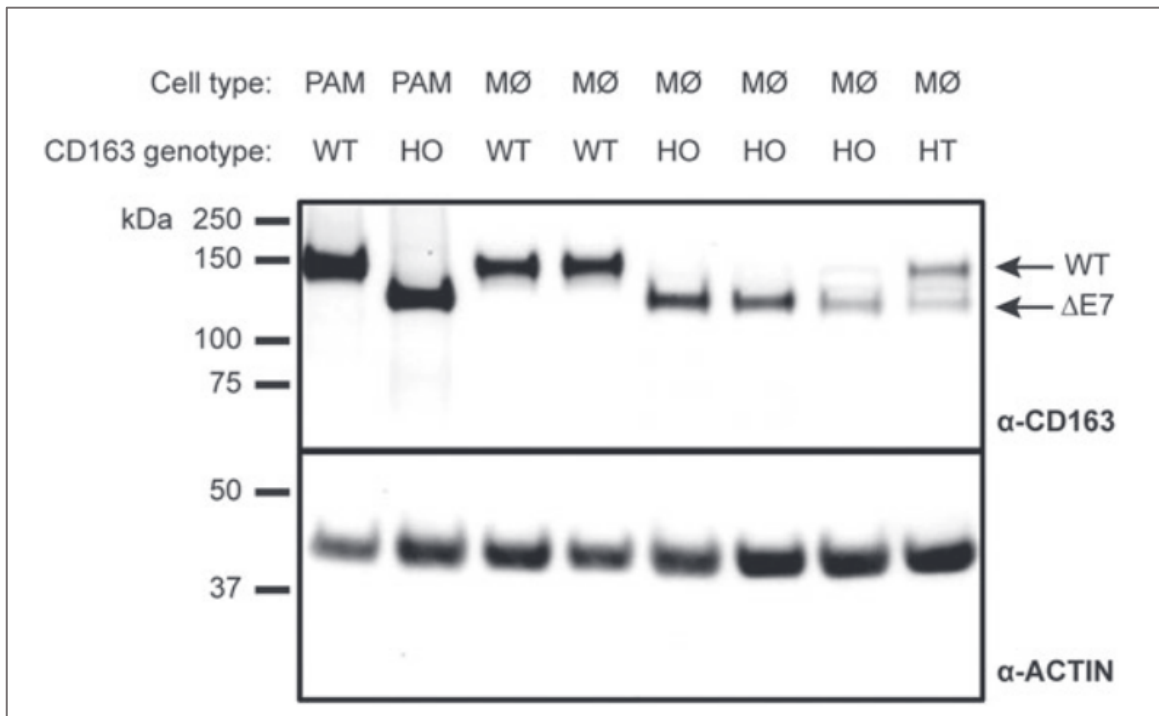


Figure n°18 : Analyse en Western-Blot de l'expression de la protéine CD163 dans les macrophages alvéolaires (PAM) et les monocytes activés (MØ). On note chez les individus sauvages (WT) une bande autour de 150 kDa correspondant à la protéine CD163 intégrée. Chez les homozygotes mutés (HO), on observe une bande inférieure à 150 kDa correspondant à la taille de la protéine CD163 déléetée de l'exon 7. Les individus hétérozygotes (HT) présentent deux bandes correspondant à la protéine CD163 intégrée et déléetée respectivement de taille supérieure et inférieure à 150 kDa. Source : Burger et al. 2024.

Comme l'indique la figure n°18, la déléetion de l'exon 7 est bien présente sur la protéine CD163 chez les individus homozygotes mutés, qui ne montrent pas de protéine CD163 intégrée dans leur profil d'expression. Les individus sont donc mutés dans toute la population de cellules étudiées.

L'épreuve aux PRRSV de type I et II a donné les résultats suivants :

| <i>Virus</i> | <i>Line</i> | <i>No. animals</i> | <i>CD163 genotype</i> | <i>Viral replication^a</i> | <i>PRRSV antibody^b</i> |
|------------------------|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| SD03-15 (Type I) | C | 8 | HO | neg | neg |
| | C | 8 | UE | pos | pos |
| | L | 7 | HO | neg | neg |
| | LW | 6 | HO | neg | neg |
| | LW | 7 | UE | pos | pos |
| | D | 7 | HO | neg | neg |
| | D | 3 | UE | pos | pos |
| NVSL 97-7895 (Type II) | C | 9 | HO | neg | neg |
| | C | 8 | UE | pos | pos |
| | L | 8 | HO | neg | neg |
| | LW | 3 | HO | neg | neg |
| | LW | 9 | UE | pos | pos |
| | D | 7 | HO | neg | neg |
| | D | 3 | UE | pos | pos |

Tableau n°7 : Épreuve à un PRRSV de type I (virus SD03-15) et à un PRSSV de type II (NVSL 97-7895) chez des individus non modifiés génétiquement (UE) et chez des individus homozygotes mutés (HO) sur la protéine CD163, pour les 4 races étudiées (C, white composite line ; L, Landrace ; LW, Large White ; D, Duroc). Les individus sauvages (UE) ont montré une réplication virale (mesurée par PCR quantitative) et des anticorps dirigés contre les deux types de PRRSV (mesurés par ELISA). Les individus homozygotes mutés n'ont montré aucune réplication virale ni anticorps dirigés contre les deux types de PRRSV. Source : Burger et al. 2024.

Les données sur ces lignées créées par la société *Genus*[®] ont d'ailleurs été soumises à l'approbation par la Food and Drug Administration aux États-Unis et des demandes d'autorisation de mise sur le marché ont été formulées en Colombie et au Brésil en 2024. Enfin, une évaluation réglementaire est actuellement effectuée en Chine (*Genus plc.*, 2024).

D'autres stratégies pour induire un *knock-out* de CD163 ont été expérimentées. Elles sont mentionnées dans le tableau n°4 : Whitworth et al. 2016; Wells et al. 2017; Burkard et al. 2017; 2018; Yang et al. 2018; Guo et al. 2019; Xu et al. 2020

L'étude de Yang et ses collaborateurs peut être évoquée (Yang et al. 2018). En effet, ils sont parvenus à générer des individus *knock-out* pour le gène codant la protéine CD163 résistants à la souche hautement pathogène du PRRSV de type II (HP-PRRSV). Leurs résultats sont illustrés sur la figure n°19.

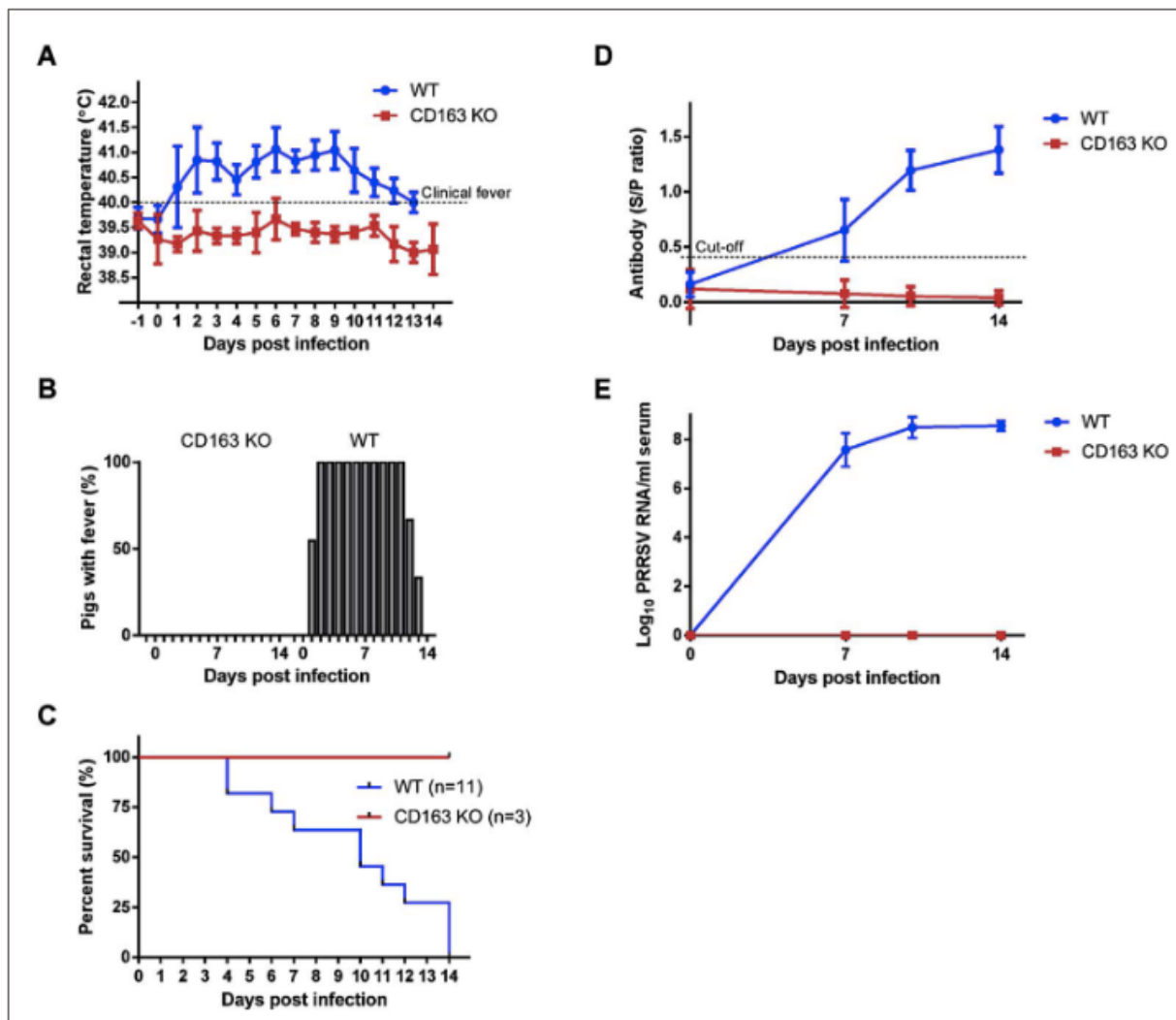


Figure n°19 : Épreuve au HP-PRRSV des porcs CD163KO. (A) Température rectale des populations sauvages et CD163KO après infection au HP-PRRSV. (B) Pourcentage de porcs ayant présenté de la fièvre post-infection (considérée comme telle pour une valeur supérieure à 40°C). (C) Courbes de survie des porcs sauvages (n = 11) et CD163KO (n = 3) après infection au HP-PRRSV. (D) Valeurs moyennes des anticorps sériques dirigés contre le PRRSV chez les deux populations. 0,4 indiquant la valeur seuil de positivité. (E) Valeurs moyennes de concentrations nucléiques du PRSSV inoculé dans le sérum des deux populations. La variation est exprimée comme l'erreur standard de la moyenne. Aucune variation n'a été montrée pour les concentrations nucléiques de PRRSV chez les porcs CD163 KO car aucun ARN viral n'a été détecté. Source : Yang et al. 2018

Cette même étude a d'ailleurs prouvé que l'induction d'un KO de ce gène n'altère pas la fonction des macrophages chez les individus homozygotes mutés. En revanche, l'étude n'a pas porté sur l'établissement d'une lignée. En effet, la portée de porcs mutés a été obtenue par transfert de noyau de cellules somatiques préalablement mutées *in vitro* (cf. paragraphe I.1.d.).

PESTE PORCINE AFRICAINE

Une autre affection sévissant dans les élevages en Europe et dans le monde est la peste porcine africaine. C'est une maladie hautement mortelle pour les suidés européens (porcs et sangliers) et affectant de façon asymptomatique les suidés sauvages (phacochères et potamochères). Elle est due à un virus ADN double-brin enveloppé du genre *Asfivirus* de la famille des *Asfiviridae* transmis par contact direct (par un congénère infecté ou par les tiques molles du genre *Ornithodoros*) ou indirect (environnement ou aliments souillés) (Weng 2024). Les cellules sensibles à l'infection virale sont principalement les cellules dendritiques et les macrophages (Franzoni, Dei Giudici, Oggiano 2018).

Cliniquement, la peste porcine africaine se manifeste par un syndrome hémorragique, une hyperthermie, de l'érythème cutané, de l'anorexie, de la léthargie, des troubles de la coordination, des vomissements ou des diarrhées (Sánchez-Vizcaíno et al. 2009). La présentation est similaire à celle de la peste porcine classique (CSV), c'est pourquoi il est nécessaire de mener des analyses virologiques ou sérologiques pour différencier la forme africaine de la forme classique.

Cette maladie a été pour la première fois identifiée en 1921 au Kenya et se limitait au continent africain jusque dans les années 1950 où elle atteignait l'Europe et l'Amérique du Sud. Dans l'Union Européenne, le virus de la peste porcine africaine a été pour la première fois observé en 2014 en Pologne et dans les pays baltes dans des populations porcines domestiques et sauvages (European Food Safety Authority (EFSA) et al. 2024). La publication de Mary Louise Penrith et Fredrick Mathias Kivaria retrace de façon plus exhaustive l'histoire de la découverte et de la propagation de la peste porcine africaine et des premières recherches sur des protocoles de vaccination (Penrith, Kivaria 2022).

La propagation de cette maladie, en dépit des mesures de biosécurité recommandées par les instances européennes, s'est principalement faite par les échanges commerciaux intercontinentaux en porcs et viande porcine, les mouvements de faune sauvage étendant les territoires déjà infectés et l'absence d'une technique d'immunisation efficace des populations sensibles (Barasona et al. 2019).

En 2020, la Belgique fût le deuxième pays état-membre de l'Union Européenne parvenu à l'éradication totale de la peste porcine africaine au sein de son territoire par la mise en œuvre de mesures rigoureuses à la suite de la découverte de cas chez des sangliers en 2018. Ces mesures comprenaient une surveillance sanitaire passive, une sensibilisation et la coopération de tous les acteurs pouvant être impliqués (vétérinaires, agriculteurs, chasseurs) ainsi que les pays voisins, dont la France métropolitaine. Le communiqué du 20 novembre 2020 de la Commission Européenne a alors permis de lever les restrictions s'appliquant à la Belgique en matière de contrôle et d'éradication de l'épidémie.

Les derniers rapports de la EFSA recensent en 2023 10 états membres de l'Europe affectés par des épidémies de peste porcine africaine au sein des élevages de porcs domestiques et 14 états membres au sein de la faune sauvage (sangliers). Les figures n°20 et 21 en illustrent la répartition sur le continent.

2023

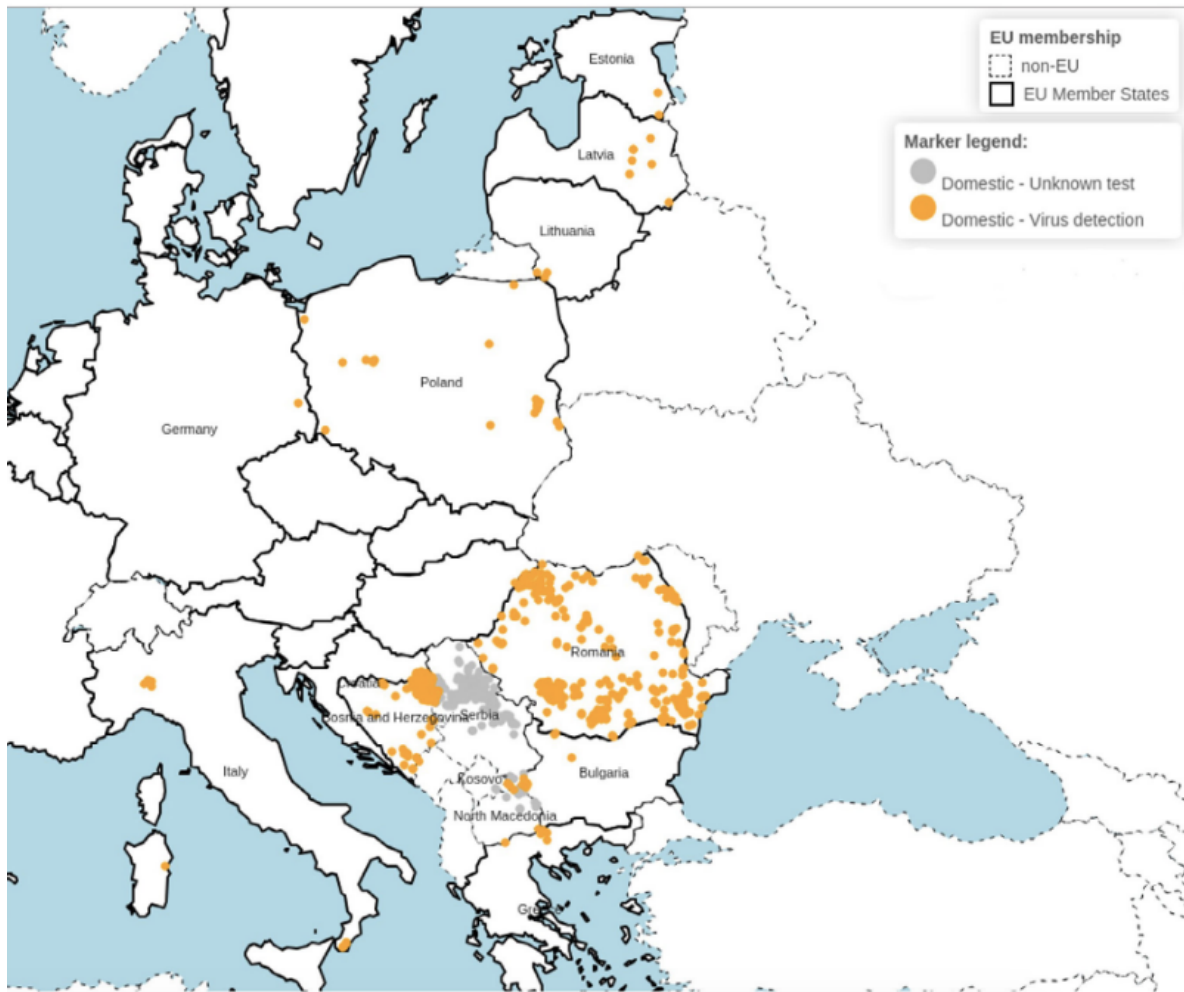


Figure n°20 : Distribution spatiale des foyers d'épidémie de peste porcine africaine parmi les élevages de porcs domestiques (en gris les foyers hors Union Européenne dont les résultats de tests ne sont pas accessibles, en orange les foyers identifiés par détection virale). Source : European Food Safety Authority (EFSA) et al. 2024

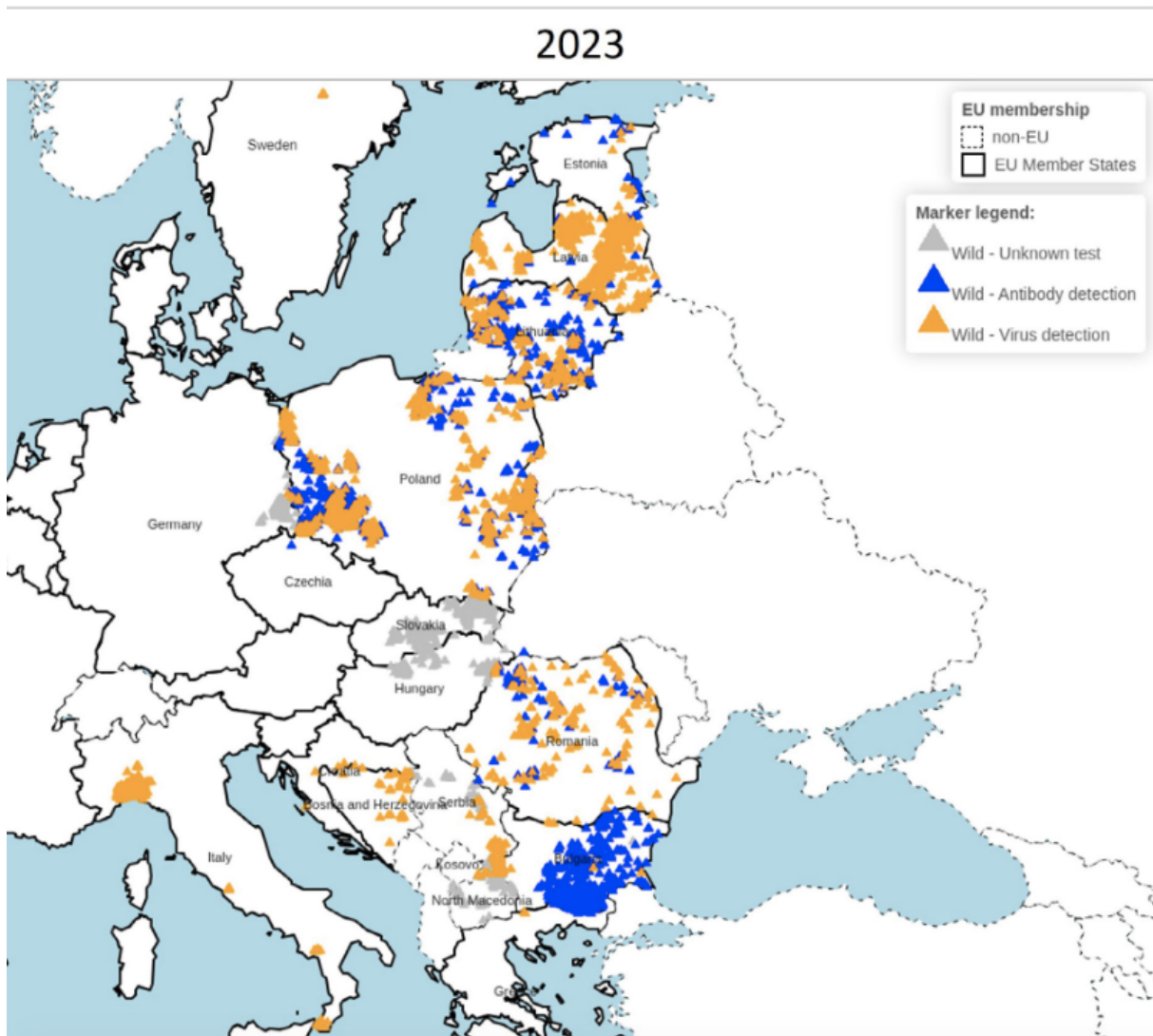


Figure n°21 : Distribution spatiale des foyers d'épidémie de peste porcine africaine parmi les populations de sangliers. 56% des foyers ont été détectés par détection virale (PCR, triangles jaunes), 21% par détection des anticorps (sérologie, triangles bleus) et 23% des foyers sont sans tests rapportés. Source : European Food Safety Authority (EFSA) et al. 2024

La Chine est le premier pays producteur et importateur de viande de porc avec une production de 52 millions de tonnes en 2022, représentant 44,15% de la production mondiale en porc (Wang, Li 2024). Cette production est en hausse depuis les années 2010 avec une intensification du système de production et une augmentation constante des élevages de grande échelle (Wang, Li 2024), comme l'illustre la figure n°22.

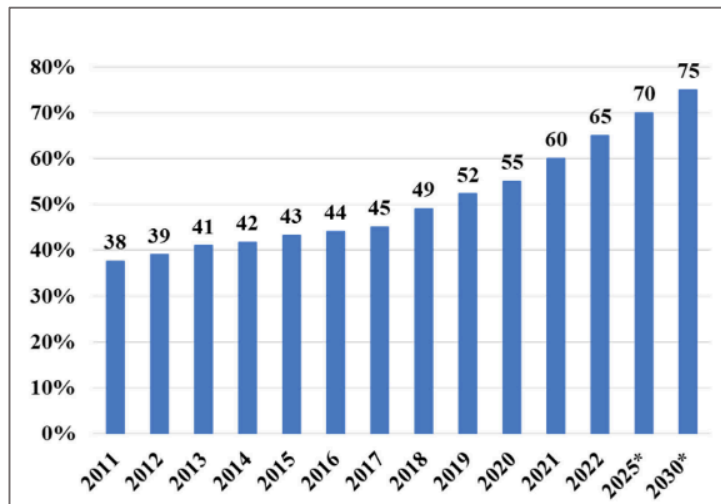


Figure n°22 : Évolution de la proportion d'élevages porcins de grande échelle (supérieurs à 800 animaux) en Chine. Source : Wang, Li 2024

La première épidémie de peste porcine africaine en Chine a été recensée en 2018. Depuis, le pays présente fréquemment de nouveaux foyers d'épidémie. La figure n°23 localise les foyers rapportés du 16 mai 2024 au 25 juillet 2024 en Chine et dans les pays asiatiques voisins.

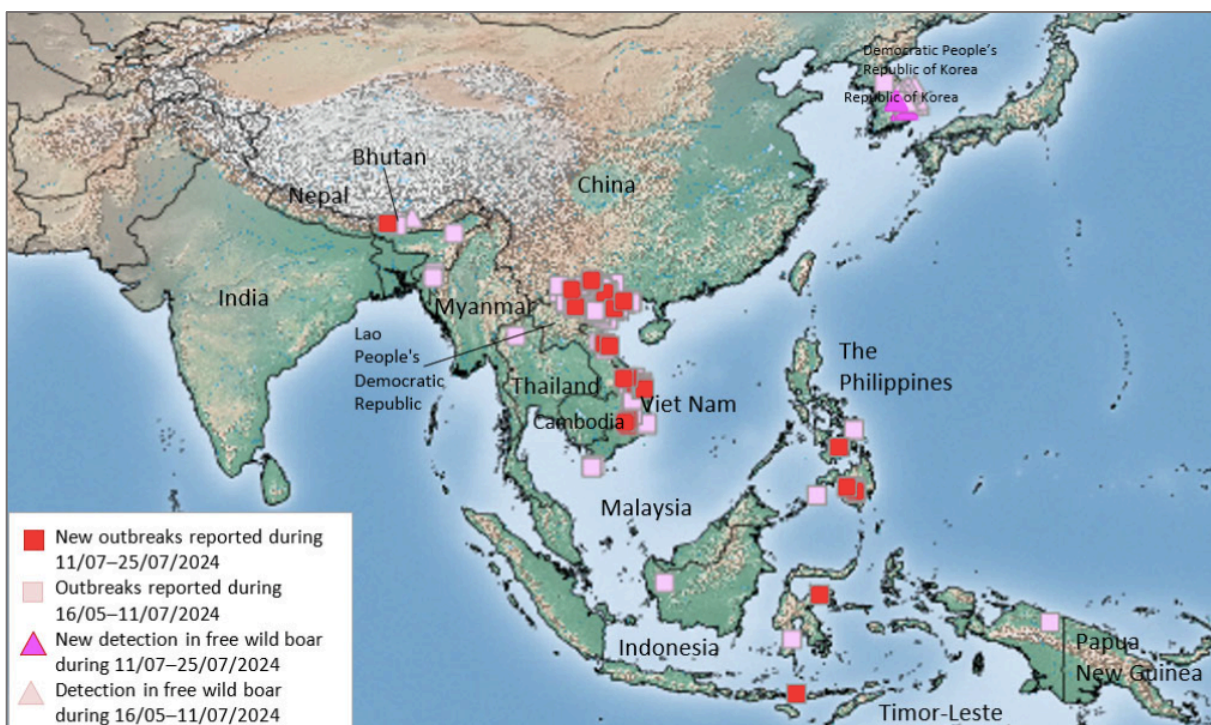


Figure n°23 : Distribution des foyers émergents de peste porcine africaine sur le continent asiatique, rapportés du 16 mai au 11 juillet 2024 (carré rose pâle) puis nouvellement rapportés du 11 juillet au 25 juillet 2024 (carré rouge) ainsi que des cas de détection dans la faune sauvage rapportés du 16 mai au 11 juillet 2024 (triangle rose), et nouvellement rapportés du 11 juillet au 25 juillet 2024 (triangle rose pâle). Source : Interface WAHIS de l'OIE, consulté le 08/08/24.

Les conséquences économiques de ces foyers sur la production porcine en Chine et dans les pays voisins sont estimées à plusieurs milliards de dollars. Les pertes estimées sont relatées dans le tableau n°8 :

| Country | Initial Stock Losses (\$ million) | | Replacement Breeders (\$ million) | | Revenue Forgone (\$ million) | | Total (\$ million) | |
|--------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------|---------------------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper |
| PRC | 24,956 | 41,594 | 3,851 | 6,543 | 21,486 | 72,981 | 50,293 | 121,118 |
| Cambodia | 108 | 180 | 8 | 14 | 44 | 152 | 160 | 346 |
| Lao PDR | 217 | 361 | 5 | 8 | 25 | 86 | 247 | 455 |
| Myanmar | 981 | 1,636 | 43 | 73 | 240 | 815 | 1,264 | 2,524 |
| Viet Nam | 1,518 | 2,530 | 168 | 286 | 939 | 3,189 | 2,625 | 6,005 |
| Total | 27,780 | 46,301 | 4,075 | 6,924 | 22,734 | 77,223 | 54,589 | 130,448 |

Tableau n°8 : Estimation des coûts directs de la peste porcine africaine sur la production porcine par pays du mois d'août 2018 au mois d'août 2019 (PRC : République Populaire de Chine ; LAO PDR : République Démocratique Populaire du Laos). Source : Weaver, Habib 2020

Une étude par modélisation a montré l'impact de la peste porcine africaine sur le prix des viandes en Chine selon le modèle suivant :

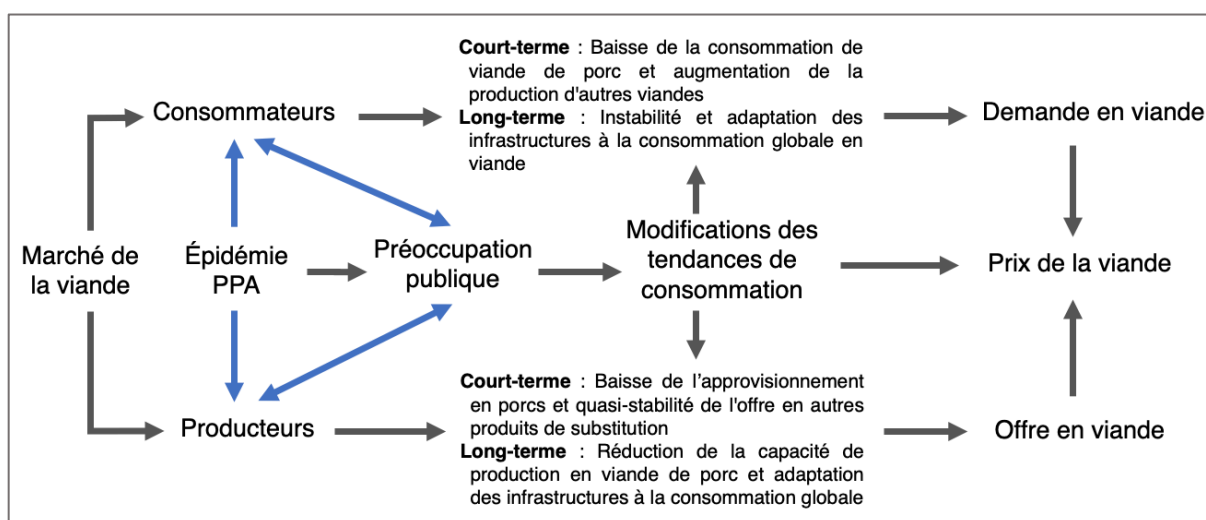


Figure n°24 : Modélisation de l'impact de la peste porcine africaine sur la demande, l'offre et les prix en viande, d'après Li et al. 2021.

Ainsi, les variations de prix en yuan (monnaie chinoise) par kilogramme de viande ont été estimées pour les 4 phases : début de l'épidémie, propagation, rebond et déclin des foyers de peste porcine africaine.

| Period ¹⁾ | | Mean | SD | Min | Max |
|----------------------|---------|--------|-------|-------|-------|
| I | Pork | 21.995 | 1.268 | 19.94 | 23.61 |
| | Chicken | 19.068 | 0.434 | 18.45 | 19.66 |
| | Beef | 64.729 | 0.652 | 63.94 | 65.72 |
| | Mutton | 61.510 | 0.850 | 60.65 | 63.06 |
| II | Pork | 23.336 | 0.545 | 22.36 | 24.33 |
| | Chicken | 20.163 | 0.276 | 19.65 | 20.71 |
| | Beef | 68.293 | 1.345 | 65.85 | 70.68 |
| | Mutton | 68.099 | 2.387 | 63.45 | 71.46 |
| III | Pork | 25.413 | 1.138 | 24.54 | 28.11 |
| | Chicken | 20.504 | 0.304 | 20.05 | 20.98 |
| | Beef | 68.999 | 0.610 | 68.25 | 70.32 |
| | Mutton | 68.524 | 0.370 | 68.09 | 69.47 |
| IV | Pork | 44.879 | 9.582 | 28.78 | 58.71 |
| | Chicken | 24.351 | 1.816 | 21.15 | 26.92 |
| | Beef | 78.528 | 3.934 | 70.70 | 82.41 |
| | Mutton | 76.125 | 3.496 | 69.76 | 79.99 |

¹⁾ I, II, III and IV, represent four stages including African swine fever (ASF) outbreak, diffusion, rebound and decline periods, respectively.

Tableau n°9 : Modélisation des prix (yuan par kg) du marché chinois en viande de porc, poulet, bœuf et mouton en phase de début d'épidémie (I) ; de propagation (II) ; de rebond (III) et de déclin (IV) des foyers de peste porcine africaine. Source : Li et al. 2021

L'impact économique de la peste porcine africaine à travers le monde est donc conséquent et justifie la mise en place de mesures pour endiguer l'épidémie.

En Europe, des mesures de lutte ont été entreprises sous les recommandations des instances telles que la Commission Européenne, par le biais de l'EFSA (European Food Safety Authority). Le dernier rapport paru le 24 avril 2024 fournit un exemple de stratégie de sortie pour les pays affectés s'articulant en deux phases :

- Phase de dépistage : surveillance passive de la population de sangliers par test sur les carcasses découvertes
- Phase de confirmation, de durée plus courte : surveillance active par abattage et test sur sangliers

Le rapport du 24 avril 2024 rappelle également les points suivants :

- Un recensement à jour des établissements de porcs est essentiel pour permettre un contrôle rapide de la maladie et éviter une propagation rapide, comme observé dans les zones frontalières de la Croatie, de la Bosnie-Herzégovine et de la Serbie.
- Les bonnes pratiques en matière de génotypage du virus, l'augmentation du nombre d'isolats séquencés et le partage rapide des données de séquence,

sont recommandées pour accroître les connaissances et la capacité à tracer les isolats à des échelles plus fines.

- La coopération stimulante des pays affectés avec l'EFSA observée cette année (et les années précédentes), y compris la soumission en temps opportun des données épidémiologiques comme décrit dans les directives sur la PPA, est essentielle et devrait se poursuivre dans les années à venir pour assurer une évaluation précise et exacte de la situation épidémiologique et la formulation de recommandations adaptées.

Plusieurs tests de détection de la peste porcine africaine sont disponibles (Muzykina et al. 2024). Les plus utilisés sont le test d'hémadsorption, l'amplification par PCR, l'ELISA sur anticorps dirigés contre le virus, et l'ELISA sur antigènes viraux.

Le test d'hémadsorption détecte la présence du virus par la liaison des érythrocytes à la membrane externe des macrophages infectés. Il présente l'inconvénient de se faire sur culture cellulaire primaire, le résultat du test est donc obtenu au bout d'une semaine environ suivant le prélèvement. D'autre part, des résultats faussement négatifs peuvent survenir, nécessitant une confirmation par PCR (Kim et al. 2020).

Le test d'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de séquences ADN virales est le test avec la meilleure sensibilité et spécificité à condition d'avoir des amorces spécifiques pour la souche virale recherchée (Olesen et al. 2022).

Les tests de dosage par ELISA des anticorps dirigés contre l'ASFV recherché ou des antigènes viraux sont moins sensibles que la PCR. Le meilleur test ELISA commercialisé actuellement, le INgezim PPA DAS K2, (Gold Standard Diagnostics, Madrid, Spain), montre une bonne corrélation avec les résultats de PCR mais une sensibilité de 77,2% contre environ 100% pour la PCR (Olesen et al. 2022).

Ils présentent néanmoins l'avantage d'être moins coûteux et permettent d'obtenir des résultats plus rapidement. De plus, les animaux deviennent séropositifs en anticorps 7 à 10 jours après l'infection. L'ELISA avec anticorps ne se positive donc pas avant cette phase de latence (Muzykina et al. 2024).

Concernant les élevages domestiques, il est également conseillé de renforcer la surveillance passive et d'accorder moins de ressources à la surveillance active. Dans les zones à risque, l'EFSA recommande de procéder à un échantillonnage hebdomadaire sur plusieurs porcs décédés spontanément dans l'établissement.

En France, le réseau SAGIR est dédié au signalement des carcasses de faune sauvage (surveillance passive) et agit comme sentinelle dans le suivi de l'évolution de la peste porcine africaine sur le territoire. Il a notamment permis d'exercer une surveillance accrue à la frontière belge lors de l'épizootie sévissant en Belgique en 2020.

Les différentes méthodes de surveillance, associées aux tests diagnostiques disponibles, ne sont pas les seuls moyens de lutte explorés ce jour. De nombreuses publications promeuvent des vaccins vivants atténués, ou à vecteur viral ou ADN depuis 2013. Bien que cette stratégie de lutte semble optimale, les recherches sont encore en phase de développement et aucun vaccin n'est encore commercialisé.

Le tableau n°10, d'après la publication de Chu et al. 2024, recense ces travaux de recherche menés sur la vaccination contre la peste porcine africaine de 2013 à 2023.

| Année | Souche virale | Publications |
|-------|-----------------------|------------------------|
| 2013 | OUR T88/3ΔDP2 | Abrams et al. 2013 |
| 2015 | ASFV-G-ΔMGF | O'Donnell et al. 2015 |
| 2015 | ASFV-G-Δ9GL | O'Donnell et al. 2015 |
| 2016 | ASFV BeninΔMGF | Reis et al. 2016 |
| 2017 | ASFV-G-Δ9GL/ΔUK | O'Donnell et al. 2017 |
| 2017 | BA71ΔCD2 | Monteagudo et al. 2017 |
| 2018 | ASFV NH/P68ΔA238L | Gallardo et al. 2018 |
| 2018 | ASFV NH/P68ΔA224L | Gallardo et al. 2018 |
| 2018 | ASFV NH/P68ΔEP153R | Gallardo et al. 2018 |
| 2019 | ASFV SY18ΔMGF | Zhang Y et al. 2019 |
| 2019 | ASFV SY18ΔMGF/CD2v | Zhang Y et al. 2019 |
| 2019 | ASFV CN2018 ΔMGF/CD2v | Unpublished data |
| 2020 | ASFV-G-ΔI177L | Borca et al. 2020 |
| 2020 | ASFV HLJ/-18-7GD | Chen et al. 2020 |
| 2020 | ASFV HLJ/-18-6GD | Chen et al. 2020 |

| Année | Souche virale | Publications |
|-------|----------------------------|-----------------------------|
| 2020 | ASFV-SY18-ΔCD2v/UK | Tecklue et al. 2020 |
| 2021 | ASFVΔI267L | Zhang et al. 2021b |
| 2021 | ASFV SY18ΔI226R | Zhang et al. 2021a |
| 2021 | ASFV-G-ΔA137R | Gladue et al.2021 |
| 2021 | ASFV-Δ7R | Li et al. 2021 |
| 2021 | ASFV BA71ΔCD2DP96R | Lopez et al. 2021 |
| 2021 | ASFV BA71ΔCD2EP153R | Lopez et al. 2021 |
| 2022 | ASFV-G-ΔA151R | Ramirez-Medina et al. 2022 |
| 2022 | ASFV-G-ΔE184L | Ramirez-Medina et al. 2022 |
| 2022 | ASFV Arm-ΔCD2v-ΔA238L | Pérez-Nunez et al. 2022 |
| 2022 | ASFV-G-ΔH108R | Vuono et al. 2022 |
| 2022 | ASFV-Δ9L/Δ7 | Ding et al. 2022 |
| 2022 | ASFV-ΔECM3 | Xie et al. 2022 |
| 2022 | ASFV-G-ΔMGF110-5L-6L | Ramirez-Medina et al. 2022c |
| 2022 | ASFV-ΔQP509L / QP383R | Li et al. 2022 |
| 2023 | ASFV SY18ΔL60L | Yang et al. 2023 |
| 2023 | ASFV-ΔMGF110 / 360-9L | Li et al. 2023a |
| 2023 | ASFV-ΔMGF300-2R | Wang et al. 2023 |
| 2023 | ASFV-GZΔI73R | Liu et al. 2023a |
| 2023 | ASFV-GZΔI177L | Liu et al. 2023b |
| 2023 | ASFV-GZΔI177LΔCD2v | Liu et al. 2023b |
| 2023 | ASFVGZΔI177LΔCD2vΔMGF | Liu et al. 2023b |
| 2023 | ASFV GΔDKE_CmutQ96R/ K108D | Rathakrishnan et al. 2023 |
| 2023 | ASFV-ΔH240R-Δ7R | Li et al. 2023b |

Tableau n°10 : Publications parues dans la littérature scientifique sur des vaccins contre la peste porcine africaine de 2013 à 2023.

Le vaccin vivant atténué ASFV de génotype II Lv17/WB/Rie1n, mis au point par l'équipe de Barasona et al. (2019), est présenté dans la suite du paragraphe en guise d'exemple.

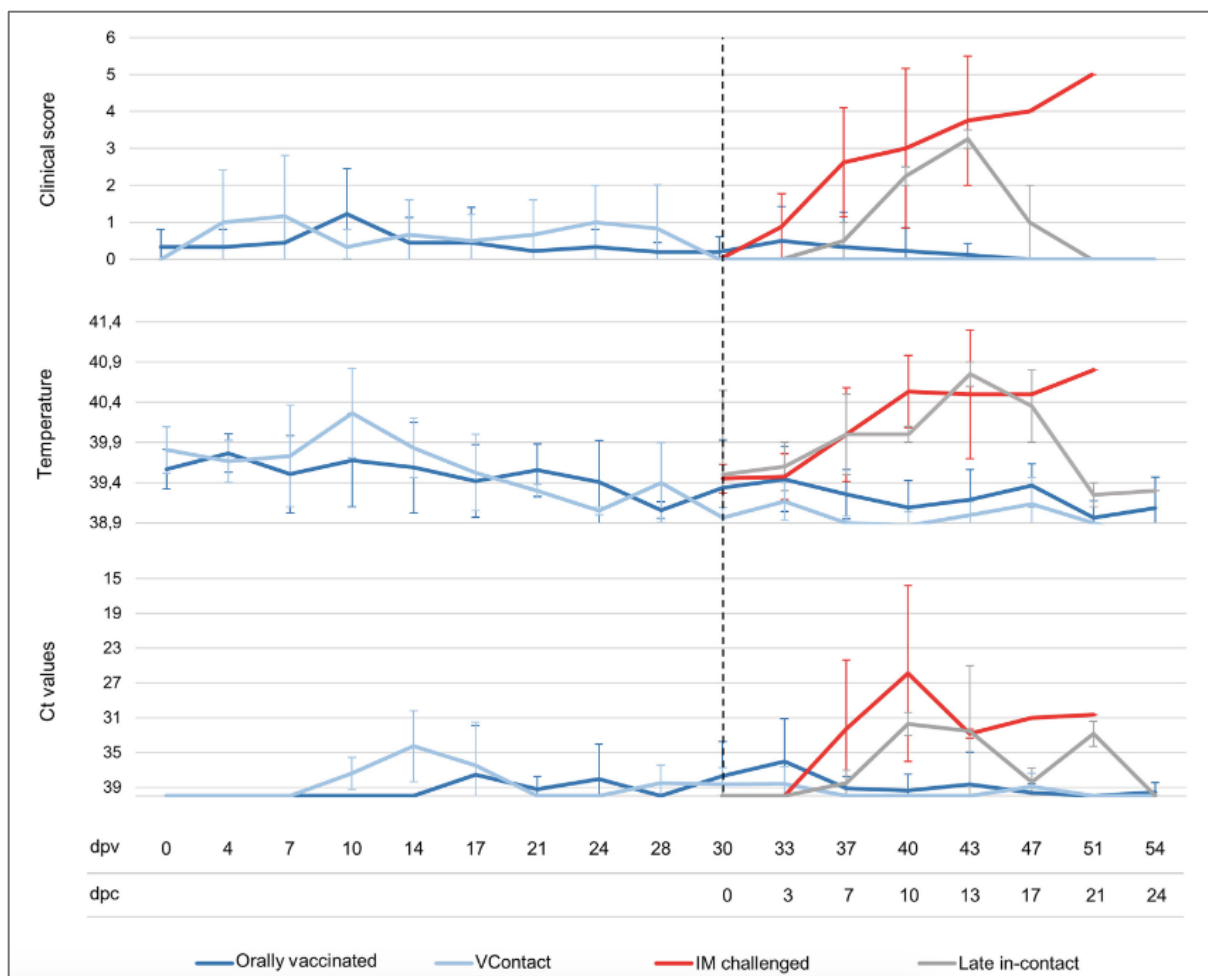


Figure n°25 : Moyenne des scores cliniques, des températures corporelles et des valeurs Ct issues de la PCR en temps réel des sangliers vaccinés par voie orale avec Lv17/WB/Rie1 (*Orally vaccinated*, n = 9; bleu foncé), exposés par contact au vaccin (*VContact*, n = 3; bleu clair), des témoins inoculés par voie intramusculaire inoculés avec l'ASFV virulent Arm07 (*IM challenged*, n = 4; rouge) et des sangliers en contact tardif (*Late in-contact*, n = 2; gris). Les moyennes sont montrées à différents jours post-vaccination (dpv), et les jours post-épreuve (dpc). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type (SD). Source : Barasona et al. 2019

La figure n°25 illustre les résultats obtenus par Barasona et son équipe. Après l'injection intramusculaire du ASFV Arm07, les animaux vaccinés directement ou par contact n'ont pas montré de virémie significativement positive après l'épreuve, sauf de façon sporadique et corrélée à une légère augmentation de la température corporelle. De même, ils ont présenté un taux de survie de 92% (11 animaux sur 12).

Pour déterminer le score clinique, les porcs ont été observés par vidéosurveillance continue et les signes alimentant ce score ont été : la position couchée, l'anorexie, les hémorragies cutanées, la cyanose cutanée, le gonflement des articulations, la

détresse respiratoire, les écoulements oculaires et les signes digestifs (vomissements, diarrhée).

Dans une autre étude de Tran et son équipe, l'évaluation de l'innocuité du vaccin vivant atténué ASFV-G- Δ I177L a été testée par observation des porcs sur 28 jours suivant la vaccination. Aucun des sujets étudiés n'a montré de signes cliniques imputables à la peste porcine africaine, de température corporelle supérieure à 40°C ou d'altération de la prise alimentaire et de l'état de vigilance (Tran et al. 2022).

Les vaccins inactivés se sont révélés inefficaces dans la protection contre une épreuve au virus de la peste porcine (Pikalo et al. 2022).

L'utilisation des nouveaux outils d'édition génomique pour rendre les porcs résistants à l'infection par le virus de la peste porcine africaine est une piste explorée depuis quelques années. Pour cela, il a été nécessaire d'identifier des acteurs importants dans l'infection virale, notamment protéiques.

Le facteur de transcription NF- κ B est connu pour son rôle dans la régulation de la réponse immunitaire, de l'inflammation et de la survie cellulaire. Il est naturellement inhibé par le facteur I κ B mais sous divers signaux, il en est libéré et est transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. La sous-unité p65 (codée par le gène *RELA*) joue un rôle central dans le mode d'action de NF- κ B (Revilla et al. 1998).

La protéine virale A238L de l'ASFV inhibe l'activité du facteur NF- κ B en mimant le mode d'action de l'inhibiteur I κ B par liaison à la sous-unité p65 de NF- κ B. Ainsi, ce dernier ne peut plus être transloqué dans le noyau et activer la transcription de gènes de l'inflammation (Palgrave et al. 2011).

Les séquences codant p65 chez le porc domestique et le phacochère ont été étudiées pour expliquer la différence de réponse clinique à l'infection virale entre ces deux espèces. Ces séquences diffèrent de trois acides aminés sur le site S531P (Palgrave et al. 2011). La modification du site S531P chez le phacochère altère l'affinité de la

protéine A238L pour le facteur NF- κ B, justifiant ainsi une différence de réponse à l'infection par l'ASFV entre le porc domestique et le phacochère (Callegari et al. 2019).

Une première stratégie d'immunisation des porcs domestiques à la peste porcine africaine a donc été de substituer la séquence codant pour p65 (*RELA*) par son orthologue chez le phacochère (*Phacochoerus africanus*) par l'emploi de nucléases à doigts de zinc (Lillico et al. 2016). Cette manipulation est illustré sur la figure n°26.

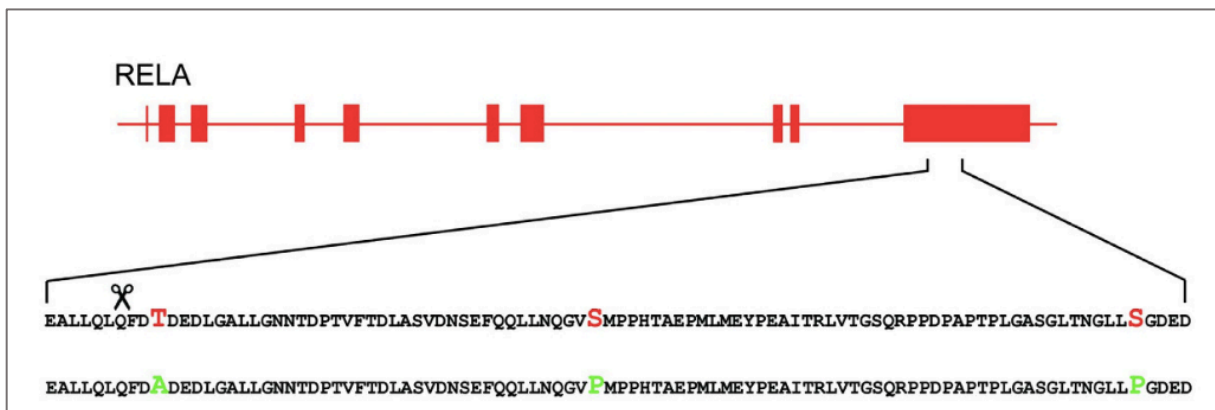


Figure n°26 : Représentation du gène RelA avec les exons représentés par des barres pleines. Une vue agrandie d'une région du dernier exon met en évidence les 3 différences d'acides aminés entre le porc domestique (en rouge) et le phacochère (en vert). Les ciseaux indiquent le site prévu de la cassure double brin. Source : Lillico et al. 2016

Néanmoins, l'épreuve par injection intranasale du virus à des porcs domestiques porteurs de la substitution n'a pas montré de résultats encourageants dans l'acquisition d'une résistance à la peste porcine africaine (cf. Figure n°27), bien que certains individus ait exprimé une présentation clinique plus tardive et une expression virale moindre (McCleary et al. 2020).

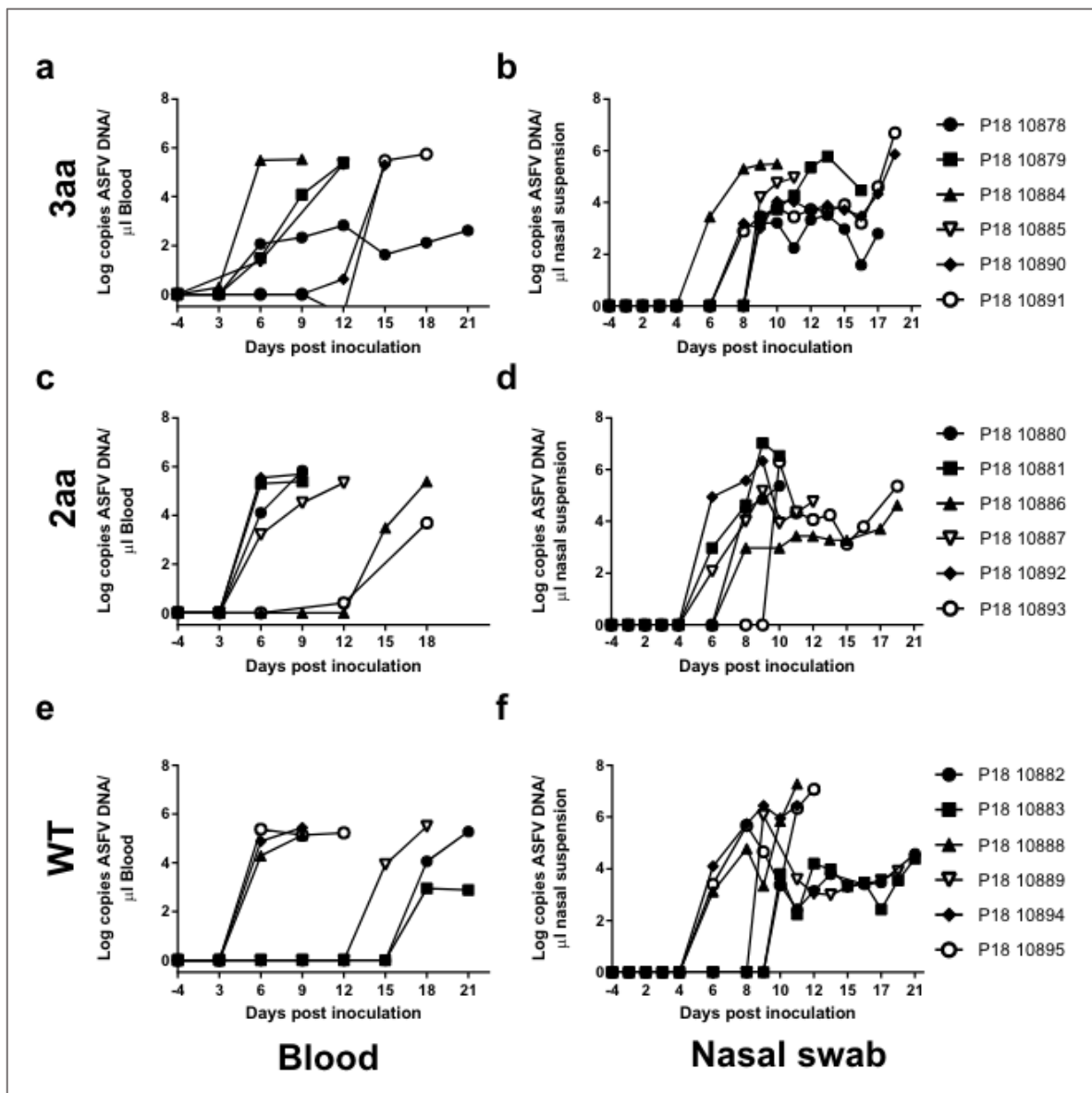


Figure n°27 : Impact des altérations du gène RELA sur la cinétique et le niveau de virémie (a,c,e) et le niveau d'excrétion du virus (b,d,f). Les prélèvements ont été réalisés chez des porcs modifiés sur les 3 acides aminés d'intérêt (a,b), sur 2 des 3 acides aminés d'intérêt (c,d) et chez des porcs domestiques non génétiquement modifiés. Chaque effectif compte 6 individus différents. Les prélèvements ont été analysés par PCR quantitative. Source : McCleary et al. 2020

Une autre stratégie a reposé sur l'altération de la fonction de la phosphoprotéine virale P30. En effet, la phosphoprotéine P30 est impliquée dans l'adhésion par liaison aux récepteurs de surface des macrophages, dans l'entrée du virus dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine, l'évasion immunitaire, et la propagation du virus d'une cellule infectée à une autre en permettant sa sortie par macropinocytose

(Venkateswaran et al. 2024). Toutes ces fonctions en font une cible de choix pour l'usage de biotechnologies.

Pour cela, une lignée de cellules pulmonaires de sanglier a été transfectée avec un plasmide codant pour la protéine Cas9 et un ARN guide ciblant les codons 71 à 78 du gène codant pour la phosphoprotéine P30 de l'ASFV (gène *CP204L*) (Hübner et al. 2018). L'altération de cette protéine a permis l'obtention des résultats suivants :

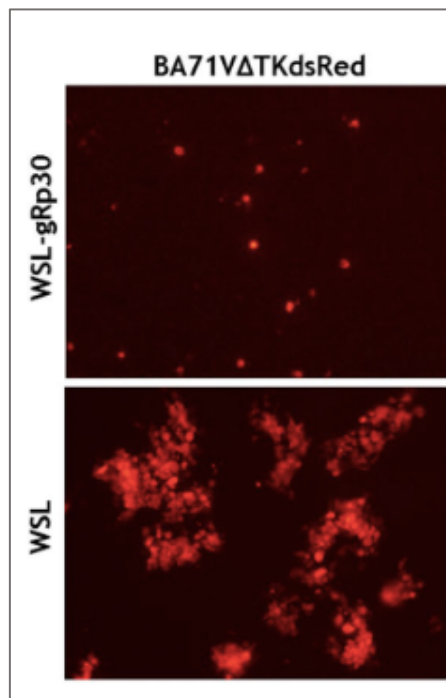


Figure n°28 : Images obtenues par microscopie à fluorescence, sur cellules génétiquement modifiées, c'est-à-dire exprimant la protéine Cas9 et l'ARN guide, et cellules sauvages, 5 jours suivant une infection au ASFVBA71VΔTKdsRed (virus désactivé porteur du marqueur de fluorescence dsRed). Plus la fluorescence est détectée, plus l'infection virale est grande et étendue à plusieurs cellules, formant alors des plaques. Source : Hübner et al. 2018

Cette étude a porté sur des cultures cellulaires. L'objectif à long terme est de parvenir à élaborer des lignées de porcs transgéniques stables, dont la descendance exprimera donc systématiquement dans ses macrophages la protéine Cas9 et l'ARN guide dirigé contre la protéine p30 virale (Hübner et al. 2018).

Une autre stratégie plus récente a cherché à éviter l'échappement immunitaire du virus en ciblant plusieurs régions de son ADN (Zheng et al. 2024). Zheng et son équipe ont ainsi construit un plasmide portant un brin d'ADN avec des séquences codant pour plusieurs ARN guide spécifiques pour des séquences de l'ASFV et séparées entre elles de séquences « ribozymes ». Ces dernières permettent une transcription en un ARN messenger de toutes les séquences. Une fois transcrits, les ARN guides sont assemblés avec des protéines Cas9. Cette construction est appelée « *multiplexed CRISPR-Cas9* ». Elle est illustrée en figure n°29 :

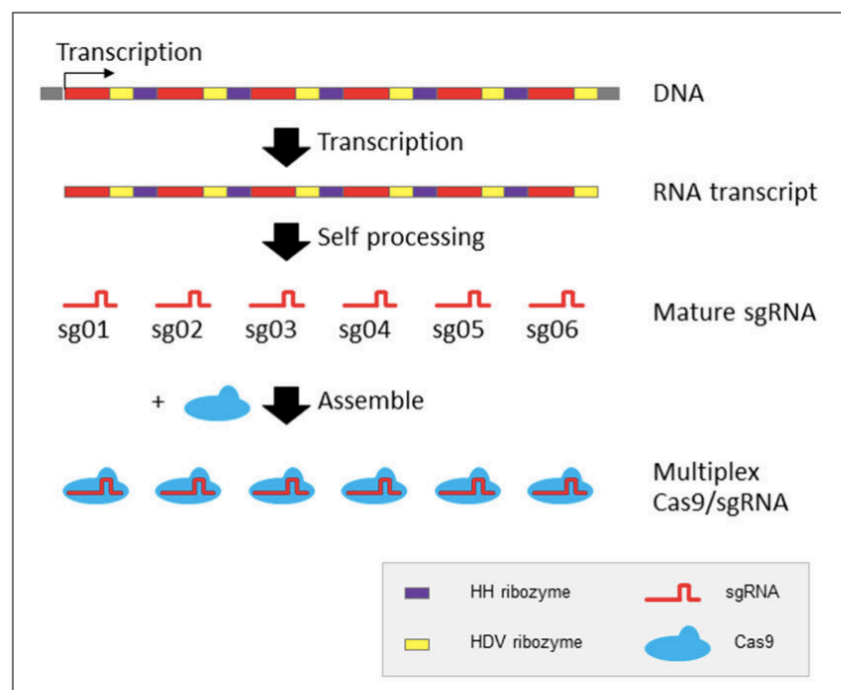


Figure n°29 : Construction de l'ADN codant pour six ARN guides (« sgRNA ») chacun encadré d'un ribozyme HH (permet un clivage en 5') et un ribozyme HDV (permet un clivage en 3'). Les gènes sont transcrits sous un seul promoteur en un ARN messenger et maturés ensuite en six ARN guides. Chacun est assemblé avec une protéine Cas9 pour former le complexe du système CRISPR-Cas9 catalytiquement actif. Source : Zheng et al. 2024

Ils ont ensuite élaboré une lignée de porcs transgéniques exprimant cette construction de façon stable et ont procédé à une épreuve à l'ASFV.

Pour ce faire, la formation des *pool* suivants a été réalisée :

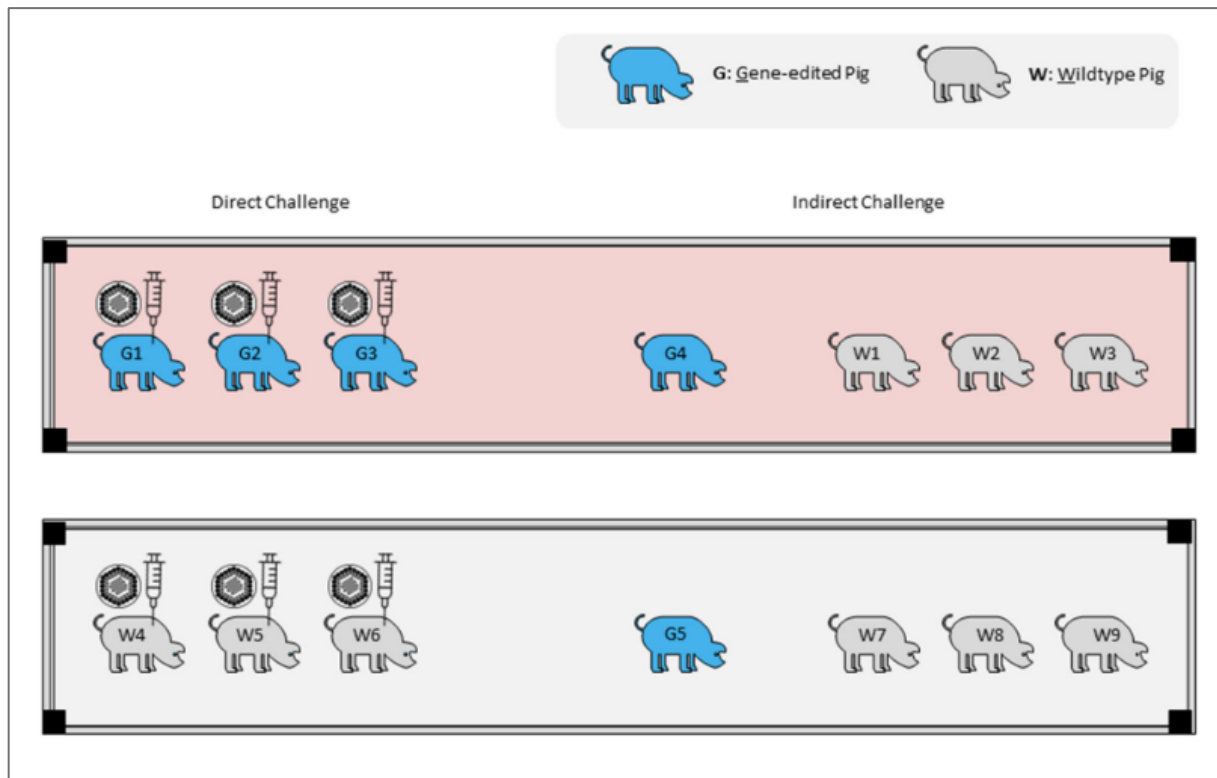


Figure n°30 : Chaque rectangle avec quatre carrés noirs indique une pièce séparée. Dans la pièce en rouge clair, trois porcs modifiés génétiquement (G1, G2, G3) ont été soumis à l'épreuve virale directe par injection intramusculaire. Les quatre autres (dont un transgénique G4 et trois sauvages W1, W2, W3) ont été soumis à l'épreuve virale indirecte par cohabitation avec les trois transgéniques infectés. Tandis que dans la pièce en gris clair, trois porcs de type sauvage (W4, W5, W6) ont été soumis à l'épreuve virale directe par injection intramusculaire. Un porc génétiquement modifié (G5) et trois porcs de type sauvage (W7, W8, W9) ont été soumis à un défi viral indirect par cohabitation avec les trois sauvages infectés. Source : Zheng et al. 2024

La virémie et la durée de survie post-infection ont été étudiées pour les différents groupes. Les résultats obtenus sont illustrés en figure n°31.

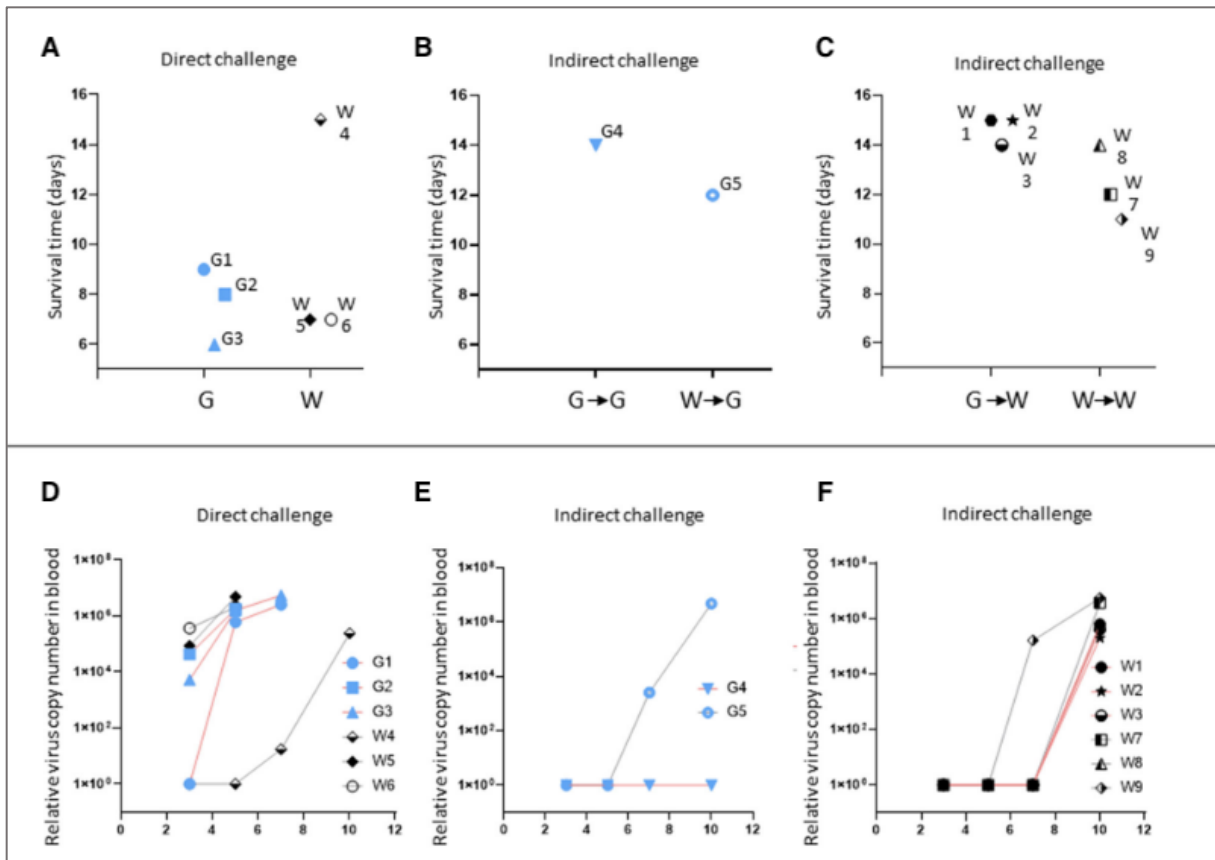


Figure n°31 : (A, B, C) Survie des porcs lors de l'épreuve virale direct et indirecte. Aucune différence statistique dans le temps de survie n'a été observée entre les deux modes d'épreuve virale en comparant les porcs modifiés génétiquement avec les porcs de type sauvage dans les mêmes conditions. La flèche indique l'épreuve virale indirecte, par exemple, W→G signifie que les porcs de type sauvage ont été soumis à l'épreuve virale directe et que les porcs modifiés génétiquement ont été soumis à l'épreuve virale indirecte libérée par des porcs de type sauvage infectés. (D, E, F) Titre de l'ASFV dans les échantillons de sang des porcs lors de l'épreuve virale directe et indirecte mesuré par PCR quantitative. Les porcs modifiés génétiquement n'ont montré aucun titre viral différent des individus sauvages. En revanche, les individus au contact des porcs transgéniques infectés ont montré une survie étendue et une virémie plus tardive. Source : Zheng et al. 2024

Aucun avantage significatif n'a été observé en termes de survie chez les porcs transgéniques par rapport aux porcs de type sauvage (cf. Figure 31A). Le système CRISPR-Cas9 n'aurait donc pas permis d'empêcher la réplication de l'ASFV *in vivo*. Cependant, la survie a été plus étendue chez les porcs cohabitant avec des porcs transgéniques infectés (cf. Figure 31B, G4 VS G5 et Figure 31C, W1, W2, W3 VS W4, W5, W6), ainsi qu'une virémie qui a augmenté avec un certain délai (cf. Figure 31E et 31F), montrant que le système CRISPR-Cas9 permettrait de ralentir la propagation du virus entre cohabitants. Cependant, tous les porcs de l'étude ont succombé après 15 jours post-infection, soulignant la nécessité de poursuivre les recherches afin d'améliorer cette stratégie.

Alors que la recherche se poursuit pour valider des protocoles vaccinaux pour la prévention de l'infection au virus de la peste porcine africaine, les nouveaux outils d'édition génomique comme CRISPR-Cas9 offrent une perspective intéressante par l'élaboration de porcs génétiquement résistants à l'infection.

ii. Élevages bovins

Les mammites chez les vaches laitières et la tuberculose bovine sont deux autres exemples de maladies évoquées dans ce chapitre en raison de leur impact économique important dans les élevages bovins. Ces deux affections ont fait récemment l'objet de nombreux articles de la littérature scientifique en termes d'applications des nouvelles technologies d'édition du génome.

MAMMITES

Une mammite désigne une inflammation des glandes mammaires, provoquant des modifications dans le tissu mammaire glandulaire et ses sécrétions. L'infection se fait via le canal du trayon et est généralement due à une contamination de l'environnement, des conditions hygiéniques défavorables et plus rarement par infection systémique (Kour et al. 2023).

Cette affection représente des pertes économiques majeures en élevage. Plusieurs études ont porté sur l'évaluation des coûts des mammites.

Par exemple, une publication de Huijps et son équipe estimait le montant de la perte liée à la forme subclinique et clinique respectivement à 77 euros et 63 euros par tête et par an (Huijps, Lam, Hogeveen 2008). Cette étude comprenait les coûts directs (production laitière) et indirects (frais vétérinaires, traitements, lait jeté, réforme, main d'œuvre et pénalités).

Une autre étude datant de 2015 a estimé ces coûts sur les trente premiers jours de lactation aux États-Unis par cas de mammite clinique (Rollin, Dhuyvetter, Overton 2015). Cette étude s'est basée sur un modèle établi à partir de paramètres calculés dans diverses publications. Les coûts directs et indirects sont respectivement estimés à 128 dollars et 444 dollars par cas de mammite clinique, soit environ 116 euros et 400 euros (cf. Tableau n°11).

| Coûts | Catégories | Coût par cas | % du coût total |
|----------------------------------|----------------------------|--------------|-----------------|
| Directs | Diagnostic | \$10 | 2.3 |
| | Traitements | \$36 | 8.1 |
| | Lait jeté | \$25 | 5.7 |
| | Frais vétérinaires | \$4 | 0.9 |
| | Main d'œuvre | \$21 | 4.7 |
| | Réforme | \$32 | 7.2 |
| | TOTAL Directs | \$128 | 28.9 |
| Indirects | Perte future en lait | \$125 | 28.2 |
| | Futures réformes | \$182 | 40.9 |
| | Impact sur la reproduction | \$9 | 2.0 |
| | TOTAL Indirects | \$316 | 71.1 |
| Moyenne des coûts par cas | | \$444 | |

Tableau n°11 : Répartition du coût estimé par cas de mammite clinique au cours des 30 premiers jours de lactation (arrondi au dollar près). Source : Rollin, Dhuyvetter, Overton 2015

Enfin, plus récemment encore, l'équipe de Bonestroo a modélisé l'impact de la présence d'une infection intra-mammaire liée à la présence d'une mammite. Ainsi, le coût moyen d'une infection a été estimé à 230 euros par cas, tout pathogène inclus (Bonestroo et al. 2023). Les coûts suivants ont été détaillés dans le tableau n°12.

| Coûts | 1 ^{er} quartile | Moyenne | 3 ^{ème} quartile |
|--|--------------------------|---------------|---------------------------|
| Perte en production laitière, mammite clinique | 26,65 | 29,64 | 32,93 |
| Perte en production laitière, mammite subclinique | 22,80 | 23,81 | 25,05 |
| Réforme | 21,88 | 24,55 | 27,62 |
| Antibiotiques | 11,42 | 12,35 | 13,15 |
| Autres traitements | 11,18 | 11,73 | 12,30 |
| Diagnostic | 0,38 | 0,41 | 0,43 |
| Lait écarté | 9,23 | 10,03 | 10,75 |
| Main d'œuvre | 0,39 | 0,42 | 0,44 |
| Coûts extras dus à la transmission | 103,48 | 117,62 | 133,48 |
| Coûts totaux | 214,94 | 230,30 | 249,86 |
| Parts des pathogènes dans les coûts totaux | | | |
| Mammite à <i>Staphylococcus aureus</i> | 102,76 | 116,96 | 135,54 |
| Mammites à bactéries Gram négatif | 8,67 | 11,01 | 13,07 |
| Mammites à <i>Streptococcus spp.</i> | 28,32 | 32,74 | 36,92 |
| Mammite à <i>Staphylococcus spp.</i> sauf <i>S. aureus</i> | 58,40 | 66,22 | 75,77 |
| Mammite sans pathogène identifié | 1,65 | 1,96 | 2,33 |

Tableau n°12 : Coûts des mammites cliniques et subcliniques et parts de chaque pathogène dans les pertes (en euros) par cas. Source : Bonestroo et al. 2023

On notera d'ailleurs que la part de coûts liés à *Staphylococcus aureus* est largement majoritaire par rapport aux autres pathogènes cités.

Ce pathogène est en effet un problème majeur dans l'industrie laitière par sa pathogénicité, sa contagiosité, sa persistance dans l'environnement, la colonisation des dermes et muqueuses et le manque de traitements efficaces contre lui. Ces caractéristiques font de *Staphylococcus aureus* un pathogène difficilement éliminé au sein d'un troupeau (Rainard et al. 2018). L'infection survient souvent entre la phase de tarissement et la parturition (Urakawa et al. 2022).

En France, une étude sur 2087 cas de mammites cliniques sévères regroupés dans la patientèle de 19 cliniques vétérinaires a été menée. 53,6% des mammites avaient pour origine *Escherichia coli* ; 11,5% pour *Streptococcus uberis* ; 8,7% pour *Staphylococcus aureus* (Salat et al. 2023).

Des mesures d'hygiène permettent de limiter la transmission du staphylocoque lors de la traite comme le port de gants, le trempage des trayons avec de l'iode, de la chlorhexidine ou du dioxyde de chlore, ou encore la désinfection et le changement fréquent des manchons trayeurs. Néanmoins, ces mesures se révèlent insuffisantes, à tel point que les mammites représentent la cause la plus importante d'utilisation d'antibiotiques en élevage laitier (Saeed et al. 2024).

Cette approche thérapeutique présente certains inconvénients : la possibilité de résidus antibiotiques dans le lait, le développement de résistance aux antibiotiques, et le faible taux de guérison (Gomes, Henriques 2016).

En effet, l'usage excessif des antibiotiques, de façon non spécifique et dont l'observance n'a pas toujours été respectée a grandement participé à l'émergence de pathogènes résistants aux antibiotiques (Hillerton, Berry 2005).

Quant à *S. aureus*, il a été le premier germe identifié, en 1948, comme résistant à la pénicilline G après l'utilisation massive de cette dernière dans le traitement des infections intra-mammaires. 60 à 90% des souches de *S. aureus* serait également résistante aux bêta-lactamines (Saeed et al. 2024).

De plus, la formation de biofilms peut améliorer la colonisation et l'adhésion de *S. aureus* dans la mamelle et donc favoriser son infection chronique. La structure particulière du biofilm formé par *S. aureus* ajoute encore à sa résistance par protection contre les processus de phagocytose (Mishra et al. 2023).

Afin de diminuer l'utilisation massive des antibiotiques dans le traitement des infections intra-mammaires, d'autres pistes sont explorées telles que des traitements à base de probiotiques (Bouchard et al. 2013; Urakawa et al. 2022), de nanoparticules (Mishra et al. 2023), de bactériophages, de cytokines (Gomes, Henriques 2016) et différents prototypes de vaccins (Kour et al. 2023).

Concernant les vaccins, aucune étude n'a montré une protection efficace dans un contexte d'infections intra-mammaires. Parmi les vaccins concernant *S. aureus*, il existe le Lysigin® de Boehringer, le Startvac® et le Mastivac® de Hipra pour certaines souches (TC5 et TC8). Ces deux derniers n'ont cependant pas permis de diminuer

l'incidence des mammites cliniques ni la cellularité dans le lait d'après l'étude de Tashakkori et al. 2020.

Concernant les probiotiques, Urakawa et son équipe ont testé les effets d'un traitement probiotique oral (*Bacillus subtilis*, et plus précisément la souche C-3102) sur l'incidence des mammites en élevage laitier (Urakawa et al. 2022). Les résultats ont été très satisfaisants avec une réduction significative de la fréquence de survenue de mammites chez des vaches en ayant déjà eu, de la nécessité de traitement médicamenteux, de la proportion de lait écarté de la consommation et du nombre de cellules somatiques dans le lait (cf. Figures n°32 et 33).

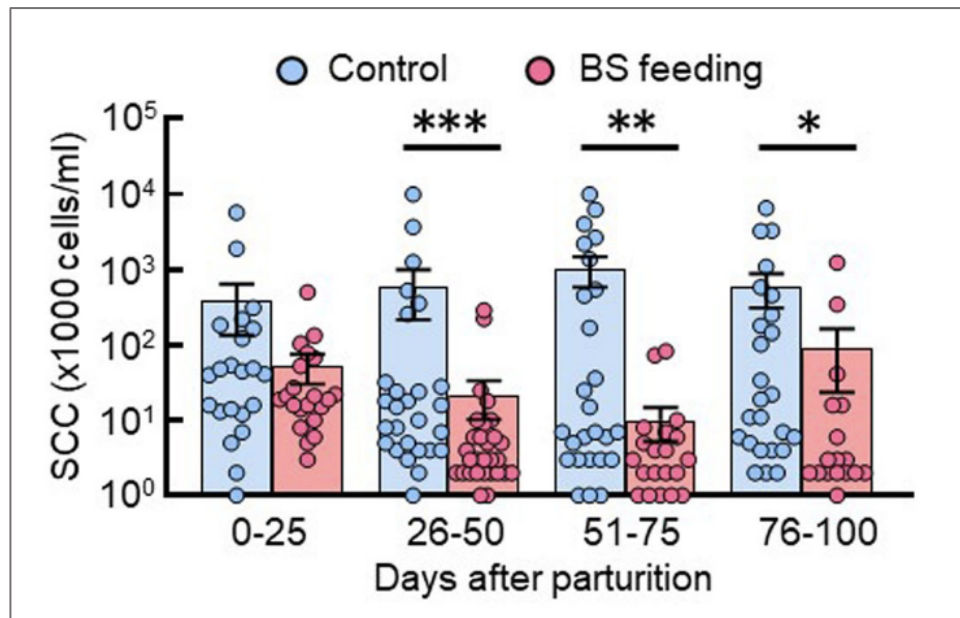


Figure n°32 : Effet de l'alimentation avec *Bacillus subtilis* (BS) sur le nombre de cellules somatiques (SCC) dans le lait des vaches laitières. Les vaches ayant des antécédents de mammite ont été réparties dans le groupe témoin (n = 6, cercle bleu) et le groupe expérimental (n = 6, cercle rouge). Le groupe témoin a reçu une alimentation normale, tandis que le groupe expérimental a été nourri avec un régime BS à partir d'un mois avant la parturition. Des échantillons de lait ont été prélevés pendant 100 jours après la parturition, et leur SCC a été déterminé. Ces données ont été divisées en quatre périodes de 25 jours chacune sur les 100 jours. Les valeurs inférieures à la limite inférieure (1000 cellules/ml) ne sont pas représentées dans les figures. Les barres bleues ou rouges représentent la moyenne des SCC avec les erreurs standards. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. Source : Urakawa et al. 2022

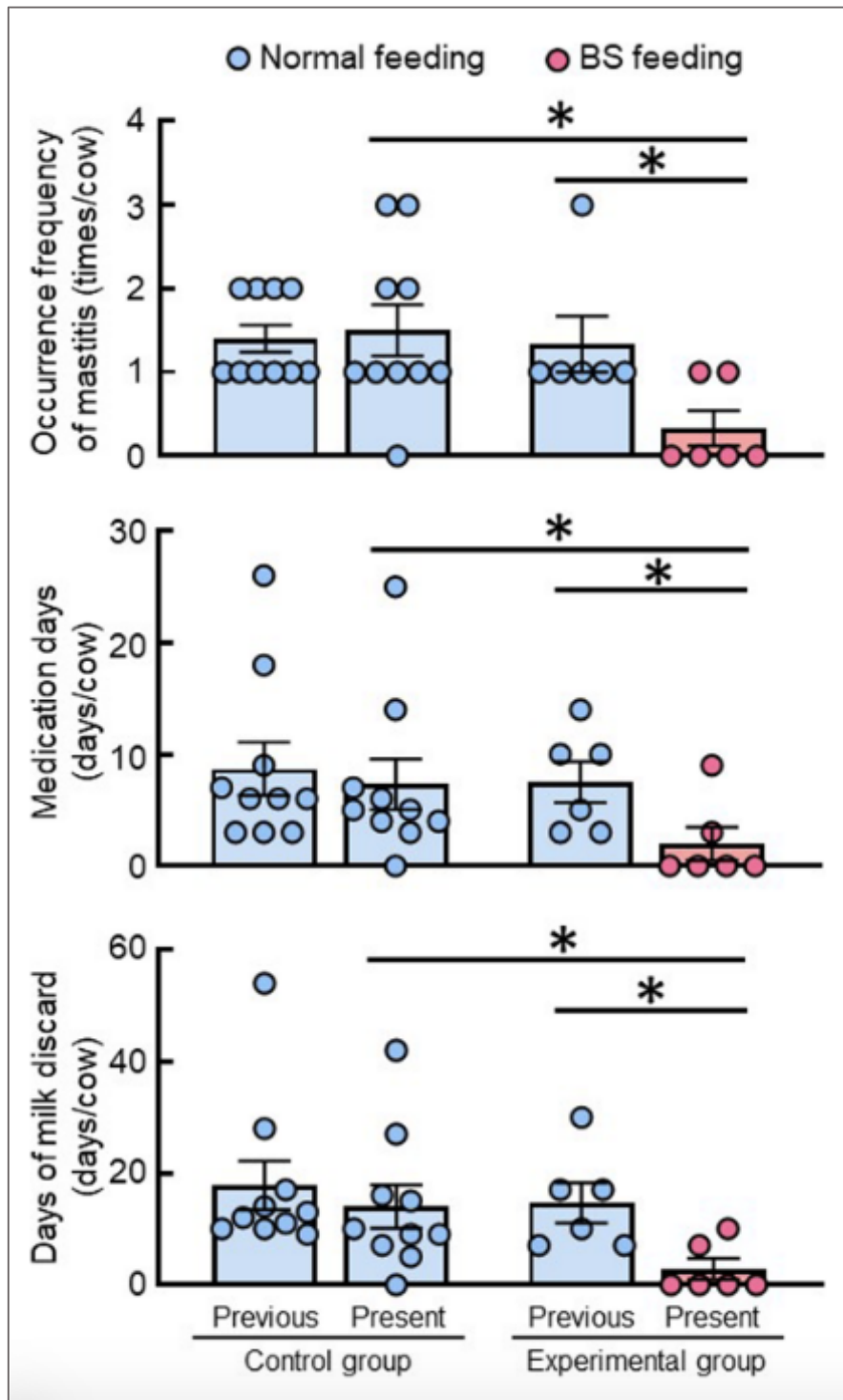


Figure n°33 : Effet prophylactique de l'alimentation avec *Bacillus subtilis* (BS) sur le risque de mammite chez les vaches laitières. Toutes les vaches laitières avaient des antécédents de mammite. Le groupe témoin (n = 10, nombre de vêlages = 4,1 ± 1,7 [moyenne ± écart-type]) a reçu une alimentation normale. Le groupe expérimental (n = 6, nombre de vêlages = 4,5 ± 1,0) a reçu un régime contenant du BS C-3102 entre 1 mois avant la parturition et la fin de la période de lactation. Les barres bleues ou rouges représentent la moyenne de chaque groupe avec les erreurs standards. *P < 0,05. Source : Urakawa et al. 2022

Une étude similaire avait été antérieurement menée in vitro par mise en contact de cellules du tissu mammaire infectées à *S. aureus* avec la bactérie *Lactobacillus casei*. Cela n'avait cependant pas permis d'obtenir une inhibition de l'adhésion et de l'internalisation de *S. aureus* après que ces processus avaient débuté dans le tissu mammaire. En revanche, à titre préventif, l'utilisation de *L. casei* a permis une diminution de l'internalisation de *S. aureus* de 60 à 80% (Bouchard et al. 2013). Cette bactérie représente donc une perspective intéressante dans le traitement des mammites par probiotiques.

En supplément des recherches précédemment citées sur des alternatives à l'utilisation des antibiotiques sur les infections intra-mammaires, des premiers travaux de transgénèse avaient été conduits pour obtenir des vaches génétiquement résistantes au développement de ces affections.

En effet, l'équipe de Wall s'était intéressée à la lysostaphine, une protéine à activité hydrolase produite naturellement par *Staphylococcus simulans* et dirigée contre les peptidoglycanes composant la paroi des staphylocoques (Wall et al. 2005). Son efficacité dans le traitement des mammites avait d'ores-et-déjà été prouvée sur le modèle murin (Kerr et al. 2001).

Selon la technique préalablement élaborée par Powell et son équipe en 2004, des fibroblastes de 6 fœtus de race Jersey ont été transfectés avec un transgène de la construction suivante : le gène codant la lysostaphine et le gène codant la GFP (*Green Fluorescent Protein*, marqueur fluorescent). L'expression du transgène était dirigée spécifiquement au niveau de l'épithélium sécrétoire de la glande mammaire et l'expression du gène codant la lysostaphine sous le contrôle du promoteur de la β -lactoglobuline ovine.

Par transfert de noyaux de cellules somatiques à partir de ces fibroblastes, 650 embryons ont été obtenus et transférés dans 330 génisses et multipares. L'expression de la GFP au stade blastocyste a permis de ne transférer que les embryons porteurs du transgène. 8 veaux sont nés vivants, dont 5 ont survécu jusqu'à l'âge adulte (Powell et al. 2004).

Les trois génisses transgéniques étudiées ensuite ont été obtenues par clonage à partir d'un même fœtus transgénique mais avec des fibroblastes donneurs transfectés à différents moments et dont l'intégration et le niveau d'expression du transgène différaient. Dix contrôles non transgéniques et non clonés, sans lien de parenté, appariés par âge et lactation, avaient également été inclus dans l'étude (trois Jerseys et sept Holsteins).

Une épreuve à *S. aureus* par inoculation intra-mammaire sur les groupes transgéniques et témoins. Les paramètres suivants ont été mesurés : nombre de cellules somatiques dans le lait, élévation de la température corporelle, élévation des marqueurs d'inflammation (LBP, pour la protéine de liaison au lipopolysaccharide et SAA, pour l'amyloïde A sérique). Les résultats sont présentés sur la figure n°34.

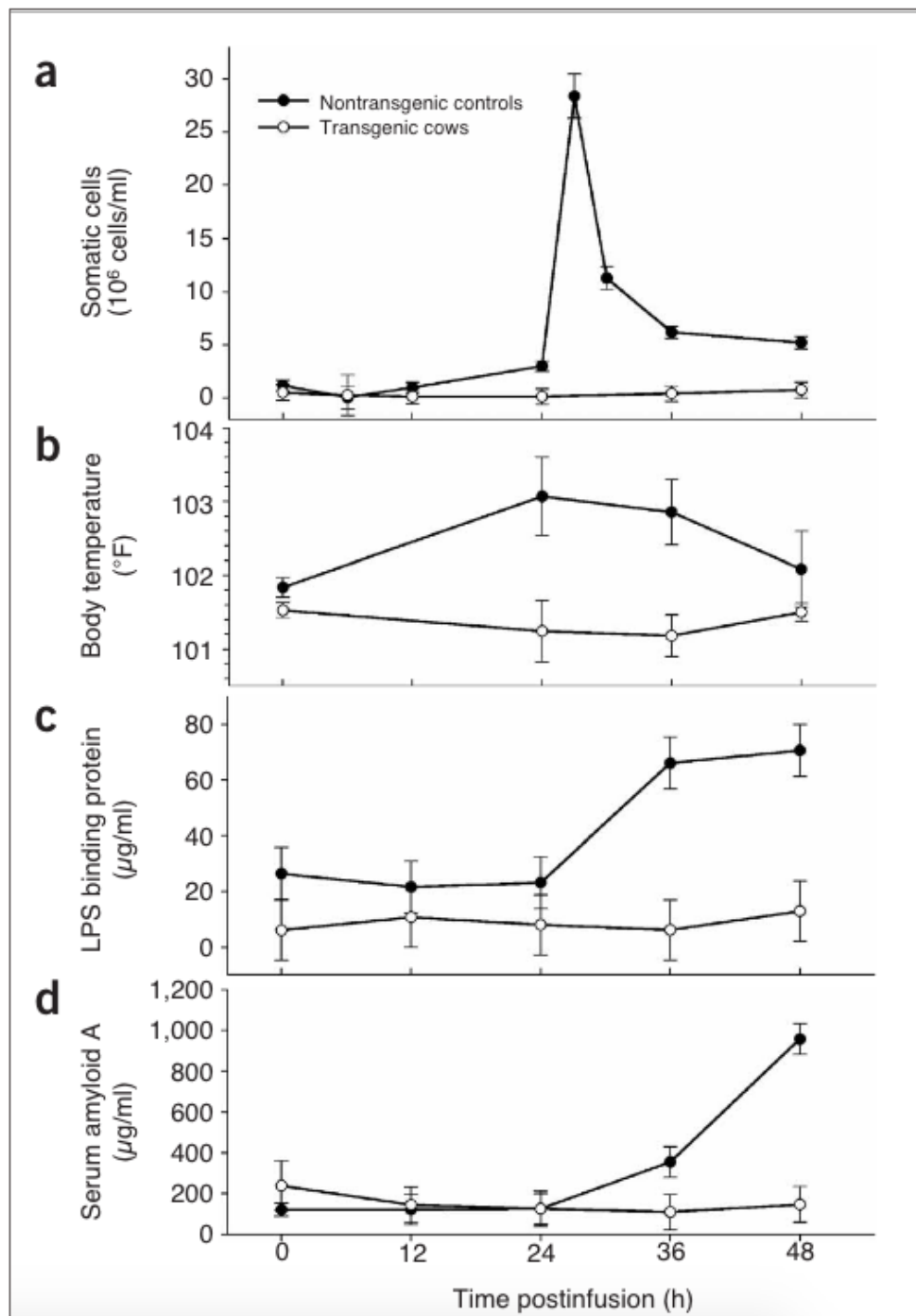


Figure n°34 : Comparaison entre les groupes transgéniques (ronds blancs) et non transgéniques (ronds noirs) de (a) la cellularité du lait, (b) la température corporelle, (c) la concentration sérique en LBP et de (d) la concentration sérique en SAA. Source : Wall et al. 2005

Les individus exprimant la lysostaphine dans leur lait présentaient donc des signes cliniques atténués. *In vitro*, la croissance de *S. aureus* était également compromise dans ce lait.

Plus tard, une autre étude s'est intéressée à une protéine similaire à la lysostaphine, le lysozyme (Liu et al. 2014). Cette protéine, particulièrement abondante dans les sécrétions humaines (larmes, salive), présente une activité bactéricide par hydrolyse de polysaccharides composant la paroi bactérienne.

Par l'emploi de nucléases à doigts de Zinc, une construction comprenant le gène du lysozyme humain (hLYZ) a été intégré par transfection au locus de la bêta-caséine bovine dans des fibroblastes fœtaux bovins, pour une expression spécifique dans le tissu de la glande mammaire. Après transfert de noyaux de cellules somatiques, les embryons obtenus ont été transférés dans des mères receveuses (Liu et al. 2014).

Le lait produit par les vaches transgéniques ainsi créées a été analysé et a montré son efficacité pour l'élimination de *Staphylococcus aureus in vitro* et *in vivo*. Les résultats *in vivo* sont présentés dans le tableau n°13.

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

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

Tableau n°13 : Taux d'infection pour trois espèces bactériennes après inoculation intra-mammaire de cinq vaches laitières transgéniques (TG) et cinq vaches non transgéniques (WT). Au cours de chaque épreuve, chaque trayon a été imprégné avec l'un des trois types de bactéries, et le quatrième avec du PBS (solution saline tamponnée au phosphate). Source : Liu et al. 2014

L'ingénierie génétique offrirait donc un outil viable pour améliorer la résistance aux maladies et améliorer la santé et le bien-être du bétail en réduisant l'incidence des mammites.

Néanmoins, ces recherches soulèvent quelques questions. En effet, plutôt que de lutter contre la présence même de *Staphylococcus aureus* dans les élevages laitiers, serait préférée la création de vaches transgéniques qui s'infecteraient et lutteraient de façon artificielle contre l'infection ?

Ne serait-il pas préférable de remettre en question nos pratiques d'élevage comme l'usage prophylactique excessif d'antibiotiques large spectre, avec une observance parfois non rigoureuse et permettant de pallier les mauvaises pratiques d'hygiène favorisant l'infection en premier lieu ?

La survenue de résistance à la lysostaphine ou au lysozyme n'était pas exclue dans l'une ou l'autre étude. Que ferions-nous si *S. aureus* développait effectivement une résistance à ces deux composés ?

L'ingénierie génétique se propose même d'aller plus loin en générant un moyen de lutter contre les mécanismes de résistance mis en place par les bactéries, et notamment avec les travaux de Deb et son équipe sur les bêta-lactamases bactériennes (Deb, Chaudhary, De 2023).

En effet, les bêta-lactamines sont les antibiotiques de première intention les plus utilisés en médecine vétérinaire et font l'objet de résistance de la part des bactéries, et notamment par *Escherichia coli*, une des bactéries les plus incriminées dans les infections intra-mammaires bactériennes. Une résistance à cette classe d'antibiotiques s'est faite au cours du temps par acquisition de gènes codant pour des bêta-lactamases par transposons ou transferts horizontaux de gènes (Liu et al. 2021).

L'étude de Deb et son équipe a consisté en l'isolation d'*E. coli* de type ESBL, c'est-à-dire exprimant des bêta-lactamases à spectre étendu, à partir de 44 échantillons de lait de vaches présentant une mammite clinique. 59% de ces 44 échantillons étaient concernés par l'expression de ces ESBL, soit 26 échantillons.

La prévalence de la résistance à différentes bêta-lactamines a été étudiée pour les 44 échantillons. Les résultats ont été les suivants :

| Bêta-lactamine | Pourcentage | Effectif sur 44 échantillons |
|----------------|-------------|------------------------------|
| Céfotaxime | 84% | 37 |
| Céfépime | 72,7% | 32 |
| Céfuroxime | 52,27% | 23 |
| Oxacilline | 50% | 22 |
| Céfalexine | 45,4% | 20 |
| Méropénem | 0% | 0 |

Tableau n°14 : Pourcentage et nombre de cultures bactériennes résistantes à différentes bêta-lactamines. Source : Deb, Chaudhary, De 2023

Aucun phénotype résistant n'avait été détecté pour le méropénem.

Les bactéries *E. coli* ESBL porteuses du gène CTX-M, conférant une résistance aux bêta-lactamases, ont ensuite été électroporées avec un plasmide recombinant porteur de la protéine Cas9, d'un tracrARN et d'un crARN (selon le même modèle traditionnel que le système CRISPR-Cas9 décrit dans le paragraphe I.2.c.).

Ces bactéries modifiées ont ensuite été soumises à l'épreuve aux antibiotiques cités précédemment. Les résultats de cette épreuve sont illustrés en figure n°35.

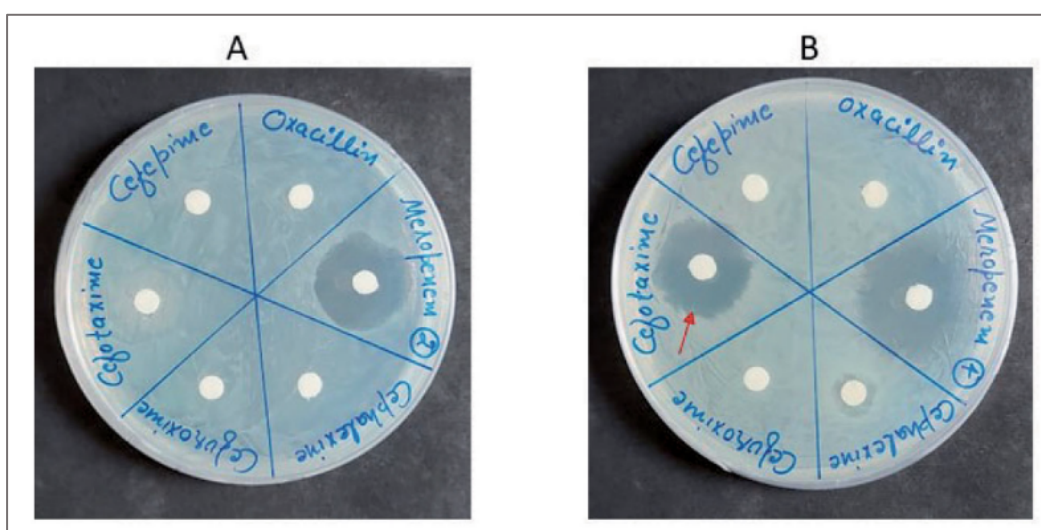


Figure n°35 : Phénotypes antibiotiques β -lactamines d'*E. coli* ESBL portant les gènes CTX-M. (A) Sans transformation avec le plasmide recombinant pCas9 ; (B) Après transformation avec le plasmide recombinant pCas9. Source : Deb, Chaudhary, De 2023

La technique de CRISPR-Cas9 sur les bactéries *E. coli* CTX-M n'a pas permis le retour à une sensibilité aux bêta-lactamines hormis pour le céfotaxime.

Cette stratégie, dirigée contre les moyens de lutte des bactéries contre les antibiotiques large spectre les plus utilisés en médecine vétérinaire, pourrait permettre de redonner à ces antibiotiques un poids dans la prise en charge thérapeutique des mammites. Cependant, la question se pose de savoir si par cette technique, ne serait pas encouragée la persévérance d'un usage déraisonné des antibiotiques ayant favorisé cette résistance en premier lieu.

TUBERCULOSE BOVINE

Une autre maladie représentant un enjeu majeur en élevage bovin est la tuberculose. Cette maladie zoonotique est principalement causée par la bactérie *Mycobacterium bovis*. La France est officiellement indemne bien que quelques foyers émergent chaque année. Dans le mois de novembre 2023 notamment, un cas de tuberculose largement médiatisé a émergé parmi l'élevage de plus de 200 têtes de Bérénice Walton, une éleveuse girondine de race locale Bazadaise. Son troupeau avait été placé sous arrêté préfectoral et une obligation d'abattage total avait été prononcée. Bien que l'éleveuse ait reçu une indemnisation de l'État, cette dernière ne couvre pas les dépenses qui l'attendent sur plusieurs années pour la reconstitution de son cheptel.

L'infection à *Mycobacterium bovis* se fait par voie directe entre bovins (aérosols) ou indirecte dans l'environnement. La faune sauvage joue un rôle d'hôte de liaison en favorisant la propagation de la maladie à d'autres élevages bovins.

Chez l'Homme, la contamination se fait plutôt par ingestion de produits contaminés et insuffisamment cuits, causant une forme extra-pulmonaire. Néanmoins, la forme pulmonaire peut être retrouvée par transmission par aérosols. Elles affectent alors plutôt le personnel amené à être en contact avec les bovins (éleveurs, vétérinaires, employés d'abattoir, etc.) (Borham et al. 2022). En 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé estimait à près de 14 000 les nouveaux cas de tuberculose, associés à plus de 1 200 décès (Dean et al. 2018).

La tuberculose bovine est une maladie réglementée catégorisée BDE au niveau européen, c'est-à-dire que les États membres sont soumis à une obligation de surveillance et d'éradication de la maladie et une réglementation régissant les échanges entre les États membres de statuts sanitaires différents.

Un pays est déclaré officiellement indemne si la prévalence de la maladie au sein d'un troupeau est inférieure à 0,1% pendant 6 ans et que les procédures de surveillance sont respectées.

La France est indemne de tuberculose depuis 2001. Ce statut a été obtenu par la mise en place progressive de mesures de dépistage et d'abattage. En 1965, l'unité épidémiologique se cantonnait aux individus infectés. Seuls ces derniers étaient abattus. En 1990, l'unité épidémiologique devient le cheptel et un individu positif entraîne l'abattage de tout le troupeau.

Un traitement intensif alliant plusieurs antibiotiques sur plusieurs mois est réservé à l'Homme (*WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 4: Treatment: drug-resistant tuberculosis treatment 2022*). Devant le risque de résistance, il n'est pas employé sur les animaux de rente. Aucun traitement n'est donc disponible chez les bovins.

À ce jour, les efforts de recherche se concentrent sur l'élaboration d'un vaccin contre la tuberculose bovine (Fromsa et al. 2024), l'amélioration des méthodes diagnostiques déjà employées (Blanco et al. 2022), et des modélisations épidémiologiques pour comprendre la dynamique de transmission de la tuberculose bovine entre différentes espèces hôtes et ainsi élaborer des stratégies de vaccination ciblées pour réduire efficacement la propagation de la maladie (Conteddu et al. 2024).

Plusieurs stratégies de lutte contre la tuberculose bovine grâce aux nouveaux outils d'édition génomique ont récemment émergé.

Par exemple, Wu et son équipe, par l'utilisation des nucléases TALEN sont parvenus à l'insertion et l'expression du gène murin codant la protéine SP110 chez le bovin (Wu et al. 2015).

Cette protéine était déjà connue chez la souris pour inhiber la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* au sein des macrophages et induire l'apoptose des macrophages infectés (He et al. 2011).

La mesure *in vitro* de la multiplication de *Mycobacterium bovis* dans des macrophages de bovins témoins ou transgéniques durant 120 heures suivant l'infection a montré que la croissance bactérienne est significativement diminuée dans les macrophages exprimant la protéine SP110 comparativement au groupe témoin. Les résultats de cette analyse sont illustrés en figure n°36.

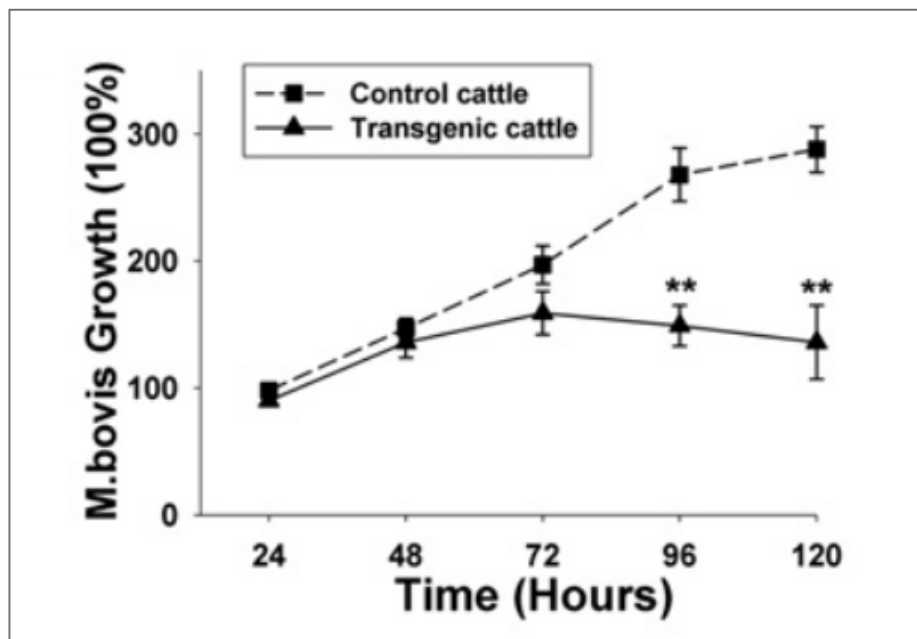


Figure n°36 : Mesure de la multiplication de *M. bovis* dans des macrophages issus de bovins témoins (n = 9) ou transgéniques (n = 9) *in vitro*. Les macrophages ont été séparés individuellement de chaque animal et regroupés par groupe. La multiplication de *M. bovis* a été déterminée par des essais CFU (colony-forming unit). Avec *P < 0.05; **P < 0.01. Source : Wu et al. 2015

Par ailleurs, Wu et son équipe ont procédé à une épreuve *in vivo* en mettant en contact un groupe témoin, un groupe d'individus transgéniques pour SP110 et un groupe témoin positif. Ils ont ensuite mesuré les taux sériques d'interférons gamma de tous les individus. En effet, la réponse à l'interféron gamma (IFN- γ) de l'immunité médiée par les lymphocytes T CD4 était d'ores-et-déjà un outil diagnostique pour l'identification des animaux porteurs de *Mycobacterium bovis*. Les résultats de cette analyse sont illustrés en figure n°37.

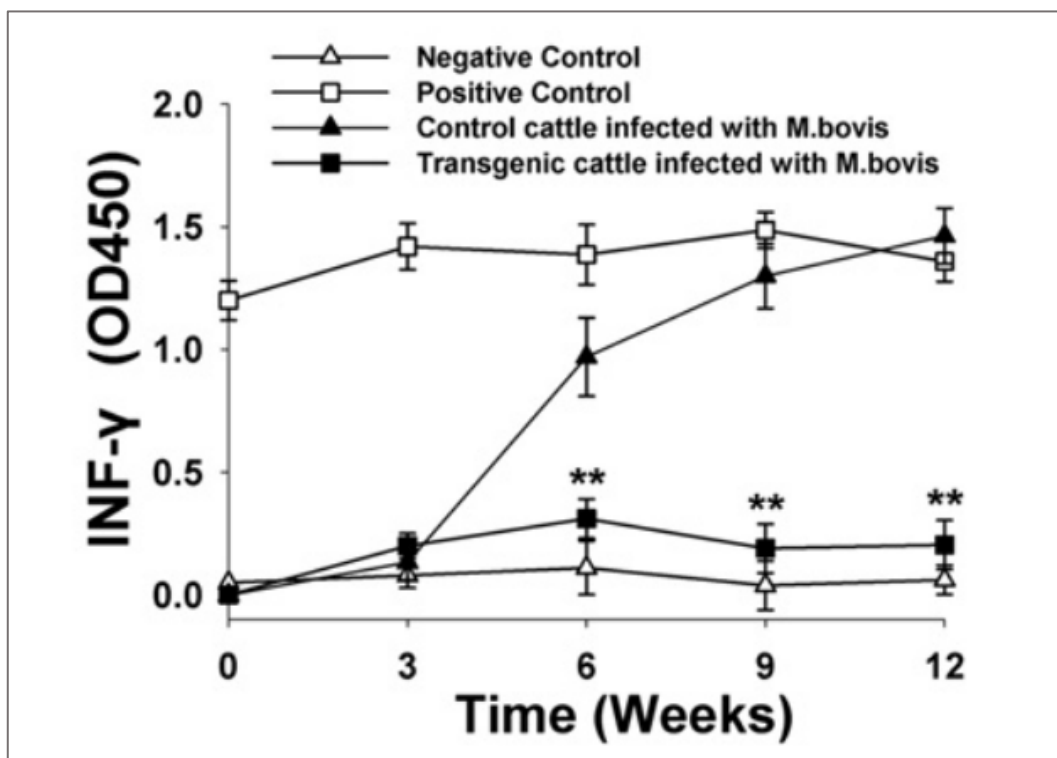


Figure n°37 : Mesure de la quantité d'interféron gamma (IFN- γ) produite chez les bovins témoins expérimentaux (n = 9) et transgéniques (n = 9) qui ont partagé un espace confiné avec des bovins témoins positifs pendant 12 semaines. Avec *P < 0.05; **P < 0.01. Source : Wu et al. 2015

Deux groupes contrôles ont été constitués avec un diagnostic qui s'est avéré négatif pour l'un (triangle vide), positif pour l'autre (carré vide). Les bovins témoins négatifs au début de l'épreuve (triangle plein) ont développé des IFN- γ dans les 6 semaines suivant leur cohabitation avec des bovins tuberculeux, et les réponses ont augmenté régulièrement tout au long de la période post-infection.

Quant aux bovins transgéniques (carré plein), la réponse immunitaire à l'interféron gamma s'est révélée significativement plus faible comparés aux témoins exposés.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les bovins transgéniques exprimant le gène codant SP110 sont capables de réguler la croissance et la multiplication de *Mycobacterium bovis*.

De plus, la transmission héréditaire de cette modification a été étudiée et confirmée, avec des descendants hétérozygotes exprimant SP110, dont les macrophages ont conservé une résistance à la tuberculose lors d'expériences in vitro. Les résultats de cette analyse sont illustrés sur la figure n°38.

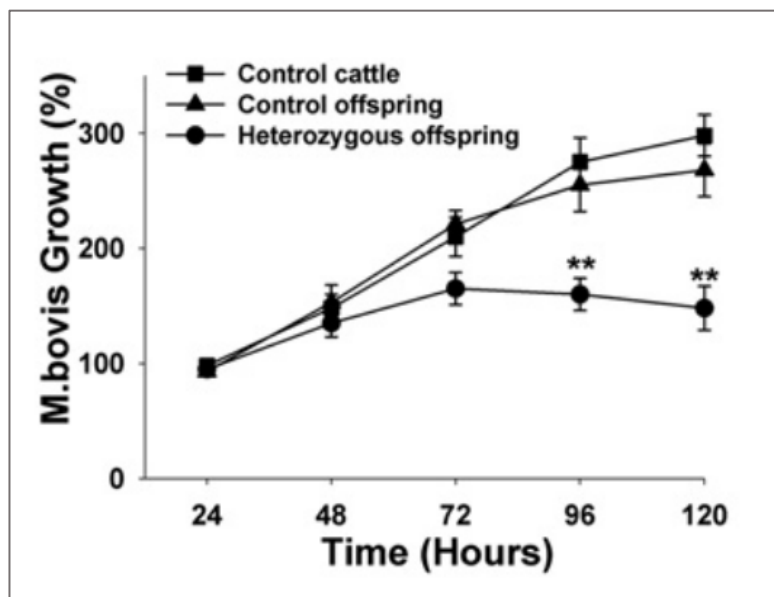


Figure n°38 : Mesure de la multiplication de *M. bovis* dans les macrophages provenant de bovins témoins, de descendants témoins ou de descendants hétérozygotes. La multiplication de *M. bovis* a été déterminée par un test CFU (unité formant colonie). Les descendants témoins sont les deux bovins descendants sans le transgène SP110. Avec *P < 0.05; **P < 0.01. Source : Wu et al. 2015

Par ailleurs, la protéine SP110 limite la propagation de *M. bovis* en favorisant l'apoptose plutôt que la nécrose. En effet, la nécrose libère des bactéries dans le milieu environnant contrairement à l'apoptose (Butler et al. 2012).

Les expériences de Wu et son équipe ont confirmé que l'apoptose était préférée à la nécrose chez les macrophages d'individus génétiquement modifiés, qu'ils soient les fondateurs de la lignée (cf. Figure n°39) ou la descendance directe hétérozygote (cf. Figure n°40).

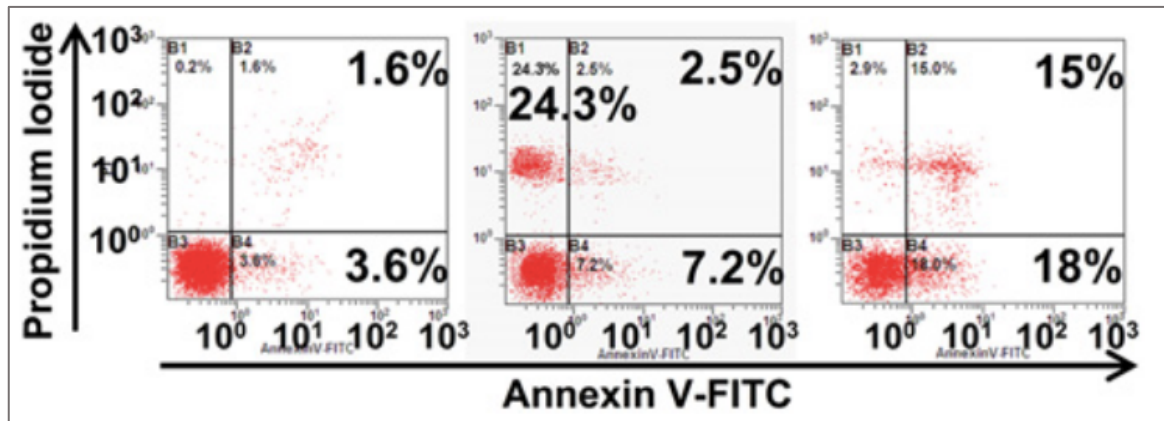


Figure n°39 : Analyse par cytométrie en flux du mécanisme de mort cellulaire des macrophages transgéniques infectés par *M. bovis*. Apoptose précoce [annexine V+ iodure de propidium (PI)-], apoptose tardive (annexine V+ PI+), et nécrose (annexine V- PI+). (À gauche) Macrophages normaux. (Au milieu) Macrophages témoins infectés. (À droite) Macrophages transgéniques infectés. Source : Wu et al. 2015

Une distinction claire avait été observée dans le mécanisme de mort cellulaire des macrophages après l'infection. Les macrophages des bovins témoins montraient une nécrose caractéristique (24,3 %) (Fig. 39, Centre), tandis que les macrophages des bovins transgéniques montraient une apoptose remarquable (33,0 %) (Fig. 39, Droite).

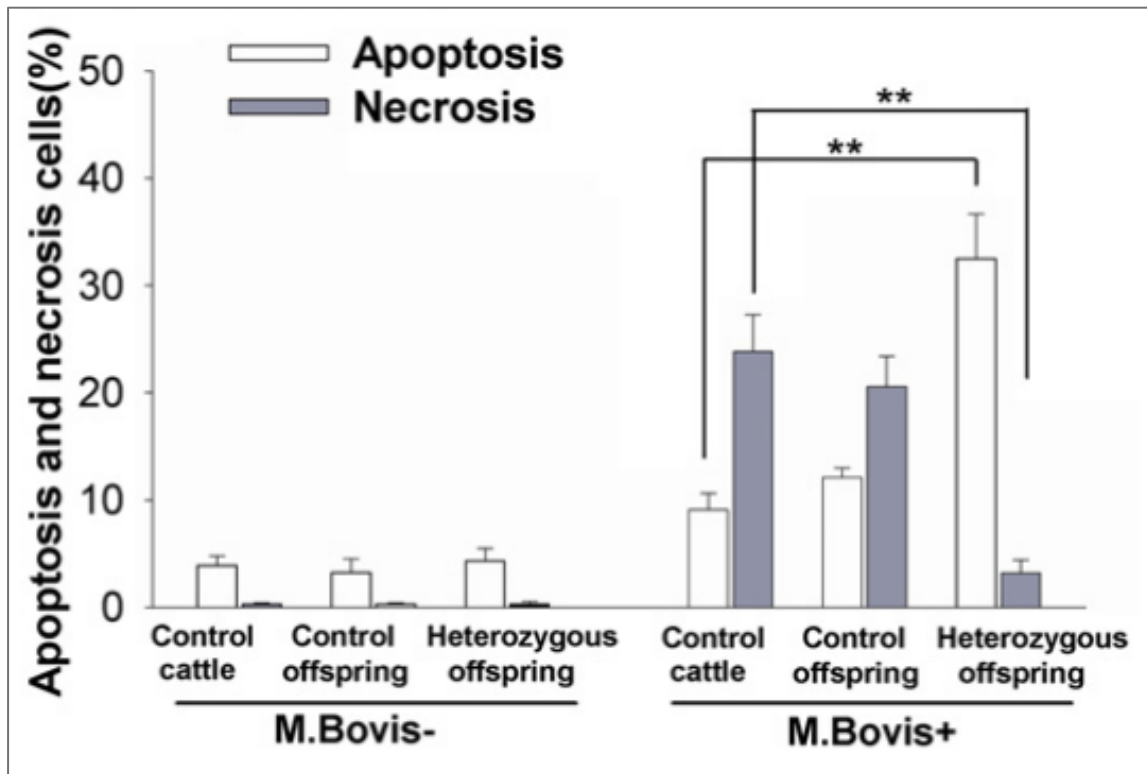


Figure n°40 : Analyse par cytométrie en flux du mécanisme de mort cellulaire des macrophages descendants transgéniques infectés par *M. bovis*. Avec *P < 0.05; **P < 0.01. Source : Wu et al. 2015

La distinction dans le mécanisme de mort cellulaire des macrophages après infection a également été observée. Les macrophages témoins ont montré une proportion de nécrose plus importante (témoins $23,8 \pm 3,4$ % contre hétérozygotes $3,3 \pm 1,5$ %, P = 0,000), tandis que les macrophages des descendants hétérozygotes ont majoritairement montré une apoptose (témoins $9,1 \pm 1,5$ % contre hétérozygotes $32,5 \pm 4,1$ %, P = 0,000) après infection par *M. bovis*.

Toutes les données acquises indiquent que la modification génomique permettant l'expression de SP110 murine au sein des macrophages bovins confère non seulement une résistance accrue à *Mycobacterium bovis* mais que la mutation est en plus héritable à la descendance et avantageuse même à l'état hétérozygote.

Cette première stratégie de lutte contre la tuberculose bovine reposant sur les nouveaux outils d'édition génomique avait déjà montré des résultats encourageants.

Une autre stratégie plus récente avait mené à l'insertion de la séquence codant pour la protéine NRAMP1 (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*) chez des bovins à l'aide d'un système Cas9 nickase (Gao et al. 2017).

La protéine NRAMP1 est un transporteur de métaux divalents dont l'expression se fait chez des cellules phagocytaires matures et confère une résistance aux infections mycobactériennes (Richer 2005). Elle est retrouvée chez de nombreux organismes, plantes comme mammifères.

Son expression augmente le taux d'apoptose et réduit le taux de nécrose des macrophages infectés par *M. bovis*, diminuant donc la résistance de cette bactérie en permettant la mise en place d'une immunité adaptative, qui est plus efficace dans l'éradication de la bactérie que l'immunité innée (Botella et al. 2012).

Ainsi, l'équipe de Gao et ses collaborateurs de l'université de médecine vétérinaire de Shaanxi, en Chine, est parvenue à faire naître 9 bovins surexprimant la protéine NRAMP1 dans leurs macrophages (*knock-in*).

L'analyse par cytométrie en flux a montré que 7,4 % des macrophages exposés subissaient un mécanisme de nécrose dans le groupe de macrophages témoins, contre 4,2 % dans le groupe de macrophages génétiquement modifiés. De plus, le taux d'apoptose observé chez les macrophages génétiquement modifiés était près de deux fois supérieur au groupe témoin ($30,2 \% \pm 0,63 \%$ contre $14,9 \% \pm 0,58 \%$, $P = 0,0036$). Ces résultats sont illustrés sur la figure n°41.

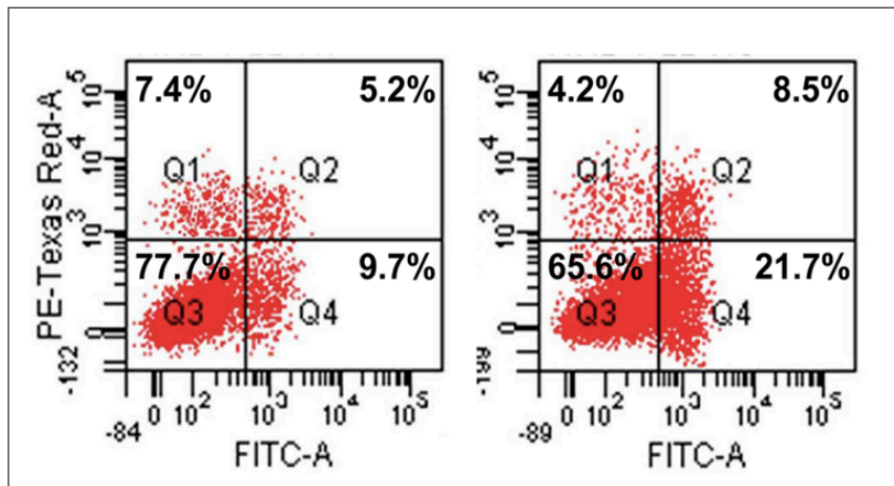


Figure n°41 : Analyse par cytométrie en flux du mécanisme de mort cellulaire des macrophages de bovins génétiquement modifiés après une infection par *M. bovis* : Nécrotique (Q1) ; Apoptotique précoc (Q2) et Apoptotique tardif (Q4). À gauche, macrophages contrôles infectés. À droite, Macrophages modifiés infectés. Source : Gao et al. 2017

Par ailleurs, une diminution significative du taux de croissance de *M. bovis* dans les macrophages modifiés a été observée (cf. Figure n°42).

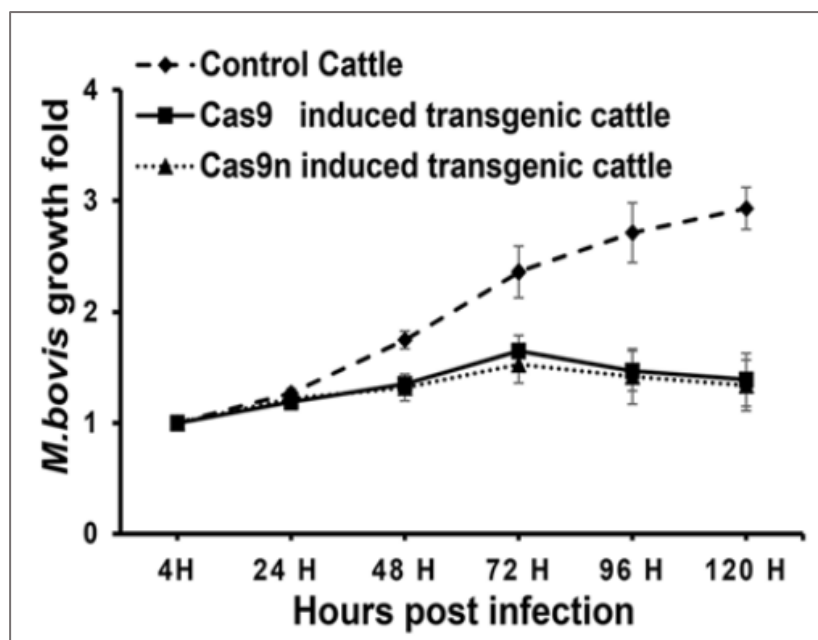


Figure n°42 : Évaluation *in vitro* de la multiplication de *M. bovis* dans les macrophages provenant des bovins contrôles ou modifiés. Les macrophages ont été séparés individuellement pour chaque animal et mélangés en fonction du groupe. La multiplication de *M. bovis* a été déterminée par des tests CFU (Colony Forming Unit). Source : Gao et al. 2017

Enfin, la mesure de la réponse à l'interféron gamma α , tout comme la recherche de Wu et son équipe, montra une réponse moindre post-infection à *M. bovis* chez les individus modifiés génétiquement pour une surexpression de NRAMP1 que chez les individus témoins (cf. Figure n°43).

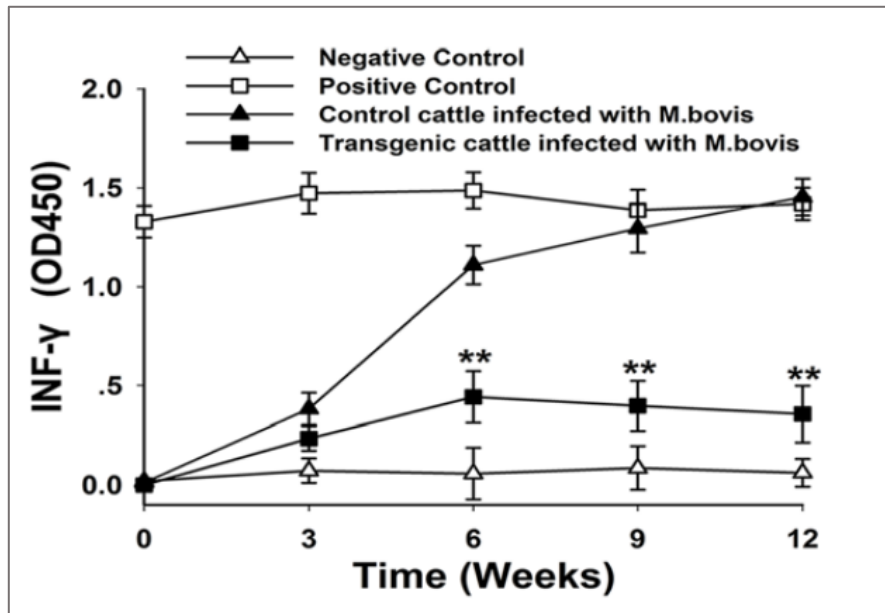


Figure n°43 : Quantités d'IFN- γ produites chez les bovins témoins expérimentaux (n = 6) et transgéniques (n = 6) à intervalles réguliers de 12 semaines. Avec *P < 0.05; **P < 0.01. Source : Gao et al. 2017

La surexpression de NRAMP1 a donc permis une meilleure résistance à l'infection par *Mycobacterium bovis* (Gao et al. 2017).

iii. Élevages avicoles : *exemple de l'influenza aviaire*

Parmi les maladies affectant les élevages avicoles et présentant des enjeux majeurs tant sur le plan économique que de la santé publique par leur caractère zoonotique, l'influenza aviaire est sans doute la plus notable. De nombreuses applications de l'édition génomique en relation avec cette affection ont été publiées ces dernières années (Ledesma, Van Eenennaam 2024).

L'influenza aviaire est une maladie virale responsable de pertes majeures en élevage avicole par son caractère hautement contagieux et mortel. On distingue l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP), qui diffuse dans tous les tissus d'un organisme, de l'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP), qui ne se restreint qu'aux muqueuses. Il suffit de quelques mutations seulement pour transformer un IAFP en IAHP (Plaza, Lambertucci 2024).

D'après le rapport d'information n°1069 déposé par Philippe Bolo et Charles Fournier sur la grippe aviaire et son impact sur les élevages, les pertes liées à l'épisode d'influenza aviaire de 2021 à 2023 s'élèvent à 245 millions de volailles, avec près de 5000 élevages de volaille atteints dans le monde par des virus *influenza* de sous-type H5N1 et 5900 foyers d'oiseaux au sein de l'avifaune sauvage (Bolo, Fournier 2023).

De mars à juin 2024 étaient encore recensés en Europe 42 foyers d'influenza aviaire hautement pathogène de sous-type H5N1, dont 15 chez les oiseaux domestiqués et 27 chez l'avifaune sauvage.

La lutte contre l'influenza aviaire passait jusqu'alors par la mise en place de mesures sanitaires strictes (protocoles de biosécurité, mises à mort préventives, etc.) et de surveillance événementielle ou programmée. En France métropolitaine, l'arrêté du 25 septembre 2023 a permis d'autoriser la vaccination préventive dans les établissements détenant plus de 250 canards mulards, Pékin ou Barbarie. Seul le vaccin contre le virus de l'IAHP H5 est autorisé.

Les nouvelles technologies d'édition du génome sont, ici encore, une piste explorée dans la lutte contre l'influenza aviaire.

Une première stratégie s'est intéressée à la protéine ANP32a. En effet, cette protéine hautement conservée dans les espèces eucaryotes, et absente chez les procaryotes et les archées, est exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules aviaires. Par sa localisation à la fois à la surface des cellules, dans le noyau, dans le cytoplasme, dans des organites intracellulaires, voire excrétée, elle serait impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires : signal, différenciation, multiplication, mort cellulaire, tumorigenèse, etc. (Yu et al. 2022).

Le virus de l'influenza aviaire, lors de son entrée dans la cellule, est à l'état de capsidie contenant 8 segments d'ARN viraux entourés de nucléoprotéines sur toute leur longueur, hormis sur les extrémités 5' et 3' qui, elles, sont reliées par un complexe de polymérase ARN unique composé des sous-unités PB1, PB2 et PA. L'ensemble est appelé vRNP pour ribonucléoprotéine virale (Peacock et al. 2019).

Une fois entrés, les segments d'ARN viraux sont transloqués dans le noyau et serviront à la synthèse d'un ARN messager (mRNA) et d'un ARN complémentaire intermédiaire (cRNA). Le cRNA est ensuite recouvert des nucléoprotéines provenant du vRNP et adopte une structure en double hélice. Il est alors appelé cRNP (Peacock et al. 2019).

Pour obtenir de l'ARN viral à partir de ce cRNP, afin de reformer des virions par la suite, une polymérase spécifique est nécessaire. Cette polymérase est majoritairement recrutée par ANP32A au sein des cellules aviaires (Peacock et al. 2019).

Une étude de Long et son équipe en 2019 a d'ailleurs mis en évidence que l'activité de la polymérase aviaire ne dépend que de ANP32A, ouvrant la voie à la conception de poulets résistants à l'influenza aviaire par édition génomique (Long et al. 2019).

Par ailleurs, l'ANP32A humaine, délétée de 33 acides aminés comparée à l'ANP32A aviaire, entraîne un soutien de la polymérase aviaire moindre et constitue une barrière importante pour limiter la transmission virale de l'espèce aviaire à l'homme (Yu et al. 2022). L'incorporation d'ANP32A aviaire directement dans les virions d'influenza aviaire a d'ailleurs permis de s'affranchir de la barrière d'espèce et a donc augmenté la transmission inter-espèces de l'influenza aviaire chez des mammifères (Na et al. 2024).

Idoko-Akoh et son équipe ont récemment conçus des poulets génétiquement modifiés homozygotes contenant deux substitutions d'acides aminés dans la protéine ANP32A, ce qui empêche l'interaction de cette dernière avec la polymérase virale aviaire (Idoko-Akoh et al. 2023).

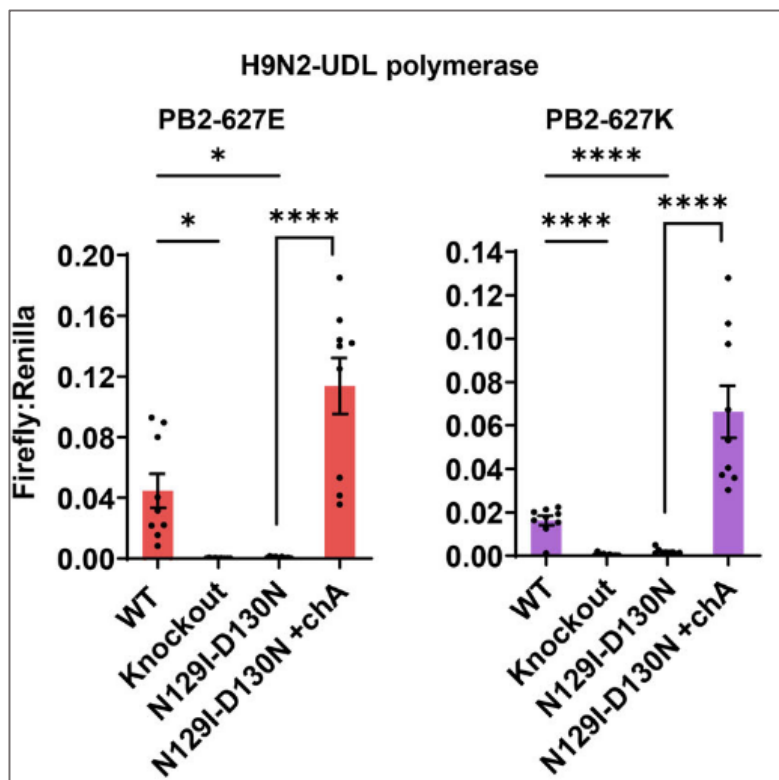


Figure n°44 : Mesure de l'activité de la polymérase aviaire reconstituée (PB2-627E) et de son isoforme humaine reconstitué de trois souches virales différentes (PB2-627K) au sein de cellules primordiales différenciées en fibroblastes issus d'individus non modifiés (WT), d'individus avec un *knock-out* pour la protéine ANP32A (Knockout), d'individus porteurs de deux mutations au sein d'ANP32A (N129I-D130N) et d'individus également N129I-D130N) mais mis en contact avec l'ANP32A sauvage (+ chA). Avec * $P \leq 0.05$, **** $P \leq 0.0001$. Source : Idoko-Akoh et al. 2023

Les deux polymérases (aviaire et isoforme humain) se sont montrées actives dans les cellules de type sauvage (WT) mais inactives dans les cellules ANP32A^{N129I-D130N} ou ANP32A *knock-out*. L'expression exogène de l'ANP32A de poulet de type sauvage a permis de restaurer l'activité de la polymérase dans les cellules ANP32A^{N129I-D130N}.

Ces résultats confirment que les acides aminés aux positions 129 et 130 de l'ANP32A de poulet sont déterminants pour l'activité de la polymérase dans les cellules de poulet.

Après ces mesures d'activité polymérase *in vitro*, l'étude s'est penchée sur la charge virale post-infection à une souche d'influenza aviaire (H9N2-UDL, Pakistan) des poulets sauvages et génétiquement modifiés pour ANP32A âgés de deux semaines, tel que décrits précédemment (ANP32A^{N129I-D130N}). L'expérience a été menée à la fois à faible et à forte dose, soit 10³ et 10⁶ PFU⁵ respectivement.

À faible dose virale, le virus a été détecté dans les écouvillons oropharyngés de manière constante chez tous les oiseaux WT directement inoculés (10 sur 10 oiseaux) du jour 1 post-inoculation jusqu'au jour 4 post-inoculation, avec des titres moyens quotidiens supérieurs à 3 × 10⁴ PFU/ml, après quoi les titres ont diminué et le virus a été éliminé au jour 6 post-inoculation. 7 des 10 oiseaux sentinelles (cohabitant avec les WT infectés) ont contracté l'infection par exposition directe aux oiseaux directement inoculés et ont excrété le virus du jour 3 au jour 6 après exposition.

Contrairement aux oiseaux WT, l'excrétion oropharyngée du virus n'a pas été détectée chez 9 des 10 oiseaux ANP32A^{N129I-D130N} directement inoculés. Un individu (#5692) a montré une excrétion retardée du jour 4 au jour 6 post-inoculation avec des titres viraux faibles. Aucun des oiseaux sentinelles ANP32A^{N129I-D130N} n'a été infecté, ce qui suggère globalement que le génotype ANP32A^{N129I-D130N} confère une résistance aux doses naturellement excrétées de l'*influenza* aviaire.

⁵ Les PFU (Plaque-Forming Units) sont des unités utilisées en virologie pour quantifier le nombre de particules virales capables d'infecter et de lyser des cellules dans une culture cellulaire. Chaque PFU représente une particule virale infectieuse qui peut former une plaque de lyse visible sur une monocouche de cellules dans un test de plaque. Ces plaques apparaissent comme des zones claires sur la culture cellulaire où les cellules ont été détruites par le virus. Le nombre de PFU permet de mesurer la concentration de virus actif dans un échantillon.

Les résultats à forte dose virale sont illustrés en figure n°45.

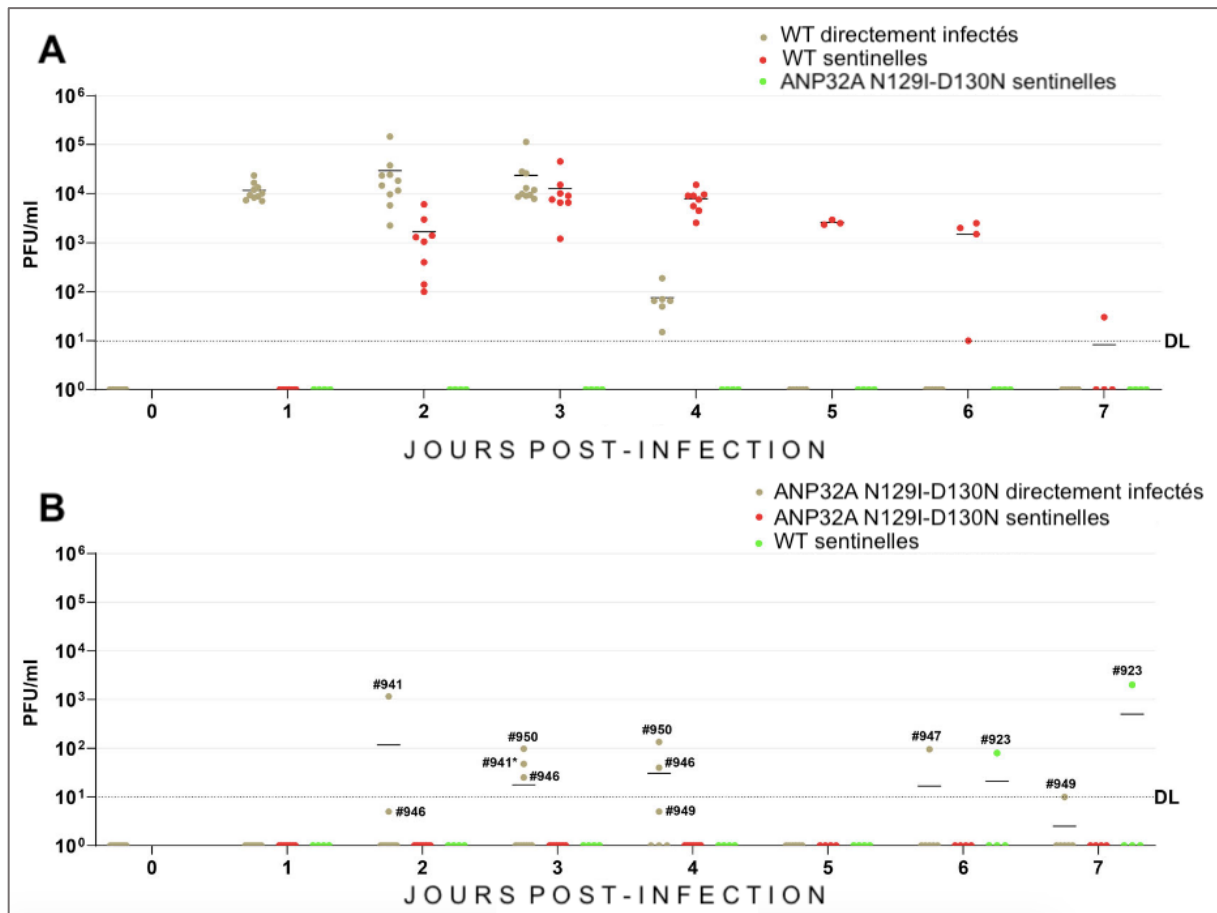


Figure n°45 : Charge virale (PFU/mL) par écouvillon journalier. Chaque point correspond à un écouvillon d'un individu au jour X. (A) En gris, les écouvillons des WT directement infectés ; en rouge, les écouvillons des WT sentinelles (mis au contact après 24 heures) ; en vert, les écouvillons des ANP32A^{N129I-D130N} sentinelles. (B) En gris, les écouvillons des ANP32A^{N129I-D130N} directement infectés ; en rouge, les écouvillons des ANP32A^{N129I-D130N} sentinelles ; en vert, les écouvillons des WT sentinelles. Avec DL, le seuil de détection de 10 PFU/mL. Source : Idoko-Akoh et al. 2023

Tous les oiseaux WT ont été fortement infectés et ont transmis le virus à tous les sentinelles WT : le titre moyen était de $2,9 \times 10^4$ PFU/ml. Tous les oiseaux sentinelles WT ont contracté l'infection et ont excrété des titres élevés de virus infectieux (titre moyen maximal de $1,3 \times 10^4$ PFU/ml au jour 2 post-exposition). En revanche, aucun des quatre oiseaux ANP32A^{N129I-D130N} logés dans l'isolateur WT n'a été infecté, ce qui suggère qu'ils étaient résistants à l'infection par une dose naturellement transmise (cf. Figure n°45A).

Une excrétion oropharyngée faible et sporadique du virus a été observée chez cinq des dix oiseaux ANP32A^{N129I-D130N} directement inoculés entre le jour 2 et le jour 7 post-inoculation. Trois des dix oiseaux ANP32A^{N129I-D130N} directement inoculés (#941, #946 et #950) ont excrété le virus aux jours 2 et 3 post-inoculation. L'excrétion oropharyngée a ensuite été observée chez deux autres oiseaux ANP32A^{N129I-D130N} (#947 et #949) entre le jour 4 et le jour 7 post-inoculation. Les titres viraux excrétés quotidiennement par les oiseaux ANP32A^{N129I-D130N} directement inoculés et infectés étaient globalement inférieurs à ceux observés chez les oiseaux WT, sauf pour un oiseau (#941) qui avait un titre de $1,2 \times 10^3$ PFU/ml au jour 2 post-inoculation (cf. Figure n°45B).

Des résultats encourageants avaient été obtenus mais le virus H9N2 s'est adapté et est parvenu à une réplication, moindre mais présente, en mobilisant la protéine ANP32A éditée (ANP32A^{N129I-D130N}) durant l'expérience. Un *knock-out* de ANP32A (AKO) a alors été testé et a montré les mêmes résultats. Tout cela indique qu'en dépit de l'absence d'ANP32A, le virus influenza parvient à s'adapter et se répliquer. L'infection n'est pas empêchée (Idoko-Akoh et al. 2023).

Une expérience supplémentaire a été menée, cette fois-ci en générant des mutants n'exprimant aucune protéine de la famille des ANP32 ou seulement ANP32B ou ANP32E. Les résultats de l'épreuve au virus H9N2 avaient montré des taux de réplication trop faible au sein des lignées cellulaires pour une interprétation significative. Ces dernières ont donc été infectées avec deux virus influenza hautement pathogènes : H5N1 Tky05 (cf. Figure n°52A) et H5N1 de clade 2.3.4.4b. Les résultats sont illustrés en figure n°46.

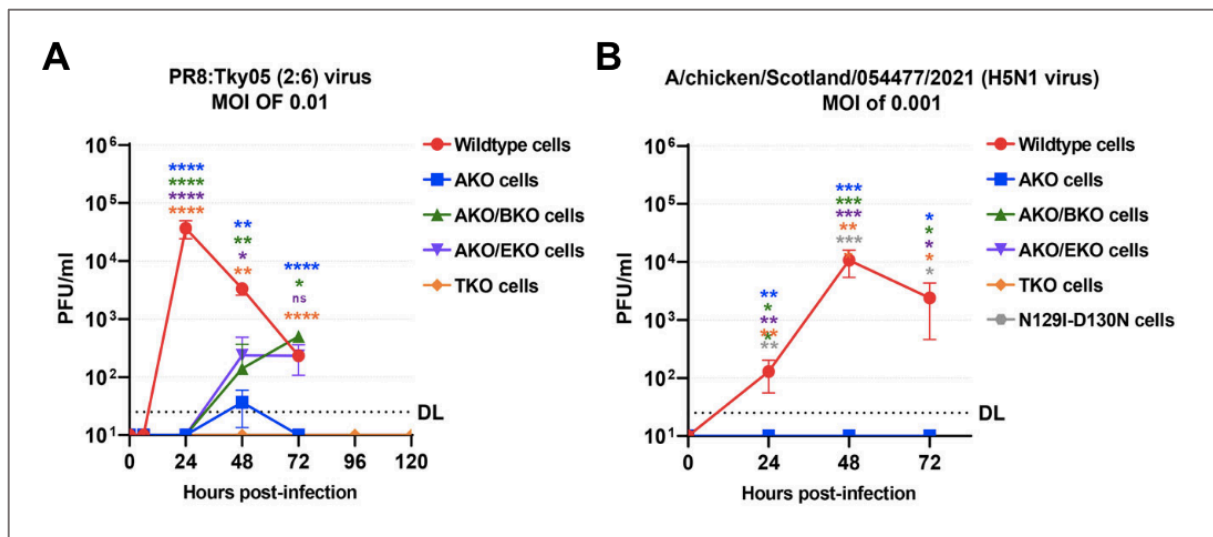


Figure n°46 : Infection de lignées de fibroblastes dérivés de cellules primordiales d'oiseaux sauvages (« Wildtype cells », en rouge), *knock-out* ANP32A (« AKO cells », en bleu), *knock-out* pour ANP32A et B (« AKO/BKO cells », en vert), *knock-out* pour ANP32A et E (« AKO/EKO cells », en violet) ou *knock-out* pour ANP32A, B et E (« TKO cells », en orange) avec l'influenza aviaire hautement pathogène (A) H5N1 Tky05 ou (B) H5N1 de clade 2.3.4.4b. Les surnageants de culture cellulaire ont été récoltés aux temps indiqués et titrés par des tests de plaques. Avec : ns non significatif, *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001, ****P ≤ 0,0001. Source : Idoko-Akoh et al. 2023

Concernant l'infection au H5N1 Tky05 (Figure n°52A), la réplication virale était significative 48 heures après l'infection dans les cellules de type sauvage et toutes les cellules modifiées, sauf dans la lignée TKO qui n'a produit aucun virus infectieux même après 120 heures d'incubation. L'infection au H5N1 de clade 2.3.4.4b. (Figure n°46B) a confirmé l'absence complète de réplication chez les cellules TKO mais a également montré l'absence de réplication chez les autres mutants.

Ces résultats soulignent l'insuffisance d'un *knock-out* d'une seule des trois protéines de la famille des ANP32 à prévenir l'infection des cellules aviaires à l'influenza. La modification des trois protéines de la famille des ANP32 semblent être une solution apportant des résultats encourageants (Idoko-Akoh et al. 2023).

D'autres travaux ont porté sur les récepteurs de type RIG-I, impliqués dans la reconnaissance intracytoplasmique des infections à virus à ARN et le recrutement d'effecteurs de la famille des interférons de type I (Blyth et al. 2016). Ces derniers ont des propriétés antivirales contre l'influenza aviaire.

Ces récepteurs sont absents chez le poulet mais présents chez le canard, où ils confèrent une plus haute résistance clinique à l'infection virale (Barber et al. 2010).

Ainsi, l'introduction par l'emploi des nouveaux outils d'édition génomique, tel que CRISPR-Cas9, pourrait laisser envisager une expression clinique moindre et une réduction de la mortalité chez les poulets infectés à l'influenza aviaire. Cette approche n'a cependant pas été testée à ce jour.

Les nouveaux outils d'édition génomique offrent donc un potentiel considérable pour le développement d'animaux résistants à diverses maladies, ouvrant ainsi la voie à des avancées significatives en matière de santé animale et de santé publique. Cependant, comme le démontre l'exemple de l'influenza aviaire, les pathogènes possèdent une capacité d'adaptation qui leur permet de contourner les modifications génétiques, ce qui peut aboutir à des infections malgré les résistances introduites. Par conséquent, bien que prometteuses, ces solutions pourraient n'offrir qu'une protection à court terme, nécessitant une vigilance continue et des stratégies complémentaires pour gérer les risques à plus long terme.

b. Amélioration des productions animales

La demande croissante en produits alimentaires requise par la croissance de la population mondiale représente un des plus grands défis auquel l'humanité devra faire face dans les années à venir (Menchaca et al. 2020).

En effet, les Nations Unies, et particulièrement la FAO (*Food and Agriculture Organization*), ainsi que la WB (*World Bank*) estiment que la population mondiale excèdera les 9 milliards d'ici 2050. S'ajoute à cette croissance démographique une augmentation de la consommation par habitant en protéines animales au détriment des produits végétaux (World Bank 2018).

Les approches classiques visant à améliorer la productivité comme la sélection génétique opérée depuis le milieu du XX^{ème} siècle contribueront de manière importante mais ne permettront pas, en l'absence de changements dans le modèle d'agriculture actuel, de s'acquitter pleinement du défi attendu.

Les nouvelles technologies d'édition génomique sont des outils considérés dans l'amélioration des caractéristiques zootechniques. Ainsi, plusieurs stratégies ont été publiées pour une croissance musculaire augmentée, une meilleure résistance aux fortes températures, une qualité de lait supérieure, etc. (Liu et al. 2024).

L'augmentation de la masse musculaire par modification du gène codant pour la myostatine chez le bovin et l'élaboration de bovins résistants aux hautes températures seront développés en guise d'exemples dans la suite de ce paragraphe.

i. Croissance musculaire

Depuis sa découverte en 1997 par McPherron, Lawler et Lee, la myostatine n'a cessé d'être au cœur de la recherche pour l'amélioration du rendement par tête en viande en élevage (McPherron, Lawler, Lee 1997). En effet, la suppression de cette protéine de la famille des facteurs de croissance transformants β (TGF- β) chez la souris permettait le développement d'une musculature supérieure à la normale, suggérant que la myostatine exerçait un rôle inhibiteur dans la croissance musculaire. Les résultats de cette étude sont illustrés en figure n°47.

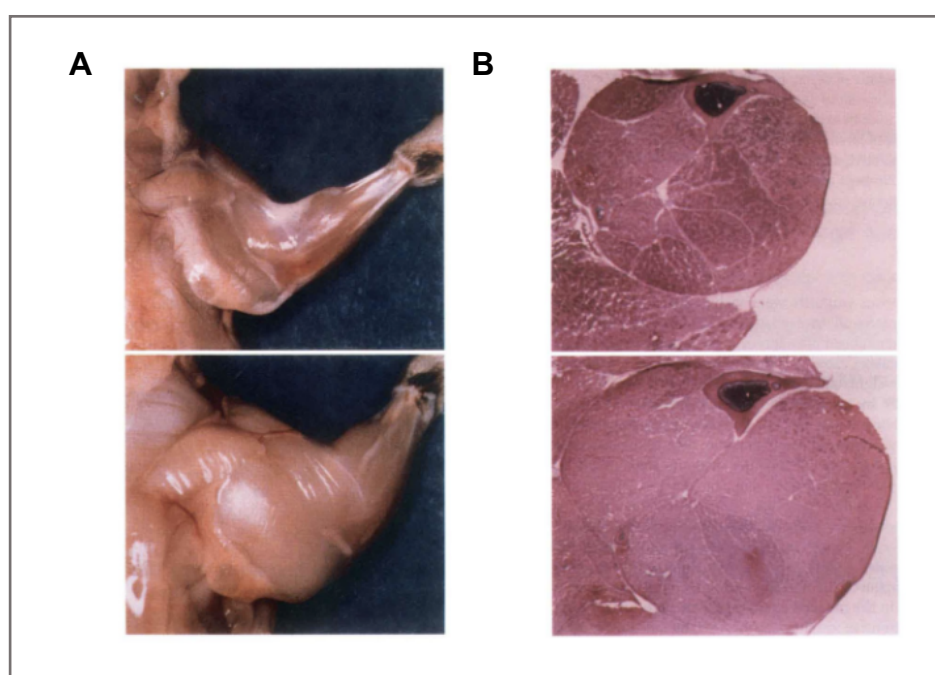


Figure n°47 : Hypertrophie musculaire chez les souris n'exprimant pas la myostatine (en bas) par rapport aux souris sauvages (en haut). (A) Photographie des muscles des membres thoraciques sur souris écorchée. (B) Coupes histologiques des muscles distaux des membres pelviens, colorées à l'éosine et à l'hématoxyline. Source : McPherron, Lawler, Lee 1997

La myostatine joue en effet un rôle clé dans l'équilibre de la structure musculaire par un effet inhibiteur limitant la taille et le nombre de fibres. Son inactivation par mutation permet donc une augmentation du rendement par tête en viande. Par ailleurs, sa mutation engendre également une diminution de la graisse intra-musculaire et ajoute donc une valeur supplémentaire à la viande produite (Ge et al. 2021).

Le mode d'action de la myostatine s'exerce au niveau de la prolifération des cellules satellites et de leur différenciation sous l'influence de plusieurs facteurs myogéniques (MyoD, Myf5 et myogénine) en fibres musculaires. Les cellules satellites constituent en effet une réserve en nouvelles fibres pour le muscle (Bonnieu et al. 2007).

Des mutations naturelles du gène, en ségrégation dans différentes races européennes (Blanc Bleu Belge, Limousine, Blonde d'Aquitaine, Charolaise ou encore Piémontaise), ont été identifiées de longue date et sont à l'origine du phénotype « culard » décrit dans ces races (Zhang, Wen, Guo 2014). Ce phénotype est illustré en figure n°48.

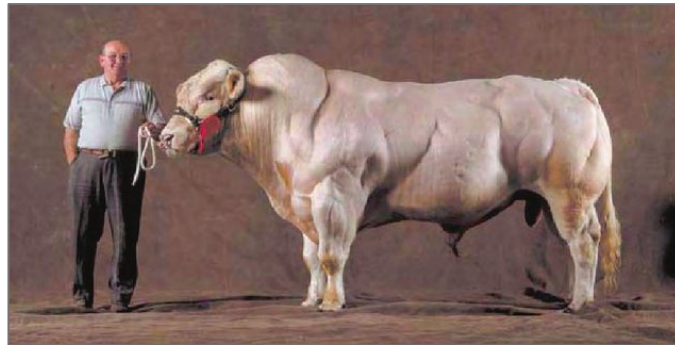


Figure n°48 : Taureau de race Bleu Blanc Belge exhibant le phénotype « culard », photographie capturée le 16 avril 2008. Source : Alford, McKiernan 2009

La mutation n'est pas anodine : les animaux porteurs présentent des troubles de la reproduction avec une difficulté de mise bas chez les femelles menant à des césariennes quasi-systématiques (jusqu'à 90% en race Bleu Blanc Belge) ou encore des troubles ostéoarticulaires devant le poids trop important des muscles (Hanzen, Laurent, Ward 1994).

La recherche s'est penchée sur l'inactivation du gène codant la myostatine par l'usage de techniques de transgénèse, et, plus récemment des nucléases à doigts de Zinc (Xian-Ju Huang et al. 2014; Zhang et al. 2016) ou des nucléases TALEN (Carlson et al. 2012).

Ces stratégies ont rapidement été abandonnées avec l'avènement de la technique CRISPR-Cas9 pour ses avantages en termes d'efficacité et de précision. Les publications sur ses applications concernant la croissance musculaire des animaux de rente sont recensées dans le tableau n°15.

| Publications | Résumé | Gène(s) ciblé(s) |
|------------------|--|---------------------|
| Dua et al. 2023 | Production d'embryons de buffles génétiquement modifiés viables | MSTN |
| Gim et al. 2022 | Les mutations du gène MSTN induites chez les bovins femelles et mâles peuvent être transmises aux cellules germinales de la génération suivante de veaux, et les mutations du gène MSTN ont été transmises à partir des cellules germinales. | MSTN |
| Zhao et al. 2022 | Les taureaux modifiés au niveau du gène MSTN ont montré des caractéristiques de croissance améliorées, des paramètres biochimiques supérieurs et une motilité des spermatozoïdes plus élevée. | MSTN |
| Gim et al. 2023 | Production de gènes mutants MSTN et PRNP chez les bovins de boucherie et utilisation des gènes mutants MSTN et BLG chez les vaches laitières | MSTN, BLG, PRNP |
| Ge et al. 2021 | Augmentation de la valeur ajoutée, de la différenciation myogénique et de la différenciation lipogénique par mutation ponctuelle de MSTN et inhibition simultanée de PPAR γ dans les cellules myogéniques bovines | MSTN, PPAR γ |
| Zhou et al. 2022 | La réduction de l'expression de Myogenic Differentiation 1 (MyoD1), un membre de la famille de gènes MRF, et l'identification de gènes exprimés différemment via un criblage par séquençage du transcriptome, ont suggéré que MyoD1 peut affecter la différenciation des cellules musculaires et la croissance musculaire. | MyoD1 |

Tableau n°15 : Applications de CRISPR-Cas9 dans l'augmentation de la croissance musculaire chez les animaux de rente. Source : Liu et al. 2024

Les travaux de Zhao et son équipe en 2022 ont, par exemple, permis l'obtention de bovins présentant une amélioration notable des caractéristiques de croissance, plus particulièrement au niveau des hanches et des quartiers arrière (cf. Figure n°50) mais également au niveau des circonférences thoracique et abdominale et de la longueur du corps (cf. Figure n°51). Des photographies des individus sauvages et génétiquement modifiés sont présentées sur la figure n°49.



Figure n°49 : Photographie d'un bovin (A) du groupe génétiquement modifié, (B) du groupe contrôle de type sauvage. Source : Zhao et al. 2022

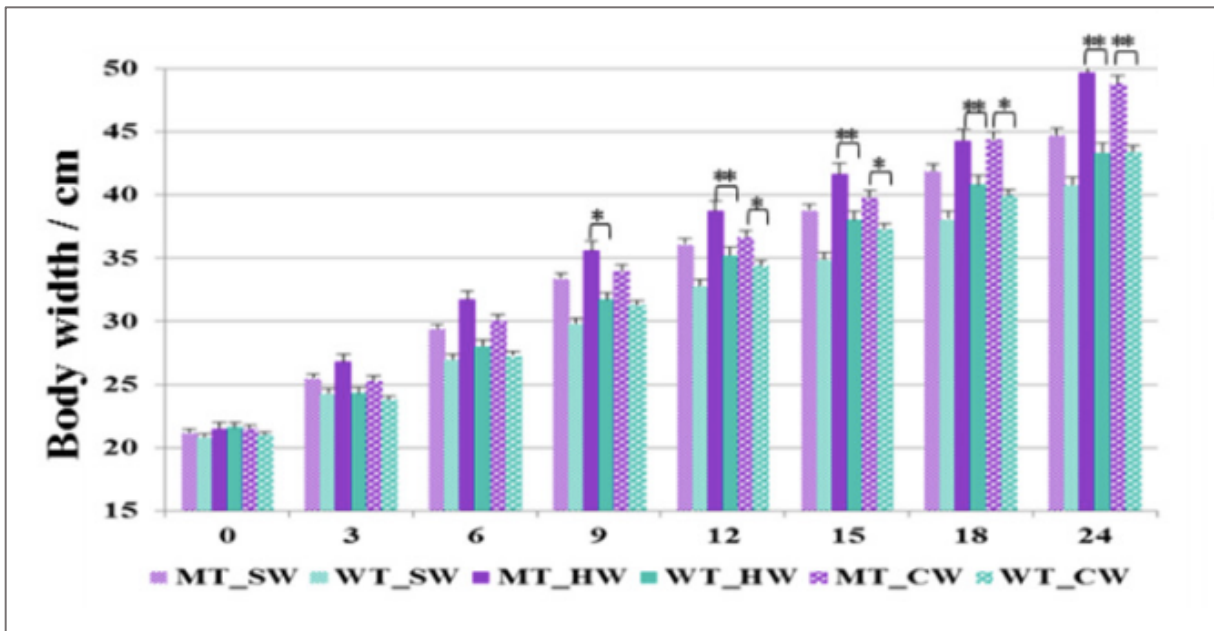


Figure n°50 : Mesures en centimètres de la largeur des épaules du bovin (SW), de la largeur de la hanche (HW) et de la largeur de la croupe (CW) chez des individus sauvages (WT) et mutés (MT). Avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Source : Zhao et al. 2022

Les largeurs de hanche et de croupe sont significativement augmentées chez les bovins génétiquement modifiés, suggérant une croissance plus importante.

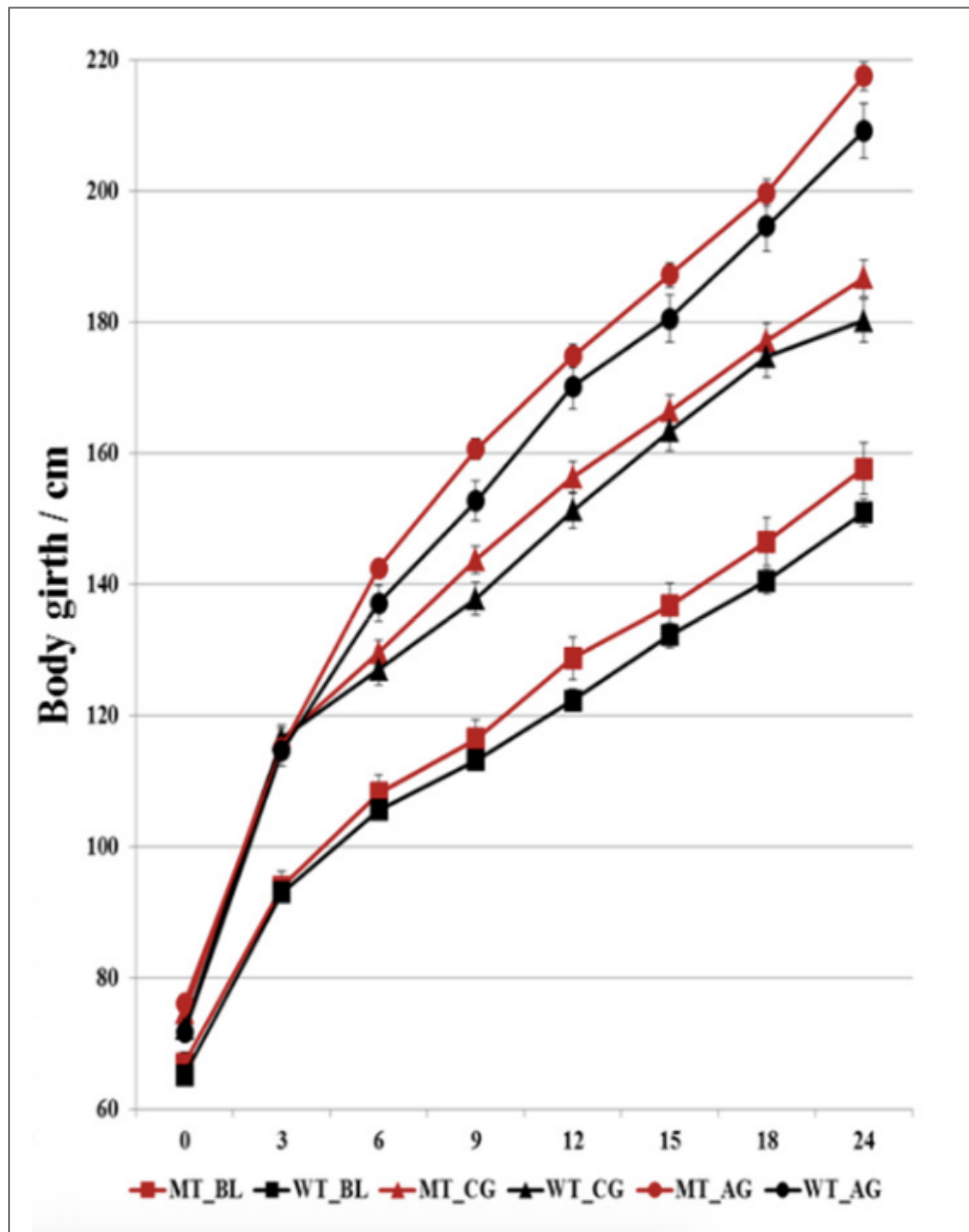


Figure n°51 : Mesures en centimètres de la longueur du corps (BL), de la circonférence thoracique (CG) et de la circonférence abdominale (AG) chez des individus sauvages (WT) et mutés (MT). Source : Zhao et al. 2022

Pour l'obtention de ces individus, Zhao et son équipe ont généré deux mutations au sein du gène codant la myostatine par CRISPR-Cas9 et SNCT. La construction du plasmide comprenait 3 ARN guides à expression indépendante et a permis d'obtenir deux types de mutations différentes au sein de l'exon 1 : une délétion de 115 paires de bases en position 505 ou une délétion de 6 paires de base en position 507.

Les avis sont contrastés concernant ce champ d'applications des nouveaux outils d'édition génomique. Contrairement à la santé animale citée précédemment ou à la protection de l'environnement abordée au paragraphe suivant, l'augmentation des productions animales recueille en effet une opinion publique plus nuancée.

Est-il raisonnable de produire des animaux avec une masse musculaire très supérieure à ce qu'il présente naturellement, connaissant les complications évoquées précédemment ?

Sous prétexte que nous le pouvons, devons-nous franchir les barrières de la sélection naturelle et de la sélection génétique et modifier à notre guise le génome des animaux afin d'obtenir des clones aux caractéristiques zootechniques « parfaites » ? Savons-nous le faire sans impacter d'autres caractéristiques essentielles à la survie ou au bien-être de l'espèce modifiée ?

L'emploi des nouvelles technologies, aussi attirant puisse-t-il l'être, permettrait-il de répondre sur le long terme aux besoins alimentaires requis par la croissance démographique mondiale ?

Ces questionnements éthiques semblent cruciaux avant d'envisager un encadrement juridique précis pour la mise sur le marché éventuelle de tels produits génétiquement modifiés. Nous y reviendrons dans les chapitres dédiés à ces sujets.

ii. Thermotolérance

Devant un contexte de changement climatique important et rapide, une autre caractéristique zootechnique est étudiée sous le prisme des nouveaux outils d'édition génomique : la thermotolérance des animaux de rente. Les températures extrêmes peuvent, en autres et par des phénomènes directs ou indirects, engendrer une baisse de fertilité, une augmentation de l'incidence de certaines affections, une baisse des productions laitières et en viande, etc. (Nardone et al. 2010).

Deux stratégies s'appuyant sur la technique CRISPR-Cas9 ont été employées chez les bovins : l'une permet de raccourcir la longueur du pelage (Cuellar et al. 2024) ; l'autre a consisté en la dilution couleur de la robe du pelage (Laible et al. 2021). Ces deux exemples sont présentés dans ce paragraphe.

OBTENTION DE BOVINS À PELAGE COURT

Plusieurs études ont d'ores-et-déjà démontré que des mutations du récepteur à la prolactine, codé par le gène PRLR, provoque une inhibition de la pousse des poils. Ces mutations d'apparition naturelle appelées « *slick* » (pour « court ») sont recensées chez plusieurs races de bovins du bassin caraïbéen (Dikmen et al. 2014).

Dans l'étude de Cuellar et ses collaborateurs, des mutations induisant un gène PRLR tronqué au niveau de l'exon 9 ont non seulement permis l'obtention de bovins capables d'une meilleure régulation leur température corporelle, mais qui ont aussi montré une croissance supérieure par rapport aux individus sauvages de la même espèce.

Par ailleurs, la prolactine est connue pour ses effets sur la reproduction. L'objet de l'étude était donc aussi de vérifier que l'altération du récepteur à la prolactine n'altérerait pas secondairement les fonctions reproductrices des bovins mutés.

Les résultats suivants ont été obtenus :



Figure n°52 : Photographies d'un bovin muté sur le gène PRLR et présentant un pelage plus court (à gauche) et d'un bovin du groupe contrôle (à droite). Source : Cuellar et al. 2024

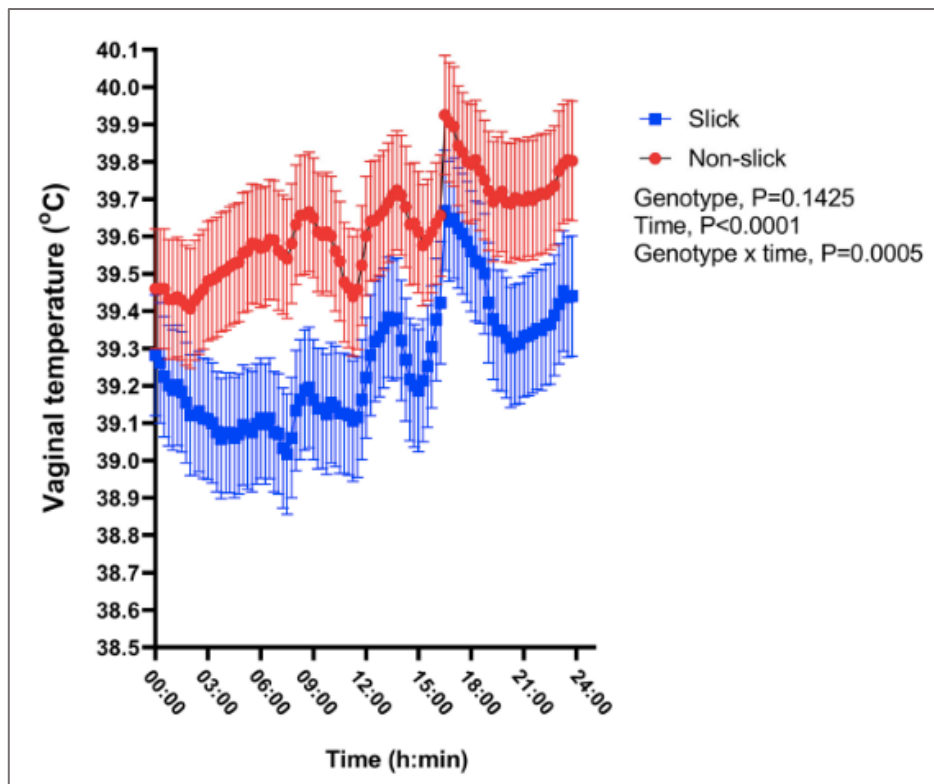


Figure n°53 : Différences entre les animaux *slick* (en bleu) et *non-slick* (en rouge) dans la régulation de la température corporelle pendant un stress thermique (en août). Les données sont des moyennes pour la température vaginale enregistrée à des intervalles de 15 minutes chez les génisses. Source : Cuellar et al. 2024

Comme l'illustre la figure n°53, les températures vaginales étaient généralement plus basses chez les femelles *slick* que chez les femelles *non-slick*, mais l'ampleur de la différence variait en fonction de l'heure de la journée. Dans l'ensemble, la température vaginale était de $39,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pour les femelles *slick* et de $39,6 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pour les femelles *non-slick*.

Néanmoins, la même étude a montré que le phénotype à pelage court n'a montré aucune amélioration vis-à-vis d'autres variables clés de réponse aux températures extrêmes comme la température cutanée et la fréquence respiratoire.

En outre, les bovins *slick* ont montré des caractéristiques de croissance supérieures à celles des bovins *non-slick*. Dans l'étude, l'épaisseur du muscle *longissimus thoracis* a été mesurée sur les carcasses âgées de 535 jours en moyenne, en novembre après la période estivale. Les résultats obtenus sont illustrés en figure n°54.

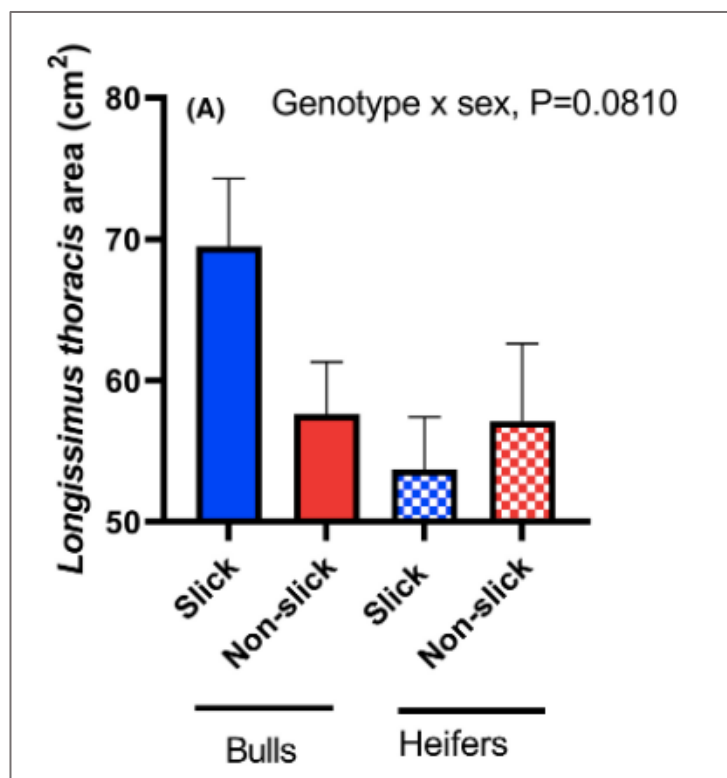


Figure n°54 : Différences entre les animaux *slick* (en bleu) et *non-slick* (en rouge) concernant la section transversale moyenne du muscle longissimus thoracis chez les taureaux (« bulls ») et les génisses (« heifers »). Source : Cuellar et al. 2024

Le diagramme en figure n°54 met en lumière une tendance significative des taureaux *slick* à présenter une section transversale du muscle longissimus thoracis plus large que les taureaux *non-slick*. En revanche, aucune différence significative n'est notée sur les génisses.

Ces travaux ont été réalisés en partie par des chercheurs de la société Acceligen®. Cette entreprise a vu ses bovins PLRL-SLICK obtenus par CRISPR-Cas9 autorisés à la consommation par la *Food and Drug Administration* en 2022. Ce bovin génétiquement modifié entre donc dans la liste des animaux génétiquement modifiés autorisés à la production et à la consommation, au même titre que le saumon transgénique AquAdvantage® mentionné précédemment.

DILUTION DE LA ROBE

Plusieurs études ont déjà montré la différence de température corporelle chez des bovins à pelage sombre ou clair pour une même durée exposition solaire. Celle de Hillman et ses collaborateurs peut être citée (P. E Hillman et al. 2001).

Cette étude avait montré que lorsqu'elles sont exposées à la lumière directe du soleil, la surface des Holstein noires en lactation, soumises à un stress thermique, s'élève d'environ 4,8°C, contre environ 0,7°C pour les Holstein blanches. Cela était dû à la plus grande absorption du rayonnement solaire par les pelages noirs (89 %) par rapport aux pelages blancs (66 %).

Le réchauffement local de la surface de la peau par le soleil semble maximiser la transpiration, mais cela n'est pas suffisant pour empêcher la température rectale d'augmenter de 1,3°C/heure chez les vaches noires contre 0,8°C/heure chez les vaches blanches en moyenne (P. E Hillman et al. 2001).

Des mutations chez des bovins de races *Galloway* et *Highland* ont été identifiées comme responsables d'une dilution de la robe. Les animaux naturellement hétérozygotes pour une délétion du codon en position 18 (correspondant à une leucine) du gène *PMEL* présentent ainsi une robe diluée. Le gène *PMEL* code en effet

pour une protéine appelée pré-mélanosome, dont la fonction est de distribuer la mélanine produite par les mélanocytes dans des mélanosomes qui achemineront le pigment dans les autres lignées cellulaires de l'épiderme (Schmutz, Dreger 2013).

La dilution de la robe des bovins à partir d'une modification du gène *PMEL* offre donc une perspective intéressante dans l'amélioration de la thermotolérance des animaux.

Elle a été réalisée avec succès par l'équipe de Laible en 2020 (Laible et al. 2021) sur des bovins de la race Prim'Holstein. Deux veaux mutants pour le gène *PMEL* ont été obtenus. L'un est décédé des suites d'une dystocie. L'autre a survécu quelques semaines mais est décédé des suites d'une omphalite diagnostiquée trop tardivement. Ce dernier a été photographié aux côtés des veaux au génotype sauvage également conçus par transfert de noyaux de cellules somatiques modifiées :



Figure n°55 : Phénotype de dilution de couleur du veau génétiquement modifié (seul, en haut à gauche). Les images montrent le veau mutant *PMEL* avec des veaux témoins non modifiés pour une comparaison directe des couleurs de la robe.

De plus, il n'y avait pas seulement une dilution générale de la couleur des marques noires, mais aussi une différence marquée dans la distribution et le motif des marques foncées et blanches sur la robe. Le veau mutant *PMEL* avait une plus grande surface totale de marques blanches et un chanfrein blanc caractéristique, comparé aux veaux témoins qui étaient majoritairement noirs avec un chanfrein noir et une forme de losange blanc sur le front. Les causes exactes de cette distribution de tâches différentes imputée à la mutation *PMEL* demeurent à explorer.

En outre, des études complémentaires devraient être réalisées pour caractériser le bénéfice zootechnique de cette modification. Une étude similaire à celle menée par l'équipe de Hillman (P. E Hillman et al. 2001) pourrait être envisagée.

Pour l'instant, aucune autorisation de mise sur le marché pour de tels animaux n'a encore vu le jour.

En modifiant des caractères phénotypiques de race présents depuis des milliers d'années, il serait donc possible d'augmenter le rendement des productions animales. L'édition génomique pourrait donc littéralement changer le paysage de l'agriculture telle qu'on la connaît. Pour autant, sommes-nous disposés à changer à ce point une espèce pour des avantages économiques ? Augmentons-nous le bien-être de ces animaux en élevage en leur donnant la capacité de mieux résister à une forte exposition solaire ?

La thermotolérance, abordée sous le prisme du bien-être animal, pourrait représenter une perspective intéressante. Cependant, l'étude de ce critère n'est nourrie que par des intérêts purement économiques à ce jour, comme en témoignent les variables étudiées des études précédentes sur la dilution de robe (production laitière, qualité de semence, etc.) (Nardone et al. 2010).

c. Promotion du bien-être animal

Alors que l'augmentation des productions animales ne représente pas une application d'édition génomique recueillant un avis très favorable du public, la question du bien-être animal, quant à elle, se démarque. Une enquête conduite auprès de citoyens brésiliens (Yunes et al. 2021a) a étudié ce phénomène.

Pour le sondage, des participants de tout âge et catégorie socio-professionnelle ont été interrogés sur trois applications d'édition génomique différentes appliquées aux bovins : la croissance musculaire augmentée, l'amélioration de la thermotolérance et l'absence de cornes par acquisition de l'allèle « polled ».

Les questions étaient formulées de la façon suivante :

« La race bovine Bleu Blanc Belge possède un gène qui permet une croissance musculaire environ 20 % supérieure à celle des races généralement utilisées dans nos systèmes de production. Une alternative possible pour augmenter la production de viande au Brésil, tout en maintenant d'autres caractéristiques de qualité de la viande, serait d'insérer ce gène dans les races souhaitées. Considérez-vous la modification génétique du bétail pour produire plus de viande... [image d'un bovin Bleu Blanc Belge] »

« Au Brésil, la plupart des vaches laitières sont élevées en pâturage et, dans de nombreux cas, ont peu ou pas accès à l'ombre. Les races laitières ont peu de résistance à la chaleur et souffrent de stress thermique. Une alternative possible est de modifier génétiquement le bétail pour qu'il possède des caractéristiques lui conférant une plus grande résistance à la chaleur. Cette méthode consiste à intégrer le gène "slick" (présent dans certaines races bovines) dans le génome des races laitières. Ainsi, tous les veaux naissent plus résistants à la chaleur. Considérez-vous la modification génétique du bétail pour le rendre plus résistant à la chaleur... [image de vaches laitières au pâturage à l'ombre] »

« Au Brésil, presque toutes les vaches laitières ont leurs cornes enlevées lorsqu'elles sont jeunes, en brûlant ou en coupant le tissu cornual. L'ablation des cornes est douloureuse, et des médicaments ne sont généralement pas utilisés pour minimiser la douleur. Une alternative possible est de modifier génétiquement le bétail pour que les cornes ne poussent jamais. Cette méthode consiste à intégrer un gène « sans cornes » (trouvé dans certaines races bovines) dans le génome des races laitières; ainsi, tous les veaux naissent sans cornes. Considérez-vous la modification génétique du bétail pour qu'il n'ait pas de cornes... [image d'une vache adulte avec cornes et d'une vache adulte sans cornes] »

(Source : Yunes et al. 2021)

Après chaque question, une échelle de Likert en 5 points était proposée (traduction de l'anglais) :

- 1 : En total désaccord.
- 2 : En désaccord.
- 3 : Neutre.
- 4 : En accord.
- 5 : En total accord.

Les résultats obtenus sur ces trois questions sont illustrés sur la figure n°56.

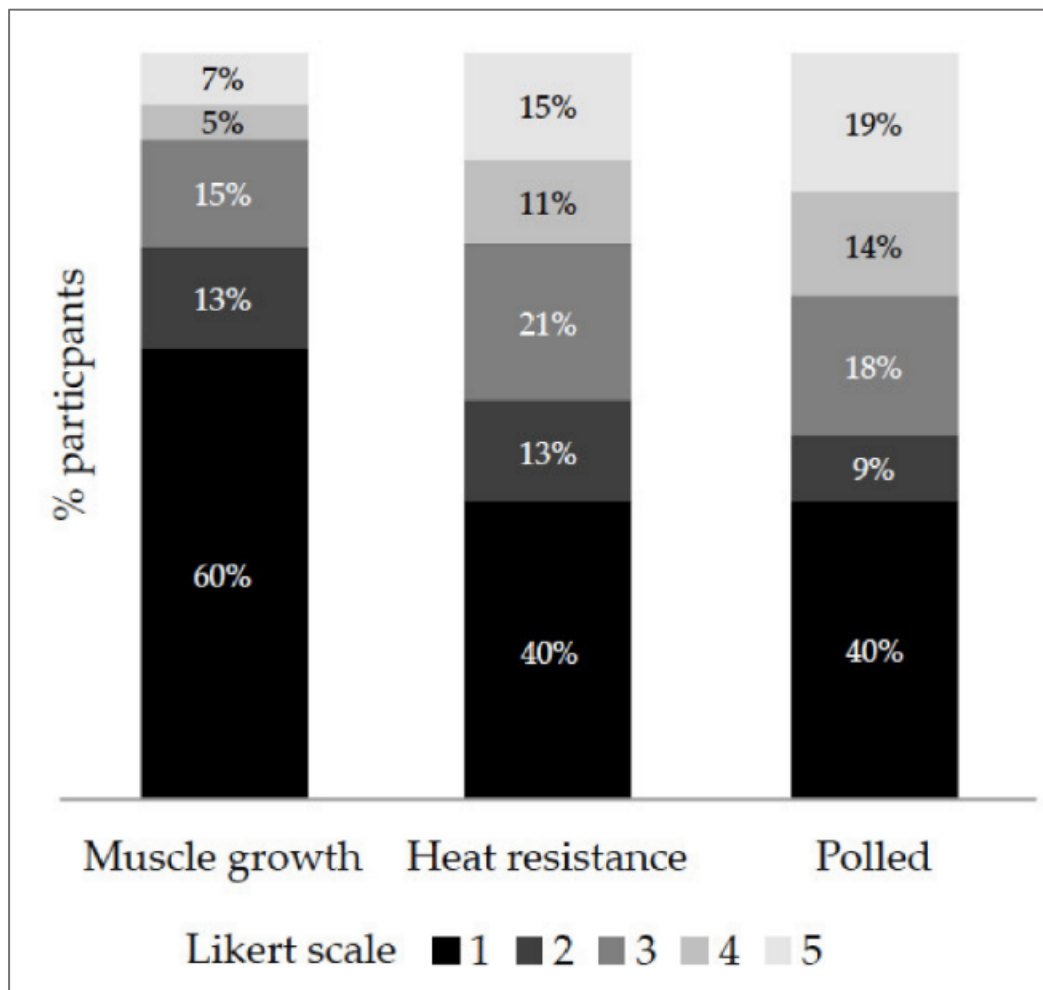


Figure n°56 : Acceptabilité (échelle de Likert, allant de 1 = pas du tout acceptable à 5 = totalement acceptable) de l'utilisation de l'édition génétique pour modifier le bétail afin d'améliorer la croissance musculaire (« muscle growth »), la résistance à la chaleur (« heat resistance ») ou l'absence de cornes (« polled »). En % des participants, n = 864. Source : Yunes et al. 2021

La publication spécifie que l'ordre des questions dans le sondage n'a pas influencé l'acceptabilité des applications d'édition génomique.

Les participants ont considéré plus acceptable une application présentée comme réduisant la souffrance animale. L'acceptabilité d'une application reflétait souvent les critiques directement faites par rapport aux systèmes d'élevage comme le manque d'ombre ou le logement confiné.

En outre, les participants percevaient l'édition génomique comme une technologie nécessitant des investissements importants, suscitant des inquiétudes quant à son potentiel à favoriser les grandes exploitations agricoles et les entreprises, au détriment des exploitations plus modestes.

Globalement, les préoccupations exprimées à propos de l'édition génomique chez les bovins étaient moins centrées sur les aspects techniques de la technologie elle-même, mais plutôt sur des inquiétudes plus larges concernant les effets des pratiques de production animale sur les animaux, les êtres humains et l'environnement.

Le bien-être animal est tout de même au cœur des préoccupations citoyennes, et les applications d'édition génomique ayant cela comme objectif premier recueillent une meilleure promotion et opinion publique.

À ce jour, plusieurs pratiques d'élevage sont controversées, comme l'écornage des bovins dont la perception était étudiée dans le sondage précédemment cité et le broyage des poussins mâles en filière de poules destinées à la production d'œufs.

Les applications d'édition génomique concernant ces deux exemples seront développées dans ce paragraphe.

i. Écornage des bovins

L'écornage des bovins est pratiqué de façon mécanique, chimique ou par cautérisation des cornes lorsque les veaux sont âgés de quelques semaines. Elle présente plusieurs avantages, notamment de s'affranchir des blessures entre congénères ou du personnel (éleveurs, vétérinaires, inséminateurs, etc.), des pertes financières secondaires (frais vétérinaires, valeur de la carcasse, etc.) et permet de réduire la surface des aires de stabulation (alimentation, repos, transit, etc.) (Marquette, Ronan, Earley 2023).

Une étude de Cozzi et ses collaborateurs en 2015 présente une revue détaillée des pratiques d'écornage en Europe. Elle présente notamment la proportion d'exploitations utilisant chaque technique, le manipulateur procédant à l'écornage et l'utilisation de sédatifs ou analgésiques, d'après une enquête sur 652 exploitations (64% de bovins laitiers, 24% de bovins de boucherie, 12% de bovins allaitants) (Cozzi et al. 2015).

Ces résultats sont illustrés dans les tableaux n°16 et 17.

Il est important de noter que l'usage de ces techniques varie selon l'aire géographique, tel qu'illustré dans le tableau n°18.

L'ébourgeonnement thermique, c'est-à-dire la cautérisation des bourgeons cornaux au fer avant l'âge de 2 mois, est la pratique la plus utilisée en Europe. Elle représente en effet 71% de l'écornage toutes filières bovines confondues, et 80% en exploitation laitière (Cozzi et al. 2015). Cette méthode, bien que rapide et efficace, est douloureuse. Une anesthésie locale est recommandée mais n'est pas toujours pratiquée. Par exemple, seules 35% des exploitations laitières européennes procèdent à une sédation, une anesthésie locale, une analgésie ou une combinaison des trois (Cozzi et al. 2015).

L'écornage chimique consiste, quant à lui, en l'application d'une crème, souvent à base d'hydroxyde de sodium ou de calcium, sur les bourgeons des cornes. Ceux-ci sont brûlés chimiquement. Cette méthode est simple mais le risque de complications, notamment des brûlures sur les tissus périphériques et des infections bactériennes locales, est plus élevé que pour la cautérisation (Marquette, Ronan, Earley 2023).

L'écornage mécanique, par l'emploi de pinces, de ciseaux voire de scies, est plutôt réservé aux animaux plus âgés. Cette méthode n'est pas très utilisée car très inconfortable pour l'animal (Marquette, Ronan, Earley 2023).

Enfin, l'écornage par la mise en place d'un élastique serré à la base des cornes des jeunes bovins, induisant une nécrose des bourgeons, est une pratique encore moins utilisée car elle est longue, inconfortable et ne s'affranchit pas des complications que présentent les autres techniques. Elle n'a donc pas de réel intérêt pratique ou économique pour l'éleveur (Marquette, Ronan, Earley 2023).

| | Overall | Production system | | | P | Contrasts | Odds ratio | 95% C.I. |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|---------|------------|------------|-----------|
| | | Beef (B) | Dairy (D) | Suckler (S) | | | | |
| Farms with dehorned cattle, % | 60.6 | 46.8 ^b | 80.7 ^a | 67.6 ^a | < 0.001 | B vs (D+S) | 0.63 | 0.51–0.79 |
| Farms with polled cattle, % | 4.9 | 7.3 | 0.9 | 4.7 | 0.135 | – | – | – |
| Disbudding: | | | | | | | | |
| % of farms with dehorned cattle | 74.7 | 71.3 ^b | 88.8 ^a | 57.8 ^b | < 0.001 | D vs (B+S) | 1.38 | 1.22–1.56 |
| Method of disbudding: | | | | | | | | |
| Hot-iron, % of farms | 71.0 ^α | 68.4 ^{αβ} | 80.4 ^α | 60.8 ^β | 0.011 | D vs S | 1.31 | 1.09–1.58 |
| Caustic paste, % of farms | 25.7 ^β | 28.2 ^{αβ} | 16.0 ^β | 36.2 ^α | 0.006 | D vs S | 0.44 | 0.26–0.75 |
| Scoop/tube, % of farms | 2.7 ^γ | 2.6 | 3.5 | 1.7 | 0.879 | – | – | – |
| Use of medications ¹ , % of farms | 27.6 | 26.2 ^{αβ} | 35.5 ^α | 16.3 ^β | 0.008 | D vs S | 2.25 | 1.34–3.78 |
| Dehorning | | | | | | | | |
| % of farms with dehorned cattle | 24.7 | 27.9 ^a | 11.1 ^b | 41.0 ^a | < 0.001 | D vs (B+S) | 0.32 | 0.18–0.57 |
| Method of dehorning: | | | | | | | | |
| Wire/saw, % of farms | 72.5 ^α | 68.8 ^β | 83.8 ^α | 62.7 ^β | 0.004 | D vs (B+S) | 1.27 | 1.12–1.45 |
| Others ² , % of farms | 26.7 ^β | 30.4 ^{αβ} | 15.7 ^β | 36.0 ^α | 0.004 | D vs S | 0.44 | 0.26–0.75 |
| Use of medications ¹ , % of farms | 43.4 | 37.9 ^β | 57.2 ^α | 35.3 ^β | < 0.001 | D vs (B+S) | 1.56 | 1.22–2.00 |

a,b,c: values within a row with different superscripts for a given classification factor differ at the reported P value.
α,β,γ: values within a column with different superscripts for a given variable differ at P < 0.001.
1: sedation, local anaesthesia, analgesia or a combination among these main treatments.
2: dehorning shears, choppers, grinders and guillotines.

Tableau n°16 : Effet du système de production sur la prévalence de l'écornage et les méthodes utilisées dans l'Union européenne. Source : Cozzi et al. 2015

| Method of dehorning | Person in charge | | | Use of medications (% of farm) | Type of medication (% of total medications) | | | | Postoperative disinfection (% of farms) |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------------|---|--------------------|--------------------|-------------------|--|
| | Stockman | Veterinarian | Technical assistant | | SED ¹ | LA | AG | COMB | |
| | | | | | | | | | |
| Disbudding: | | | | | | | | | |
| Hot-iron, % of farms | 71.7 ^a | 24.7 ^b | 3.6 ^c | 50.7 ^α | 24.8 ^β | 26.6 ^β | 2.4 ^c | 46.2 ^a | 59.9 ^α |
| Caustic paste, % of farms | 92.3 ^a | 2.6 ^b | 5.1 ^b | 5.6 ^γ | 21.2 ^{αβ} | 28.8 ^a | 12.5 ^b | 37.5 ^a | 21.8 ^β |
| Scoop/tube, % of farms | 59.9 ^a | 39.6 ^b | 0.5 ^c | 25.9 ^β | 22.6 ^β | 49.9 ^a | 20.0 ^{bc} | 7.5 ^c | 66.6 ^α |
| Dehorning: | | | | | | | | | |
| Wire/saw, % of farms | 48.6 ^a | 47.3 ^a | 4.1 ^b | 55.8 | 22.3 ^b | 32.0 ^{ab} | 3.6 ^c | 42.1 ^a | 72.4 |
| Other ² , % of farms | 32.7 ^b | 61.4 ^a | 5.9 ^c | 52.5 | 13.6 ^b | 34.3 ^a | 12.7 ^b | 39.5 ^a | 71.8 |

1: SED=sedation; LA=local anaesthesia; AG=analgesia; COMB=combination among SED and/or LA and/or AG.
a,b,c: values within a row with different superscripts for a given classification factor differ at P < 0.001.
α,γ,β: values within a column with different superscripts for a given variable differ at P < 0.001.
2: dehorning shears, choppers, grinders and guillotines.

Tableau n°17 : Personne responsable de l'écornage et utilisation de médicaments et de désinfection postopératoire. Source : Cozzi et al. 2015

| | EU macro-regions | | | | P |
|--|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------|
| | North | Centre | East | South | |
| Farms with dehorned cattle, % | 85.6 ^a | 61.2 ^b | 46.4 ^{bc} | 36.6 ^c | < 0.001 |
| Farms with polled cattle, % | 16.9 ^a | 1.4 ^b | 1.9 ^b | 0.8 ^b | < 0.001 |
| Disbudding: | | | | | |
| % of farms with dehorned cattle | 87.7 ^a | 79.2 ^{ab} | 64.0 ^{bc} | 53.7 ^c | < 0.001 |
| Method of disbudding: | | | | | |
| Hot-iron, % of farms | 91.1 ^a | 83.7 ^a | 40.0 ^b | 35.1 ^b | < 0.001 |
| Caustic paste, % of farms | 6.7 ^b | 16.2 ^b | 52.3 ^a | 57.2 ^a | < 0.001 |
| Scoop/tube, % of farms | 2.2 | 0.1 | 7.7 | 7.7 | 0.060 |
| Use of medications ¹ , % of farms | 25.4 | 32.2 | 21.5 | 22.8 | 0.310 |
| Dehorning | | | | | |
| % of farms with dehorned cattle | 12.3 ^c | 20.8 ^{bc} | 36.0 ^{ab} | 42.9 ^a | < 0.001 |
| Method of dehorning: | | | | | |
| Wire/saw, % of farms | 54.1 ^b | 70.9 ^b | 93.8 ^a | 87.3 ^a | < 0.001 |
| Others ² , % of farms | 42.2 ^a | 29.1 ^a | 6.2 ^b | 12.7 ^b | < 0.001 |
| Use of medications ¹ , % of farms | 52.5 ^a | 41.4 ^{ab} | 56.8 ^a | 28.1 ^b | < 0.001 |

a,b,c: values within a row with different superscripts for a given classification factor differ at the reported P value.
1: sedation, local anaesthesia, analgesia or a combination among these main treatments.
2: dehorning shears, choppers, grinders and guillotines.

Tableau n°18 : Effet de la région géographique sur la prévalence de l'écornage et les méthodes utilisées dans l'Union européenne. Source : Cozzi et al. 2015

Comme l'illustrent les trois tableaux, l'usage d'une analgésie, d'une anesthésie locale ou d'une sédation n'est pas systématique. Pourtant, l'écornage est une pratique douloureuse. Plusieurs études l'ont montré. La publication de Grøndahl-Nielsen de 1999 peut être évoquée (Grøndahl-Nielsen et al. 1999).

Cette étude a porté sur 6 groupes de veaux âgés de 4 à 6 semaines soumis à un écornage dans des conditions différentes :

- Groupe 1 : Un bloc nerveux cornual (lidocaïne 2 % sur les deux nerfs cornuaux) a été réalisé. Un écorneur fictif a été utilisé 15 minutes plus tard avec un fer froid, pour mimer l'intervention humaine sans réaliser l'écornage afin d'améliorer la représentativité de ce groupe témoin.
- Groupe 2 : Comme le groupe 1, mais en utilisant un fer chaud (environ 600°C).
- Groupe 3 : Les veaux ont reçu un mélange de xylazine (Rompun, Bayer®) à 0,2 mg/kg et de butorphanol (Torbugesic, Fort Dodge®) à 0,1 mg/kg par injection intramusculaire, et ont été écornés à chaud 20 minutes plus tard.
- Groupe 4 : Les veaux ont reçu la même injection sédative et analgésique que le groupe 3. Après 5 minutes, un bloc nerveux cornual a été réalisé et les veaux ont été écornés à chaud 15 minutes plus tard.
- Groupe 5 : Les veaux ont été écornés à chaud sans sédation ni analgésie.
- Groupe 6 : Ces veaux n'ont pas été manipulés et ont servi de témoins pour les études comportementales.

Les mouvements des oreilles, des membres et de la tête pendant l'écornage, les taux de cortisol plasmatique immédiatement après écornage puis le délai de reprise de la rumination et la fréquence cardiaque en post-écornage ont été comparés entre les groupes. Ces paramètres représentent en effet des marqueurs de stress, douleur et inconfort. Certains des résultats de l'étude sont présentés ci-dessous.

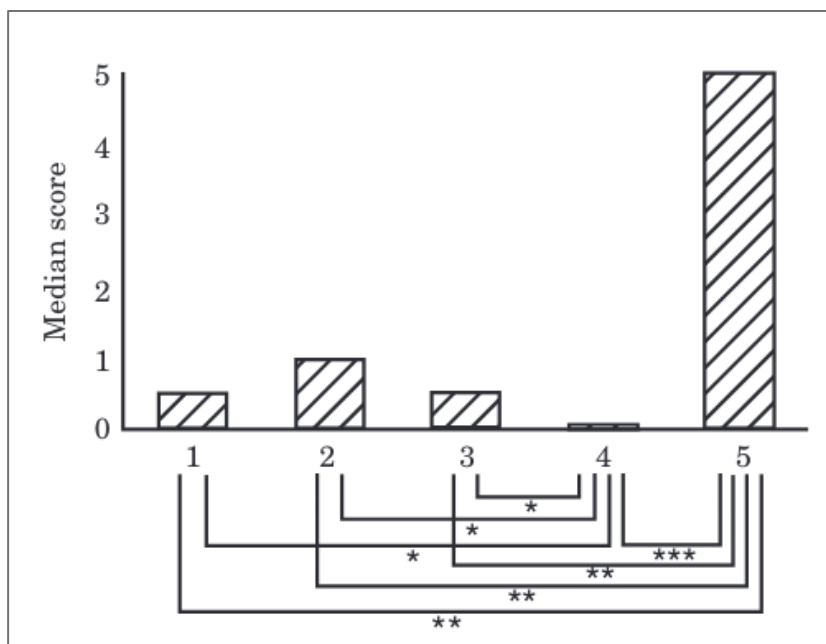


Figure n°57 : Moyenne des scores d'intensité du mouvement des membres par groupe durant l'écornage. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Source : Grøndahl-Nielsen et al. 1999

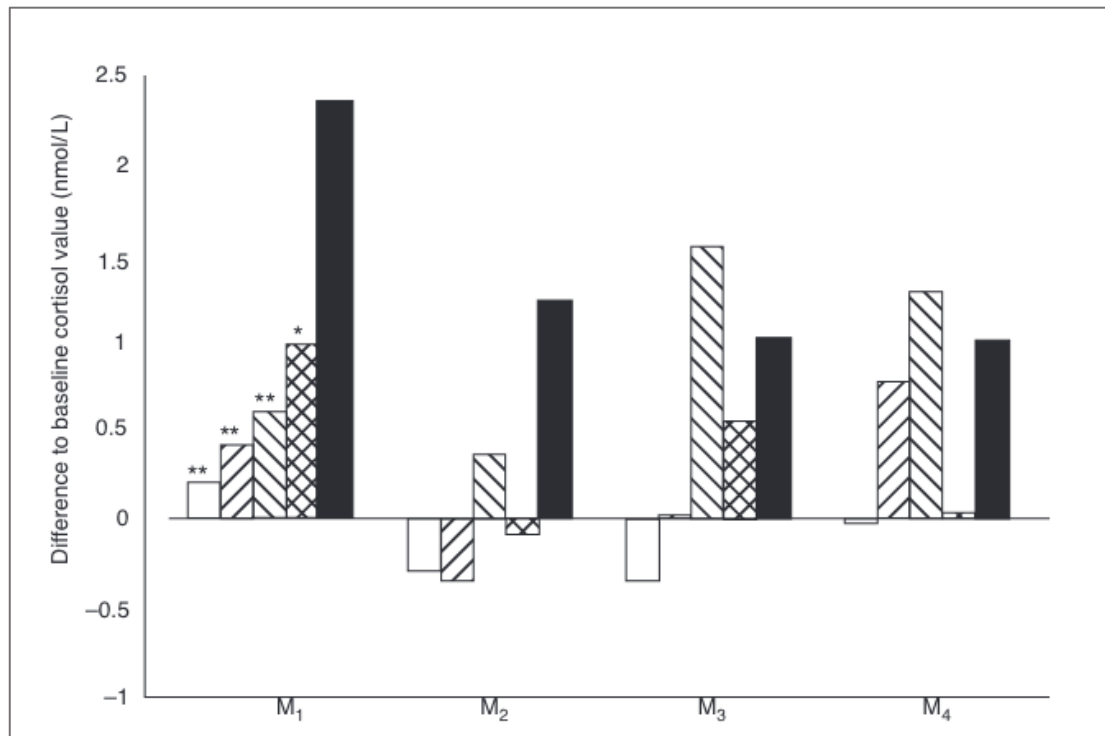


Figure n°58 : Moyennes géométriques des différences entre les valeurs maximales (M1–M4) et les valeurs de base du cortisol exprimées en nmol/L. Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes de traitement 1–4 et 5. Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre les groupes 1–4. *P<0,05 ; **P<0,01. Source : Grøndahl-Nielsen et al. 1999

Les comparaisons par paires entre les cinq groupes ont montré que la concentration plasmatique de cortisol dans le groupe 5 immédiatement après l'écorchage (M1) a augmenté de manière significativement plus importante que dans tous les autres groupes (cf. Figure n°58).

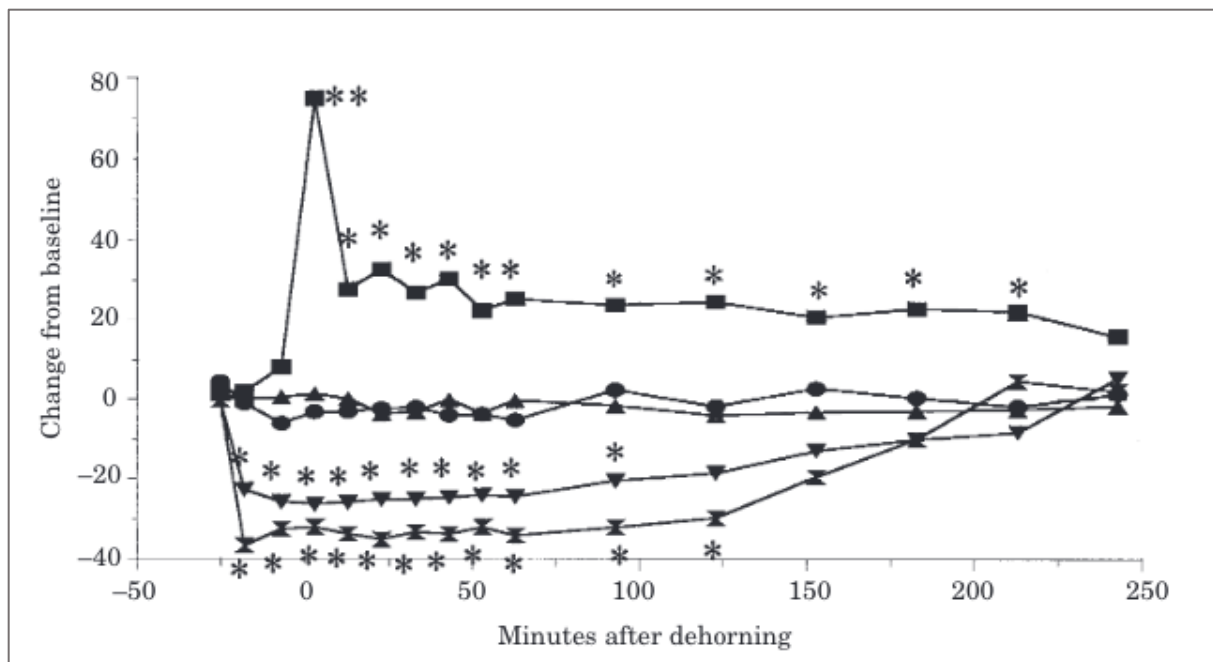


Figure n°59 : Fréquences cardiaques avant et après l'écornage dans les cinq groupes expérimentaux, mesurées par la différence entre les fréquences cardiaques mesurées et la moyenne du groupe pour la première fréquence cardiaque enregistrée pré-écornage. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au groupe 1. Groupes : 1 (▲) ; 2 (●) ; 3 (▼) ; 4 (⌘) ; 5 (■). *P<0,05, **P<0,01. Source : Grøndahl-Nielsen et al. 1999

Toutes les variables citées ont été mesurées sur une période de quatre heures suivant l'écornage et ont montré la même tendance, avec des mouvements de tête, membres et oreilles d'une plus grande incidence et une fréquence de rumination diminuée chez le groupe 5 (n'ayant reçu aucun traitement avant écornage) de façon significative.

Cette étude met en lumière les réponses de stress générées par l'écornage chez les veaux. Une autre étude très récente a montré des résultats similaires sur d'autres paramètres (Cui et al. 2024). Ils ne seront pas détaillés dans ce manuscrit mais cités pour leur pertinence.

Comme souligné par l'enquête de Yunes et al. 2021, la notion du bien-être animal est importante pour les consommateurs. Les pratiques d'écornage leur sont peu connues mais une fois présentées, leur apparaissent cruelles.

Avant la domestication des bovins par l'homme, les cornes étaient essentielles à la survie des espèces sauvages en représentant un outil de défense fondamental contre les prédateurs. Après la domestication, les cornes étaient un trait recherché dans la plupart des régions d'élevage pour l'utilisation des bovins comme animaux de trait dans l'agriculture. Les cornes permettaient en effet de les harnacher aux outils de travail du sol pour les cultures de produits végétaux ou aux outils de transport de charges lourdes. Néanmoins, certaines régions ont privilégié des bovins présentant de naissance le phénotype « *Polled* », c'est-à-dire sans cornes, par exemple la Scandinavie ou l'Écosse. Parmi les races présentant ce phénotype, la race *Angus* peut être citée (Medugorac et al. 2012).

Grâce aux avancées dans le domaine de la génétique, l'absence de cornes génétiquement héritée, qui était autrefois sélectionnée par les éleveurs en faisant reproduire les individus présentant ce caractère phénotypique entre eux, a été caractérisée en 2012. Deux mutations autosomales dominantes indépendantes responsables du phénotype « sans cornes » ont été identifiées sur le chromosome 1 par génotypage de bovins du continent européen (Medugorac et al. 2012). Le gène correspondant a été nommé *POLLED*.

Les allèles correspondant à ces deux mutations sont : l'allèle d'origine frisonne (P_F), une duplication de 80 128 paires de bases (pb) (position 1909352–1989480 pb du chromosome 1), et l'allèle d'origine celtique (P_C) correspondant à une duplication de 212 pb (position 1705834-1706045 pb du chromosome 1) à la place d'une délétion de 10 pb (position 1706051–1706060 pb du chromosome 1).

L'identification de ces allèles et les progrès dans le domaine de la génétique ont encouragé la recherche sur l'édition du gène *POLLED* dans le but d'obtenir des bovins génétiquement conçus sans cornes.

Les premiers travaux recensés dans ce domaine datent de 2016. Carlson et son équipe ont en effet produit, par l'emploi de nucléases programmables de type TALEN, des bovins de race *Prim Holstein* sans cornes (Carlson et al. 2016).

Pour cela, l'allèle P_C a été introduit dans le génome de fibroblastes embryonnaires bovins. Les lignées cellulaires homozygotes et hétérozygotes obtenues ont permis la genèse par transfert de noyaux de cellules somatiques de quatre veaux dont le phénotype « polled » a été confirmé par expertise vétérinaire.

L'analyse du génotype des quatre veaux par PCR a montré l'introgression homozygote de l'allèle « polled » chez les veaux RCI001, RCI002 et RCI003 et hétérozygote chez le veau RCI004 (cf. Figure n°60).

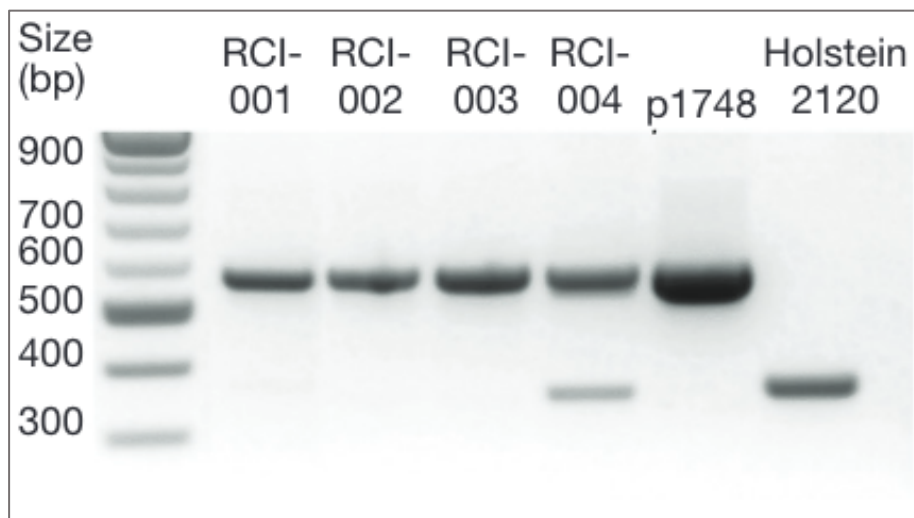


Figure n°60 : Analyse par PCR puis Southern-Blot de l'introgression de l'allèle P_C chez les bovins génétiquement modifiés RC001, RCI002, RCI003, RCI004. L'identité des produits PCR a été confirmée par séquençage Sanger. Le contrôle positif (p1748) était un plasmide contenant l'allèle P_C. Le produit « Holstein 2120 » correspond à l'allèle sauvage de l'individu dont les fibroblastes ont été prélevés pour l'élaboration des veaux génétiquement modifiés. RCI0001, 2 et 3 présentent une unique bande identique au produit d'amplification « p1748 » correspondant à l'allèle modifié P_C. Ils sont donc homozygotes pour l'allèle P_C. RCI004 présente une bande pour l'allèle P_C et une bande identique au produit d'amplification « Holstein 2120 ». Il est donc hétérozygote avec un allèle P_C et un allèle sauvage. Source : Carlson et al. 2016



Figure n°61 : Phénotype « Polled » obtenu chez des veaux Prim Holstein. Photographies des veaux RCI002 et RCI003 à 2 mois d'âge. Source : Carlson et al. 2016

Depuis ces travaux, deux autres variants de l'allèle pour le phénotype *Polled* ont été identifiés. L'allèle *Mongolian* a été mis en évidence en 2017 (Medugorac et al. 2017). Il se caractérise par une duplication complexe avec quelques insertions et délétions, débutant en position 1 976 128 pb du chromosome 1 (Aldersey et al. 2020).

La figure n°62 est une représentation schématique des trois variants.

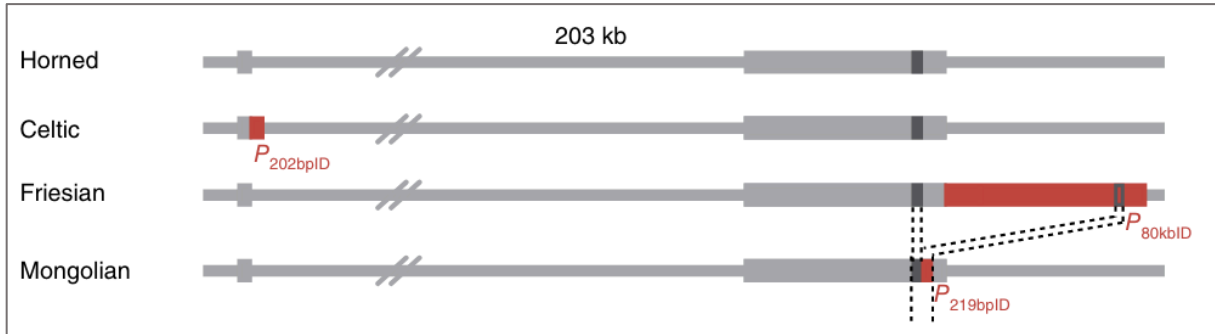


Figure n°62 : Schéma présentant la nature et la localisation des mutations différentes identifiées au locus POLLED dans l'allèle bovin par rapport à l'allèle de type sauvage. La région affichée s'étend de 1 690 000 pb à 2 090 000 pb sur le chromosome 1 (indiquée par des lignes pointillées dans la figure b). Les boîtes rouges représentent les segments qui sont dupliqués dans les allèles celtique, frison et mongol, tandis que les boîtes gris clair et foncées représentent les segments originaux. Il est à noter qu'aucune des trois mutations POLLED n'affecte les régions codantes et que le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'absence de cornes reste inconnu à ce jour. Source : Medugorac et al. 2017

Plus tard, le variant *Guarani* du gène *POLLED* a été identifié en 2019. Il est, tout comme les autres variants connus, localisé dans les régions intergéniques du chromosome 1. À ce jour, le mécanisme moléculaire complexe qui, depuis ces allèles, résulte en l'absence de cornes n'est pas connu (Utsunomiya et al. 2019).

Une autre piste est alors explorée pour comprendre la fonction des gènes impliqués dans le phénotype *polled*. Le gène *RFXP2* (*Relaxin Family Peptide receptor 2*) est exprimé de façon plus importante au niveau des bourgeons cornuaux chez les fœtus au phénotype sauvage en comparaison avec les fœtus au phénotype *polled*. Une étude histologique sur des fœtus bovins âgés de 58 jours a mis en évidence l'absence d'expression de *RFXP2* dans l'épithélium cornual chez les veaux *polled*. *RFXP2* pourrait représenter une cible intéressante pour l'élaboration de bovins sans cornes dans le futur après une caractérisation plus complète de sa fonction (Aldersey et al. 2024).

En 2020, un variant de CRISPR-Cas9, le système CRISPR-Cas12a a été utilisé par Schuster et son équipe pour concevoir des veaux *Polled* par insertion du variant celtique (PC) (Schuster et al. 2020).

Le système CRISPR-Cas12a offre des avantages intéressants dans la réalisation d'expérience par knock-in de séquences. En effet, CRISPR/Cas12a est un système CRISPR de type V classe II qui ne nécessite qu'un seul ARN CRISPR (crRNA) au lieu d'un complexe tracr comme CRISPR/Cas9.

Par ailleurs, Cas12a ne possède qu'un seul domaine de coupure actif, qui coupe un brin d'ADN en cis et l'autre en trans-position, générant des extrémités cohésives (non franches) contrairement à CRISPR-Cas9 qui possède deux domaines de coupure, qui aboutissent à l'obtention d'une coupure de la séquence cible aux extrémités franches (Swarts, Van Der Oost, Jinek 2017). Les coupures cohésives facilitent l'insertion orientée de séquence exogène, faisant de CRISPR-12a un outil très intéressant pour des travaux d'édition génomique.

Pour la génération de descendants sans cornes, des fibroblastes ont donc été prélevés chez un taureau cornu de race *Holstein* et modifiés par intégration par CRISPR-12a du variant celtique du gène *POLLED* préalablement isolé à partir de cellules d'une vache de race *Angus* et amplifié par PCR (Schuster et al. 2020). Le variant celtique est représenté en figure n°63.

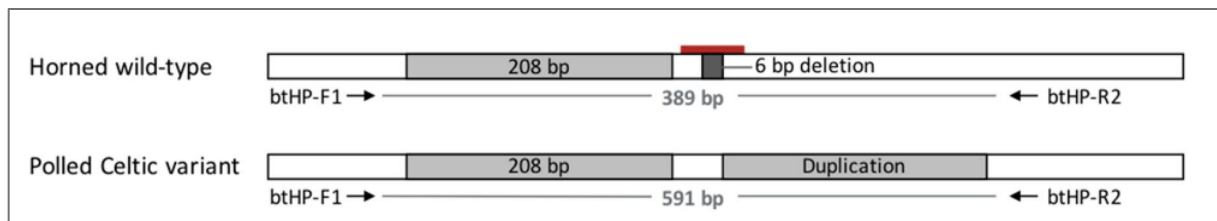


Figure n°63 : Représentation schématique du locus *POLLED*. L'allèle Polled Celtic (Pc) (en bas) consiste en une duplication de 208 pb associée à une délétion de 6 pb. Le système CRISPR/Cas12a ciblait la séquence de 6 pb de la variante de type sauvage (WT) (barre rouge) (qui n'est pas présente dans la variante Pc). Des amorces spécifiques (btHP-F1 et btHP-R2) ont été utilisées pour distinguer les séquences sauvage (389 pb) et Pc (591 pb) dans les produits obtenus après réalisation de l'édition par CRISPR-Cas12a. Source : Schuster et al. 2020

Les fibroblastes modifiés ont ensuite permis l'élaboration d'embryons bovins par transfert de noyaux de cellules somatiques (SNCT soit *Somatic Nuclear Cell Transfer*). Les phénotypes des fœtus obtenus ont été photographiés et des analyses histologiques des bourgeons cornuaux ont été réalisées (cf. Figure n°64).

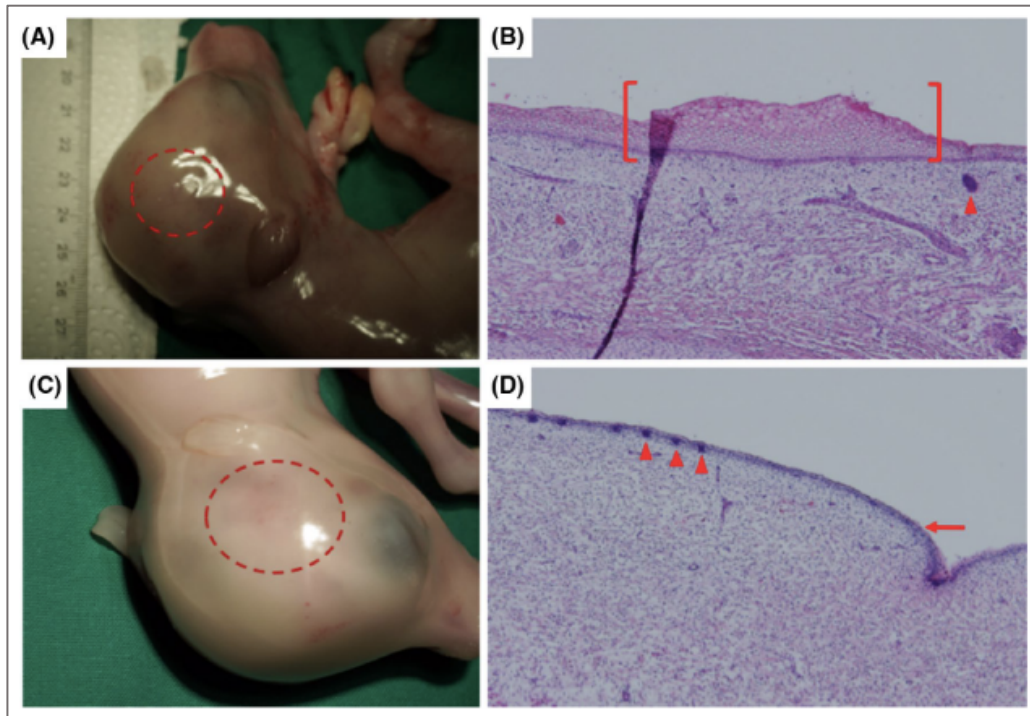


Figure n°64 : Analyse des foetus bovins. (A) Foetus non modifié prélevé sur une carcasse en abattoir, visualisation d'une déformation frontale (bourgeon cornual). (B) Épaississement épidermique en regard du bourgeon cornual en 11 à 13 couches de kératinocytes (entre crochets rouges) chez le veau non modifié. (C) Foetus génétiquement modifié, absence de déformation compatible avec la présence d'un bourgeon cornual. (D) Absence d'épaississement de l'épiderme dans la région du bourgeon cornual. Source : Schuster et al. 2020

Six blastocystes avaient été obtenus, seule une gestation a été constatée. La gestation est arrivée à terme mais le veau est décédé d'une défaillance multi-organique quelques minutes après extraction par césarienne. Il présentait le phénotype *polled* attendu, comme l'illustre la figure n°65.



Figure n°65 : Veau né par extraction. Le veau a été délivré avec succès par césarienne. Le veau est décédé peu de temps après la naissance en raison de malformations multiples des organes, entraînant finalement une insuffisance cardio-vasculaire. Source : Schuster et al. 2020

L'obtention d'un seul individu porteur de la mutation et présentant une défaillance multi-organique incompatible avec la vie, s'ajoutant à la méconnaissance des circonstances d'expression des allèles du locus *POLLED* soulève quelques questions. Sommes-nous capables de prédire les effets de ces mutations sur le long terme sans en comprendre le mécanisme moléculaire ? Avant d'envisager une mise sur le marché de tels animaux génétiquement modifiés, ne serait-il pas judicieux de poursuivre l'exploration de la fonction de ces variations intergéniques ? De leurs effets *off-target* potentiels ?

Une question supplémentaire subsiste. Le fait de priver les bovins de leurs cornes présente avant tout un intérêt économique pour l'éleveur, en limitant les frais liés aux blessures entre congénères mais aussi et surtout, de permettre une forte densité animale dans un milieu clos où le stress engendre des comportements agressifs. Par l'élaboration de bovins naissant sans corne, n'encourageons-nous pas des pratiques d'élevage inadaptées aux besoins de ces animaux ? Limitons-nous le stress ou seulement ses conséquences ? Agissons-nous réellement pour leur bien-être ?

À ce jour, aucun bovin génétiquement modifié pour le locus *POLLED* n'a vu sa mise sur le marché. Pour autant, certaines entreprises, telle que Recombinetics®, sont déjà prêtes à les commercialiser. La FDA, en simplifiant la mise sur le marché d'animaux génétiquement modifiés, autorisera sûrement très rapidement la vente de tels animaux aux États-Unis, où la régulation est plus flexible qu'en Europe par exemple. Ce serait alors la deuxième application d'édition génomique autorisée sur le marché des bovins aux États-Unis, la première étant la mutation *Slick* rendant le pelage plus court, également abordée dans ce manuscrit.

ii. Broyage des poussins

Dans la filière « ponte » hautement spécialisée dans laquelle aucun animal n'est valorisé pour sa carcasse (viande), les œufs étaient autrefois portés à éclosion et triés ensuite par sexe. Les mâles étaient éliminés dès la sortie de l'œuf par broyage mécanique, asphyxie au dioxyde de carbone ou dislocation cervicale car le coût de leur élevage excédait la valeur de leur carcasse sur le marché. Les femelles étaient, quant à elles, gardées pour renouveler les poules pondeuses des élevages de production d'œufs.

Dans le courant des années 2010, des photographies et vidéos de l'élimination des poussins mâles par broyage mécanique et asphyxie avaient été capturées en caméra cachée et diffusées par des associations de protection animale pour dénoncer massivement cette pratique, la qualifiant de cruelle et inhumaine. On peut notamment citer l'implication de l'association L214 dans cette opération de médiatisation.

Sous la pression de ces organisations et des citoyens, l'Europe avait réfléchi aux moyens de mettre fin à ces pratiques. En France, le décret n°2022-137 du 5 février 2022 relatif à l'interdiction de mise à mort des poussins des lignées de l'espèce *Gallus gallus* destinés à la production d'œufs de consommation interdisait ces pratiques au 31 décembre 2022. Cette décision avait encouragé l'expansion des systèmes de sexage *in ovo* dans les élevages, c'est-à-dire la détermination du sexe du poussin directement dans l'œuf avant son éclosion.

Le sexage *in ovo* repose actuellement sur diverses techniques très peu invasives, donc ne nuisant ni au développement *in ovo* ni à l'éclosion. La plus employée à ce jour en raison de sa rapidité, de son efficacité et de sa précision est la spectroscopie Raman (Jia et al. 2023).

Cette technique repose sur l'analyse par laser d'un échantillon de liquide allantoïde ou de sang prélevé dans l'œuf. Son innocuité n'est pas totale du fait du risque d'endommagement de l'embryon par introduction éventuelle de pathogènes (Jia et al. 2023).

L'équipement requis (lasers, capteurs hyperspectraux) est également assez coûteux et nécessite un entretien et un calibrage régulier (Jia et al. 2023).

Enfin, la spectroscopie Raman offre un taux de précision élevé, jusqu'à 93% de sexage correct, mais des variations d'épaisseur de la coquille, ou la position de l'embryon dans l'œuf peuvent interférer. Elle peut également s'avérer plus lente que d'autres techniques de spectroscopie (Galli et al. 2018).

La spectroscopie par résonance magnétique ou spectroscopie optique sont deux stratégies ne nécessitant pas de prélèvement de liquide allantoïde ou sang mais l'équipement utilisé est plus coûteux encore que celui employé pour la spectroscopie Raman.

Les nouvelles techniques d'édition génomique offrent un nouveau regard sur le sexage *in ovo* en permettant de s'affranchir du prélèvement de matériel biologique dans l'œuf et des coûts conséquents des équipements. Pour cela, le sexe chromosomique est une piste explorée.

En effet, la détermination chromosomique du sexe de la descendance chez les espèces avicoles est, contrairement aux mammifères, imputée à la femelle. En effet, les femelles sont ZW et les mâles sont ZZ. Par conséquent, le tri de la semence pour la production de descendants d'un seul sexe n'était pas envisageable chez les espèces avicoles d'élevage.

Lee et son équipe s'était penchés en 2019 sur l'insertion ciblée de la séquence codant pour la protéine GFP sur le chromosome Z par CRISPR-Cas9 et par recombinaison non homologue dans des cellules germinales primordiales de poulet (PGCs). Ils sont parvenus à cette modification sans qu'aucun effet *off-target* n'ait été identifié.

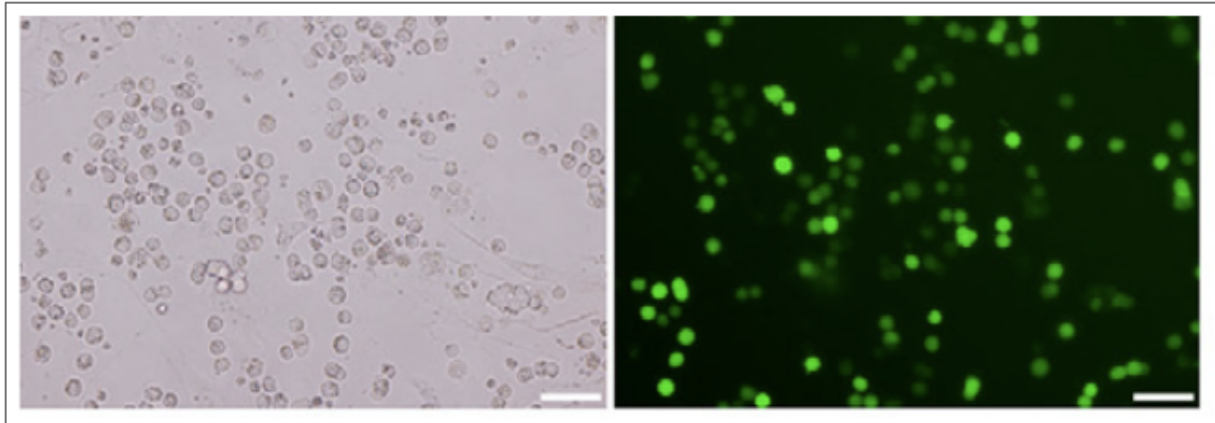


Figure n°66 : Expression de la GFP dans les cellules germinales primordiales de poulet sept jours après transfection du plasmide CRISPR-Cas9. Barre d'échelle : 100 μ m. Source : Lee et al. 2019

Ils ont ensuite obtenu des poussins à partir de ces cellules primordiales modifiées (cf. figure n°67).



Figure n°67 : Détection de l'expression de la protéine GFP chez des poussins à l'aide d'une lampe à fluorescence. La GFP s'exprime dans différentes lignées cellulaires, comme le prédisait l'expression des gènes encadrant le locus d'insertion de la séquence codant la GFP. Source : Lee et al. 2019

Cependant, une lignée n'a pu être fondée car les descendants G2 femelles ne portent la mutation que sur un de leur chromosome Z, tel qu'illustré dans les figures n°68A et B.

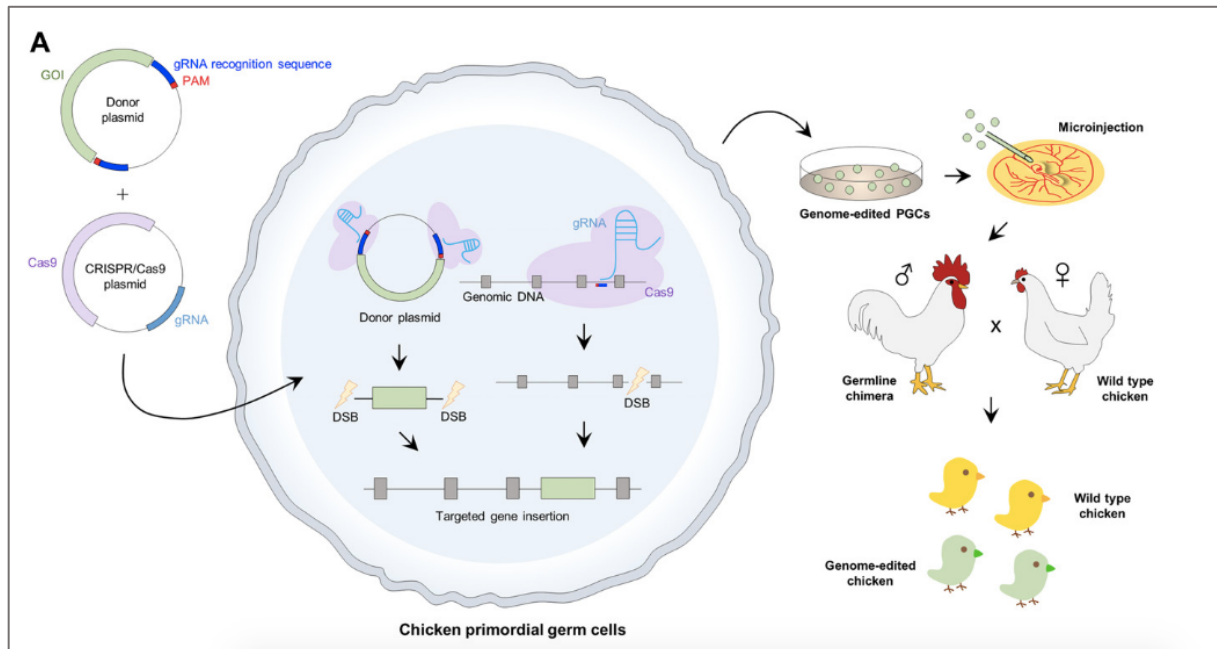


Figure n°68A : Représentation schématique de la méthode d'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9-NHEJ pour le développement de modèles aviaires. (A) L'introduction du plasmide CRISPR/Cas9 codant pour la protéine Cas9 et l'ARN guide (gRNA), ainsi que du plasmide donneur contenant les séquences de reconnaissance du gRNA et le gène d'intérêt (GFP), entraîne des cassures double-brin (DSB) dans l'ADN génomique du poulet ainsi que dans le plasmide donneur introduit. La séquence codant la GFP est donc insérée à un locus précis. Les PGCs modifiées génétiquement ont été établies *in vitro* à l'aide de la sélection par ampicilline (séquence de résistance contenue dans le plasmide CRISPR-Cas9), puis ces PGCs modifiées ont été transplantées dans des poulets chimeriques germinaux pour produire des poulets modifiés génétiquement. Source : Lee et al. 2019

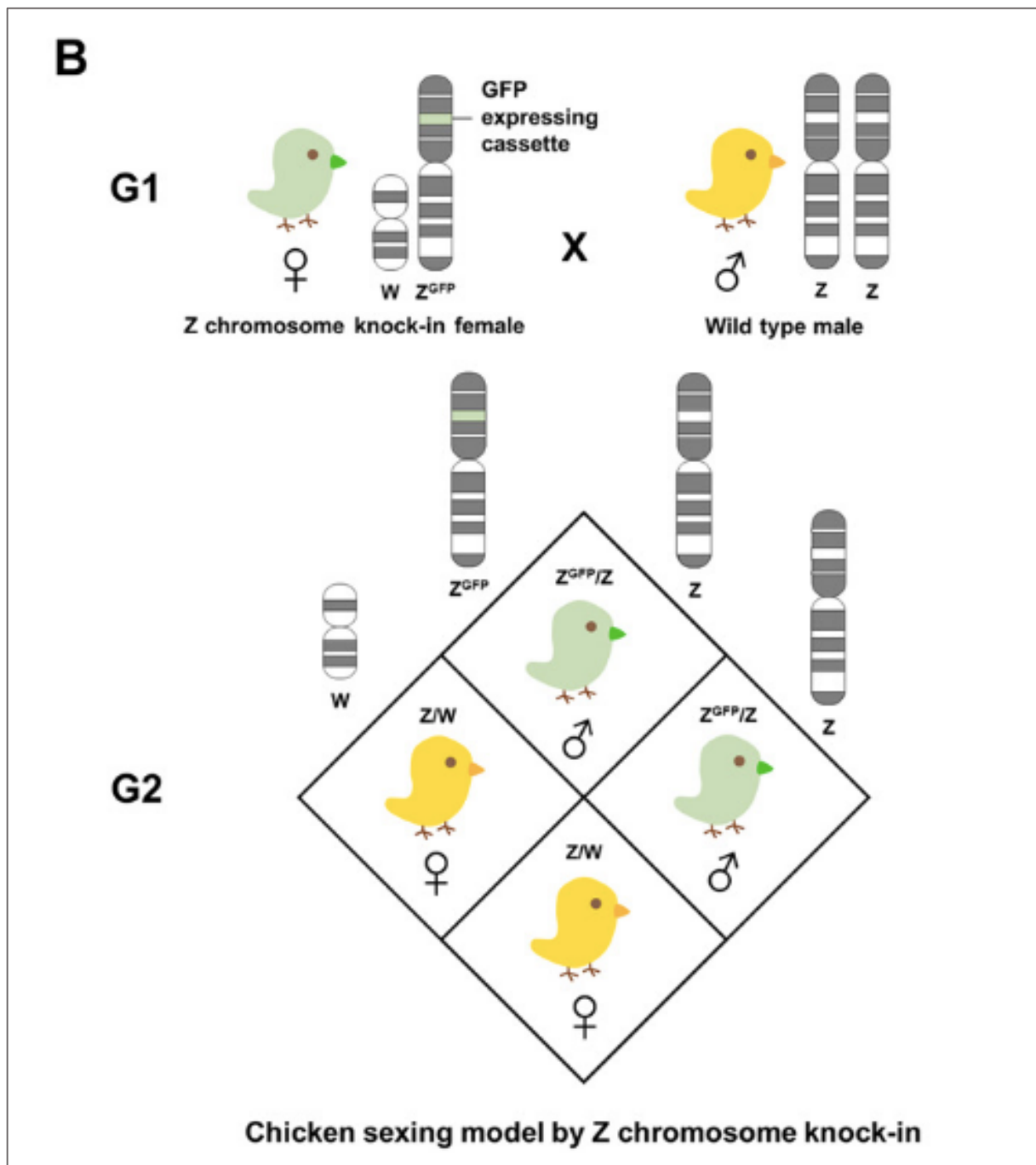


Figure n°68B : Représentation schématique du développement du modèle de sexage des poulets mutés pour exprimer la GFP. Source : Lee et al. 2019

Ces travaux de recherche ont donc permis l'élaboration d'individus génétiquement modifiés dont le croisement avec un individu sauvage entraîne une descendance femelle fluorescente. Les embryons mâles n'exprimeront pas le transgène.

Le croisement de ces femelles fluorescentes obtenues (G1) avec des individus mâles sauvages engendrera une descendance composée de femelles au génotype sauvage,

qui ne seront pas différentes des poules pondeuses classiques et produiront des œufs non modifiés et propres à la consommation, et des mâles fluorescents qui seront écartés avant éclosion (G2).

Cette stratégie mobilisant la technique de CRISPR-Cas9 ouvre donc la voie au sexage *in ovo*. Néanmoins, aucun système n'avait encore été développé afin d'appliquer ces travaux à l'échelle industrielle, avec la rapidité d'analyse que nécessitent les exploitations avicoles. Les travaux de Kang et son équipe ont porté sur le développement de ce système.

De la même façon que la recherche précédemment citée, des poulets *knock-in* pour la GFP sur le chromosome Z ont été générés à partir de cellules germinales primordiales modifiées micro-injectées dans l'aorte dorsale embryonnaire. Le promoteur utilisé pour l'expression de la GFP était connu pour permettre une expression ubiquitaire.

L'expression de la GFP a été visualisée à travers l'œuf intact en illuminant l'embryon avec une lumière ayant une intensité maximale à la longueur d'onde d'émission de 488 nm (laser LED bleu ; Beijing Toplaser Technology Co. Ltd., Beijing, Chine), et le signal d'excitation a été détecté à l'aide d'un filtre à bande étroite pour la longueur d'onde de 510 nm (Huidongbao Technology Co. Ltd., Shenzhen, Guangdong, Chine). Les résultats obtenus après usage du laser sont illustrés en figure n°69.

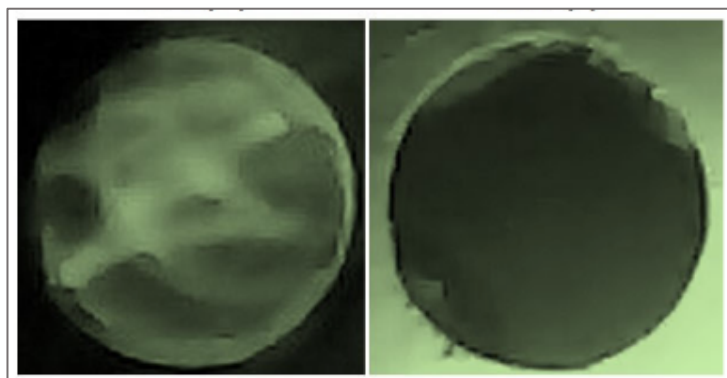


Figure n°69 : Détection de la GFP chez les embryons modifiés sur leur chromosome Z (à gauche) et les embryons contrôles (à droite).

Ces travaux illustrent le potentiel des outils d'édition génomique dans l'abolition de pratiques d'élevage controversées. L'Europe est assez avant-gardiste car a déjà adopté depuis quelques années une loi interdisant le broyage des poussins mâles en filière de ponte. Développer des méthodes peu coûteuses par l'emploi des nucléases programmables pour le sexage *in ovo* pourrait encourager d'autres pays à suivre cet exemple.

d. Impacts environnementaux des élevages

L'une des grandes problématiques liées à l'élevage des animaux de rente est son impact environnemental conséquent. Une des publications pionnières soulevant ce point est le rapport de la FAO, par Steinfeld et al. 2006. En effet, ce rapport mentionne les parts imputées à l'élevage dans la pollution de l'air, la pollution de l'eau et la diminution de la biodiversité. Pour des raisons de clarté, ces parts seront abordés en trois paragraphes distincts bien qu'elles soient incontestablement interconnectées.

POLLUTION DE L'AIR

Concernant par exemple la pollution de l'air, il était estimé que les activités d'élevage contribuaient à hauteur de 18% aux émissions anthropiques totales de gaz à effet de serre en 2006. Dans la mise à jour de ce rapport de 2013, ce chiffre était estimé à 14,5% (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture 2013) avec une méthodologie plus sophistiquée pour l'estimation des émissions des systèmes de production.

L'élevage serait par exemple responsable de 35 à 40% des émissions anthropiques mondiales de méthane, dont 80% sont attribués à la fermentation entérique et le fumier seuls. 9% des émissions anthropiques mondiales de dioxyde de carbone lui sont également imputés, par la déforestation pour la création de pâtures, les cultures fourragères et la dégradation des pâtures (Steinfeld et al. 2006).

Pour le protoxyde d'azote, l'impact de l'élevage est estimé à 65% des émissions anthropiques mondiales. Ce gaz à effet de serre est produit par la nitrification et dénitrification liées à l'utilisation d'engrais azotés sur les cultures destinées à nourrir le bétail ; par la décomposition du fumier lors de stockage prolongé ou application excessive sur les sols ; par les résidus de récolte des cultures fourragères et par la déforestation et la conversion des terres pour l'agriculture (Steinfeld et al. 2006).

Enfin, l'élevage est responsable de 64% des émissions anthropiques mondiales d'ammoniac, par les mêmes pratiques d'élevage mentionnées pour le protoxyde d'azote (Steinfeld et al. 2006).

POLLUTION DE L'EAU

Le rapport de la FAO de 2006 met également en lumière l'impact significatif de l'élevage sur la pollution de l'eau, un aspect souvent sous-estimé mais crucial de l'empreinte environnementale du secteur. L'élevage contribue à la pollution de l'eau de plusieurs manières, principalement à travers le rejet de polluants dérivés du fumier, des lisiers, des engrais ou des produits vétérinaires (antibiotiques, hormones, etc.) dans les cours d'eau (Steinfeld et al. 2006).

Les grandes quantités de fumier et lisier produites par les animaux d'élevage, lorsqu'elles ne sont pas gérées correctement, peuvent entraîner une surcharge en nutriments, notamment en azote (53% de la charge totale en azote) et en phosphore (47% de la charge totale en phosphore), dans les systèmes aquatiques. Cette surcharge conduit à l'eutrophisation, un phénomène qui provoque la prolifération des algues, l'épuisement de l'oxygène et la mort de la faune aquatique, compromettant ainsi la qualité de l'eau (Steinfeld et al. 2006).

De plus, le rapport souligne que l'expansion des pâturages et des cultures fourragères entraîne une déforestation et une dégradation des sols, augmentant ainsi le ruissellement des sédiments et des produits chimiques agricoles vers les rivières et les lacs. Ce processus contribue non seulement à la sédimentation excessive des plans d'eau, mais aussi à la pollution par les pesticides et les métaux lourds (Steinfeld et al. 2006).

En outre, l'élevage intensif nécessite de grandes quantités d'eau pour abreuver les animaux et pour le nettoyage des installations, ce qui exerce une pression supplémentaire sur les ressources en eau, particulièrement dans les régions où l'eau est déjà une ressource rare (Steinfeld et al. 2006). On estime en effet à 15 000 litres d'eau environ le volume nécessaire à la production d'un kilogramme de viande bovine (Mekonnen, Hoekstra 2012).

IMPACT SUR LA BIODIVERSITÉ

Le rapport de la FAO de 2006 met aussi en évidence l'impact considérable du secteur de l'élevage sur la biodiversité, soulignant que l'élevage est l'un des principaux moteurs de la perte de biodiversité à l'échelle mondiale (Steinfeld et al. 2006).

L'expansion des terres agricoles pour le pâturage et la production de cultures fourragères est l'une des principales causes de la déforestation, dont 70% concernent la forêt amazonienne, une région riche en biodiversité. Cette destruction des habitats naturels entraîne une perte massive d'espèces végétales et animales, certaines étant endémiques et menacées d'extinction (Steinfeld et al. 2006).

En outre, l'élevage contribue également à la fragmentation des habitats, ce qui isole les populations d'espèces sauvages et réduit leur capacité à se reproduire, augmentant ainsi leur vulnérabilité. Le rapport estime que l'élevage est une menace pour environ 20 % des espèces classées comme vulnérables ou en danger d'extinction par l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN) (Steinfeld et al. 2006).

La surexploitation des terres pour le pâturage, associée à l'érosion des sols et à la dégradation des terres, conduit également à une réduction de la qualité des écosystèmes, affectant leur capacité à abriter la diversité biologique (Steinfeld et al. 2006).

De plus, tel qu'évoqué dans les paragraphes précédents, la pollution des sols et des cours d'eau réduit la diversité des espèces aquatiques par perturbation de leurs écosystèmes (Steinfeld et al. 2006).

En conclusion de ces paragraphes, il semble important de noter que les activités d'élevage, par la production de gaz à effet de serre et la perturbation des cycles du carbone, du méthane et de l'azote, contribuent de façon importante aux changements climatiques mondiaux. Ces problèmes sont exacerbés dans certains élevages tandis que d'autres apportent des aménités environnementales significatives.

Ce constat souligne l'urgence de réformer les pratiques d'élevage pour atténuer ces effets délétères sur l'environnement (Steinfeld et al. 2006).

Ces effets sont exacerbés par certaines pratiques d'élevage mais d'autres systèmes présentent de multiples contributions positives. Ces aménités sont mentionnées dans le dossier web « L'élevage des ruminants et les services rendus » de l'institut d'élevage français (IDELE). On compte parmi elles des effets positifs sur la préservation de la biodiversité, la qualité des sols, la qualité de l'air et la transition énergétique.

APPLICATIONS D'ÉDITION GÉNOMIQUE

Les nouvelles technologies d'édition génomique, telles que CRISPR-Cas9, offrent une piste prometteuse pour répondre aux défis environnementaux posés par les élevages. À ce jour pourtant, aucune application des nucléases programmables pour la diminution directe de l'impact environnemental des élevages n'est recensée dans la littérature scientifique. Plusieurs explications justifient ce fait.

Premièrement, les financements pour la recherche et l'innovation sont souvent guidés par les intérêts des grandes industries agricoles, qui privilégient des solutions visant à augmenter la production ou à réduire les coûts. Les consommateurs et les marchés ont historiquement privilégié des produits plus abondants et moins coûteux. La sécurité alimentaire a été au centre des préoccupations depuis des décennies (Menchaca et al. 2020). Ainsi, les innovations qui augmentent la productivité animale sont rapidement adoptées.

Bien que les enjeux environnementaux soient importants, ils reçoivent moins de soutien financier et politique, ce qui ralentit les avancées dans ce domaine. Les pressions économiques, sociales et politiques pour exploiter les terres peuvent donc entraver les efforts de conservation de la biodiversité (Garnett, Godfray 2012).

En outre, la protection de l'environnement est d'ores-et-déjà abordée indirectement, sous divers aspects. En optimisant les systèmes de production, par exemple en favorisant la croissance accrue des animaux ou en améliorant leur résistance aux maladies, et donc en somme, en augmentant l'efficacité alimentaire d'une production, l'impact environnemental de l'élevage peut être considérablement réduit (Coles, Frewer, Goddard 2015).

Enfin, la question de la préservation de l'environnement est une question complexe à aborder sous le prisme de la génétique. L'impact environnemental est influencé par de nombreux facteurs au-delà de la seule génétique, comme les pratiques de gestion, l'alimentation, et les conditions environnementales. Modifier la génétique pour améliorer un aspect spécifique ne suffit pas, dans la plupart des cas, à générer un impact significatif sans des changements concomitants dans d'autres domaines (Coles, Frewer, Goddard 2015). La complexité de l'élaboration d'animaux

génétiqnement modifiés permettant une production plus respectueuse de l'environnement requiert plus de prudence, ce qui en retarde le développement et l'adoption par les consommateurs.

Bien qu'il n'y ait pas d'animaux génétiquement modifiés par CRISPR-Cas9, ZFN, TALEN ou tout autre système impliquant des nucléases programmables dans ce but, des recherches avaient été menées par le passé pour réduire la pollution des eaux par transgénèse.

En 2001, Golovan et ses collaborateurs sont parvenus à l'élaboration de porcs transgéniques, nommés « *Enviro-pig* », dont le lisier présentait une teneur en phosphore réduite de plus de 75% (Golovan et al. 2001). Ces recherches ont été inspirées par la découverte qu'une supplémentation en phytase de synthèse dans l'alimentation des porcs ou des volailles pouvait réduire la teneur en phosphore du lisier (Wodzinski, Ullah 1996).

Le développement des « *Enviro-pig* » a consisté en la micro-injection de transgènes porteurs de la séquence codant pour une phytase isolée de *Escherichia coli* dans des lignées de fibroblastes porcins puis l'élaboration à partir de ces derniers d'embryons par transfert de cellules de noyaux somatiques (SNCT).

Les porcs ainsi obtenus exprimaient la phytase dans leurs glandes salivaires, l'estomac, le duodénum, le jujénum et leurs annexes, comme l'illustre le tableau n°19.

| Tissue ^a | Weanling pigs | | |
|---------------------|--|-------------------------------------|--|
| | Non-transgenic ^b Sp. act. ^c | Transgenic ^d Sp. act. | Phytase % Distribution ^e |
| Parotid gland | 0.0001 | 632 ± 228 | 100 |
| Sublingual gland | 0.003 | 54 ± 23 | 8.6 |
| Submaxillary gland | 0.001 | 279 ± 149 | 44.1 |
| Stomach | 0.003 | 3.49 ± 1.9 | 0.6 |
| Stomach contents | ND | 32.8 ± 9.2 | 5.1 |
| Duodenum | 0.003 | 0.62 ± 0.43 | 0.1 |
| Duodenal contents | < 0.001 | 8.9 ± 2.6 | 1.4 |
| Ileal contents | 0.002 | 2.7 ± 2.7 | 0.4 |

Tableau n°19 : Distribution de l'activité de la phytase dans les tissus des porcs non transgéniques et transgéniques. La distribution est normalisée par rapport à la glande parotide. Source : Golovan et al. 2001

Les résultats de cette étude avaient révélé un potentiel prometteur de la transgénèse pour réduire l'impact environnemental des élevages par la réduction de la pollution au phosphore des eaux et des sols (cf. Figure n°70).

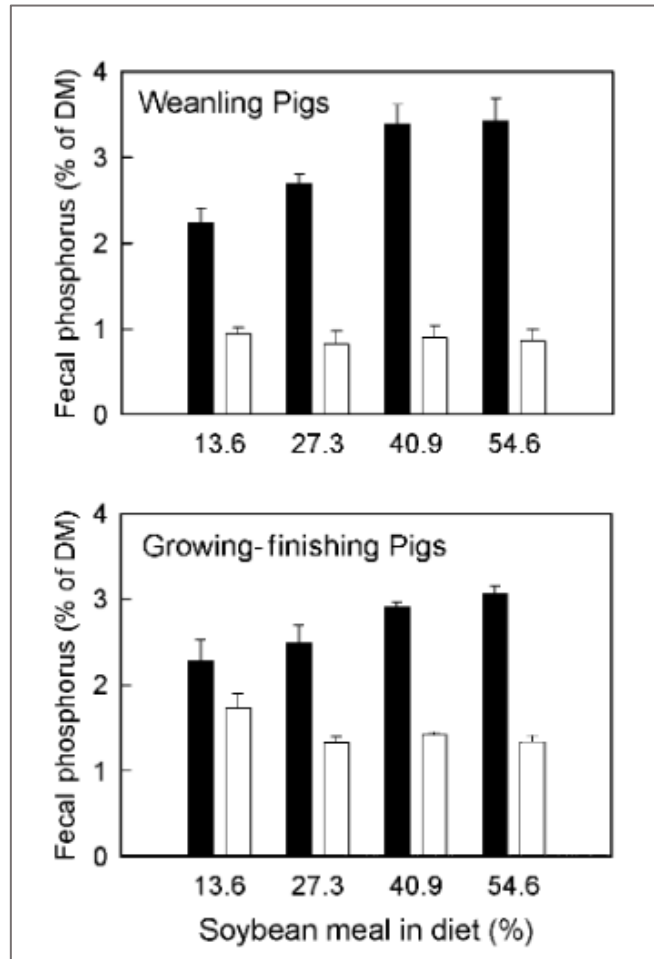


Figure n°70 : Teneur totale en phosphore (sur une base de matière sèche) des matières fécales des porcs non transgéniques (■) et des porcs transgéniques (□) nourris avec différents niveaux de tourteau de soja comme seule source de phosphore alimentaire. *Weanling pigs* : porcs en sevrage. *Growing-finishing pigs* : porcs en croissance et finition. DM : teneur en matière sèche des matières fécales. Source : Golovan et al. 2001

Plus récemment, en 2018, Zhang et son équipe ont développé des porcs présentant non seulement un lisier à teneur réduite en phosphore, mais également une croissance musculaire accrue (Xianwei Zhang et al. 2018).

De la même façon que les travaux précédemment décrits, les porcs ont été générés par transgénèse, avec une injection nucléaire d'un plasmide porteur des séquences codant pour trois enzymes microbiennes dans des fibroblastes porcins puis transfert de leurs noyaux dans des cellules embryonnaires.

Ainsi, les porcs transgéniques expriment dans leurs glandes salivaires la β -glucanase, la xylanase et la phytase dans les glandes salivaires. La digestion des polysaccharides non amylacés (PNA) et du phytate dans les aliments a été améliorée. Les rejets d'azote et de phosphore dans les matières fécales des porcs transgéniques ont été réduits de 23,2 à 45,8 %, et le taux de croissance a augmenté de 23,0 % (troues) et 24,4 % (verrats) par rapport à celui de leurs congénères non transgéniques du même âge soumis au même régime alimentaire.

Les porcs transgéniques ont montré une amélioration de 11,5 à 14,5 % du taux de conversion alimentaire par rapport aux porcs non transgéniques. Les résultats de la digestibilité et de l'excrétion fécale en phosphore, azote et calcium sont présentés dans la figure n°71.

Ces travaux sur la phytase offrent donc, sur le papier, une perspective prometteuse dans la réduction de l'impact environnemental des élevages sans pour autant porter atteinte au bien-être animal, ni altérer fondamentalement la nature de l'espèce porcine. En revanche, cette application pourrait au contraire servir d'argument pour renforcer les systèmes d'élevage intensif en augmentant la densité animale.

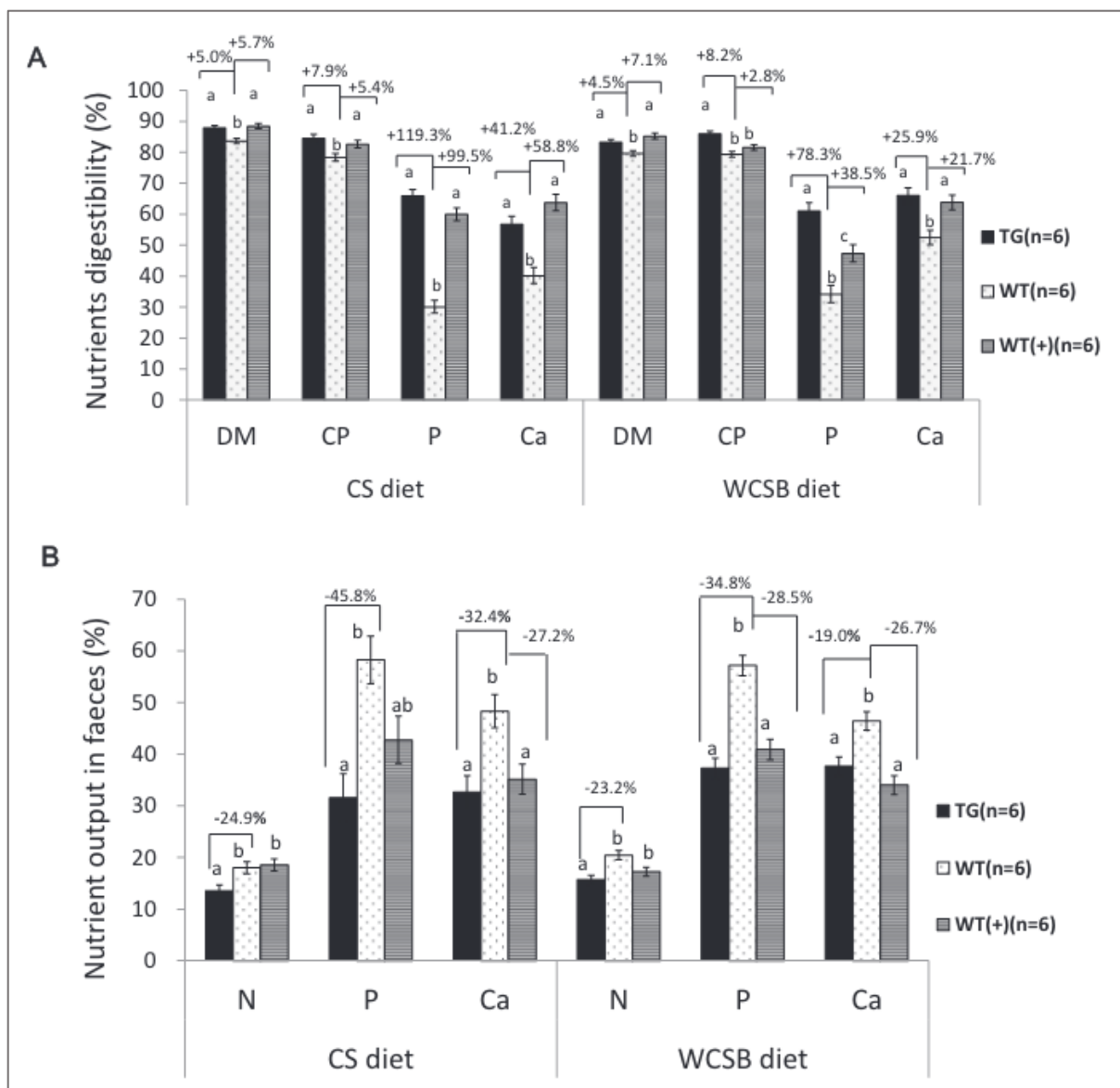


Figure n°71 : Comparaison des valeurs de digestibilité totale des nutriments dans le tractus digestif (%) et des rejets fécaux de nutriments (% de leur apport alimentaire) entre les porcs transgéniques (TG) et leurs congénères non transgéniques (WT) nourris avec des régimes à base de maïs et de tourteau de soja (CS) et de blé, maïs et tourteau de soja (WCSB) avec et sans enzymes alimentaires exogènes. (A) Comparaison des valeurs apparentes de digestibilité totale des nutriments dans le tractus digestif (%) de la matière sèche (DM), des protéines brutes (CP), du phosphore (P) et du calcium (Ca). (B) Comparaison des rejets fécaux de N, P, et Ca. WT(+): Porcs en croissance WT nourris avec les régimes CS et WCSB supplémentés avec une dose optimale de β -glucanase, xylanase et phytase. Source : Zhang et al. 2018

Une autre piste est actuellement explorée dans le but d'améliorer l'efficacité et la durabilité des productions animales. L'objectif est d'identifier et de suivre les composants microbiens symbiotiques pour développer de nouvelles approches améliorant la santé, le bien-être et l'efficacité de la production animale, et donc œuvrer indirectement pour la préservation de l'environnement (Rexroad et al. 2019).

Une publication très récente soulève l'utilisation des nouveaux outils d'édition génomique dans la modification de bactéries ruminales méthanogènes, comme technique qui pourrait permettre à l'avenir une réduction de l'émission de méthane par les ruminants de rente (bovins, ovins) (Khan et al. 2024). Des travaux ont notamment été initiés chez *Methanosarcina acetivorans* par CRISPR-Cas9 (Nayak, Metcalf 2017), ou encore chez *Methanobrevibacter ruminantium*, dont le séquençage du génome a mis en lumière des cibles potentielles (Leahy et al. 2010; Bharathi, Senthil Kumar, Chellapandi 2020).

Pour conclure, bien qu'actuellement l'amélioration de l'impact environnemental des élevages ne soit pas une application des nouvelles techniques d'édition du génome animal mise en avant, les perspectives évoquées offrent un potentiel prometteur pour diminuer, à l'avenir, l'impact des productions animales sur la pollution de l'air, des eaux et des sols.

2. Applications pour la santé humaine

a. Xénotransplantations d'organes

L'idée de la xénotransplantation, c'est-à-dire la transplantation d'organes, de tissus ou de cellules provenant d'une espèce animale à une autre, remonte à plusieurs siècles. Cette approche est née du besoin croissant de pallier la pénurie d'organes humains disponibles pour les transplantations, un problème qui ne cesse de s'accroître à mesure que la demande continue d'augmenter (Cooper 2012).

Par exemple, en France, au 1^{er} janvier 2023, 10 810 patients étaient inscrits sur liste d'attente pour un don d'organes d'après l'agence de la biomédecine.

Les premières xénotransplantations auraient été réalisées au XVII^{ème} siècle, avec la transfusion de sang porcin chez des patients humains par Jean-Baptiste Denis (Roux, Saï, Deschamps 2007). S'en sont suivies, au XIX^{ème} siècle, des tentatives infructueuses de xénogreffes de peau ou de cornée (Cooper 2012).

Il faudra attendre les années 1960 pour voir réussir le premier traitement d'insuffisance rénale aiguë par xénogreffe de rein par Keith Reemtsma. Ce dernier a choisi comme source d'organes le chimpanzé pour son évolution proche de l'humain. Treize transplantations avaient été réalisées au total. La plupart ont échoué par rejet de l'organe, par défaut d'utilisation d'agents immunosuppresseurs à cette époque, ou par complication infectieuse ayant pour cause l'utilisation excessive de ces agents. Un des patients a survécu pendant neuf mois dans un état de santé satisfaisant avant de décéder soudainement, consécutivement à un déséquilibre électrolytique aigu supposé (Cooper 2012).

Une première xénogreffe cardiaque avait été réalisée par James Hardy en 1964 mais le transplant n'avait pas permis de supporter la circulation sanguine du patient, menant rapidement à son décès. Inspiré par les travaux de Hardy, Leonard Bailey exécutait, en 1983, une xénogreffe de cœur de babouin sur une jeune fille. Elle survivra alors 20 jours avant de succomber d'un rejet du greffon, malgré l'usage d'agents immunosuppresseurs (Cooper 2012).

Pour leurs nombreux avantages présentés dans le tableau n°20, les porcs sont, depuis quelques années, les sujets les plus étudiés dans le domaine de la xénogreffe.

| | Pig | Baboon |
|--|---|--------------------------------------|
| Availability | Unlimited | Limited |
| Breeding potential | Good | Poor |
| Period to reproductive maturity | 4–8 months | 3–5 years |
| Length of pregnancy | 114 ± 2 days | 173–193 days |
| Number of offspring | 5–12 | 1–2 |
| Growth | Rapid (adult human size within 6 months)* | Slow (9 years to reach maximum size) |
| Size of adult organs | Adequate | Inadequate* |
| Cost of maintenance | Significantly lower | High |
| Anatomical similarity to humans | Moderately close | Close |
| Physiological similarity to humans | Moderately close | Close |
| Relationship of immune system to humans | Distant | Close |
| Knowledge of tissue typing | Considerable (in selected herds) | Limited |
| Necessity for blood type compatibility with humans | Probably unimportant | Important |
| Experience with genetic engineering | Considerable | None |
| Risk of transfer of infection (xenozoonosis) | Low | High |
| Availability of specific pathogen-free animals | Yes | Yes |
| Public opinion | More in favor | Mixed |

Tableau n°20 : Avantages et inconvénients comparés entre le porc et le babouin en tant que source potentielle d'organes et cellules pour l'homme. *Les races de porcs miniatures représentent environ 50 % du poids des porcs domestiques à la naissance et à la maturité sexuelle, et atteignent un poids maximal d'environ 30 % de celui des races standard. À taille adulte, les porcs miniatures sont plus faciles à loger et à manipuler. Source : Cooper 2012

Deux critères essentiels sont à satisfaire pour une xénogreffe réussie : une histocompatibilité du greffon avec l'homme permettant de s'affranchir du risque de rejet, et l'absence de risques infectieux. Parmi les risques infectieux, il existe notamment le risque de contamination du patient par des virus oncogènes (Dolgin 2021). Ces deux points seront décrits dans les paragraphes suivants.

i. Histocompatibilité du greffon

Pour éviter les risques de rejet des xénogreffes, la recherche s'est penchée sur l'identification d'agents provoquant des réactions immunitaires chez l'homme. Le galactose α 1,3-galactose a alors été identifié (Joziassse, Oriol 1999).

Les épitopes galactose- α 1,3-galactose (α 1,3Gal) sont des carbohydrates communs présents à la surface des cellules de presque tous les mammifères, à l'exception des humains, et de certains primates. En effet, ces espèces ne possèdent pas de copie fonctionnelle du gène codant pour l' α 1,3Galactosyltransférase (α 1,3GalT), l'enzyme catalysant l'obtention de α 1,3Gal. La présence de ces épitopes à la surface des cellules et des tissus de porcs est la principale cause du rejet hyperaigu (ou HAR) lors de xénotransplantation du porc vers l'humain (Dai et al. 2002).

En effet, lorsque des organes ou des tissus de porc sont transplantés dans le corps humain, l'isotype IgM humain de l'anticorps anti-Gal α 1,3Gal se lie aux antigènes Gal α 1,3Gal présents sur les tissus porcins, ce qui provoque l'activation de la cascade du complément, entraînant la lyse des cellules (Song et al. 2010).

Un *knockout* du gène codant l'enzyme α 1,3GalT avait été expérimenté chez le modèle murin en 1999 (Tearle et al. 1996), avant qu'il ne soit réalisé chez le modèle porcin pour la première fois en 2002 (Dai et al. 2002).

Les séquences codant pour l'enzyme, notamment pour son site catalytique, sont localisées pour la majorité sur l'exon 9 d'un gène porté par le chromosome 1 chez le porc. Un plasmide a donc été conçu pour cibler spécifiquement cette région et transfecté dans des lignées de fibroblastes fœtaux porcins. Les lignées KO ont ensuite été confirmées par Southern-Blot. Puis, par transfert de noyaux de cellules somatiques, elles ont permis l'obtention de 38 fœtus hétérozygotes pour le knockout de α 1,3GT. Cinq porcelets α 1,3GT-KO hétérozygotes en bonne santé sont nés.

Il est important de noter que cette première expérience n'avait cependant pas permis l'élaboration de porcs homozygotes pour le *knockout* recherché. Ces porcs n'étaient donc pas de bons candidats pour une xénogreffe vers l'humain.

Pourtant, en 2020, la *Food and Drug Administration* a autorisé à la commercialisation les porcs *GalSafe*® par la société Revivicor®, des porcs génétiquement édités afin de ne pas exprimer l' α 1,3-Galactose.

L'absence de l' α 1,3-Galactose détectable à la surface des cellules des porcs *GalSafe*® a des implications pour les personnes souffrant du syndrome alpha-gal (AGS), une allergie à la viande rouge provenant des mammifères producteurs de denrées alimentaires (bœuf, porc, et agneau, par exemple) et à d'autres produits contenant des matériaux d'origine mammalienne, y compris les cosmétiques et les médicaments.

Ce syndrome, acquis par morsure de la tique *Amblyomma americanum*, aurait une faible prévalence mondiale puisqu'il ne concernerait que quelques milliers de personnes.

La demande d'autorisation de mise sur le marché mentionnait également l'avantage que représenterait ce porc sur la recherche pour les xénogreffes.

Pourtant, d'autres antigènes semblent être impliqués dans le rejet des xénogreffes. Ils sont appelés les antigènes non- α 1,3Gal (Miwa et al. 2004).

Les porcs *GalSafe*® n'offrent donc pas une perspective prometteuse dans la recherche sur la transplantation d'organes porcins sans phénomène de rejet de la part du patient en étant porteur d'une inactivation d'un seul des nombreux acteurs moléculaires impliqués, contrairement à ce que vantent leurs fabricants.

Il a été suggéré que le NeuGc (N-glycolylneuraminique), un autre acide sialique présent chez tous les mammifères à l'exception de l'homme pourrait être l'un d'eux (Song et al. 2010). Cet acide sialique est présent chez les autres espèces grâce à la présence d'une enzyme capable de convertir le NeuAc en NeuGc. Cette enzyme est appelée la *CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase* (CMAH) (Song et al. 2010).

Les NeuGc sont exprimés à la surface des cellules endothéliales. Chez l'homme, ils sont perçus comme du non-soi. Des anticorps, appelés anti-non- α 1,3Gal, s'y lient (Miwa et al. 2004).

Plus récemment, un troisième agent de rejet a été identifié : les antigènes du groupe Sd porcins (Song et al. 2010).

La bêta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 2 (B4GALNT2) est une enzyme retrouvée chez le porc et l'homme. Sa fonction est de synthétiser les antigènes du groupe sanguin Sd⁶ (différent du système ABO, ou du rhésus). Chez l'homme, cette synthèse se fait à partir du NeuAc (Song et al. 2010).

Les antigènes Sd ont été identifiés comme responsables de rejet peu après les investigations sur α 1,3Gal (Song et al. 2010). En effet, l'expression de la B4GALNT2 porcine induite chez des cellules humaines (cellules embryonnaires rénales HEK, alors appelées HEK-B4T) a montré une augmentation des anticorps dirigés contre le système Sd dans la circulation générale (Byrne et al. 2014).

Par ailleurs, la réactivité des anticorps non-Gal des primates non humains (NHP) envers les cellules HEK-B4T pouvait être éliminée par contact avec des cellules endothéliales porcines, mais pas avec des cellules endothéliales humaines (qui n'expriment pas B4GALNT2 ou l'antigène SDa). Cela indique que les cellules endothéliales porcines et les cellules HEK-B4T partagent un antigène non-Gal commun, dépendant de B4GALNT2 : les antigènes Sd porcins (Byrne et al. 2014).

Trois agents de rejet exprimés chez le porc avaient donc été identifiés : les antigènes Sd (produit par l'enzyme B4GALNT2 porcine), les acides sialiques NeuGc (produits par l'enzyme CMAH), et la glycoprotéine α 1,3Gal.

En 2022, Yoon et son équipe parviennent à l'élaboration de porcs triple *knock-out* pour les gènes *GGTA1*, *CMAH* et *B4GALNT2* codant respectivement pour la glycoprotéine α 1,3Gal, l'enzyme CMAH et l'enzyme B4GALNT2 (Yoon et al. 2022).

Les résultats, tels qu'illustrés en figures n°72 et 73, ont révélé que les trois antigènes de rejet n'étaient pas exprimés dans le cœur, les poumons ou le foie des porcs *Jeju*

⁶ Différent du système ABO, ou Rhésus, le système SDa humain regroupe notamment des antigènes spécifiques à certaines glycoprotéines de surface des hématies.

Native Pigs (JNPs) triple *knockout*, et une faible expression de α -Gal et Neu5Gc a été confirmée dans les reins.

Comparativement aux tissus rénaux, cardiaques et pulmonaires des JNPs de type sauvage, ceux des JNPs receveurs avec *knockout* GGTA1/CMAH/B4GALNT2 présentaient également une réduction de la liaison des IgM et IgG humaines ainsi qu'une expression réduite de chaque composant de rejet immunologique.

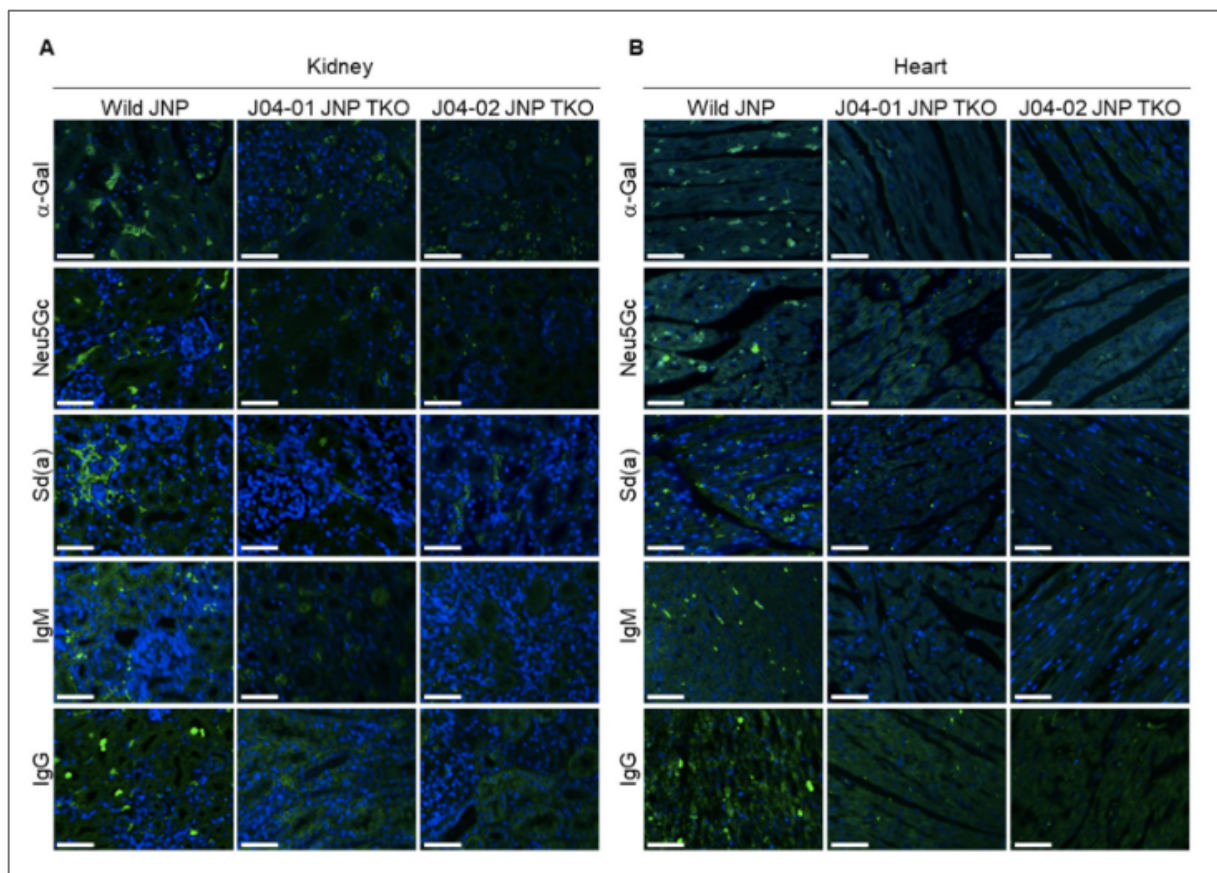


Figure n°72 : Analyse des profils d'expression de α -Gal, Neu5Gc et Sd ainsi que des tests de liaison des anticorps IgM et IgG humains dans les reins et le cœur des JNPs de type sauvage (*Wild JNP*) » et de deux JNP triple *knockout* (J04-01 et J04-02 JNP TKO) par immunofluorescence.

(A) Sur les reins (B) Sur le cœur.

Les images représentées sont superposées avec du bleu (DAPI) pour les noyaux et du vert (Alexa Fluor 488) pour les protéines cibles. Échelle = 30 μ m. Source : Yoon et al. 2022

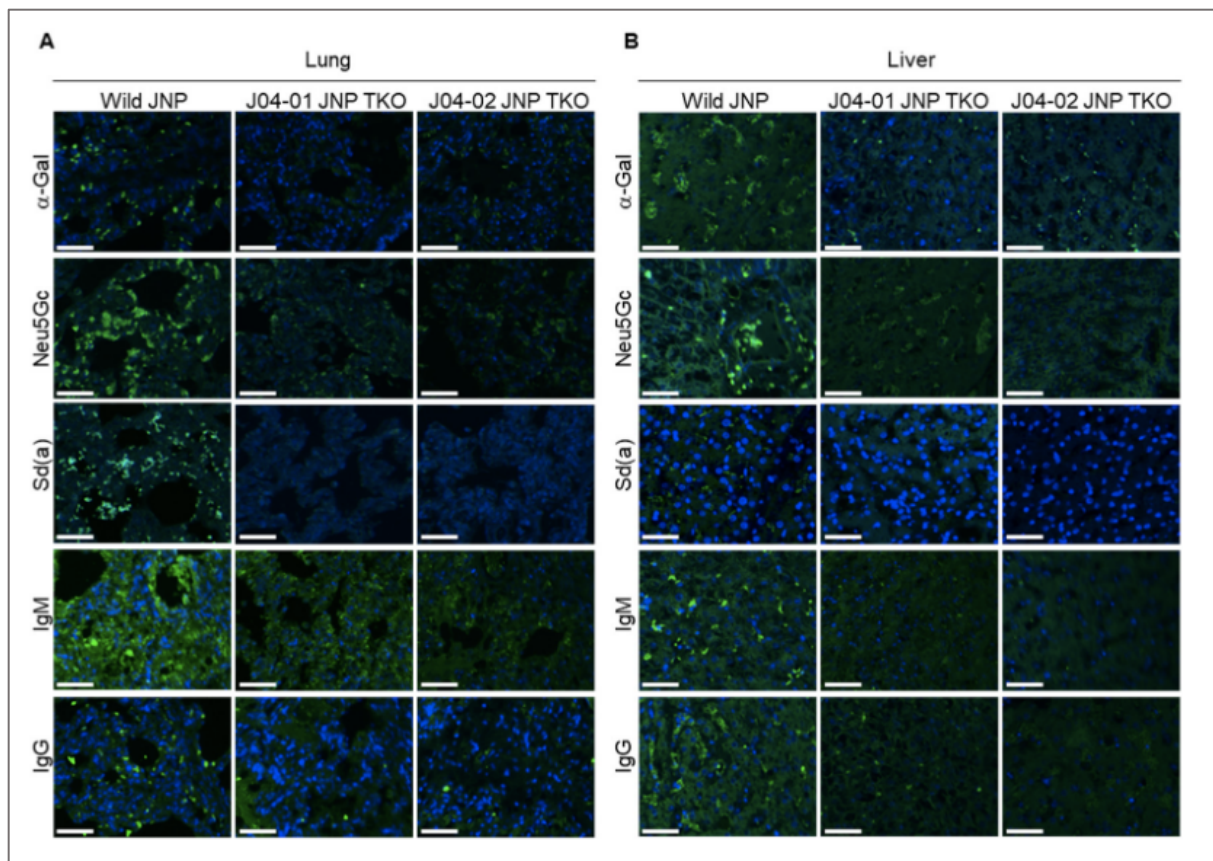


Figure n°73 : Analyse des profils d'expression de α -Gal, Neu5Gc et Sd ainsi que des tests de liaison des anticorps IgM et IgG humains dans les reins et le cœur des JNPs de type sauvage (*Wild JNP*) » et de deux JNP triple *knockout* (J04-01 et J04-02 JNP TKO) par immunofluorescence.

(A) Sur les poumons. (B) Sur le foie.

Les images représentées sont superposées avec du bleu (DAPI) pour les noyaux et du vert (Alexa Fluor 488) pour les protéines cibles. Échelle = 30 μ m. Source : Yoon et al. 2022

Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'organes de JNP *knockout* pour la xénotransplantation pourrait minimiser ou même éliminer totalement le rejet des organes porcins par l'organisme humain, surpassant ainsi les porcs *GalSafe*® déjà sur le marché.

ii. Risques infectieux

Pour une xéno greffe réussie, il est non seulement nécessaire de limiter le risque de rejet par le patient mais il est aussi primordial de ne pas risquer la contamination de ce dernier par des agents zoonotiques infectieux portés par le greffon qui pourraient compromettre le succès de la greffe (Dolgin 2021).

Les rétrovirus endogènes porcins (PERV). ont été identifiés comme représentant un risque pour l'homme, ayant la capacité de se répliquer dans les cellules humaines et d'y exercer une pression oncogène (Patience, Takeushi, Weiss 1997).

La transmission des PERV du porc à l'homme a déjà été démontrée *in vitro* par Niu et al. (2017). Les expériences *in vivo* chez l'homme ne rapportent pas d'infection au PERV bien que le risque existe. La pathogénicité du virus nécessite des précautions, bien qu'auparavant, elle n'ait été considérée (Niu et al. 2021).

Les PERV sont classés en trois familles virales : PERV-A et PERV-B qui sont des virus polytropiques, c'est-à-dire retrouvés chez plusieurs espèces, et PERV-C est un virus écotropique, présent uniquement chez l'espèce porcine (Denner 2016a).

Une des difficultés rencontrées lors d'ingénierie génétique pour l'obtention de porcs *PERV-free* est la présence d'un nombre de copies de provirus pour le PERV variable au sein d'une même lignée cellulaire ou d'un même tissu à l'échelle individuelle, et entre individus au sein d'une même espèce (Denner 2016a).

Par exemple, 40 copies ont été rapportées chez les porcs miniatures, 30 chez les porcs *Duroc*, 20 chez les porcs *Landrace*, 25 chez les porcs *Yorkshire* et 15 chez les porcs *Jeju* coréens en analysant l'ADN des cellules mononucléées du sang périphérique (Lee et al. 2011).

En plus de cette variabilité, il existe au sein d'un même individu coinfected par PERV-A et PERV-C des recombinaisons entre ces deux virus (Niu et al. 2021).

L'élaboration de porcs ne portant aucune séquence codant pour des variants proviraux des PERV représente donc une opération complexe.

Les premières tentatives d'élimination des multiples provirus par édition génomique ont été réalisées à l'aide de nucléases à doigts de zinc (ZFN) spécifiques de séquences hautement conservées dans la région *pol*, mais des effets cytotoxiques ont été observés, probablement en raison du nombre élevé de copies des provirus (Semaan, Ivanusic, Denner 2015). Récemment, l'inactivation de 62 PERVs dans la lignée cellulaire de porc PK-15 par la technologie CRISPR/Cas9 a été démontrée, suggérant que le problème des PERVs pourrait être résolu de cette manière (Yang et al. 2015).

Étant donné que les études ont été menées in vitro sur une lignée cellulaire porcine, il restait à déterminer si cette méthode peut aboutir à la création de porcs vivants dépourvus de PERV. Pour cloner des porcs via le transfert nucléaire de cellules somatiques, ces expériences doivent être reproduites dans des cellules souches porcines ou dans des cellules primaires. Il n'est pas certain que l'inactivation des PERV soit aussi facile dans ces cellules que dans les cellules PK15, ni que les porcs résultants seront en bonne santé (Denner 2015).

Par ailleurs, Denner soulève le point que les rétrovirus endogènes jouent un rôle crucial dans le développement du placenta et la gestation par un procédé impliquant les protéines de l'enveloppe (Denner 2016b). L'édition génomique sur les séquences provirales pourrait réduire l'excrétion virale sans altérer ces fonctions.

Niu et al. (2017) sont parvenus à l'obtention de porcs *PERV-inactivated* par *multiplexed-CRISPR-Cas9* sur les 25 copies de PERVs contenus dans une lignée de fibroblastes primaires fœtaux porcins. Un transfert de noyaux de ces cellules (SNCT) a permis la genèse d'embryons qui ont été portés à terme par des mères porteuses ne présentant pas d'infection au PERC-C (Niu et al. 2017).

Le nombre de copies des PERVs modifiés chez les porcs obtenus restait proche de 25, confirmant l'absence de réinfection depuis la mère porteuse. De plus, l'isolation de cellules provenant de différents tissus des porcs modifiés et la mesure du niveau d'hybridation des ARN messagers dans ces cellules par hybridation à des ADNc complémentaires des modifications apportées sur chaque séquence ont confirmé une efficacité d'éradication des PERV de 100%, comme l'illustre la figure n°74.

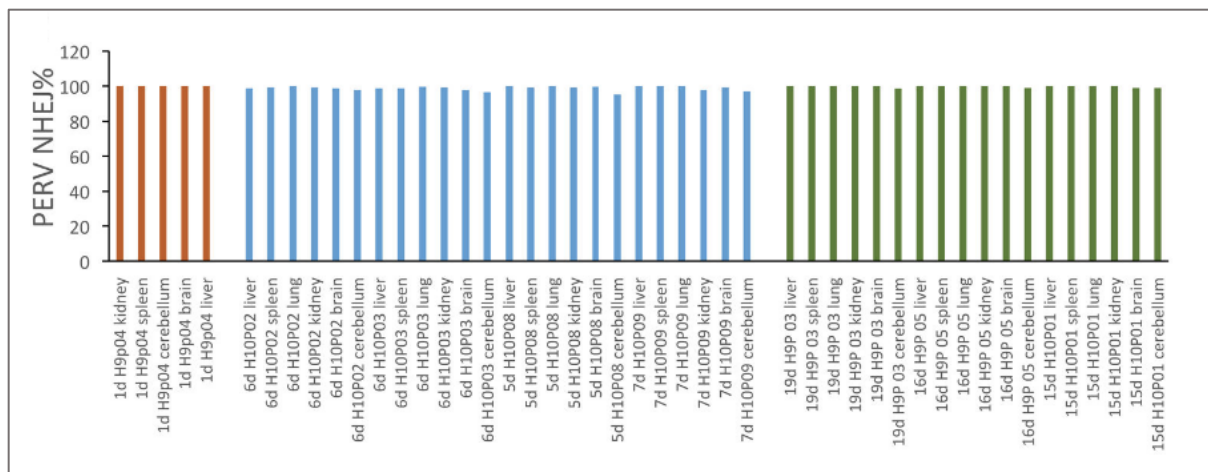


Figure n°74 : Inactivation des PERV au niveau de l'ARNm. Tous les porcs KO ont montré une efficacité d'éradication des PERV d'environ 100% au niveau de l'ARNm. Source : Niu et al. 2017

En résumé, l'ensemble de ces travaux montre le potentiel prometteur de CRISPR-Cas9 dans le développement de greffons porcins dépourvus de PERV et non immunogènes pour l'hôte, en réduisant le risque d'infection et de rejet pour l'Homme et améliorant la sécurité des xénotransplantations.

b. Aliments hypoallergéniques

La construction par édition génomique de produits hypoallergéniques n'est pas l'application recevant le plus de promotion. En effet, les individus souffrant d'allergies ont tendance à écarter l'aliment en cause de leur alimentation. La modification d'animaux afin qu'ils puissent produire ce type d'aliments n'est donc pas un défi de santé publique crucial.

Pour autant, certains travaux, à l'aide des nouveaux outils génomique comme les nucléases programmables (ZFN, TALEN, CRISPR-Cas9) ou les éditeurs de base, ont permis l'obtention de produits animaux hypoallergéniques comme le lait bovin ou caprin ou encore les œufs de poules pondeuses. Ces exemples seront abordés dans ce paragraphe.

β-LACTOGLOBULINE BOVINE ET CAPRINE

La prévalence mondiale de l'allergie au lait de vache serait estimée entre 2 et 3% chez les enfants (Warren et al. 2024). En Australie, une étude sur des échantillons provenant d'enfants âgés d'un an a montré une prévalence d'immunoglobulines E (IgE) dirigés contre la β-lactoglobuline (BLG) bovine de 1,3% (Soriano et al. 2023).

Cette protéine, retrouvée dans le lait de vache ou de chèvre, représenterait entre 50 et 60% des protéines du lactosérum. Sa concentration dans le lait atteindrait 3 à 4 grammes par litre de lait (Kontopidis, Holt, Sawyer 2004).

La β-lactoglobuline est particulièrement allergisante chez l'homme. En effet, quelques heures après l'ingestion de lait, l'allergie se manifeste par des signes cliniques cutanés, respiratoires et gastro-intestinaux dont les conséquences peuvent être très délétères, voire mener au décès du patient dans les cas les plus sévères (Hochwallner et al. 2014).

Aucune publication de la littérature scientifique ne fait état de travaux de transgénèse classique sur cette protéine, la recherche se concentrant plutôt sur l'augmentation des résistances aux maladies et l'expression de protéines d'intérêt pharmaceutique à cette époque (Sun et al. 2018).

Plus tard néanmoins, les nouveaux outils d'édition génomique ont été mis à contribution pour la construction de bovins et caprins *BLG-KO*.

La première utilisation a été réalisée sur des fibroblastes fœtaux bovins *in vitro* en employant les nucléases ZFN (Yu et al. 2011). Plusieurs mutants différents ont été obtenus, contenant des délétions ou des insertions au niveau de la séquence codant pour la BLG, tels qu'illustré en figure n°75.

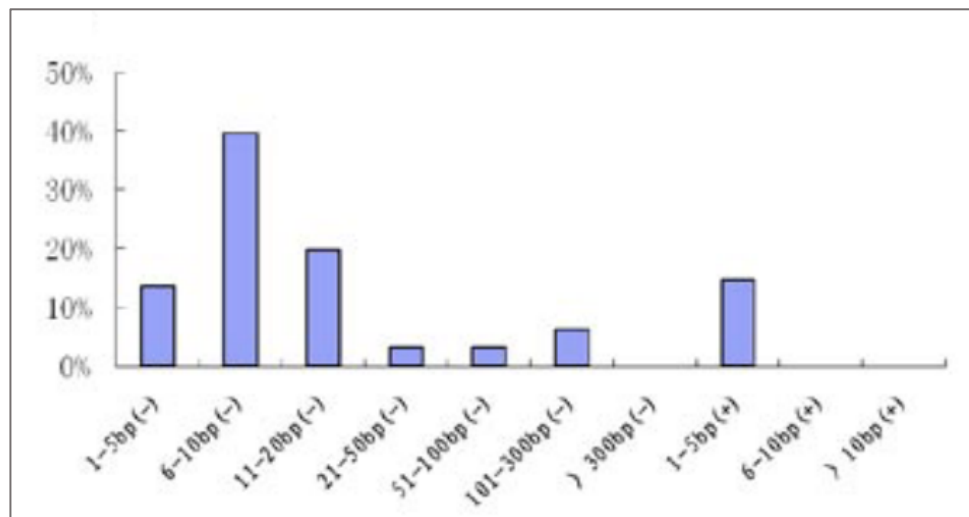


Figure n°75 : Nature des mutants induits par les ZFN dans les fibroblastes de fœtus bovin. Environ 100 mutants ont été analysés, et la plupart d'entre eux présentaient des délétions ou des insertions de courts fragments. L'axe vertical indique le pourcentage de mutants. L'axe horizontal indique les différentes échelles de délétion de fragments (-) ou d'insertion (+). Source : Yu et al. 2011

Une des colonies mutantes a été utilisée pour l'élaboration d'animaux clonés, par transfert de noyaux de cellules somatiques (SNCT). Huit animaux clonés sont nés. Six d'entre eux sont décédés peu après la mise-bas. Les deux restants ont été en bonne santé, au moins jusqu'à leurs six mois d'âge (à la date de parution de la publication de Yu et al.).

Les individus obtenus étaient modifiés de façon bi-allélique avec des mutations différentes, comme présenté en figure n°76.

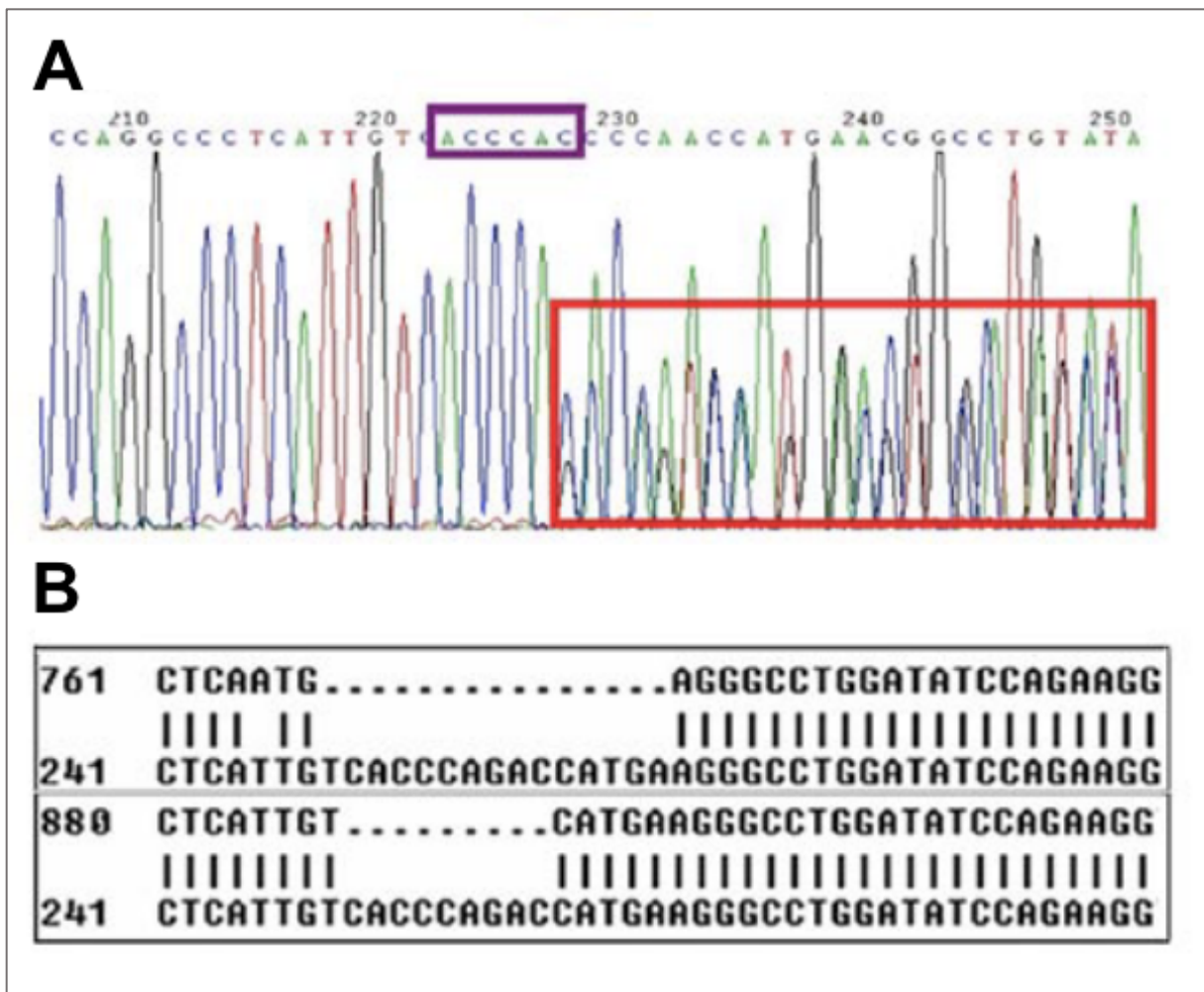


Figure n°76 : (A) Détection des mutations dans une colonie de cellules uniques par séquençage des produits de PCR. Si la colonie est un clone mutant, les pics sont doubles après le site de coupure des ZFN (boîte violette). Les doubles pics sont effectivement observés (boîte rouge). (B) Analyse des séquences des clones BLG-KO. La séquence mutante est bi-allélique au locus BLG. Source : Yu et al. 2011

Ces travaux ont confirmé la possibilité de modifier le gène codant pour la β -lactoglobuline bovine par ZFN. Néanmoins, la composition du lait produit par ces animaux génétiquement modifiés n'a pas été étudiée (Yu et al. 2011).

La technique de ZFN a été de nouveau mise à contribution dans les travaux de Sun et al. (2018). De la même façon que les travaux de Yu et al., des bovins de la race *Prim Holstein* n'exprimant pas la BLG dans leur lait ont été générés : des individus hétérozygotes composites, c'est-à-dire une mutation unique sur chacun des deux allèles du gène codant pour la BLG).

La composition protéique du lait produit par ces bovins génétiquement modifiés a ensuite été analysée par test immuno-enzymatique (ELISA). Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure n°77.

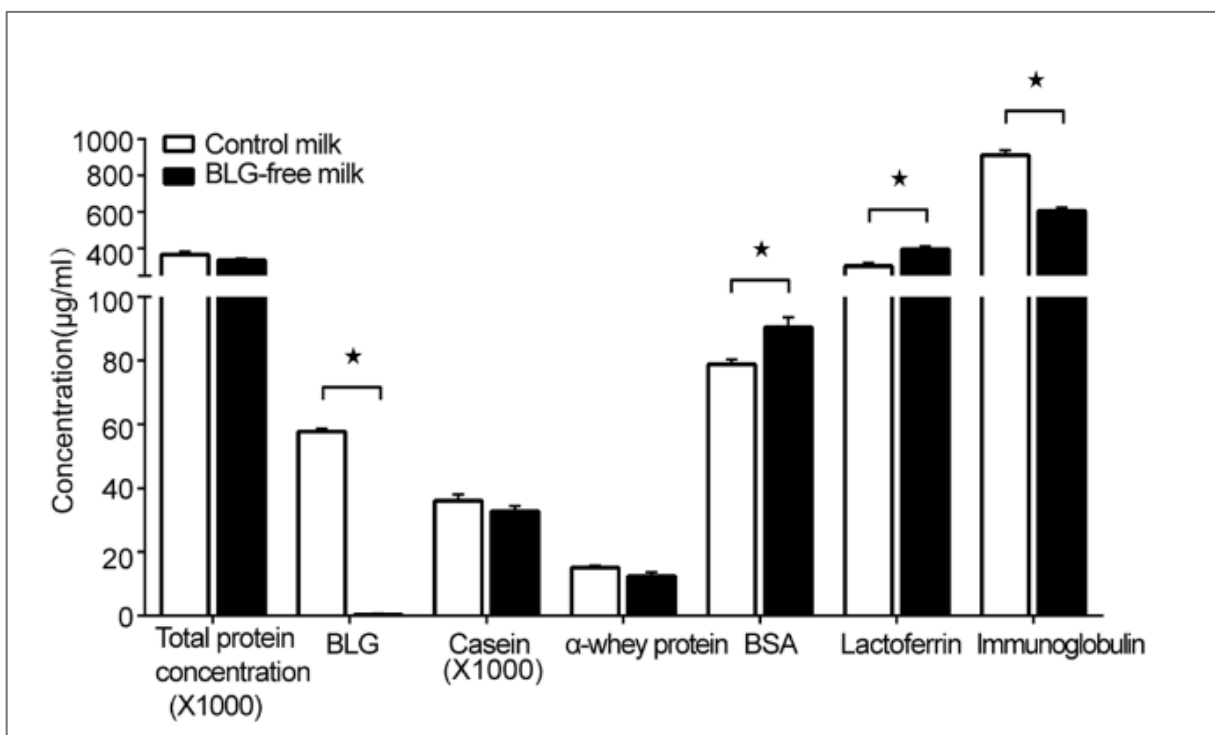


Figure n°77 : Concentration des principales protéines dans le lait de contrôle et le lait sans BLG. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écart-type (SD). *P < 0,05, significativement différent du lait de contrôle. Source : Sun et al. 2018

Bien que la BLG soit absente chez l'individu *BLG-free*, la quantité totale de protéines n'a pas été modifiée en raison de l'amélioration de l'expression d'autres protéines endogènes, telles que l'albumine sérique bovine (BSA) et la lactoferrine.

Par ailleurs, le croisement de deux bovins bi-alléliques *free-BLG* a permis l'obtention de descendants *BLG-free* viables et en bonne santé, héritant d'un allèle mutant de chaque parent, suggérant que la mutation induite chez les parents a été transmise par la lignée germinale.

Une étude similaire a été réalisée la même année par l'emploi des nucléases TALEN et permettant également de générer des bovins bi-alléliques *BLG-free* et dont les allèles mutants sont transmis à la descendance (Wei et al. 2018).

Par la suite, CRISPR-Cas9 a été utilisé pour induire un double *knockout* du gène codant la BLG (*PAEP*) et du gène codant pour la *BLG-like protein* (*LOC100848610*). La *BLG-like protein* est une protéine ayant des similitudes structurelles avec la BLG. Ses fonctions ne sont pas bien caractérisées à ce jour mais son inactivation chez les bovins pourraient réduire les manifestations allergiques chez les personnes sensibles à la BLG (Singina et al. 2021).

De la même façon que les travaux précédemment décrits, les bovins génétiquement modifiés ont été obtenus par modification du génome de fibroblastes fœtaux bovins puis transfert de noyaux de cellules somatiques dans des ovocytes énucléés. Les individus obtenus étaient bien double KO pour les protéines ciblées. La composition du lait n'a cependant pas été analysée dans cette étude.

Cette dernière a tout de même permis de souligner la possibilité de modifier les gènes codant pour la BLG et la *BLG-like protein* par CRISPR-Cas9 et de façon viable.

Enfin, des travaux ont également été effectués sur l'espèce caprine, bien qu'ils ne soient pas promus avec le même zèle. En effet, dans le monde, tandis que le lait de bovins représente 81% de la production laitière mondiale estimée en 2021, le lait de caprins arrive en troisième position en représentant seulement 2%. Les autres espèces prenant part à la production mondiale laitière sont les suivantes : bufflons (16%), ovins (1%) et chameaux (0,2%) (Source : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière « L'économie laitière en chiffres, éditions 2023 »).

Pour autant, le prix du lait de chèvre est près de deux fois supérieur à celui de vache en France par exemple (chèvre : entre 81 et 95 cts/L environ ; vache : 45 cts/L environ)⁷.

Initialement réalisé par TALEN (Cui et al. 2015), l'emploi de CRISPR-Cas9 sur la séquence codant la β -lactoglobuline caprine, a par la suite, permis l'obtention de chèvres produisant un lait dépourvu de cette protéine (Zhou et al. 2017).

L'analyse des protéines du lactosérum de ces caprins modifiés, comparés aux caprins sauvages, souligne l'absence totale de β -lactoglobuline dans le lait des caprins modifiés (cf. Figure n°78). On note également que la présence des autres protéines du lactosérum n'est pas altérée.

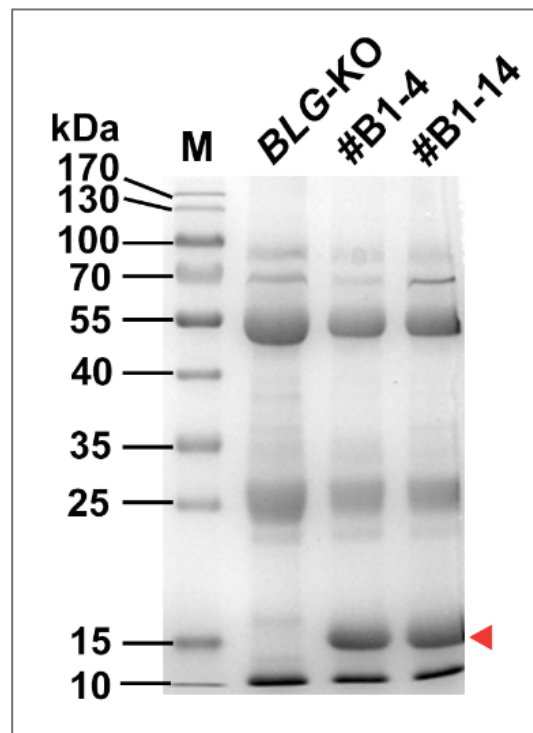


Figure n°78 : Analyse des protéines du lactosérum par coloration au bleu de Coomassie après séparation par SDS-PAGE. Des quantités égales d'échantillons de lait ont été chargées. Le triangle rouge indique les bandes de 18 kDa correspondant à la BLG sauvage (WT). Source : Zhou et al. 2017.

⁷ Ces valeurs ont été extraites du site web de l'institut de l'élevage Idele : <https://www.tendances-lait-viande.fr>

OVOMUCOÏDE ET OVALBUMINE DES OEUFS DE POULES PONDEUSES

Une étude européenne datant de 2016 portant un effectif de 12049 enfants dont 9336 ont été suivis jusqu'à l'âge de deux ans, a montré une prévalence de l'allergie aux œufs de poule chez 1,23% d'entre eux. Cette allergie s'est résolue spontanément l'année d'après chez la moitié d'entre eux environ (Xepapadaki et al. 2016).

Deux protéines allergènes sont incriminées : l'ovomucoïde, codée par le gène *OVM*, et l'ovalbumine, codée par le gène *OVA*. Ces protéines ont été la cible de plusieurs travaux de recherche en édition génomique afin de concevoir des poules génétiquement modifiées pour produire des œufs sans ces deux protéines.

Parmi ces travaux, ceux de Oishi et al. (2016) peuvent être cités. Cette étude a été la première à élaborer des poulets génétiquement modifiés viables par CRISPR-Cas9. La technique employée pour introduire des mutations dans les gènes *OVA* et *OVM* a montré une efficacité de 90%, c'est-à-dire que 90% des cellules primordiales germinales transfectées avec la construction CRISPR-Cas9 ont présenté les mutations désirées.

Une mutation du gène codant l'ovalbumine avait déjà été tentée auparavant en utilisant les nucléases TALEN, montrant une efficacité de 33,3% (Park et al. 2014).

La méthode employée par Oishi et al. semble donc prometteuse pour l'élaboration d'œufs hypoallergéniques. Néanmoins, cette étude ne fait pas état des qualités organoleptiques des œufs produits. En effet, l'ovalbumine représente plus de la moitié des protéines contenues dans le blanc d'œuf, et, en raison de ses propriétés moussantes, gélifiantes, émulsifiantes, adhésives et texturantes, est impliquée dans la réussite de nombreuses préparations culinaires (meringues, soufflés, mousses, flans, œufs brouillés, omelettes, mayonnaise, pain, etc.) (Rostamabadi et al. 2023). Des œufs dépourvus de cette protéine ne seraient donc pas aussi valorisés dans l'industrie que des œufs non modifiés. Le consommateur allergique ne disposerait pas d'un produit présentant des caractéristiques fidèles à l'œuf original.

La qualité des œufs a été étudiée plus tard, chez des poules domestiques de race *Plymouth Barred Rock* (« BPR ») homozygotes pour un *knockout* de la séquence codant pour l'ovomucoïde ($OVM^{-/-}$) par modification avec CRISPR-Cas9 (Mukae et al. 2021). Les résultats des tests de qualité sont montrés sur la figure n°79.

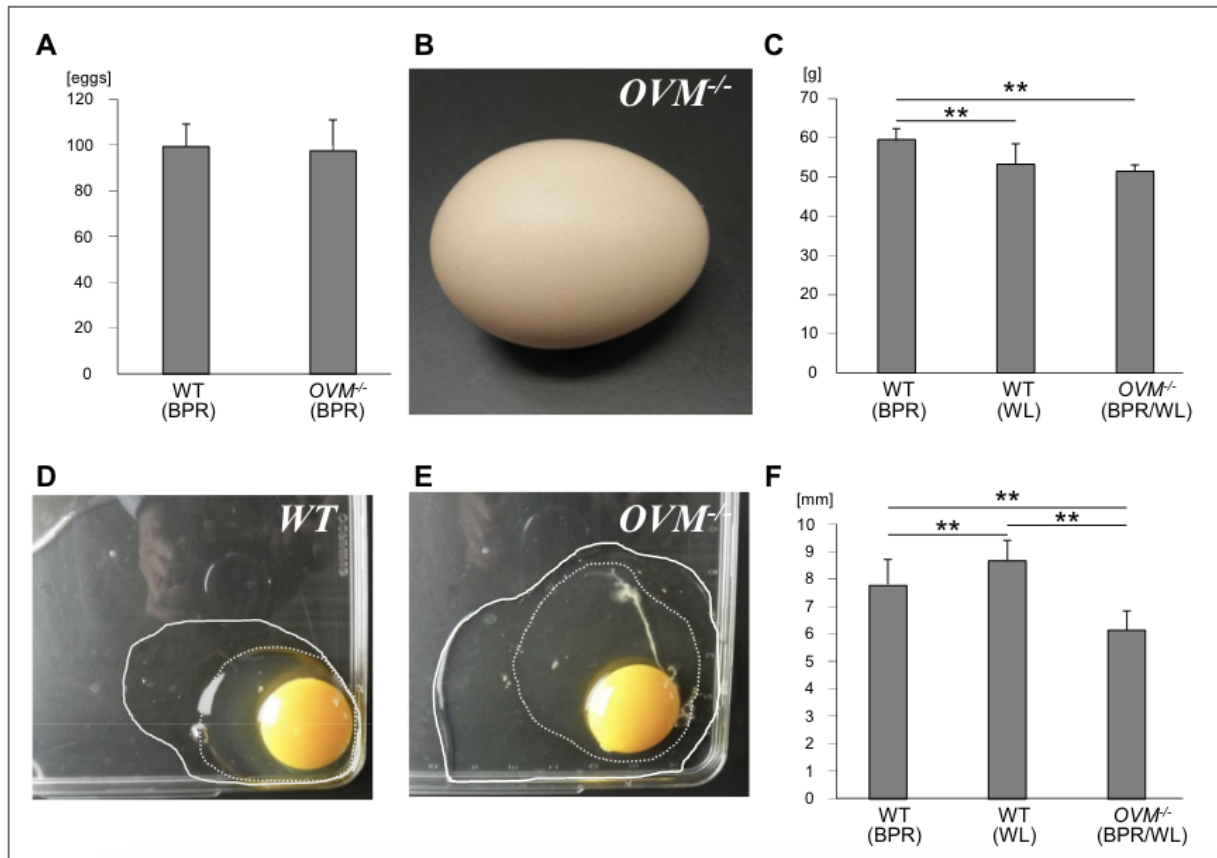


Figure n°79 : Œufs de poules $OVM^{-/-}$. (A) Moyenne du nombre d'œufs produits par les poules WT (n = 4) et $OVM^{-/-}$ (n = 2) au cours des 150 premiers jours. (B) Apparence d'un œuf $OVM^{-/-}$. (C) Poids moyen des œufs des poules WT et $OVM^{-/-}$ à 10 mois d'âge. (D, E) L'œuf $OVM^{-/-}$ avait un blanc plus liquide comparé au type sauvage. (D) Œufs de type sauvage d'une semaine et (E) œufs $OVM^{-/-}$. Les lignes pleines et pointillées indiquent les bords délimitant l'albumen mince et épais, respectivement. (F) Hauteur moyenne de l'albumen dans les œufs WT et $OVM^{-/-}$. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. **P < 0,01. Source : Mukae et al. 2021

Les œufs fécondés de poules $OVM^{-/-}$ ont donné des descendants viables, l'un est illustré en figure n°80.



Figure n°80 : Poussin éclos à partir des œufs de poule *OVM*^{-/-}. Source : Mukae et al. 2021

c. Modèles de recherche

Les nouvelles biotechnologies ont rapidement transformé le paysage de la recherche médicale, offrant des possibilités inédites pour la compréhension, le traitement, et la prévention des maladies. Parallèlement, CRISPR-Cas9 pourrait s'avérer, sur le papier, être un allié précieux pour la mise en œuvre du principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) en recherche animale, une démarche éthique visant à améliorer les conditions de la recherche biomédicale en minimisant l'utilisation d'animaux.

Le concept des 3R, introduit par William Russell et Rex Burch en 1959, est un cadre éthique fondamental en recherche animale. Ce principe vise, sans altérer la qualité, la pertinence et la crédibilité du projet de recherche, à remplacer les animaux par des modèles alternatifs, de réduire le nombre d'animaux utilisés, et de raffiner les procédures expérimentales pour minimiser la souffrance animale (Tannenbaum, Bennett 2015).

Les outils d'édition génomique pourraient, à priori, contribuer de manière significative à deux de ces trois principes : remplacer et réduire. Leurs applications en cours de recherche dans le domaine de la médecine humaine sont nombreuses, et de fait, ne pourront pas être citées de manière exhaustive mais ce manuscrit se propose d'en citer quelques exemples.

D'une part, ces techniques permettent la réduction des modèles animaux par le développement de modèles cellulaires et organoïdes humains sophistiqués (structure cellulaire imitant l'organisation ou la fonction d'un tissu ou organe). Par exemple, Xiaoshuai et al. (2022) ont généré des organoïdes mimant une *spina bifida*, pathologie du développement embryonnaire ayant des effets délétères sur le tissu nerveux (Xiaoshuai, Qiushi, Rui 2022).

D'autre part, les outils de modification du génome animal permettent l'élaboration de modèles animaux plus précis et donc de minimiser le nombre de portées nécessaires pour l'obtention de ces individus. Par exemple, les porcs de type *mini-pigs* (variété sélectionnée pour une petite taille) sont largement employés dans la recherche médicale humaine.

Whitelaw et al. ont dressé un tableau des applications de ZFN, TALEN et CRISPR-Cas9 dans la production de modèles porcins fidèles dans le domaine de la recherche médicale humaine, de 2011 à 2015 (Whitelaw et al. 2016). Ce dernier est reproduit sur le tableau n°21.

| Publications | Technique | Gène(s) ciblé(s) | Applications en médecine |
|--|---|--|-----------------------------|
| Yang et al. 2011 Wang et al. 2015 | ZFN CRISPR-Cas9 | PPAR γ NPC1L1 | Maladies cardiovasculaires |
| Hauschild et al. 2011 Li et al. 2013 Lutz et al. 2013 Xin et al. 2013 Bao et al. 2014 Li et al. 2014 Reyes et al. 2014 | ZFN ZFN ZFN TALEN ZFN CRISPR-Cas9 CRISPR-Cas9 | α 1,3GT α 1,3GT α 1,3GT, CMAH α 1,3GT α 1,3GT α 1,3GT SLA1,2,3 | Xénogreffes |
| Kim et al. 2013 Watanabe et al. 2013 Huang et al. 2014 Whitworth et al. 2014 Chen et al. 2015 | TALEN ZFN TALEN CRISPR-Cas9 CRISPR-Cas9 | LDLR IL2RG RAG1, RAG2 CD1d IgM | Maladies auto-immunes |
| Yao et al. 2014 Zhou et al. 2015 | TALEN CRISPR-Cas9 | DJ-1 PARK2, PINK1 | Maladies neurodégénératives |
| He et al. 2015 | ZFN | PKD1 | Maladies rénales |
| Zhou et al. 2015 | | TYR | Maladies dermatologiques |

Tableau n°21 : Élaboration de porcs « *mini-pigs* » génétiquement modifiés comme modèle de recherche en médecine humaine à l'aide des nouveaux outils d'édition génomique ZFN, TALEN ou CRISPR-Cas9. Source : Whitelaw et al. 2016

Parmi les champs prometteurs dans l'application de CRISPR-Cas9, la thérapie génique est le plus étudié. En effet, la mutagenèse dirigée permet de corriger des mutations à l'origine de maladies héréditaires monogéniques. Parmi ces dernières, la bêta-thalassémie, l'infection au HIV et certains types de cancer peuvent être cités. Les essais cliniques en cours en 2024 sont recensés dans le tableau n°22.

| Applications CRISPR en cours d'essai clinique en 2024 | | Entreprises/Laboratoires |
|---|---|--|
| Hémoglobinopathies | Drépanocytose Bêta thalassémie | Vertex Pharmaceuticals® |
| Infections urinaires | <i>E. coli</i> | Locus Biosciences® |
| Maladies neurodégénératives | Parkinson Alzheimer | Intellia Therapeutics® |
| Maladies inflammatoires | Angioedème héréditaire | Intellia Therapeutics® |
| Cancers | Leucémies Lymphomes | CRISPR Therapeutics® Caribou Biosciences® |
| | Leucémies, lymphomes Gastro-intestinal Mammaire Pancréas | Beam Therapeutics® |
| Maladies cardiovasculaires | Cholestérol | Verve Therapeutics® CRISPR Therapeutics® |
| HIV | | Excision Biotherapeutics® |
| Diabète | Type I | CRISPR Therapeutics® ViaCyte® |
| Maladies auto-immunes | Lupus érythémateux systémique | Cabaletta Bio® |

Tableau n°22 : État des lieux des applications CRISPR en cours d'essai clinique en 2024 dans la recherche en médecine humaine, préalablement testées sur modèles animaux.

Source : <https://innovativegenomics.org/news/crispr-clinical-trials-2024/>

Très récemment, l'agence de régulation des traitements et produits de santé du Royaume-Uni (*UK's Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency*) ainsi que la *Food and Drug Administration* (USA) ont autorisé pour la première fois aux mois de novembre et décembre 2023, respectivement, l'utilisation clinique d'une thérapie génique obtenue par CRISPR-Cas9 comme traitement de la drépanocytose (*Casgevy*, de la société *Vertex Pharmaceuticals*®).

Ce traitement a, par la suite, été autorisé par la commission européenne le 13 février 2024, à la fois pour le traitement de la drépanocytose et également pour une autre maladie dont les résultats obtenus en essai clinique étaient tout aussi encourageants : la bêta-thalassémie. Une autorisation est attendue au Canada pour 2024. Ces premières autorisations devraient, sans aucun doute, encourager la recherche sur modèles animaux sur un champ plus large de maladies.

CRISPR-Cas9 représente donc une avancée majeure dans la recherche médicale, avec un potentiel immense pour transformer le diagnostic, le traitement, et la prévention des maladies. En parallèle, son intégration dans le cadre éthique des 3R marque un progrès significatif dans la réduction de l'utilisation d'animaux dans la recherche scientifique. Alors que cette technologie continue d'évoluer, elle soulève également des questions éthiques complexes.

Bien que le sujet sorte du cadre de ce manuscrit sur l'édition des génomes animaux, il semblait important de souligner le risque de dérives que l'édition génomique soulève en médecine humaine.

Celle-ci est employée dans la résolution des pathologies mais, entre de mauvaises mains et sous un cadre juridique flou, pourrait mener à des dérives telles qu'elles avaient eu lieu en novembre 2018 avec la recherche sur embryons humains de He Jiankui.

Ce dernier avait produit, de manière illégale, des embryons humains génétiquement immunisés contre l'infection au HIV par édition du gène CCR5. 3 enfants étaient nés de ces manipulations génomiques. À ce jour, leur état de santé et leur statut face à une infection au HIV demeurent confidentiels.

Cette expérience avait déclenché un scandale planétaire et He Jiankui avait écopé de trois ans de prison et d'une interdiction d'exercer des travaux de recherche sur embryons humains. Par ce travail, il avait en effet violé la réglementation chinoise encadrant la recherche sur les embryons humains et les grands principes éthiques notamment promus par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Le manque de validation scientifique et la poursuite de ce projet en secret, sans revue ni approbation par la communauté scientifique n'avaient qu'ajouté à la culpabilité du scientifique chinois.

L'affaire He Jiankui avait donc mis en lumière les dangers de l'édition génomique humaine non contrôlée et les lacunes juridiques dans la réglementation de ces technologies émergentes.

Les violations des lois chinoises, des normes éthiques internationales, et la précipitation de l'utilisation clinique de CRISPR-Cas9 ont posé des problèmes juridiques majeurs, encourageant un débat mondial sur la nécessité d'une réglementation juridique stricte sur l'édition des génomes humains, mais aussi végétaux et animaux.

3. Cas particuliers des animaux jugés nuisibles : *gene drive*

Chaque année, une augmentation de l'incidence et de la distribution géographique des maladies vectorisées par les moustiques et autres insectes est observée. On estime à 80% la proportion de la population mondiale à risque de développer ces maladies (Wang et al. 2021).

Bien que les mécanismes complexes guidant les interactions entre les moustiques et l'environnement soient consensuellement reconnus, les changements climatiques (températures, précipitations, humidité) seraient moteurs dans cette dynamique d'expansion de la population de moustiques. Par ailleurs, les changements dans la distribution et l'utilisation des terres (déforestation, agriculture, irrigation, urbanisation) sont également un facteur aggravant en augmentant l'exposition humaine et les habitats de reproduction. Au-delà des facteurs environnementaux, des facteurs socio-économiques sont identifiés par la corrélation entre la précarité d'une population et la prévalence des maladies vectorielles (Franklinos et al. 2019).

Par ailleurs, la survenue de résistances aux insecticides chimiques et le changement de comportement des moustiques, comme la prise du repas sanguin avancée dans la journée pour pallier l'emploi des moustiquaires, sont notifiés depuis quelques années (Wang et al. 2021).

Parmi les maladies vectorisées par les moustiques, le paludisme (ou « malaria »), la dengue, le chikungunya, le virus Zika, la filariose lymphatique et la fièvre jaune représentent les plus prévalentes mondialement. Le tableau n°23 regroupe le genre de vecteurs et le nombre de cas estimés par an.

| | Predominant vectors by genus | Estimated or reported number of cases per annum |
|-----------------------|--|---|
| Malaria | <i>Anopheles</i> | 212 million (range 148–304 million) |
| Dengue | <i>Aedes</i> | 96 million (range 67–136 million) |
| Lymphatic filariasis | <i>Aedes, Anopheles, and Culex</i> | 38.5 million (range 31.3–46.7 million) |
| Chikungunya | <i>Aedes, Anopheles, Culex, and Mansonia</i> | 693 000 (Americas) |
| Zika virus | <i>Aedes</i> | 500 000 (Americas) |
| Yellow fever | <i>Aedes and Haemagogus</i> | 130 000 (range 84 000–170 000) (Africa) |
| Japanese encephalitis | <i>Culex</i> | 42 500 (range 35 000–50 000) |
| West Nile fever | <i>Culex</i> | 2588 |

Tableau n°23 : Nombre de cas des principales maladies à transmission vectorielle par les moustiques d'importance mondiale pour la santé par an. Source : Franklins et al. 2019

Plusieurs mesures de lutte sont mises en place contre les espèces jugées nuisibles : des mesures biologiques en introduisant les prédateurs naturels des cibles ou par la lutte autocide, c'est-à-dire l'espèce luttant contre sa propre espèce par différents mécanismes ; des mesures chimiques par le biais d'insecticides dans le cas des moustiques ; ou encore des mesures hygiéniques par l'utilisation de moustiquaires.

Actuellement, plusieurs technologies sont disponibles pour réduire voire supprimer ces populations jugées indésirables. Par exemple, il est possible d'induire par exposition à des rayonnements ionisants la stérilité de moustiques mâles.

Par ailleurs, l'infection des populations avec une bactérie intracellulaire du genre *Wolbachia* montre une inhibition de la multiplication de certains virus. Elle est transmise de façon verticale, c'est-à-dire de la mère aux embryons, et peut conduire à l'infertilité voire l'extinction des descendants mâles (Wang et al. 2021).

Cette technique est difficilement mise en place car elle nécessite la ré-inoculation d'individus infectés à chaque génération pour induire une réduction durable ou une éradication complète de la population cible.

Intervient alors la technique du *gene drive* qui consiste en la transmission d'un allèle par reproduction sexuée de façon favorisée, c'est-à-dire qui s'affranchit de la loterie génétique (transmission mendélienne) et de la sélection naturelle des caractères avantageux pour l'espèce. Concernant les populations de moustiques, une

introduction de caractères délétères pour la survie de l'espèce (stérilité ou létalité) est recherchée. On distingue deux techniques de *gene drive* : le *homing based gene drive* obtenu par CRISPR/Cas9 et le *sex linked meiotic drive*.

Le *sex linked meiotic drive* repose sur des variations naturelles dans le processus de méiose, c'est-à-dire la division cellulaire dans les lignées germinales.

En effet, chez les moustiques du genre *Aedes*, la transmission des gamètes subit un biais par la présence d'un gène ou ensemble de gènes portés par un des chromosomes sexuels, souvent sur le chromosome Y porté par les mâles, et favorise un sexe génétique. En résulte une prépondérance d'un des sexes génétiques dans la descendance, ce qui impacte significativement la dynamique des populations concernées par ce phénomène.

Le mécanisme du *sex linked meiotic drive* a inspiré des modifications génomiques par CRISPR-Cas9. Les travaux de Kyrou et al. peuvent être cités. En effet, cette équipe a élaboré une population de moustiques du genre *Anopheles* composée de femelles à la stérilité induite, et de mâles intacts.

Chez ce genre de moustique, le gène *doublesex* (*Agdsx*) produit deux transcrits distingués par épissage alternatif : *dsx-female* (*AgdsxF*) et *dsx-male* (*AgdsxM*), chacun étant responsable de la différenciation des sexes.

Le transcrit femelle inclut un exon spécifique (exon 5) dont la séquence est hautement conservée parmi les différentes espèces de moustiques *Anopheles*. Par modification génomique à l'aide de CRISPR-Cas9, une inactivation de l'expression de *AgdsxF* à l'état homozygote engendre des femelles stériles et au phénotype intersexué. Les mâles ne présentent pas d'altération du développement ou de la fertilité (Kyrou et al. 2018). Par ailleurs, un système de forçage génétique a été construit pour la transmission du caractère au sein d'une population. Pour cela, les séquences codant les constituants nécessaires à CRISPR-Cas9 sont introduits dans le génome des moustiques directement par CRISPR-Cas9.

La construction exprimée ciblant cette séquence s'est propagée rapidement parmi des populations de moustiques en laboratoire, atteignant une prévalence de 100 % en 7 à 11 générations, tout en réduisant progressivement la production d'œufs jusqu'à

l'éradication complète de la population. Ces résultats sont montrés en figure n°81. Aucune résistance génétique significative n'a été sélectionnée contre le forçage génétique, malgré l'apparition de variantes résistantes au Cas9 à chaque génération.

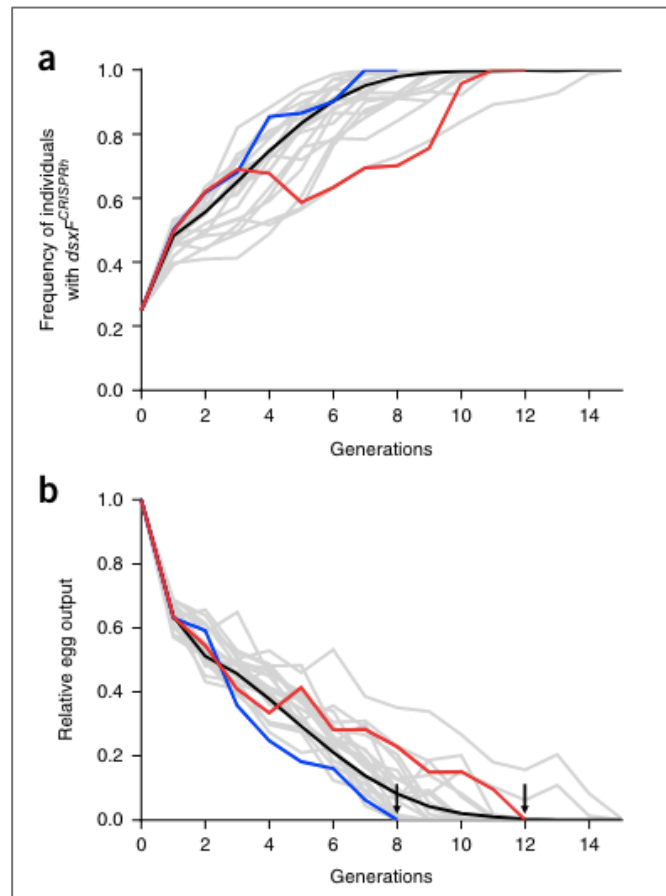


Figure n°81 : Dynamique de la propagation de l'allèle *dsxF^{CRISPRh}* et effet sur la capacité reproductive de la population. Deux cages ont été préparées avec une population de départ de 300 femelles de type sauvage, 150 mâles de type sauvage et 150 mâles **dsxF^{CRISPRh}/+**, ce qui a permis d'obtenir une fréquence initiale de l'allèle **dsxF^{CRISPRh}** de 12,5 % dans chaque cage. (a) La fréquence des moustiques **dsxF^{CRISPRh}** a été mesurée pour chaque génération. L'allèle de forçage a atteint une prévalence de 100 % dans la cage 2 (bleu) et la cage 1 (rouge) respectivement à la génération 7 et 11, conformément à un modèle déterministe (ligne noire) qui prend en compte les valeurs des paramètres récupérés des essais de fécondité. Vingt simulations stochastiques ont été réalisées (lignes grises) en supposant une taille maximale de population de 650 individus. (b) La production totale d'œufs provenant de chaque génération dans chaque cage a été mesurée et normalisée par rapport à la production de la génération de départ. La suppression de la production reproductive de chaque cage a conduit à l'effondrement complet de la population (flèches noires) à la génération 8 (cage 2) ou à la génération 12 (cage 1). Source : Kyrou et al. 2018

Deux autres techniques de *sex linked meiotic drive* ont été décrites : le *X-poisoning* et le *X-shredding*.

Le *X-poisoning* repose sur l'utilisation d'une endonucléase, comme CRISPR-Cas9, qui induit une coupure sur un gène du chromosome X (une copie fonctionnelle unique du gène permet de maintenir une fonction normale) au cours de la spermatogenèse. Après fécondation, les embryons femelles (porteurs du X muté transmis par le gamète mâle) n'arrivent pas au terme de leur développement (en raison d'une absence de synthèse de la protéine codée par le gène muté). Cette technique est illustrée en figure n°82A.

Le *X-shredding* est plus invasif. De la même façon, il repose sur l'utilisation d'une endonucléase programmée pour cibler et couper spécifiquement des séquences du chromosome X essentielles à la survie des spermatozoïdes porteurs du chromosome X. Le *X-shredding* mène donc à la destruction des gamètes mâles porteurs du chromosome X et donc à une population dont le sexe génétique est uniquement mâle (Haber et al. 2024). Le mécanisme est décrit en figure n°82B.

Des expériences de distorsion du *sex ratio* avait déjà étaient menées en 2012 sur *Aedes aegypti*. Une descendance de plus de 80% de mâles avait été obtenue (Shin et al., 2012). Toutefois, il avait été montré que privilégier une descendance majoritairement constituée de mâles encourageait à la polyandrie des femelles, c'est-à-dire la multiplication des partenaires sexuels dans le but d'augmenter dans la population les individus portant le sexe défavorisé (Wilkinson et al. 2003). La corrélation entre le *sex linked meiotic drive* et les processus d'adaptation à cette sélection au sein des populations de moustiques demeurant encore mal définie, rendent complexes les prédictions de dynamique de populations dans ce contexte.

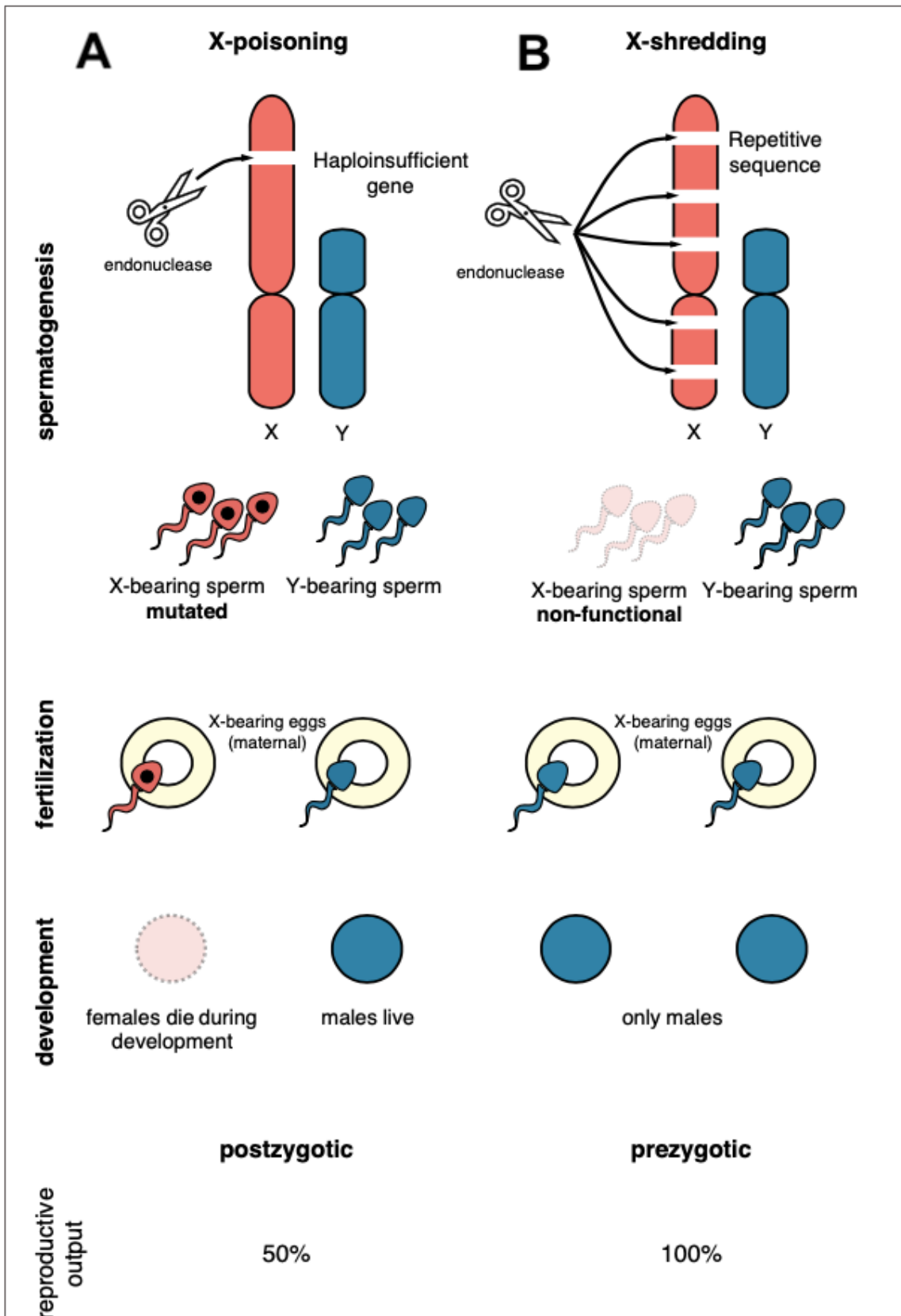


Figure n°82 : Distorsion du sex ratio par (A) *X-Poisoning* : par mutation de gènes haplosuffisants sur le chromosome X induisant la létalité des zygotes femelles. (B) *X-Shredding* : par destruction du chromosome X chez les spermatozoïdes, conduisant un forçage méiotique vers la transmission du chromosome Y. Source : Haber et al. 2024

Concernant le *homing-based gene drive*, il utilise le système CRISPR-Cas9 avec une construction comprenant classiquement une endonucléase spécifique, un ARN guide et un transgène comprenant la séquence d'intérêt insérée au site de coupure, la séquence codant pour Cas9 et la séquence codant pour l'ARN guide dirigé vers la séquence cible. On nomme HEG (*Homing Endonuclease Genes*) les gènes codant les Cas9 utilisées dans le contexte de *homing-based gene drive* (Wang et al. 2021).

Lorsque le moustique porteur de ce transgène se reproduit, l'enzyme Cas9, guidée par l'ARN guide, coupe le chromosome homologue à l'endroit où le transgène avait été inséré. Lors de la réparation de cette cassure par la cellule, la machinerie de réparation de l'ADN utilise la copie intacte du chromosome contenant le transgène comme modèle pour réparer la cassure. Cela conduit à l'intégration du transgène dans le site de coupure, convertissant ainsi l'autre chromosome en une copie du transgène.

Les HEG sont insérés dans des séquences hautement conservées sans altérer leur expression, pour permettre une propagation facilitée par le maigre coût de portage par l'hôte. Généralement, pour mener à la disparition d'une population de moustiques, les HEG sont intégrés dans des gènes liés à la fertilité des femelles ou dans des gènes critiques pour le développement.

La figure n°83 illustre la technique de *homing-based gene drive* et l'obtention de 100% de descendants mutants au sein de la population hypothétique en quelques générations.

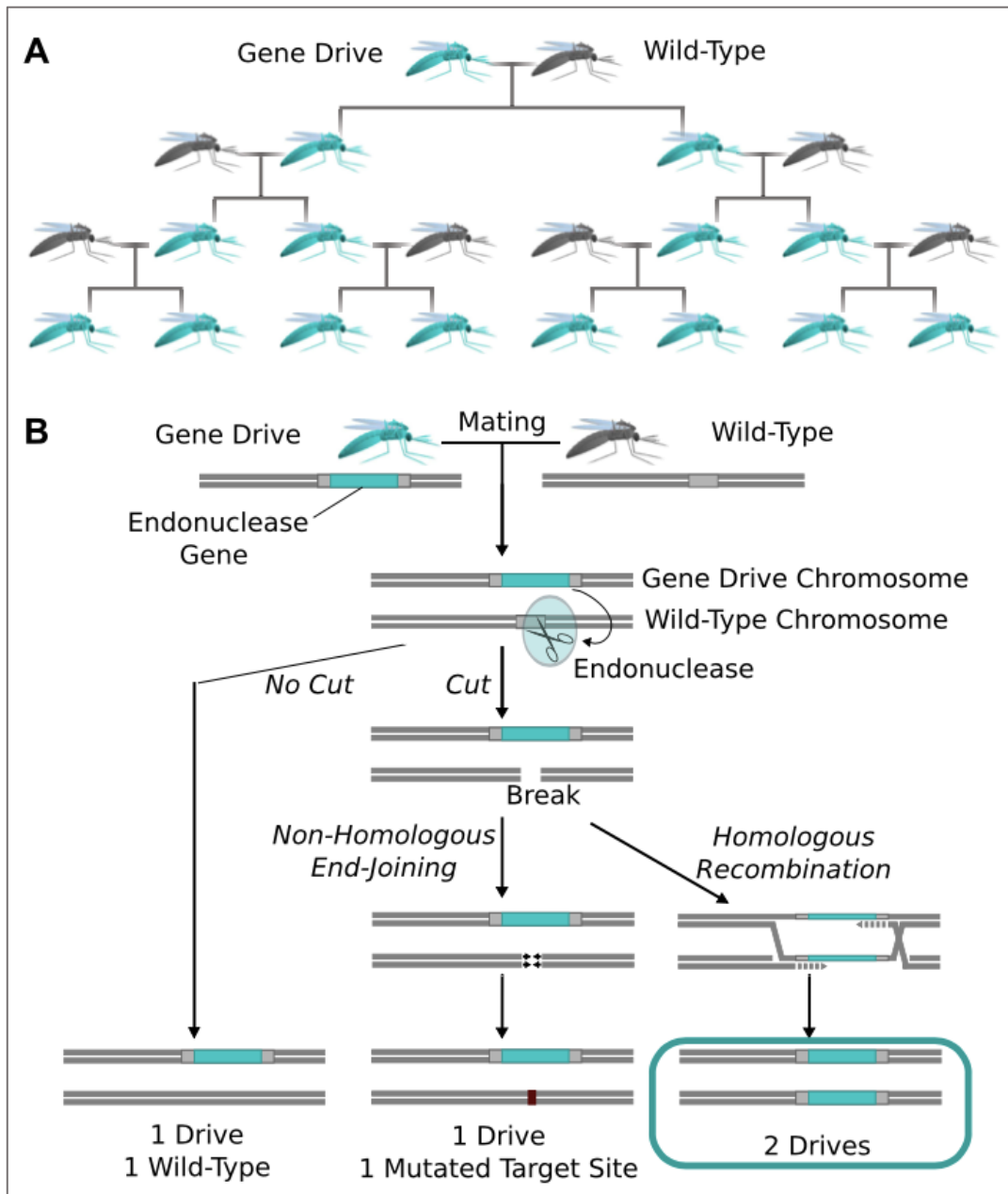


Figure n°83 : *Homing-based gene drive*. (A) Lorsque qu'un organisme portant un forçage génétique à endonucléase (en bleu) s'accouple avec un organisme de type sauvage (en gris), le forçage génétique est préférentiellement hérité par toute la descendance. Cela permet au forçage de se répandre jusqu'à ce qu'il soit présent chez tous les membres de la population, même s'il est légèrement délétère pour l'organisme. (B) Les forçages génétiques à endonucléase sont préférentiellement hérités parce que l'endonucléase coupe le chromosome homologue de type sauvage. Lorsque la cellule répare la cassure en utilisant la recombinaison homologue, elle doit utiliser le chromosome porteur du forçage génétique comme modèle de réparation, copiant ainsi le forçage sur le chromosome de type sauvage. Si l'endonucléase ne parvient pas à couper ou si la cellule utilise la voie de réparation compétitrice appelée jonction d'extrémités non homologues, le forçage n'est pas copié, donc les forçages génétiques efficaces doivent couper de manière fiable lorsque la réparation dirigée par homologie est la plus probable. Source : Esvelt et al. 2014

Une problématique majeure de l'utilisation des HEG est qu'elle échappe à la maîtrise de la technique dans le temps et l'espace.

Ainsi, ont été élaborés des *split HEG* qui reposent sur les mêmes éléments de construction que précédemment décrits, mais dont les séquences codantes sont à des *loci* éloignés, réduisant le taux de coupure. Ainsi, l'effet de HEG se dissipe après quelques générations.

Cette technique a été expérimentée pour la première fois sur des moustiques de l'espèce *Aedes aegypti* (Li et al. 2020). Les simulations sur le terrain ont montré une propagation de la construction à une fréquence allélique de plus de 67 % dans la population voisine après un seul lâcher pour du *homing-based gene drive* classique. En revanche, le *split-HEG* atteint une fréquence maximale d'environ 30 % dans la population voisine quatre ans après 10 lâchers avant d'être progressivement éliminé en raison du coût de portage du gène intégré (Li et al. 2020).

Cette technique ne mène pas à l'éradication de la population mais à son contrôle. De plus, cette même équipe de recherche a montré qu'une séquence hautement conservée du gène *white* pouvant servir de cible pour l'insert des composants du système CRISPR-Cas9 et ainsi permettre une lecture phénotypique de la diffusion du système et donc un suivi simplifié de la dynamique de la population modifiée.

Avec les avancées significatives dans le domaine de la diffusion génétique et la possibilité que les mécanismes de diffusion se propagent à l'échelle mondiale, il est logique que les discussions sur l'éthique, les risques, la gouvernance et l'application pratique des mécanismes de diffusion sur le terrain soient désormais d'une importance capitale.

La conception de systèmes de *gene drive* confinés et ciblant des gènes permettant un phénotype des individus mutés différent des sauvages empêcherait la propagation vers des populations non ciblées et facilitera l'évaluation de la dynamique des populations, des risques de ces modifications génétiques ainsi que des conséquences non intentionnelles.

4. Applications sur les animaux de compagnie

L'allergie au chat domestique est la plus commune des allergies aux mammifères, affectant plus de 15% de la population mondiale et induisant des symptômes allant de la rhino-conjonctivite à la manifestation d'asthme (Chan, Leung 2018).

La protéine Fel D1 contenue dans la salive est la principale responsable de l'allergie humaine à l'espèce féline (Van Ree et al. 1999). Cette protéine est constituée de deux sous-unités en chaîne (CH1 et CH2).

Alors que des aliments spécifiquement conçus pour réduire l'expression de la protéine Fel D1 dans la salive de chat par ajout d'immunoglobulines Y anti-Fel D1 dans leur composition ont d'ores-et-déjà été élaborées (Satyaraj et al. 2019) et commercialisés, la recherche va plus loin en proposant de rendre hypoallergénique génétiquement l'espèce féline par CRISPR-Cas9.

En effet, l'équipe de Lee et al. (2024) a généré un mâle et une femelle fondateurs à partir de micro-injection du système CRISPR-Cas9 dans des embryons au stade d'une cellule. Ils ont obtenu un mâle mosaïque pour la mutation induite sur la séquence codant CH2 (nommé « Heavy ») et une femelle hétérozygote pour la mutation CH2 (CH2+/-, appelée Haemi »). Le croisement de ces deux individus a donné une portée de quatre chatons dont un homozygote muté CH2^{-/-} nommé Alsik. Alsik a été cloné à l'identique pour donner Alsik C. Une photographie de ces individus est montrée en figure n°84 (Lee et al. 2024).



Figure n°84 : Photographies des chats de l'expérimentation. (a) Heavy (CH2 mosaïque) (b) Haemi (CH2^{+/-}) (c) Lasik (CH2^{-/-}) (d) Lasik C (CH2^{-/-}). Source : Lee et al. 2024

L'expression salivaire et la présence sur la fourrure de Fel D1 ont été quantifiées chez des mâles contrôles au phénotype sauvage, Heavy, Haemi et Alsik. Les résultats obtenus sont illustrés en figures n°85 et 86. (Lee et al. 2024).

Par rapport aux individus sauvages, l'individu homozygote muté pour le gène CH2 (« Alsik ») montre une réduction significative de l'expression salivaire de la protéine Fel D2, et de sa présence sur le pelage. On observe également une forte diminution de ces paramètres chez Haemi, individu hétérozygote CH2^{+/-}. Il a été suggéré que l'altération de CH2 chez la femelle montre un plus grand effet hypoallergénique. Haemi étant la seule femelle hétérozygote CH2^{+/-} testée, il semblerait indiqué de comparer un groupe hétérozygote femelle et un groupe hétérozygote mâle avant de trancher sur cette interrogation.

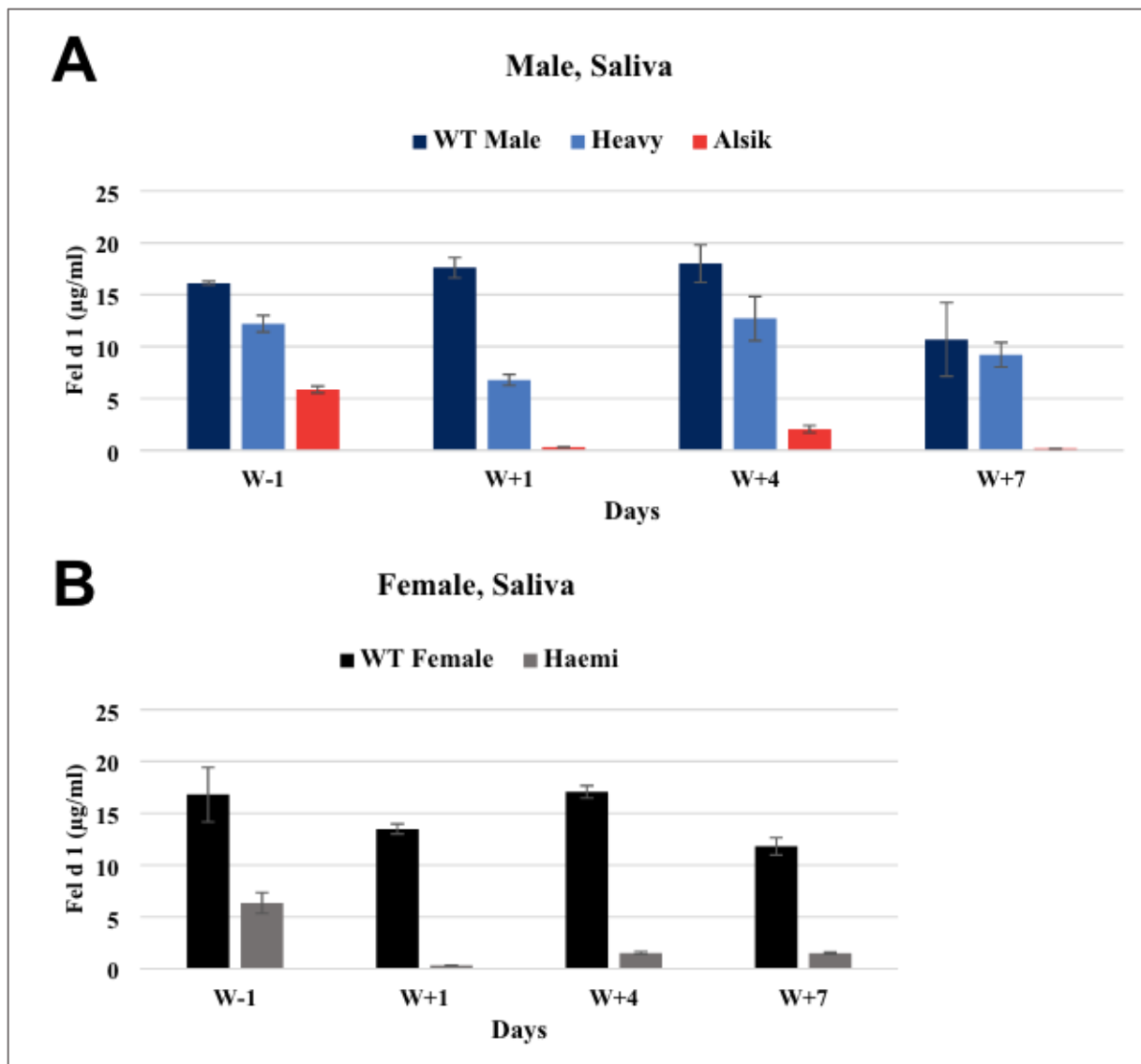


Figure n°85 : Expression salivaire de la protéine Fel D1 chez (A) les mâles sauvages (bleu foncé) ; Heavy (individu mosaïque, en bleu clair) ; Alsik (CH2 homozygote muté, en rouge) (B) les femelles sauvages (noir) et Haemi (gris). W – 1 : Jour avant lavage du pelage ; W : Jour du lavage ; W +1 : Jour n°1 après lavage ; W + 4 : Jour n°4 après lavage et W + 7 : Jour n°7 après lavage. Source : Lee et al. 2024

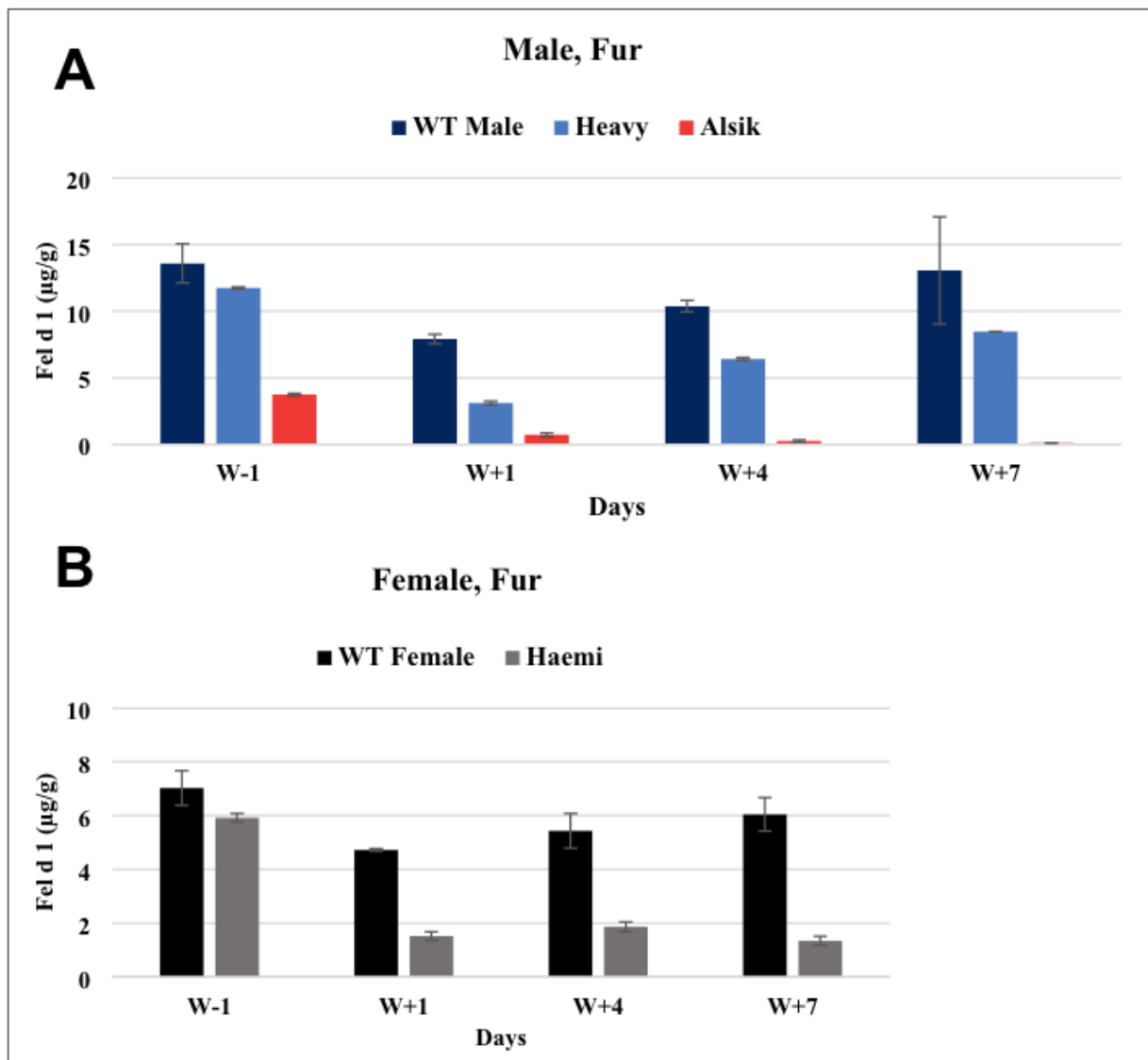


Figure n°86 : Quantification de la protéine Fel D1 sur le pelage chez (A) les mâles sauvages (bleu foncé) ; Heavy (individu mosaïque, en bleu clair) ; Alsik (CH2 homozygote muté, en rouge) (B) les femelles sauvages (noir) et Haemi (gris). W – 1 : Jour avant lavage du pelage ; W : Jour du lavage ; W + 1 : Jour n°1 après lavage ; W + 4 : Jour n°4 après lavage et W + 7 : Jour n°7 après lavage. Source : Lee et al. 2024

Lee et al. ont donc *a priori* élaboré des chats hypoallergéniques pour les patients sensibles à Fel D2 par CRISPR-Cas9.

Concernant le chien, il est plus difficile d'élaborer une modification génomique rendant l'animal hypoallergénique car bien souvent, et au contraire du chat, un individu est allergique à plusieurs facteurs (Hilger et al. 2024).

Nous sommes en droit de nous interroger sur les questions d'ordre éthique que cette manipulation génomique soulève. En effet, cette application de CRISPR-Cas9 consiste en une altération du génome félin pour le seul bénéfice de l'homme. Est-il acceptable, face à la condition allergique de quelques patients, de modifier le chat afin que celui-ci soit hypoallergénique ? Concevoir des animaux spécifiquement pour répondre à des besoins humains, comme réduire les allergies, pourrait être perçu comme une « objectification » des animaux.

Avec l'essor que connaît déjà le clonage des animaux de compagnie (chiens, chats et chevaux) dans certains pays comme les États-Unis (ViaGen Pets®), la Corée du Sud (Soaam Biotech®) et la Chine (Sinogene®, Boyalife Group®), il ne serait pas étonnant de retrouver rapidement ces produits issus d'édition génomique sur ce marché.

D'ailleurs, l'entreprise Boyalife Group®, en collaboration avec Soaam Biotech®, a lancé, en 2015, la fabrication d'une usine de clonage animal en masse, la plus grande au monde, à Tianjin en Chine. Elle reposerait sur un processus robotique qui permettrait l'obtention de clones avec un taux de réussite de 27,5% contre 10% par intervention humaine. Des retards dans les projets de construction, des questionnements éthiques ainsi que des défis techniques pourraient influencer l'ouverture de l'usine mais ces points ne sont pas communiqués au grand public.

La technologie CRISPR-Cas9 pourrait être combinée avec les techniques de clonage pour concevoir des individus aux performances exceptionnelles, en particulier pour les chevaux de course et les chiens de travail, ou aux caractéristiques esthétiques sur mesure, selon l'attente du client. Une telle utilisation de l'édition génomique soulève des questions profondes sur les relations anthropozoologiques et, plus largement, sur la manière dont nous interagissons avec la nature. À ce jour, aucun travail de recherche de ce type n'est documenté.

III. ÉVALUATION ÉTHIQUE ET CONTROVERSE

Plusieurs comités d'éthique nationaux et internationaux se sont penchés sur la question de l'édition du génome animal, comme le Comité consultatif commun d'éthique Inra-Cirad-Ifremer ou le Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé (CCNE) ou encore le Groupe européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies (GEE).

En effet, les manipulations génétiques précises opérées par les nouvelles nucléases programmables, et plus particulièrement par CRISPR-Cas9, soulèvent inévitablement des questions d'ordre scientifique, technique, éthique et sociétale.

Un débat anticipant l'arrivée de ces animaux génétiquement modifiés sur le marché est jugé, par ces comités, comme essentiel à la mesure de l'ampleur de leurs implications potentielles, à l'élaboration d'un encadrement juridique adapté, et prenant en considération les applications hypothétiques déjà publiées et celles en cours d'étude.

Afin de comprendre les questionnements éthiques découlant de l'avènement de ces nouveaux outils d'édition génomique et de leurs utilisations *a priori* avantageuses sur l'animal, il semble tout d'abord judicieux de se pencher sur le contexte historique. Cela fera l'objet du premier point abordé dans cet axe du manuscrit.

En effet, l'Homme exerce depuis plus de 10 000 ans une domestication des animaux en agissant, à son profit, sur les caractéristiques et les comportements de ceux-ci. L'édition du génome pourrait donc être perçue comme l'outil moderne s'inscrivant dans la continuité de cet acte domesticatoire et successeur de la sélection génétique telle qu'on la connaissait.

Par ailleurs, ces questionnements éthiques interviennent dans un temps où le débat public n'a pas encore, ou très peu, émergé dans de nombreux pays, dont la France. Il est encore restreint aux sphères scientifiques et spécialisées du domaine. Les comités d'éthique affirment pourtant, et de façon consensuelle, que la réflexion sur l'acceptabilité des animaux génétiquement modifiés ne doit pas être à la seule

discrétion des scientifiques et des concepteurs mais qu'une réflexion collective et inclusive est nécessaire. De plus, l'accélération des découvertes permises par les nucléases programmables, dont CRISPR-Cas9, pourrait précipiter l'ouverture des citoyens à ce débat. De nombreuses études s'intéressent donc, par anticipation, à la perception publique des nouvelles biotechnologies et leurs applications potentielles en productions animales, en santé humaine ou encore en santé publique.

Ces études pointent d'ores-et-déjà du doigt la corrélation entre le regard porté sur les applications des nouvelles technologies d'édition génomique et leurs vocations. Par exemple, les applications promettant l'amélioration de la santé et du bien-être animal reçoivent une meilleure acceptation publique que celles visant l'augmentation des rendements des productions animales.

Il apparaît d'autant plus pertinent d'étudier la question de l'édition du génome animal du point de vue des citoyens quand la sphère scientifique se montre globalement favorable à certaines applications controversées du grand public. Par exemple, dans le milieu scientifique, les applications les plus favorablement considérées concernent les perspectives de recherche et d'innovation médicale. Les nucléases programmables ouvrent notamment la voie à l'élaboration précise de modèles de recherche sur des affections complexes, ou encore le traitement de maladies génétiques sévères affectant l'homme. En revanche, cela signifierait l'augmentation potentielle de l'utilisation des animaux comme modèles de recherche.

Une autre question survient lorsque l'on s'intéresse à la diffusion d'animaux génétiquement modifiés (ou « AGM ») dans l'environnement, notamment avec l'émergence des techniques de *gene drive*. Comment empêcher leur propagation, qui risquerait d'impacter des écosystèmes entiers, au sein des populations sauvages ? Avons-nous les connaissances suffisantes sur les conséquences de nos agissements sur les populations animales ? L'évaluation éthique par les comités nationaux et internationaux autour du risque de libération d'animaux génétiquement modifiés dans la nature sera étudiée dans un troisième axe.

Une interrogation supplémentaire émerge devant l'avancée des progrès en matière de manipulations génomiques fines : une modification sur un gène suffit-elle à l'appropriation et au brevetage d'une espèce sélectionnée depuis des milliers

d'années ? Qu'advient-il de son accessibilité pour les producteurs ? Le statut et la brevetabilité des animaux génétiquement modifiés par des nucléases programmables seront questionnés. En outre, si les espèces génétiquement modifiées sont largement commercialisées et adoptées, notamment en ce qui concerne les animaux de rente, la crainte est portée sur une perte de diversité génétique plus considérable encore que celle initiée par la sélection génétique depuis des décennies.

Enfin, et plus largement, l'édition du génome est parfois présentée comme la réponse aux défis agroécologiques de demain, notamment concernant la sécurité alimentaire, en rejoignant ainsi le débat initié sur les espèces végétales. Pourtant, l'édition génomique pourrait encourager les pratiques d'élevage actuelles qui ont un impact environnemental majeur par la pollution des eaux et des sols. La dégradation de ces ressources réduit en effet la production alimentaire mondiale.

Par ailleurs, la perte de biodiversité engendrée par les productions animales entraînent notamment le déclin des populations de pollinisateurs essentielles pour la production alimentaire. L'édition génomique, bien qu'attrayante à court terme, permettrait-elle une résolution de ces défis agroécologiques sur le long terme ? Ou représenterait-elle un moyen de repousser à plus tard le changement de paradigme nécessaire de notre modèle d'agriculture actuel ? Les évaluations éthiques concernant ces interrogations seront étudiées dans cet axe.

1. L'édition du génome, un outil supplémentaire pour la domestication des animaux

La domestication est un processus résultant de longues années d'évolution culturelle et technique dans lequel l'Homme n'a eu de cesse de questionner sa place dans la Nature. D'abord à la fois chasseur et proie, l'émergence de l'agriculture au Néolithique a marqué un tournant dans les relations anthropozoologiques, plaçant l'homme au centre de ce monde. L'objectif n'était plus de connaître et comprendre la nature mais bien de la maîtriser, c'est-à-dire de s'approprier les animaux à des fins « utilitaires », comme le mentionnent Xavier Rognon, Denis Laloë et Étienne Verrier dans le premier chapitre de l'ouvrage *Génétique des animaux d'élevage*. Cette réflexion a nourri des années de sélection de traits avantageux pour l'homme en créant des populations domestiquées s'éloignant des formes sauvages ancestrales.

Combiné à l'ensemble des forces évolutives faisant partie intégrante de la sélection naturelle, l'accroissement démographique des espèces généré par l'élevage a permis un accroissement du nombre de mutants. Ces mutants, issus d'un évènement rare, étaient auparavant plus susceptibles de disparaître par des mécanismes de sélection naturelle. En effet, la mutation pouvait représenter un désavantage dans le milieu naturel. Par exemple, une variation dans la couleur du pelage pouvait impacter la capacité de l'animal à échapper aux prédateurs en le rendant plus repérable. L'homme, en sélectionnant ces mutants, a eu un impact considérable sur la survie et la reproduction de ces derniers. Son action a conduit à une réduction de la pression de sélection naturelle.

L'animal ayant reçu la pression sélective la plus importante, du fait de la domestication, demeure le chien. Celui-ci a été domestiqué depuis peut-être plus de 20 000 ans comme en témoignent les peintures rupestres préhistoriques. Au fil des années, l'espèce a été déclinée en diverses races, différant par leur taille, leur pelage ou même leur personnalité. La sélection ne s'est en effet pas arrêtée à l'obtention de chiens de travail mais bien à l'obtention de chiens répondant notamment à des critères purement esthétiques. Avec l'avènement des sciences de la génétique au temps de la révolution industrielle, d'autres espèces animales, tels que les animaux de rente, ont fait l'objet de programmes de sélection génétique intense à partir de la fin du XIX^{ème} siècle.

Durant cette période, la notion de race fait son apparition et désigne des caractéristiques phénotypiques ou zootechniques lui étant propre : le mouton Mérinos connu pour sa laine fine, le cheval Arabe connu pour sa vitesse et sa robustesse face aux hautes températures extérieures, la vache Charolaise pour sa musculature importante, etc.

L'émergence d'associations d'éleveurs ou d'acteurs des filières de productions animales tenant des livres généalogiques et élaborant des standards de conformité de races ont accentué ce phénomène de sélection durant le XXème siècle. La composante socio-économique donne une dimension supplémentaire à cette sélection en subdivisant une espèce en plusieurs races et variétés afin d'exploiter à son paroxysme une caractéristique zootechnique, au détriment des aptitudes mixtes.

Par exemple, la filière avicole s'est subdivisée en la production de poulets de chair ou de poules pondeuses. La chair des poules pondeuses n'est pas valorisée et les poussins mâles sont écartés car issus de lignées hautement sélectionnées pour la production d'œufs au détriment de leur capacité à produire une chair valorisée. De la même façon, la sélection sur le bovin a mené à l'élaboration de vaches laitières hautement performantes et de vaches allaitantes dont la viande est fortement valorisée, bien que des races aux aptitudes mixtes subsistent.

Au début des années 1970, le progrès en matière de technologies numériques permettent de mobiliser des méthodes statistiques plus sophistiqués pour aider les reproducteurs. La notion de « BLUP » émerge quelques années plus tard et s'impose très vite comme un standard dans l'évaluation de la valeur génétique des individus reproducteurs.

L'efficacité incontestable de la domestication et de la sélection animale a permis de distinguer différentes populations au sein d'une espèce et d'orienter l'évolution de chacune en fonction des objectifs ciblés. En revanche, l'accélération de ces progrès à mesure de l'acquisition de connaissances en matière de génétique et d'outils toujours plus perfectionnés permettant de la modifier sur les dernières décennies a soulevé son lot de questions éthiques. Le fait de disposer de l'artillerie nécessaire pour effectuer de telles manipulations du génome justifie-t-il que nous y recourions ? L'Homme est-il en droit de se substituer à la Nature et défier les lois de sélection naturelle jusqu'à les éditer lui-même ?

Cette réflexion sur la domestication et la sélection génétique nourrit des questions plus larges encore sur l'élevage et les relations anthropozoologiques (Delanoue et al. 2018) qu'ils seraient difficiles de traiter de façon exhaustive dans ce manuscrit. Parmi les ouvrages examinant ces relations entre l'homme et l'animal, *Éthique animale* de Jean-Baptiste Jeangène Vilmer (2018) offre une introduction aux principaux débats en éthique animale et revient sur la notion d'utilitarisme. Ce concept était déjà largement abordé dans l'ouvrage fondateur du mouvement éponyme *Libération animale* de Peter Singer (1975), notamment sur la considération des animaux de rente. Récemment, un nouvel ouvrage de cet auteur permettant une actualisation de ces questionnements est paru : *Peter Singer et La libération animale. Quarante ans plus tard* (2017).

2. Recevabilité des animaux génétiquement modifiés

Comme précédemment abordé dans le paragraphe sur les applications d'édition génomique sur l'animal, toutes ne sont pas promues avec le même intérêt par le public. Les applications visant, en apparence, la santé humaine (De Graeff et al. 2019) ainsi que la santé et le bien-être animal reçoivent en effet un meilleur accueil (Yunes et al. 2021a).

La publication de De Graeff et al. offre une revue exhaustive des arguments avancés pour ou contre l'édition des génomes animaux dans un *pool* de 134 articles scientifiques datant de 2011 à 2018 (De Graeff et al. 2019). Les arguments y sont classés en différentes catégories :

- Liés au bien-être et la dignité animale
- Liés à la santé humaine
- Liés aux considérations environnementales

Concernant le bien-être et la dignité animale, les publications d'Adam Henschke (Henschke 2012), et de Marcus Schultz-Bergin en réponse à ce dernier (Schultz-Bergin 2014) sont citées par De Graeff. Elles soulèvent en effet des questionnements éthiques sur le bien-fondé des techniques visant l'amélioration du bien-être animal.

En effet, Henschke revient sur le concept de « désamélioration animale », qui repose sur l'altération de la capacité des animaux à ressentir la douleur ou avoir conscience de leur existence et permet la perpétuation du système intensif tout en satisfaisant l'attention portée sur le bien-être animal. Cette notion émane d'une demande croissante en viande devant une consommation en constante augmentation.

Il critique cette approche en avançant que la désamélioration ne permettra pas de résoudre les problématiques environnementales ou de santé publique émanant du système d'élevage intensif.

De plus, il affirme qu'encourager ce système revient à aggraver plus encore l'impact environnemental de l'élevage et à s'exposer à une émergence de résistance des pathogènes face aux moyens de lutte employés, notamment aux antibiotiques.

Henschke conclut que la désamélioration n'est pas la solution aux problématiques rencontrées par l'élevage et s'exprime en faveur d'une évolution des régimes alimentaires vers une réduction de la consommation de viande et une amélioration des conditions d'élevage plutôt que d'avoir recours à la modification génétique des animaux pour les rendre insensibles à la souffrance (Henschke 2012).

Schultz-Bergin revient sur cette notion de désamélioration en reprochant à Henschke de ne pas prendre en compte la réalité actuelle mais un monde idéal où le système intensif n'existe pas. Il empêcherait alors les arguments rationnels en faveur de la désamélioration. Schultz-Bergin soutient l'idée qu'une analyse contextuelle est nécessaire avant de juger du bien-fondé d'une désamélioration animale (Schultz-Bergin 2014).

Les travaux de recherche les plus médiatisés illustrant ce concept ont été ceux sur l'étude comportementale de poulets congénitalement aveugles. Les résultats suggéraient que les poules pondeuses atteinte de cécité montraient une diminution des comportements agressifs. (Thompson 2008). Une étude similaire avait porté sur la sélection de poulets sans plumage, par des éleveurs de volailles en Israël, mieux adaptés à l'élevage en climats chauds. Ces travaux illustrent le dilemme se situant entre l'altération de la nature pour l'adapter aux conditions d'élevage ou la réforme des pratiques d'élevages actuelles pour obéir aux lois naturelles (Sandøe, Christiansen, Gamborg 2008).

Ce manuscrit cite un exemple comparable et plus récent : l'élaboration de vaches sans cornes afin d'éviter les blessures entre congénères ou envers le personnel de l'élevage (Carlson et al. 2016). Pourtant, l'idée de désamélioration animale se heurte à plusieurs arguments dans ce cas précis.

D'une part, la considération des vaches sans corne par édition génomique comme une entorse au naturel n'est peut-être pas justifiée dans la mesure où l'alternative, aujourd'hui, est d'écorner les bovins à leur jeune âge (Sandøe et al. 2021). Dans les deux cas, l'intervention humaine mène à un physique « sans corne » mais l'un offre une alternative sans douleur pour l'animal.

La réalité est donc que l'animal est d'ores-et-déjà dénaturé pour s'adapter aux pratiques d'élevage. Une réforme pour se conformer aux besoins de l'animal résiderait plutôt en la diminution de la densité d'élevage afin de limiter les comportements agressifs. Cette mesure n'est pas adoptée pour des raisons économiques. L'édition génomique semble être une solution à mi-chemin entre l'écornage douloureux et l'évolution des pratiques d'élevage. Pourtant, elle permettrait de s'affranchir de la douleur sans pour autant mener à un changement de paradigme dans l'agriculture.

Retirer les cornes des bovins ne permet pas une diminution des comportements liés aux conditions d'élevage mais de leurs conséquences. Le bien-être animal n'est donc pas pleinement satisfait pour autant, seule son intégrité physique serait préservée. L'édition génomique représenterait alors une solution partielle à cette problématique.

D'autre part, les détracteurs de l'édition génomique pour le retrait des cornes des bovins soulignent que l'intégrité de l'animal n'est préservée ni dans ces conditions, ni lors d'écornage classique. Aucune des deux pratiques ne devrait alors être promue afin de préserver la dignité de l'animal (Sandøe et al. 2021).

Concernant la santé animale par l'emploi des nucléases programmables, l'avis n°12 du comité consultatif commun d'éthique Inra-Cirad-Ifremer (CCCE), le comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé (CCNE) ou encore le Groupe européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies (GEE) mettent en garde sur le risque d'émergence de résistances des pathogènes pour les modifications effectuées.

En guise d'exemple, l'élimination des populations de moustiques vecteurs de maladies humaines, abordées dans le paragraphe suivant, pourrait engendrer un déplacement et un renforcement du problème en sélectionnant un hôte plus hautement pathogène. La durabilité du bénéfice obtenu par manipulation du génome est donc questionnée.

Par ailleurs, le CCCE, en s'appuyant sur le rapport du comité scientifique du Haut Conseil des Biotechnologies de 2017 sur le *gene drive* et prenant en considération que le déploiement de populations génétiquement modifiées ne serait pas immédiat, émet l'idée qu'une résurgence de la maladie pourrait avoir des conséquences catastrophiques sur une population qui a déjà perdu en immunité collective⁸.

Concernant la diminution de l'impact environnemental des élevages grâce à l'édition génomique, celle-ci reçoit un accueil positif de la part du grand public. Pourtant, au sein de la sphère scientifique, des préoccupations émergent au sujet du risque d'échappement des espèces génétiquement modifiées, avec en ligne de mire les espèces aquacoles et leur impact sur les écosystèmes sauvages.

Bien que des techniques aient été développées afin de limiter la pollution génétique des populations sauvages en cas d'échappement d'individus d'élevage dans le milieu naturel, comme l'induction d'une stérilité chez les poissons déjà modifiés pour présenter une croissance augmentée par CRISPR-Cas9 (Okoli et al. 2022), il apparaît encore difficile d'évaluer pleinement le risque réel d'introgession d'un transgène dans le milieu sauvage.

En somme, l'édition du génome pourrait donc représenter un moyen de préserver le bien-être animal et promouvoir la santé humaine et des animaux, comme encourager la poursuite de pratiques d'élevage inadaptées et porter atteinte à la santé publique en favorisant le développement de résistance aux pathogènes.

⁸ Immunité collective : désigne la situation dans laquelle une proportion suffisamment élevée d'une population est immunisée contre une maladie infectieuse, par la vaccination ou par une infection antérieure. La propagation du pathogène et donc de la maladie concernée s'en trouve limitée voire supprimée au sein de cette population.

Les différents comités d'éthique, tels que le GEE, le CCNE ou encore le CCCE, se prononcent globalement en faveur d'une étude au cas par cas de la pertinence de l'emploi des nucléases programmables face aux alternatives déjà existantes pour les problèmes considérés, et notamment ceux en lien avec la santé et le bien-être animal.

Devant la dualité entre les opinions publiques et de la sphère scientifique, les comités d'éthiques préconisent également un devoir d'information de la société afin de garantir une transparence et une intégrité du débat public.

3. Enjeux autour du forçage génétique par mutagenèse ciblée, ou « *gene drive* »

Comme il a été évoqué précédemment, CRISPR-Cas9 est un outil puissant qui permettrait un contrôle des populations jusqu'à leur éradication par forçage génétique, ou « *gene drive* ». Cette application a été particulièrement étudiée chez plusieurs espèces de moustiques.

Le forçage génétique permet de s'affranchir de la reproduction mendélienne et le jeu de la sélection naturelle pour favoriser une transmission d'un caractère d'intérêt et ainsi guider la dynamique d'une population entière. Chez les insectes et particulièrement les moustiques, des campagnes de lutte chimique (pesticides) ou biologique (*Wolbachia*), peuvent être menées et présentent l'avantage d'être confinées dans l'espace et dans le temps, car nécessitant la répétition de l'intervention sur chaque génération de la population visée. Le forçage génétique peut être utilisé de la même façon, dans un système spatio-temporellement maîtrisé, par le déploiement des *split-HEG*. Pour autant, il est également possible d'obtenir un système de *gene drive* qui échappe à tout contrôle et mène à l'extinction de la population cible voire à la transmission non souhaitée de la construction à des populations voisines.

L'avis du comité consultatif commun d'éthique de l'INRA, du CIRAD et de l'Ifremer invite à la prudence devant le manque de connaissances sur les effets écologiques engendrés par la disparition de l'espèce jugée nuisible. Les travaux d'évaluation des risques fournissent des données de terrain concernant la réussite de la technique mais ne s'intéressent pas à ses conséquences sur les écosystèmes visés. Le comité affirme qu'une étude au cas par cas pourrait apporter des données supplémentaires sur les relations de la population visée et son environnement sans pour autant parvenir à une exhaustivité permettant de sortir de l'incertitude. L'inquiétude porte aussi sur la réversibilité de cette technique si l'application sur le terrain venait à échapper aux prédictions et aux objectifs premiers et montrer des effets indésirables. Enfin, un dernier point abordé dans cet avis concerne l'éventualité d'un transfert adaptatif du pathogène vers un hôte nouveau qui pourrait représenter un risque plus grand encore.

Néanmoins, l'émergence d'une résistance à la lutte autocide par mutagenèse ciblée n'est pas préoccupante dans l'absolu, car considérée comme permettant d'empêcher une disparition jugée non souhaitable en posant des limites à l'efficacité sur le long terme de la technique.

Le CCNE souligne, quant à lui, que le bénéfice attendu du forçage génétique ne doit pas conduire à la négligence d'autres approches relativement efficaces comme le drainage des eaux stagnantes, l'usage de moustiquaires et la mise en place de campagnes de vaccination. Ce comité soulève un point assez innovant dans son rapport sur l'éthique autour de l'édition génomique des espèces non-humaines en mentionnant l'éventualité d'une application du *gene drive* dans le bioterrorisme. Pour cela, il appelle à la transparence des recherches sur cette technique et le partage des données et des connaissances acquises.

L'utilisation du *gene drive* pour éradiquer des espèces nuisibles ou vectrices de maladies, comme les moustiques porteurs du paludisme, reflète une vision anthropocentrée : les bénéfices pour l'humanité, notamment la protection de la santé publique, sont mis en avant, tandis que les conséquences potentielles pour les écosystèmes et la valeur intrinsèque des autres espèces se trouvent reléguées au second plan.

Finalement, le débat éthique autour de l'utilisation du *gene drive* semble rejoindre celui sur l'instrumentalisation de la nature par l'homme et revient sur les relations anthropozoologiques qui ont, jusqu'à présent, initié et guidé la domestication et la sélection des animaux à son avantage.

4. Statut et brevetabilité de l'animal génétiquement modifié

Anthropocentrisme et respect de la dignité animale

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, la considération des espèces jugées nuisibles, dont la réduction ou l'extinction est à l'étude, interpelle sur les relations anthropozoologiques. La notion de la dignité entre alors dans le débat sur l'édition du génome animal. En effet, elle interroge sur le statut moral des animaux et la légitimité des interventions humaines sur ces êtres vivants.

La dignité animale repose sur l'idée que les animaux, en tant qu'êtres vivants, possèdent une valeur intrinsèque qui mérite d'être respectée, indépendamment de leur utilité pour l'homme. Modifier le génome d'un animal pourrait être perçu comme une atteinte à son intégrité naturelle, qui pourrait ignorer ses caractéristiques physiques et comportementales propres à son mode de vie et son environnement. Il s'agit de se demander si cette modification, souvent motivée par des objectifs économiques, respecte l'animal ou si ce dernier est réduit au statut d'outil pour servir l'humanité.

La dignité animale implique aussi de considérer les impacts à long terme de telles modifications, non seulement sur l'individu mais aussi sur l'espèce dans son ensemble. Il s'agit de se demander si l'ingérence humaine, souvent motivée par des objectifs utilitaires ou commerciaux, respecte réellement les intérêts des animaux ou si elle réduit ces êtres à de simples outils au service de l'humanité.

Les applications de l'édition génomique doivent être examinées à travers le prisme de la dignité animale. L'obligation morale de l'homme envers la nature est donc remise en question.

Par ailleurs, l'avis du comité consultatif commun éthique de l'INRA, du CIRAD et de l'Ifremer mentionne la phrase suivante : « *Si l'exploitation abusive de la nature ou une intervention dans l'environnement entraîne des conséquences fâcheuses, c'est à lui même que l'être humain fait du tort.* ». Par cette affirmation, l'avis montre qu'une vision anthropocentrique peut résider en la reconnaissance que le préjudice apparent pour l'homme sert en réalité la protection de la nature, entité dont il fait partie intégrante.

Bien que l'anthropocentrisme soit critiqué pour sa focalisation sur les intérêts humains, il peut aussi conduire à une prise de conscience environnementale. En reconnaissant que la protection de la nature est finalement bénéfique pour l'humanité, cette vision centrée sur l'homme peut encourager des actions en faveur de l'environnement.

Brevetabilité des organismes modifiés : défis socio-économiques et culturels

D'un autre côté, la propriété intellectuelle des animaux génétiquement modifiés doit être clarifiée. En effet, la brevetabilité des animaux dont le génome a été modifié par intervention humaine, est une question pour l'instant sous-représentée dans le débat public. Est-il légitime de breveter une espèce qui a été sélectionnée durant des milliers d'années simplement en raison d'une intervention unique sur son génome ?

Par ailleurs, qu'en est-il de l'accessibilité de ces ressources génétiques présentant un avantage essentiel pour les différents acteurs ? L'influence possible du *lobbying* dans la détermination de l'accès aux ressources génétiques brevetées peut être questionnée.

Les pays en développement et les petits agriculteurs pourraient être désavantagés face aux multinationales et aux pays disposant de ressources plus importantes pour investir dans ces technologies. Cette inégalité d'accès pourrait donc exacerber les disparités économiques et renforçant les déséquilibres mondiaux.

Par ailleurs la concentration des droits de propriété intellectuelle entre les mains de quelques grandes entreprises pourrait mener à des monopoles, sur la production d'animaux génétiquement modifiés mais aussi l'orientation des projets de recherche et le contrôle des applications accessibles en élevage.

La brevetabilité d'un animal génétiquement modifié aurait donc un impact socio-économique significatif.

Ces questions d'appartenance touchent également des aspects culturels et moraux, notamment dans les sociétés où les animaux sont intégrés dans des systèmes de croyance et des pratiques traditionnelles. Modifier génétiquement un animal pourrait être perçu comme une violation des liens ancestraux qui unissent certaines communautés à leurs animaux, ce qui pourrait provoquer des tensions sociales et culturelles.

5. L'édition du génome animal, une réponse aux défis agroécologiques actuels et futurs ?

L'agroécologie désigne un ensemble de concepts et de pratiques dans lesquels les connaissances de l'écologie sont utilisées pour la production agricole. Elle vise à promouvoir des systèmes alimentaires durables, écologiquement sains, économiquement viables et socialement justes, en préservant les ressources naturelles mondiales, d'après Alexander Wezel et Jean-Claude Jauneau.

Les principaux défis qui rendent nécessaire la transition agroécologique ont été abordés tout au long de ce manuscrit et sont : le changement climatique, la pression démographique, la dégradation des sols, la perte de biodiversité, les pénuries futures en eau et les inégalités d'accès aux ressources.

La place de l'édition du génome animal dans la vaste notion de l'agroécologie est pour l'instant largement discutée pour les espèces végétales, mais il est certain que cette question viendra pour les espèces animales, lorsque le débat s'ouvrira au grand public (Ducos et al. 2018).

L'édition du génome pour nourrir la planète soulève des questions éthiques complexes, touchant à la fois à la sécurité alimentaire, à l'équité sociale et à la durabilité environnementale. D'un côté, les partisans de ces technologies avancent que l'édition génomique sur les espèces végétales, comme avec CRISPR-Cas9, offre des solutions prometteuses pour augmenter les rendements agricoles, améliorer la résistance des cultures aux maladies et aux conditions climatiques extrêmes, et enrichir la valeur nutritionnelle des aliments. Ces innovations pourraient être cruciales pour répondre aux besoins alimentaires croissants d'une population mondiale en expansion tout en réduisant l'empreinte environnementale de l'agriculture (Goddard, 2019).

Cependant, les critiques mettent en garde contre les risques et les implications éthiques de ces technologies. Ils soulignent que les effets à long terme des modifications génomiques sur les écosystèmes et la biodiversité sont encore largement inconnus. De plus, il existe des préoccupations concernant la concentration

du pouvoir entre les mains de grandes entreprises biotechnologiques, ce qui pourrait exacerber les inégalités économiques et sociales, notamment en privant les petits agriculteurs de leur autonomie et en accentuant la dépendance aux semences brevetées (Montenegro de Wit, 2020).

Un autre regard est porté sur la sécurité alimentaire. Le rapport de l'association de protection de l'environnement WWF « L'Europe dévore la planète » dresse un constat alarmant sur l'impact des modes de production et de consommation de denrées alimentaires de l'Europe sur le monde (*L'Europe dévore la planète 2022*).

Ce rapport soutient que le monde produit déjà assez de denrées pour assurer la sécurité alimentaire (Willett et al. 2019) mais que le gaspillage alimentaire ainsi que la composition des régimes (Westhoek et al. 2014) ne permettent pas une distribution équitable des ressources agricoles.

Le rapport appelle donc à une réforme en profondeur du système alimentaire européen, en réduisant la consommation de produits d'origine animale, en diminuant le gaspillage alimentaire, et en adoptant des politiques publiques plus ambitieuses pour soutenir des régimes alimentaires sains et durables.

Ainsi, tandis que l'édition génomique représente une avancée potentielle majeure pour la sécurité alimentaire mondiale, la question de sa pertinence pour répondre aux problématiques agroécologiques actuelles et de demain subsiste.

La sécurité alimentaire est déjà largement discutée en ce qui concerne les manipulations des génomes végétaux, mais elle sera rapidement au cœur des débats sur l'édition des génomes animaux.

En conclusion, cette partie consacrée à l'évaluation éthique et aux controverses sur l'édition des génomes animaux met en lumière les nombreuses questions complexes que cette technologie soulève. Les comités d'éthique nationaux et internationaux, tels que le CCCE, le CCNE et le GEE, s'accordent sur la nécessité d'un débat public inclusif concernant les animaux génétiquement modifiés. Ces débats sont d'autant plus urgents que les technologies comme CRISPR-Cas9 progressent rapidement, créant des opportunités mais aussi des risques, notamment en matière de bien-être animal, de biodiversité et de sécurité alimentaire.

Historiquement, la domestication et la sélection animale ont toujours impliqué une intervention humaine pour améliorer des caractéristiques spécifiques. Aujourd'hui, l'édition du génome est perçue comme une extension moderne de cette pratique, bien que beaucoup plus puissante et précise. Cependant, cette avancée technique soulève des préoccupations éthiques quant à la dignité des animaux, la brevetabilité des espèces génétiquement modifiées, et les impacts potentiels sur les écosystèmes si ces animaux venaient à être libérés dans la nature.

Le concept de désamélioration animale illustre bien les dilemmes éthiques actuels. Si certaines applications de l'édition génomique peuvent améliorer le bien-être animal, elles risquent aussi de perpétuer des pratiques d'élevage intensives au lieu de promouvoir des changements plus fondamentaux dans l'agriculture, pourtant souhaitables.

En ce qui concerne les aspects écologiques, le *gene drive* est un autre sujet de controverse, en permettant potentiellement d'éradiquer des espèces jugées nuisibles mais avec des risques écologiques incertains par manque de connaissances et d'outils pour les prédire. Les comités d'éthique appellent donc à la prudence, soulignant le manque de données sur les conséquences à long terme et les effets possibles sur les écosystèmes.

Enfin, la brevetabilité des animaux génétiquement modifiés soulève des questions socio-économiques importantes. Il existe un risque que la concentration des droits de propriété intellectuelle entre les mains de quelques grandes entreprises exacerbe les inégalités globales, en particulier pour les petits agriculteurs dans les pays en développement.

Bien que l'édition génomique puisse offrir des réponses aux défis agroécologiques, elle ne doit pas être considérée comme une réponse unique. La technologie pourrait encourager la poursuite de pratiques agricoles controversées et ne résout pas les problèmes fondamentaux liés à la sécurité alimentaire, à la répartition équitable des ressources et à la durabilité environnementale. Un débat public inclusif et une évaluation éthique rigoureuse sont donc essentiels pour guider les applications futures de cette technologie.

IV. RÉGLEMENTATION

L'Union Européenne, dont la France est État membre, interdit actuellement la mise sur le marché de produits (viande, poissons, fruits de mer, œufs, produits laitiers, produits apicoles) ou sous-produits (non destinés à la consommation humaine, aliments périmés ou contaminés, déchets d'abattoir) d'animaux génétiquement modifiés.

Néanmoins, d'autres pays comme l'Argentine, les États-Unis ou le Japon ont récemment autorisé la commercialisation de poissons génétiquement modifiés, faisant preuve d'une souplesse législative insolite, aux antipodes de la politique européenne sur ce sujet et ouvrant le débat sur une uniformisation mondiale des politiques de dissémination des animaux génétiquement modifiés.

Avec l'avènement des nouvelles techniques d'édition génomique, une demande de d'évolution de la réglementation est portée par les principaux lobbies du secteur, allant dans le sens d'une évaluation des produits eux-mêmes, et non pas des produits sur la base des techniques d'obtention, comme ce qui est actuellement imposée par la réglementation européenne en vigueur (basée sur la Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement).

Cette législation a d'ailleurs déjà fait l'objet d'une demande d'assouplissement formulée par l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, ou EFSA, en octobre 2023, concernant les végétaux génétiquement modifiés par les nouvelles techniques génomiques (NGT), comprenant notamment les végétaux modifiés par CRISPR-Cas9.

En France, suivant les directives européennes, la législation alimentaire repose sur la sécurité, l'évaluation pérenne et la gestion des risques de façon transparente et suivant les avis scientifiques impartiaux de l'EFSA. Si des autorisations de mise sur le marché de produits ou sous-produits d'animaux génétiquement modifiés venaient à voir le jour prochainement, alors elles devraient répondre à ces exigences.

Cet axe du manuscrit se propose d'aborder dans un premier temps l'autorisation de mise sur le marché d'animaux génétiquement modifiés dans certains pays, puis de constater que la réglementation des végétaux modifiés par nucléases programmables est actuellement au cœur d'un débat. La pression des lobbies pour faire évoluer la réglementation des animaux génétiquement modifiés sera également évoquée. Enfin, nous mentionnerons l'avis de la communauté vétérinaire sur l'avenir de ces animaux.

1. État des lieux de la réglementation dans le monde

Pour répondre à de tels questionnements sur les applications des biotechnologies, une approche globale à l'égard de la préservation de la diversité biologique avait été signée lors de la Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement à Rio De Janeiro le 5 juin 1992 pour une entrée en vigueur le 29 décembre 1993. Lors de cette conférence, un groupe de travail avait été chargé d'élaborer un protocole sur la prévention des risques biotechnologiques, et plus spécifiquement l'effet de mouvements transfrontaliers d'organismes génétiquement modifiés sur la conservation de la diversité biologique. Ce protocole, nommé le Protocole de Cartagena, a été achevé et adopté à Montréal le 29 janvier 2000. Ce dernier constitue un cadre réglementaire international conciliant la protection environnementale et les impératifs commerciaux (Secretariat of the Convention on Biological Diversity 2000).

Il définit comme « *organisme vivant modifié, tout organisme vivant possédant une combinaison de matériel génétique inédite obtenue par recours à la biotechnologie moderne* ». Cette définition comprend donc non seulement les organismes obtenus par transgénèse, c'est-à-dire par incorporation d'une séquence d'ADN étranger dans le génome de l'organisme modifié, mais aussi les modifications génomiques obtenus par les dernières techniques disponibles impliquant les nucléases artificielles.

Avec l'avènement des nouveaux outils d'édition génomique qui n'introduisent plus de séquences d'ADN exogène mais corrigent le génome de l'animal sans laisser de traces, un débat mondial sur la réglementation de tels produits a vu le jour.

En 2018, la Cour de justice européenne déclare que ces produits animaux, issus de ces nouvelles techniques de mutagenèse dirigée, tombent sous la juridiction du protocole de Cartagena (CE 2001/18) et sont donc considérés, au même titre que les animaux conçus par transgénèse, comme des organismes génétiquement modifiés. Aucune autorisation de mise sur le marché n'a donc été prononcée pour des animaux génétiquement modifiés sur le territoire de l'Union Européenne.

En revanche, sur les autres continents, plusieurs pays se montrent ouverts voire autorisent la commercialisation de ces produits génétiquement modifiés par édition génomique. Parmi eux, il y a notamment les États-Unis, le Brésil, la Colombie, l'Argentine et le Japon. La figure n°94 offre un état des lieux de la réglementation en vigueur dans le monde, d'après Hallerman et al. 2024.

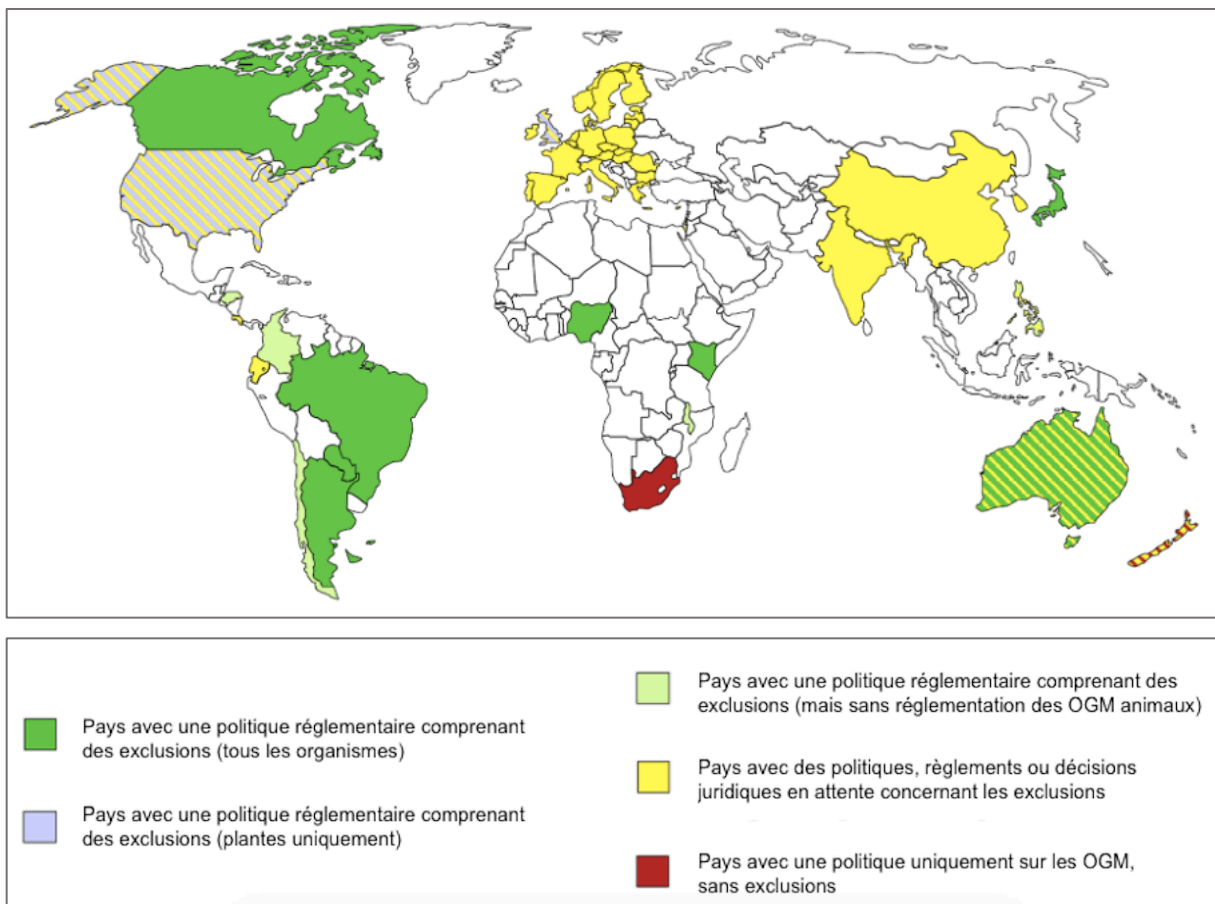


Figure n°87 : Statut de la réglementation concernant les animaux génétiquement modifiés dans le monde, tel qu'elle était au 16 juin 2023, d'après Hallerman et al. 2024

Comme le montre la figure n°87, de nombreux pays présentent d'ores-et-déjà un cadre réglementaire sur les technologies traditionnelles de modifications du génome. En blanc, figurent les pays qui n'ont pas commencé ou développent encore leur réglementation sur les modifications des génomes végétaux et animaux. Certains pays ont acquis une certaine expérience dans la prise de décisions réglementaires concernant les animaux et les plantes porteurs de transgène (traditionnels « OGM »).

Suite à l'émergence des outils d'édition génomique, de nombreux pays ont été amenés à réévaluer leurs cadres réglementaires. Ces changements sont motivés par plusieurs éléments tels que la précision et la facilité relative de l'édition génomique, qui devraient donc accroître le nombre de demandes soumises, par un nombre accru d'acteurs disposant des outils nécessaires à de telles entreprises.

Pour autant, aucun pays, à ce jour, n'a formulé de textes réglementaires distincts entre les animaux génétiquement modifiés par transgénèse classique et les animaux génétiquement modifiés par édition.

L'Argentine et le Japon ont, tous deux, considéré comme répondant à la définition d'animaux génétiquement modifiés les individus obtenus par transgénèse uniquement. Ainsi, la commercialisation d'animaux génétiquement modifiés par les nouveaux outils d'édition génomique a pu voir le jour.

Par exemple, au Japon, la réglementation encadrant la production d'organismes génétiquement modifiés est étudiée par le Ministère de l'environnement, le Ministère de l'économie, le Ministère de l'agriculture et Ministère de la santé (Kondo, Taguchi 2022). Ces instances font le constat que le protocole de Cartagena n'inclut pas les organismes ne contenant pas d'ADN exogène et donc qu'une commercialisation peut être accordée si elle répond à plusieurs critères, selon le ministère de l'environnement. Ces derniers comprennent : l'espèce modifiée ; la méthode d'obtention de l'organisme modifié ; le gène ciblé et ses fonctions ; le phénotype associé à la mutation ; les effets hors-cible ; l'objectif dans lequel l'organisme modifié s'inscrit ; et l'effet de sa dissémination sur la diversité biologique.

Aux yeux du ministère de la Santé japonais, les aliments génétiquement modifiés présentent aussi peu de risques pour la santé humaine que les aliments traditionnels et à ce titre, ne devraient pas faire l'objet d'une évaluation avant leur mise sur le marché contrairement aux produits génétiquement modifiés obtenus par transgénèse.

Par ailleurs, les demandeurs peuvent prédire les effets hors-cible au moyen d'outils *in silico* permettant l'identification de séquences similaires à la séquence cible dans le génome de l'organisme-modèle (Matsuo, Tachikawa 2022). L'absence d'effets non désirés serait alors un argument de choix pour accéder à la mise sur le marché.

Les fabricants devront par ailleurs soumettre un schéma du système métabolique dans lequel s'inscrit le gène ciblé, et mesurer l'effet de sa modification dans ce système.

En somme, au Japon, un produit qui ne contient pas d'ADN exogène n'est pas considéré comme un organisme génétiquement modifié *sensu stricto* et ne fait donc pas l'objet de la réglementation encadrant ces derniers. Si le ministère de la santé et du travail japonais n'est pas en mesure de confirmer l'innocuité du produit, il émet donc une demande de consultation auprès de commission de sécurité alimentaire (FSCJ, pour Food Safety Commission of Japan) qui se chargera d'apporter un avis fondé sur des preuves scientifiques.

Une fois l'espèce autorisée, les croisements de celles-ci avec d'autres individus de même espèce ne feront pas l'objet d'une nouvelle étude de mise sur le marché. Celle-ci sera automatiquement accordée. L'accent est porté sur la confiance du consommateur, si bien que les risques sont communiqués de façon transparente par le ministère de la santé et du travail.

À ce jour, les applications sur le génome animal ayant suivi un processus réglementaire permettant une commercialisation des produits sont listés dans le tableau n°24 (Ledesma, Van Eenennaam 2024).

| Country | Common name | Trait | Gene | Year |
|-----------|------------------|--|--------------------|--------------------|
| Argentina | Nile Tilapia | Increased yield | Myostatin | 2018 |
| | Beef cattle | Heat tolerance | Prolactin receptor | 2020 |
| | | Dairy cattle | Heat tolerance | Prolactin receptor |
| | Cattle | Increased yield | Myostatin | 2021 |
| Brazil | Various species | Undisclosed as not required for non-GMO products | | |
| | Nile Tilapia | Increased yield | Myostatin | 2019 |
| | Beef cattle | Heat tolerance | Prolactin receptor | 2021 |
| | | Dairy cattle | Heat tolerance | Prolactin receptor |
| Cattle | Increased yield | Myostatin | 2021 | |
| | Pig | PRRS-resistance | CD-163 | 2024 |
| Colombia | Pig | PRRS-resistance | CD-163 | 2023 |
| Japan | Red Sea Bream | Increased yield | Myostatin | 2021/ 2022 |
| | Tiger Pufferfish | Faster growth | Leptin receptor | 2022 |
| USA | Olive Flounder | Faster growth | Leptin receptor | 2023 |
| | Cattle* | Heat tolerance | Prolactin receptor | 2022 |

Tableau n°24 : Liste des produits animaux édités par génome ayant reçu une évaluation réglementaire. * Une permission est accordée pour deux bovins de boucherie, le développeur n'est donc pas tenu de soumettre une demande d'approbation par la FDA. Source : Ledesma, Van Eenennaam 2024

En conclusion, l'émergence de l'édition génomique pose de nouveaux défis réglementaires. Les pays réagissent différemment, en fonction de leur perception des risques et des bénéfices de la mise en circulation d'animaux édités. Cette diversité dans les régulations peut influencer le développement futur de la biotechnologie, en particulier dans le domaine agricole et alimentaire, avec des répercussions sur le marché international des produits génétiquement modifiés.

2. Génomes végétaux : évolution de la réglementation

Actuellement, l'Europe est en pleine réflexion sur la réglementation et l'autorisation des plantes génétiquement modifiées (PGM), notamment celles issues des nouvelles technologies d'édition génomique comme CRISPR-Cas9.

En juillet 2023, la Commission européenne a proposé un assouplissement des règles régissant les PGM, en demandant une distinction réglementaire entre les plantes obtenues par des méthodes classiques de transgénèse et celles modifiées par des techniques d'édition génomique, contrairement à ce qui était énoncé par le règlement européen 2017/625.

Cette proposition vise à faciliter la recherche et l'innovation en biotechnologie tout en garantissant des standards élevés de sécurité alimentaire et environnementale (European Commission 2023).

La Commission envisage de classer les plantes obtenues par édition génomique, qui ne contiennent pas de gènes étrangers, dans une catégorie moins réglementée, estimant que ces modifications sont similaires à celles pouvant se produire naturellement ou par sélection traditionnelle. Cette démarche s'appuie sur des rapports scientifiques suggérant que les risques posés par ces plantes sont comparables à ceux des plantes conventionnelles.

Cependant, cette proposition suscite un débat intense. Les partisans de l'assouplissement, dont des scientifiques et des entreprises agricoles, soutiennent que l'édition génomique peut contribuer à la sécurité alimentaire, à la durabilité et à la résilience face au changement climatique (Puchta 2023).

D'un autre côté, d'autres chercheurs, des organisations écologistes et certaines organisations non gouvernementales plaident pour la prudence, invoquant des préoccupations sur les impacts à long terme sur la biodiversité et la santé humaine, ainsi que sur la transparence et la traçabilité des produits alimentaires. Ces personnes et organisations rappellent aussi la première recommandation formulée par le comité d'éthique INRAE-CIRAD-IFREMER, nous invitant à « être vigilant quant aux formes

d'agriculture, d'économie et de société que prépare l'édition des génomes végétaux, et plus spécifiquement l'utilisation du système CRISPR-Cas9 ».

La proposition de la Commission doit encore être discutée et approuvée par le Parlement européen et les États membres, un processus qui promet d'être complexe et controversé. Si elle est adoptée, cette réforme pourrait marquer un tournant majeur dans la politique européenne sur les biotechnologies agricoles.

Il y a fort à parier que le même débat émergera bientôt sur la réglementation des modifications des génomes animaux.

3. Une réglementation sous pression des lobbies

La pression des lobbies joue un rôle crucial dans le débat sur l'accessibilité, l'appartenance et la brevetabilité des animaux obtenus par les nouvelles techniques d'édition du génome, ajoutant une couche supplémentaire de complexité aux questions éthiques déjà présentes. Les grandes entreprises biotechnologiques, qui investissent massivement dans la recherche et le développement de ces technologies, exercent une influence considérable sur les processus législatifs et réglementaires (Ducos et al. 2018).

Certains scientifiques participent à l'effort de *lobbying* (Carroll et al. 2016; Murray, Maga 2016) et dénoncent un système réglementaire jugé trop contraignant et freinant l'innovation dans l'édition génomique.

En effet, les défenseurs affirment que l'édition permet des modifications qui imitent des mutations naturelles. Ce fait justifierait une régulation moins stricte. Ils cherchent donc à orienter la réglementation vers l'évaluation du produit final et non pas de son procédé de fabrication.

En réduisant les coûts de conformité réglementaire, les produits seraient d'une plus grande accessibilité aux entreprises de taille moyenne, et diminuerait le monopole exercé par les multinationales (Carroll et al. 2016).

L'exemple du saumon AquAdvantage est souvent cité par les partisans de la commercialisation des produits génétiquement modifiés. Le processus d'approbation de ce poisson aurait duré plus de 20 ans et nécessité des dizaines de millions de dollars. La lenteur de ces démarches juridiques découragerait l'innovation au service des défis de sécurité alimentaire actuels.

Bien que la nécessité d'un cadre plus souple soit défendue, il est souligné que le processus réglementaire doit permettre de s'assurer de l'innocuité du produit évalué pour le consommateur (Murray, Maga 2016).

Pour autant, alors que les comités d'éthique mettent en lumière l'importance d'une inclusion citoyenne sur la question des animaux génétiquement modifiés, les développeurs et organisations commerciales de ces produits s'expriment plutôt en défaveur de cette inclusion, soulignant que l'avis des groupes de consommateurs ou des organisations non gouvernementales ralentiraient les démarches réglementaires, et subséquemment l'innovation (Kuzma, Cummings 2021).

Par ailleurs, l'industrie développant ces produits valoriserait plutôt la compétitivité et la libre entreprise sans interférence extérieure. Elle favoriserait cette autonomie au sein d'un environnement économique global en s'appuyant sur l'évaluation d'experts internes plutôt que d'acteurs externes (Kuzma, Cummings 2021).

Il apparaît donc clairement que l'intention des grandes entreprises de conserver une certaine indépendance ne s'accorde pas avec la volonté des comités d'éthique d'inclure les citoyens dans la réflexion sur les applications d'édition génomique.

Une partie de la communauté scientifique s'exprime en défaveur de l'évolution de la réglementation des animaux génétiquement modifiés soumise à la pression des lobbies (Feeney, Cockbain, Sterckx 2021; Asquer, Morrison 2022).

Une préoccupation importante réside dans le fait que la modification rapide des réglementations dans certains pays, influencée par les *lobbies* industriels, pourrait provoquer des inégalités à l'échelle internationale. Cela donnerait l'opportunité à des entreprises ou des acteurs peu scrupuleux de déplacer leurs activités vers des régions où les réglementations sont plus souples, voire inexistantes, échappant ainsi à des contrôles stricts. Ce phénomène pourrait conduire à un affaiblissement global des standards éthiques et de sécurité, en particulier dans le domaine des technologies d'édition génomique (Feeney, Cockbain, Sterckx 2021).

Dans le même sens, les détracteurs d'une évolution de la réglementation affirment que l'absence de cadre éthique mondial harmonisé laisse la porte ouverte à des pratiques potentiellement dangereuses de la part des entreprises, guidées simplement par la recherche d'une maximisation du profit (Asquer, Morrison 2022).

En outre, des inquiétudes sont soulevées concernant l'impact environnemental de cette nouvelle agriculture sur le long terme. L'accent est mis sur les bénéfices

économiques à court terme au détriment des préoccupations liées à la biodiversité et aux écosystèmes. Six grands principes sont énoncés dans la publication de Gordon et al. (2021). Ils sont illustrés en figure n°88.

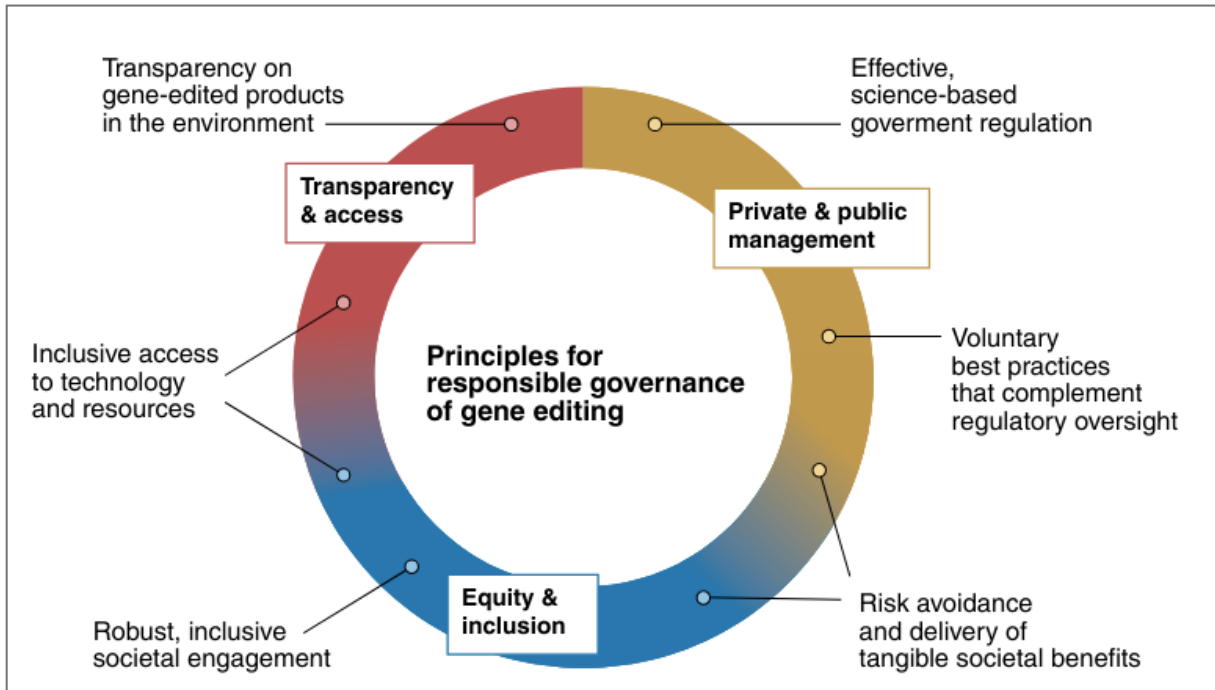


Figure n°88 : Six principes de gouvernance des produits génétiquement édités. Source : Gordon et al. 2021

Le premier principe est que la réglementation des produits doit être soumise à la tangibilité des bénéfices sociétaux et l'absence de risques consécutifs à leur commercialisation. En effet, il est essentiel d'assurer la sécurité pour le consommateur et plus globalement pour les écosystèmes de l'introduction de tels produits sur le marché. Cette évaluation des risques doit être basée sur des faits scientifiques.

Par ailleurs, l'application d'édition génomique doit impliquer un dialogue transparent avec les parties prenantes et populations concernées. Les produits doivent également faire l'objet d'une traçabilité efficace afin que la survenue de risques ou effets indésirables puisse engendrer une réactivité exemplaire.

Une autre idée soulevée par cet article consiste en l'établissement d'un registre national assurant la transparence des applications d'édition génomique dans l'agriculture et l'environnement et renforçant ainsi la confiance du public.

Enfin, les auteurs ajoutent qu'un accès inclusif aux technologies et ressources doit être garanti afin d'élargir les possibilités d'innovations et leurs secteurs d'application.

Ces principes visent donc à encourager une gouvernance équilibrée et responsable des technologies d'édition génomique, garantissant à la fois des bénéfices sociaux et environnementaux tout en minimisant les risques de leur introduction au sein de nos sociétés.

De plus, les lobbies influencent souvent la perception publique et le discours autour de ces technologies, en finançant des campagnes de communication et des études favorables qui minimisent les risques potentiels et mettent en avant les bénéfices économiques et productifs. Ces campagnes présentent souvent l'édition génomique comme une solution incontournable aux crises alimentaires mondiales, sans mentionner suffisamment les risques et les alternatives existantes qui pourraient être moins risquées du point de vue environnemental et social (Asquer, Morrison 2022).

Ce déséquilibre dans l'information diffusée en direction du public peut altérer le débat démocratique et limiter la transparence nécessaire pour une évaluation critique et éthique des impacts à long terme de ces technologies.

Par exemple, les pressions exercées par les lobbies peuvent conduire à une sous-évaluation des risques écologiques et sociaux liés à l'édition du génome animal, ainsi qu'à une précipitation dans l'adoption de cadres législatifs permissifs sans une consultation adéquate des différentes parties prenantes, y compris les scientifiques indépendants, les organisations non gouvernementales et les citoyens (Feeney, Cockbain, Sterckx 2021).

En résumé, les arguments contre l'évolution actuelle de la réglementation sur l'édition génomique soulignent le danger d'un affaiblissement des contrôles sous l'influence des lobbies, la nécessité d'un cadre éthique mondial robuste, et les risques environnementaux potentiellement sous-estimés dans le débat public.

Ainsi, la pression des lobbies ne fait pas seulement pencher la balance réglementaire en faveur des grandes entreprises, elle biaise également la manière dont les questions éthiques, telles que la brevetabilité et la propriété des animaux génétiquement modifiés, sont abordées dans le débat public.

4. Avis de la société vétérinaire de France

S'appuyant sur l'avis de l'académie d'agriculture de France, l'académie vétérinaire de France a produit, le 20 juin 2019, un avis relatif à l'application aux animaux domestiques des nouvelles techniques d'édition génomique.

Les avantages pour la santé animale et publique y sont présentés, illustrés par la production potentielle d'animaux résistants aux maladies de façon héréditaire, qui permettrait la diminution de l'usage d'antibiotiques ou antiparasitaires. Avec l'émergence de résistances à ces traitements, l'édition génomique se poserait comme une solution attirante pour lutter contre les maladies sans compromettre l'efficacité des plans thérapeutiques dont on dispose ce jour.

Par ailleurs, la recevabilité de l'édition génomique est reconnue notamment dans la gestion prophylactique des maladies d'élevage. L'abattage des troupeaux, bien qu'efficace, est de moins en moins accepté par la société.

L'Académie met également en avant la possibilité de tracer les modifications génomiques sur plusieurs générations voire d'assurer un contrôle rigoureux de ces modifications en interrompant la dissémination du génotype modifié en cas de détection d'effets indésirables ou inattendus. De plus, cette traçabilité du produit animal modifié garantirait une sécurité alimentaire auprès des consommateurs.

Sur le plan éthique, l'Académie recommande la prise en compte du débat citoyen dans l'acceptation de ces techniques. En effet, les citoyens soulèvent des préoccupations sur le bien-être animal, l'impact sur la biodiversité et la sécurité sanitaire tout à fait pertinentes dans l'élaboration d'un cadre juridique adapté.

Une évaluation au cas par cas est suggérée dans la mesure des bénéfices apportés par les modifications à la société.

L'Académie semble donc encourager l'innovation en ingénierie génomique tout en plaidant pour une évaluation rigoureuse de chaque projet, tant du point de vue scientifique que sociétal, avec des considérations éthiques solides répondant aux préoccupations publiques. Elle propose ainsi une législation plus flexible autour de ces innovations.

En conclusion de ce paragraphe sur la réglementation des animaux génétiquement modifiés, il est à retenir que des différences significatives entre les approches réglementaires concernant les animaux génétiquement modifiés dans le monde s'observent. Alors que l'Union européenne, dont la France fait partie, adopte une position stricte interdisant leur commercialisation, des pays comme les États-Unis, le Japon et l'Argentine font preuve d'une plus grande flexibilité, autorisant la mise sur le marché de ces produits.

Avec l'avènement de nouvelles techniques d'édition génomique telles que CRISPR-Cas9, la question d'une révision de la réglementation devient de plus en plus pressante. Les *lobbies* poussent en faveur d'une évaluation basée sur les produits eux-mêmes plutôt que sur la méthode de modification, ce qui diffère de la réglementation européenne actuelle.

Cependant, cette pression suscite des débats éthiques et environnementaux, notamment en ce qui concerne la sécurité à long terme et l'impact sur la biodiversité de la mise en circulation de tels produits animaux. Les discussions restent vives, et la communauté scientifique, les législateurs, ainsi que les citoyens, doivent se prononcer sur l'avenir de ces techniques en tenant compte de ces enjeux cruciaux.

CONCLUSION

Ce travail s'est proposé d'explorer en profondeur les enjeux éthiques, scientifiques et réglementaires liés à l'édition génomique animale, en particulier par le biais de la technologie CRISPR-Cas9. Les applications potentielles de ces outils sont vastes, allant de l'amélioration de la santé animale à la lutte contre les maladies zoonotiques, tout en soulevant des questionnements complexes sur la biodiversité et la sécurité alimentaire.

Les avancées rapides dans ce domaine mettent en lumière la nécessité de réglementations internationales harmonisées. Alors que certains pays comme les États-Unis ont déjà assoupli leur cadre réglementaire pour les animaux génétiquement modifiés, l'Union Européenne maintient une position plus prudente, visant à protéger les consommateurs et l'environnement. Ce contraste entre les approches pourrait avoir des conséquences importantes sur le développement de ces biotechnologies à l'échelle mondiale.

D'un point de vue éthique, il est essentiel de garantir que ces nouvelles technologies servent l'intérêt général tout en minimisant les risques pour la biodiversité et le bien-être animal. Les débats publics et les évaluations rigoureuses par des comités d'éthique, telles que celles menées par le CCNE et le CCCE INRAE-CIRAD-IFREMER, doivent jouer un rôle central pour guider l'utilisation de l'édition génomique dans l'agriculture et l'élevage.

En conclusion, l'édition génomique animale ouvre un large éventail de possibilités pour la nécessaire transition agroécologique. Toutefois, son application nécessite une réglementation rigoureuse, une évaluation éthique approfondie, ainsi qu'une participation active des citoyens et ne doit pas occulter la recherche de solutions plus respectueuses des sociétés et de l'environnement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALDERSEY, J. E., SONSTEGARD, T. S., WILLIAMS, J. L. et BOTTEMA, C. D. K., 2020. Understanding the effects of the bovine POLLED variants. *Animal Genetics*. mars 2020. Vol. 51, n° 2, pp. 166-176. DOI 10.1111/age.12915.

ALDERSEY, Johanna E., CHEN, Tong, PETROVSKI, Kiro, WILLIAMS, John L. et BOTTEMA, Cynthia D. K., 2024. Histological characterisation of the horn bud region in 58 day old bovine fetuses. *The International Journal of Developmental Biology* [en ligne]. 2024. [Consulté le 25 août 2024]. DOI 10.1387/ijdb.240040ja. Disponible à l'adresse : <https://ijdb.ehu.eus/article/240040ja>

ALFORD, Andrew R et MCKIERNAN, William A, 2009. The Economic Effects of Using Heterozygotes for a Non-functional Myostatin Mutation within a Commercial Beef Production System. . 2009.

AN, Tong-Qing, TIAN, Zhi-Jun, XIAO, Yan, LI, Ran, PENG, Jin-Mei, WEI, Tian-Chao, ZHANG, Yi, ZHOU, Yan-Jun et TONG, Guang-Zhi, 2010. Origin of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, China. *Emerging Infectious Diseases*. février 2010. Vol. 16, n° 2, pp. 365-367. DOI 10.3201/eid1602.090005.

ANDERSON, Mads Valdemar, HALDRUP, Jakob, THOMSEN, Emil Aagaard, WOLFF, Jonas Holst et MIKKELSEN, Jacob Giehm, 2021. pegIT - a web-based design tool for prime editing. *Nucleic Acids Research*. 2 juillet 2021. Vol. 49, n° W1, pp. W505-W509. DOI 10.1093/nar/gkab427.

ANZALONE, Andrew V., RANDOLPH, Peyton B., DAVIS, Jessie R., SOUSA, Alexander A., KOBLAN, Luke W., LEVY, Jonathan M., CHEN, Peter J., WILSON, Christopher, NEWBY, Gregory A., RAGURAM, Aditya et LIU, David R., 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 5 décembre 2019. Vol. 576, n° 7785, pp. 149-157. DOI 10.1038/s41586-019-1711-4.

ARAKI, Kimi et YAMAMURA, Ken-ichi, 2012. Genetic Manipulations Using Cre and Mutant LoxP Sites. In : MOROZOV, Alexei (éd.), *Controlled Genetic Manipulations* [en ligne]. Totowa, NJ : Humana Press. pp. 29-45. *Neuromethods*. [Consulté le 7 août 2024]. ISBN 978-1-61779-532-9. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-533-6_2

ASQUER, Alberto et MORRISON, Michael, 2022. Editorial: Regulation and governance of gene editing technologies (CRISPR, etc.). *Frontiers in Political Science*. 20 septembre 2022. Vol. 4, pp. 1027410. DOI 10.3389/fpos.2022.1027410.

BAO, Lei, CHEN, HaiDe, JONG, UiMyong, RIM, CholHo, LI, WenLing, LIN, XiJuan, ZHANG, Dan, LUO, Qiong, CUI, Chun, HUANG, HeFeng, ZHANG, Yan, XIAO, Lei et FU, ZhiXin, 2014. Generation of GGTA1 biallelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and somatic cell nuclear transfer. *Science China Life Sciences*. février 2014. Vol. 57, n° 2, pp. 263-268. DOI 10.1007/s11427-013-4601-2.

BARASONA, Jose A., GALLARDO, Carmina, CADENAS-FERNÁNDEZ, Estefanía, JURADO, Cristina, RIVERA, Belén, RODRÍGUEZ-BERTOS, Antonio, ARIAS, Marisa et SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, Jose M., 2019. First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II. *Frontiers in Veterinary Science*. 26 avril 2019. Vol. 6, pp. 137. DOI 10.3389/fvets.2019.00137.

BARBER, Megan R. W., ALDRIDGE, Jerry R., WEBSTER, Robert G. et MAGOR, Katharine E., 2010. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 30 mars 2010. Vol. 107, n° 13, pp. 5913-5918. DOI 10.1073/pnas.1001755107.

BERNAS, Guillaume, OUELLET, Mariette, BARRIOS, Andréa, JAMANN, Hélène, LAROCHELLE, Catherine, LÉVY, Émile et SCHMOUTH, Jean-François, 2022. Introduction of loxP sites by electroporation in the mouse genome; a simple approach for conditional allele generation in complex targeting loci. *BMC Biotechnology*. décembre 2022. Vol. 22, n° 1, pp. 14. DOI 10.1186/s12896-022-00744-8.

BHARATHI, M., SENTHIL KUMAR, N. et CHELLAPANDI, P., 2020. Functional Prediction and Assignment of Methanobrevibacter ruminantium M1 Operome Using a Combined Bioinformatics Approach. *Frontiers in Genetics*. 16 décembre 2020. Vol. 11, pp. 593990. DOI 10.3389/fgene.2020.593990.

BLANCO, Federico Carlos, QUEVAL, Christophe J., ARAUJO, Flabio R. et DE WAARD, Jacobus Henri, 2022. Editorial: Recent Advances in Bovine Tuberculosis. *Frontiers in Veterinary Science*. 26 avril 2022. Vol. 9, pp. 907353. DOI 10.3389/fvets.2022.907353.

BLYTH, Graham A. D., CHAN, Wing Fuk, WEBSTER, Robert G. et MAGOR, Katharine E., 2016. Duck Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Mediates Restriction of Influenza Viruses. SANDRI-GOLDIN, R. M. (éd.), *Journal of Virology*. janvier 2016. Vol. 90, n° 1, pp. 103-116. DOI 10.1128/JVI.01593-15.

BOGDANOVE, Adam J, SCHORNACK, Sebastian et LAHAYE, Thomas, 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 1 août 2010. Vol. 13, n° 4, pp. 394-401. DOI 10.1016/j.pbi.2010.04.010.

BOLO, Philippe et FOURNIER, Charles, 2023. 1069 : *Rapport d'information sur la grippe aviaire et son impact sur les élevages*. Rapport d'information. France : Assemblée Nationale.

BONESTROO, John, FALL, Nils, HOGVEEN, Henk, EMANUELSON, Ulf, KLAAS, Ilka Christine et VAN DER VOORT, Mariska, 2023. The costs of chronic mastitis: A simulation study of an automatic milking system farm. *Preventive Veterinary Medicine*. janvier 2023. Vol. 210, pp. 105799. DOI 10.1016/j.prevetmed.2022.105799.

BONNIEU, Anne, CARNAC, Gilles et VERNUS, Barbara, 2007. Myostatin in the Pathophysiology of Skeletal Muscle. *Current Genomics*. 1 novembre 2007. Vol. 8, n° 7, pp. 415-422. DOI 10.2174/138920207783591672.

BORHAM, Mohamed, OREIBY, Atef, EL-GEDAWY, Attia, HEGAZY, Yamen, KHALIFA, Hazim O., AL-GAABARY, Magdy et MATSUMOTO, Tetsuya, 2022. Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant Mycobacterium Species. *Pathogens*. 21 juin 2022. Vol. 11, n° 7, pp. 715. DOI 10.3390/pathogens11070715.

BOTELLA, Hélène, STADTHAGEN, Gustavo, DE CHASTELLIER, Chantal et NEYROLLES, Olivier, 2012. Un rôle nouveau des métaux de transition dans l'immunité antimicrobienne. *médecine/sciences*. janvier 2012. Vol. 28, n° 1, pp. 18-21. DOI 10.1051/medsci/2012281006.

BOTTERILL, Justin J., KHLAIFIA, Abdessattar, WALTERS, Brandon J., BRIMBLE, Mark A., SCHARFMAN, Helen E. et ARRUDA-CARVALHO, Maithe, 2021. Off-Target Expression of Cre-Dependent Adeno-Associated Viruses in Wild-Type C57BL/6J Mice. *eneuro*. novembre 2021. Vol. 8, n° 6, pp. ENEURO.0363-21.2021. DOI 10.1523/ENEURO.0363-21.2021.

BOUCHARD, Damien S., RAULT, Lucie, BERKOVA, Nadia, LE LOIR, Yves et EVEN, Sergine, 2013. Inhibition of Staphylococcus aureus Invasion into Bovine Mammary Epithelial Cells by Contact with Live Lactobacillus casei. *Applied and Environmental Microbiology*. février 2013. Vol. 79, n° 3, pp. 877-885. DOI 10.1128/AEM.03323-12.

BURGER, Brian T., BEATON, Benjamin P., CAMPBELL, Matthew A., BRETT, Benjamin T., ROHRER, Melissa S., PLUMMER, Sarah, BARNES, Dylan, JIANG, Ke, NASWA, Sudhir, LANGE, Jeremy, OTT, Alina, ALGER, Elizabeth, RINCON, Gonzalo, ROUNSLEY, Steven, BETTHAUSER, Jeff, MTANGO, Namdori R., BENNE, Joshua A., HAMMERAND, Jessica, DURFEE, Codie J., ROTOLO, Marisa L., CAMERON, Peter, LIED, Alexandra M., IRBY, Matthew J., NYER, David B., FULLER, Chris K., GRADIA, Scott, KANNER, Steven B., PARK, Ki-Eun, WATERS, Jerel, SIMPSON, Sean, TELUGU, Bhanu P., SALGADO, Brianna C., BRANDARIZ-NUÑEZ, Alberto, ROWLAND, Raymond R.R., CULBERTSON, Matt, RICE, Elena et CIGAN, A. Mark, 2024. Generation of a Commercial-Scale Founder Population of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Resistant Pigs Using CRISPR-Cas. *The CRISPR Journal*. 1 février 2024. Vol. 7, n° 1, pp. 12-28. DOI 10.1089/crispr.2023.0061.

BURKARD, Christine, LILLICO, Simon G., REID, Elizabeth, JACKSON, Ben, MILEHAM, Alan J., AIT-ALI, Tahar, WHITELAW, C. Bruce A. et ARCHIBALD, Alan L., 2017. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. PEREZ, Daniel R. (éd.), *PLOS Pathogens*. 23 février 2017. Vol. 13, n° 2, pp. e1006206. DOI 10.1371/journal.ppat.1006206.

BURKARD, Christine, OPRIESSNIG, Tanja, MILEHAM, Alan J., STADEJEK, Tomasz, AIT-ALI, Tahar, LILLICO, Simon G., WHITELAW, C. Bruce A. et ARCHIBALD, Alan L., 2018. Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. GALLAGHER, Tom (éd.), *Journal of Virology*. 15 août 2018. Vol. 92, n° 16, pp. e00415-18. DOI 10.1128/JVI.00415-18.

BUTLER, Rachel E., BRODIN, Priscille, JANG, Jichan, JANG, Mi-Seon, ROBERTSON, Brian D., GICQUEL, Brigitte et STEWART, Graham R., 2012. The Balance of Apoptotic and Necrotic Cell Death in Mycobacterium tuberculosis Infected Macrophages Is Not Dependent on Bacterial Virulence. BRIKEN, Volker (éd.), *PLoS ONE*. 30 octobre 2012. Vol. 7, n° 10, pp. e47573. DOI 10.1371/journal.pone.0047573.

BYRNE, Guerard W., DU, Zeji, STALBOERGER, Paul, KOGELBERG, Heide et MCGREGOR, Christopher G. A., 2014. Cloning and expression of porcine β 1,4 N-acetylgalactosaminyl transferase encoding a new xenoreactive antigen. *Xenotransplantation*. novembre 2014. Vol. 21, n° 6, pp. 543-554. DOI 10.1111/xen.12124.

CAELERS, Antje, MACLEAN, Norman, HWANG, Gyulin, EPPLER, Elisabeth et REINECKE, Manfred, 2005. Expression of endogenous and exogenous growth hormone (GH) messenger (m) RNA in a GH-transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research*. février 2005. Vol. 14, n° 1, pp. 95-104. DOI 10.1007/s11248-004-5791-y.

CAI, Huanchang, ZHANG, Hewei, CHENG, Huai, LIU, Min, WEN, Shubo et REN, Jingqiang, 2023. Progress in PRRSV Infection and Adaptive Immune Response Mechanisms. *Viruses*. 27 juin 2023. Vol. 15, n° 7, pp. 1442. DOI 10.3390/v15071442.

CALLEGARI, Andrea, SIEBEN, Christian, BENKE, Alexander, SUTER, David M., FIERZ, Beat, MAZZA, Davide et MANLEY, Suliana, 2019. Single-molecule dynamics and genome-wide transcriptomics reveal that NF- κ B (p65)-DNA binding times can be decoupled from transcriptional activation. WELLS, Christine A. (éd.), *PLOS Genetics*. 17 janvier 2019. Vol. 15, n° 1, pp. e1007891. DOI 10.1371/journal.pgen.1007891.

CAMPBELL, K. H. S., MCWHIR, J., RITCHIE, W. A. et WILMUT, I., 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. mars 1996. Vol. 380, n° 6569, pp. 64-66. DOI 10.1038/380064a0.

CARLSON, Daniel F, LANCTO, Cheryl A, ZANG, Bin, KIM, Eui-Soo, WALTON, Mark, OLDESCHULTE, David, SEABURY, Christopher, SONSTEGARD, Tad S et FAHRENKRUG, Scott C, 2016. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nature Biotechnology*. mai 2016. Vol. 34, n° 5, pp. 479-481. DOI 10.1038/nbt.3560.

CARLSON, Daniel F., TAN, Wenfang, LILLICO, Simon G., STVERAKOVA, Dana, PROUDFOOT, Chris, CHRISTIAN, Michelle, VOYTAS, Daniel F., LONG, Charles R., WHITELAW, C. Bruce A. et FAHRENKRUG, Scott C., 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23 octobre 2012. Vol. 109, n° 43, pp. 17382-17387. DOI 10.1073/pnas.1211446109.

CARROLL, Dana, VAN EENENNAAM, Alison L, TAYLOR, Jeremy F, SEGER, Jon et VOYTAS, Daniel F, 2016. Regulate genome-edited products, not genome editing itself. *Nature Biotechnology*. mai 2016. Vol. 34, n° 5, pp. 477-479. DOI 10.1038/nbt.3566.

CERMAK, Tomas, STARKER, Colby G. et VOYTAS, Daniel F., 2015. Efficient Design and Assembly of Custom TALENs Using the Golden Gate Platform. In : PRUETT-MILLER, Shondra M. (éd.), *Chromosomal Mutagenesis* [en ligne]. New York, NY : Springer New York. pp. 133-159. Methods in Molecular Biology. [Consulté le 9 mai 2024]. ISBN 978-1-4939-1861-4. Disponible à l'adresse : https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1862-1_7

CHAN, Sanny K. et LEUNG, Donald Y. M., 2018. Dog and Cat Allergies: Current State of Diagnostic Approaches and Challenges. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2018. Vol. 10, n° 2, pp. 97. DOI 10.4168/air.2018.10.2.97.

CHANG, Hao, ZHENG, Jiaying, QIU, Yingwu, CHEN, Chuanxin, LI, Qunhui, WU, Qianwen, LIN, Limiao, ZHAO, Haishen, ZHOU, Qingfeng, GONG, Lang, SUN, Yankuo, ZHANG, Xiangbin et WANG, Heng, 2023. Isolation, identification, and pathogenicity of a NADC30-like porcine reproductive and respiratory disorder syndrome virus strain affecting sow production. *Frontiers in Veterinary Science*. 7 juillet 2023. Vol. 10, pp. 1207189. DOI 10.3389/fvets.2023.1207189.

CHEN, Fengjiao, WANG, Ying, YUAN, Yilin, ZHANG, Wei, REN, Zijian, JIN, Yong, LIU, Xiaorui, XIONG, Qiang, CHEN, Qin, ZHANG, Manling, LI, Xiaokang, ZHAO, Lihua, LI, Ze, WU, Zhaoqiang, ZHANG, Yanfei, HU, Feifei, HUANG, Juan, LI, Rongfeng et DAI, Yifan, 2015. Generation of B Cell-Deficient Pigs by Highly Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Targeting. *Journal of Genetics and Genomics*. août 2015. Vol. 42, n° 8, pp. 437-444. DOI 10.1016/j.jgg.2015.05.002.

CHEN, Peter J., HUSSMANN, Jeffrey A., YAN, Jun, KNIPPING, Friederike, RAVISANKAR, Purnima, CHEN, Pin-Fang, CHEN, Cidi, NELSON, James W., NEWBY, Gregory A., SAHIN, Mustafa, OSBORN, Mark J., WEISSMAN, Jonathan S., ADAMSON, Britt et LIU, David R., 2021. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*. octobre 2021. Vol. 184, n° 22, pp. 5635- 5652.e29. DOI 10.1016/j.cell.2021.09.018.

CHEN, Sean, LEE, Benjamin, LEE, Angus Yiu-Fai, MODZELEWSKI, Andrew J. et HE, Lin, 2016. Highly Efficient Mouse Genome Editing by CRISPR Ribonucleoprotein Electroporation of Zygotes. *Journal of Biological Chemistry*. juillet 2016. Vol. 291, n° 28, pp. 14457-14467. DOI 10.1074/jbc.M116.733154.

CHU, Van Trung, WEBER, Timm, WEFERS, Benedikt, WURST, Wolfgang, SANDER, Sandrine, RAJEWSKY, Klaus et KÜHN, Ralf, 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*. mai 2015. Vol. 33, n° 5, pp. 543-548. DOI 10.1038/nbt.3198.

CHU, Xuefei, GE, Shengqiang, ZUO, Yuanyuan, CUI, Jin, SHA, Zhou, HAN, Naijun, WU, Bingrong, NI,

Bo, ZHANG, Hui, LV, Yan, WANG, Zhiliang et XIAO, Yihong, 2024. Thoughts on the research of African swine fever live-attenuated vaccines. *Vaccine*. juin 2024. pp. S0264410X24006935. DOI 10.1016/j.vaccine.2024.06.020.

CLAEYS, W.L., VERRAES, C., CARDOEN, S., DE BLOCK, J., HUYGHEBAERT, A., RAES, K., DEWETTINCK, K. et HERMAN, L., 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*. août 2014. Vol. 42, pp. 188-201. DOI 10.1016/j.foodcont.2014.01.045.

COLES, David, FREWER, Lynn J. et GODDARD, Ellen, 2015. Ethical Issues and Potential Stakeholder Priorities Associated with the Application of Genomic Technologies Applied to Animal Production Systems. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. avril 2015. Vol. 28, n° 2, pp. 231-253. DOI 10.1007/s10806-015-9529-z.

COMMISSION EUROPÉENNE, 2021. *EU farm economics overview FADN 2018*. Bruxelles : Commission Européenne.

CONTEDDU, Kimberly, ENGLISH, Holly M., BYRNE, Andrew W., AMIN, Bawan, GRIFFIN, Laura L., KAUR, Prabhleen, MORERA-PUJOL, Virginia, MURPHY, Kilian J., SALTER-TOWNSHEND, Michael, SMITH, Adam F. et CIUTI, Simone, 2024. A scoping review on bovine tuberculosis highlights the need for novel data streams and analytical approaches to curb zoonotic diseases. *Veterinary Research*. 21 mai 2024. Vol. 55, n° 1, pp. 64. DOI 10.1186/s13567-024-01314-w.

COOPER, David K. C., 2012. A Brief History of Cross-Species Organ Transplantation. *Baylor University Medical Center Proceedings*. janvier 2012. Vol. 25, n° 1, pp. 49-57. DOI 10.1080/08998280.2012.11928783.

COZZI, G., GOTTARDO, F., BRSCIC, M., CONTIERO, B., IRRGANG, N., KNIERIM, U., PENTELESCU, O., WINDIG, J.J., MIRABITO, L., KLING EVEILLARD, F., DOCKES, A.C., VEISSIER, I., VELARDE, A., FUENTES, C., DALMAU, A. et WINCKLER, C., 2015. Dehorning of cattle in the EU Member States: A quantitative survey of the current practices. *Livestock Science*. septembre 2015. Vol. 179, pp. 4-11. DOI 10.1016/j.livsci.2015.05.011.

CUELLAR, Camila J., AMARAL, Thiago F., RODRIGUEZ-VILLAMIL, Paula, ONGARATTO, F., MARTINEZ, D. Onan, LABRECQUE, Rémi, LOSANO, João D. De Agostini, ESTRADA-CORTÉS, Eliab, BOSTROM, Jonathan R., MARTINS, Kyra, RAE, D. Owen, BLOCK, Jeremy, HOORN, Quinn A., DAIGNEAULT, Bradford W., MERRIAM, Jonathan, LOHUIS, Michael, DIKMEN, Serdal, BITTAR, João H. J., MAIA, Tatiane S., CARLSON, Daniel F., LARSON, Sabreena, SONSTEGARD, Tad S. et HANSEN, Peter J., 2024. Consequences of gene editing of *PRLR* on thermotolerance, growth, and male reproduction in cattle. *FASEB BioAdvances*. août 2024. Vol. 6, n° 8, pp. 223-234. DOI 10.1096/fba.2024-00029.

CUI, Chenchen, SONG, Yujie, LIU, Jun, GE, Hengtao, LI, Qian, HUANG, Hui, HU, Linyong, ZHU, Hongmei, JIN, Yaping et ZHANG, Yong, 2015. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Scientific Reports*. 21 mai 2015. Vol. 5, n° 1, pp. 10482. DOI 10.1038/srep10482.

CUI, Weiguo, LIU, Mengyu, GU, Tianyu, ZHAO, Shuai et YIN, Guoan, 2024. Multi-dimensional evaluation of pain response in low day-age calves to two types of dehorning. *Frontiers in Veterinary Science*. 22 mai 2024. Vol. 11, pp. 1406576. DOI 10.3389/fvets.2024.1406576.

DAI, Yifan, VAUGHT, Todd D., BOONE, Jeremy, CHEN, Shu-Hung, PHELPS, Carol J., BALL, Suyapa, MONAHAN, Jeff A., JOBST, Peter M., MCCREATH, Kenneth J., LAMBORN, Ashley E., COWELL-

LUCERO, Jamie L., WELLS, Kevin D., COLMAN, Alan, POLEJAEVA, Irina A. et AYARES, David L., 2002. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*. mars 2002. Vol. 20, n° 3, pp. 251-255. DOI 10.1038/nbt0302-251.

DE GRAEFF, Nienke, JONGSMA, Karin R., JOHNSTON, Josephine, HARTLEY, Sarah et BREDENOORD, Annelien L., 2019. The ethics of genome editing in non-human animals: a systematic review of reasons reported in the academic literature. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 13 mai 2019. Vol. 374, n° 1772, pp. 20180106. DOI 10.1098/rstb.2018.0106.

DEAN, Anna S, FORCELLA, Simona, OLEA-POPELKA, Francisco, IDRISSE, Ahmed El, GLAZIOU, Philippe, BENYAHIA, Amina, MUMFORD, Elizabeth, ERLACHER-VINDEL, Elisabeth, GIFFORD, Glen, LUBROTH, Juan, RAVIGLIONE, Mario et FUJIWARA, Paula, 2018. A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. février 2018. Vol. 18, n° 2, pp. 137-138. DOI 10.1016/S1473-3099(18)30013-6.

DEB, Rajib, CHAUDHARY, Parul et DE, Sachinandan, 2023. CRISPR/cas9 cassette targeting *Escherichia coli* ^{bla} CTX-M specific gene of mastitis cow milk origin can alter the antibiotic resistant phenotype for cefotaxime. *Animal Biotechnology*. 3 septembre 2023. Vol. 34, n° 5, pp. 1849-1854. DOI 10.1080/10495398.2022.2053695.

DELANOUE, Elsa, DOCKÈS, Anne-Charlotte, CHOUTEAU, Alizée, ROGUET, Christine et PHILIBERT, Aurore, 2018. Regards croisés entre éleveurs et citoyens français : vision des citoyens sur l'élevage et point de vue des éleveurs sur leur perception par la société. *INRA Productions Animales*. 2018. Vol. 31, pp. 51-68.

DELPUTTE, P. L., COSTERS, S. et NAUWYNCK, H. J., 2005. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *Journal of General Virology*. 1 mai 2005. Vol. 86, n° 5, pp. 1441-1445. DOI 10.1099/vir.0.80675-0.

DENNER, Joachim, 2015. Elimination of porcine endogenous retroviruses from pig cells. *Xenotransplantation*. novembre 2015. Vol. 22, n° 6, pp. 411-412. DOI 10.1111/xen.12210.

DENNER, Joachim, 2016a. How Active Are Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs)? *Viruses*. 3 août 2016. Vol. 8, n° 8, pp. 215. DOI 10.3390/v8080215.

DENNER, Joachim, 2016b. Expression and function of endogenous retroviruses in the placenta. *APMIS*. janvier 2016. Vol. 124, n° 1-2, pp. 31-43. DOI 10.1111/apm.12474.

DIKMEN, S., KHAN, F.A., HUSON, H.J., SONSTEGARD, T.S., MOSS, J.I., DAHL, G.E. et HANSEN, P.J., 2014. The SLICK hair locus derived from Senepol cattle confers thermotolerance to intensively managed lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. septembre 2014. Vol. 97, n° 9, pp. 5508-5520. DOI 10.3168/jds.2014-8087.

DOLGIN, Elie, 2021. First GM pigs for allergies. Could xenotransplants be next? *Nature Biotechnology*. avril 2021. Vol. 39, n° 4, pp. 393-396. DOI 10.1038/d41587-021-00001-x.

DU, Shao Jun, GONG, Zhiyuan, FLETCHER, Garth L., SHEARS, Margaret A., KING, Madonna J., IDLER, David R. et HEW, Choy L., 1992. Growth enhancement in transgenic atlantic salmon by the use of an « all fish » chimeric growth hormone gene construct. *Nature Biotechnology*. Volume 10. Research Institute, The Hospital for Sick Children and Departments of Clinical Biochemistry and Biochemistry, University of Toronto, Toronto, Canada, février 1992. pp. 176-181.

DUA, Seema, BANSAL, Sonu, GAUTAM, Devika, JOSE, Bosco, SINGH, Priyanka, SINGH, Manoj

Kumar, DE, Sachinandan, KUMAR, Dharmendra, YADAV, Prem Singh, KUES, Wilfried et SELOKAR, Naresh L., 2023. Production of *MSTN* Gene-Edited Embryos of Buffalo Using the CRISPR/Cas9 System and SCNT. *Cellular Reprogramming*. 1 juin 2023. Vol. 25, n° 3, pp. 121-127. DOI 10.1089/cell.2023.0003.

DUCOS, A, BED'HOM, B, ACLOQUE, H. et PAIN, B., 2018. Modifications ciblées des génomes : apports et impacts pour les espèces d'élevage. *INRA Productions Animales*. 14 juin 2018. Vol. 30, n° 1, pp. 3-18. DOI 10.20870/productions-animales.2017.30.1.2226.

ESVELT, Kevin M, SMIDLER, Andrea L, CATTERUCCIA, Flaminia et CHURCH, George M, 2014. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *eLife*. 17 juillet 2014. Vol. 3, pp. e03401. DOI 10.7554/eLife.03401.

EUROPEAN COMMISSION, 2023. *Regulation of the European Parliament and of the Council on plants obtained by a certain new genomic techniques and their food and feed, and amending Regulation (EU) 2017/625*. Bruxelles.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), STÅHL, Karl, BOKLUND, Anette Ella, PODGÓRSKI, Tomasz, VERGNE, Timothée, ABRAHANTES, José Cortiñas, CATTANEO, Eleonora, PAPANIKOLAOU, Alexandra et MUR, Lina, 2024. Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union during 2023. *EFSA Journal* [en ligne]. mai 2024. Vol. 22, n° 5. [Consulté le 2 août 2024]. DOI 10.2903/j.efsa.2024.8809. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2024.8809>

FAIRALL, Louise, SCHWABE, John, CHAPMAN, Lynda, FINCH, John et RHODES, Daniela, 1993. The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Letters to Nature*. 1993.

FEENEY, Oliver, COCKBAIN, Julian et STERCKX, Sigrid, 2021. Ethics, Patents and Genome Editing: A Critical Assessment of Three Options of Technology Governance. *Frontiers in Political Science*. 21 septembre 2021. Vol. 3, pp. 731505. DOI 10.3389/fpos.2021.731505.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015. 141-454 : *FDA NADA 141-454 Application document*. FDA Application document.

FRANKLINOS, Lydia H V, JONES, Kate E, REDDING, David W et ABUBAKAR, Ibrahim, 2019. The effect of global change on mosquito-borne disease. *The Lancet Infectious Diseases*. septembre 2019. Vol. 19, n° 9, pp. e302-e312. DOI 10.1016/S1473-3099(19)30161-6.

FRANZONI, Giulia, DEI GIUDICI, Silvia et OGGIANO, Annalisa, 2018. Infection, modulation and responses of antigen-presenting cells to African swine fever viruses. *Virus Research*. octobre 2018. Vol. 258, pp. 73-80. DOI 10.1016/j.virusres.2018.10.007.

FROMSA, Abebe, WILLGERT, Katriina, SRINIVASAN, Sreenidhi, MEKONNEN, Getnet, BEDADA, Wegene, GUMI, Balako, LAKEW, Matios, TADESSE, Biniam, BAYISSA, Berecha, SIRAK, Asegedech, GIRMA ABDELA, Musse, GEBRE, Solomon, CHIBSSA, Tesfaye, VEERASAMI, Maroudam, VORDERMEIER, H. Martin, BAKKER, Douwe, BERG, Stefan, AMENI, Gobena, JULEFF, Nick, DE JONG, Mart C. M., WOOD, James, CONLAN, Andrew et KAPUR, Vivek, 2024. BCG vaccination reduces bovine tuberculosis transmission, improving prospects for elimination. *Science*. 29 mars 2024. Vol. 383, n° 6690, pp. eadl3962. DOI 10.1126/science.adl3962.

GALLARDO, C., NIETO, R., SOLER, A., PELAYO, V., FERNÁNDEZ-PINERO, J., MARKOWSKA-DANIEL, I., PRIDOTKAS, G., NURMOJA, I., GRANTA, R., SIMÓN, A., PÉREZ, C., MARTÍN, E., FERNÁNDEZ-PACHECO, P. et ARIAS, M., 2015. Assessment of African Swine Fever Diagnostic

Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. LOEFFELHOLZ, M. J. (éd.), *Journal of Clinical Microbiology*. août 2015. Vol. 53, n° 8, pp. 2555-2565. DOI 10.1128/JCM.00857-15.

GALLI, Roberta, PREUSSE, Grit, SCHNABEL, Christian, BARTELS, Thomas, CRAMER, Kerstin, KRAUTWALD-JUNGHANNS, Maria-Elisabeth, KOCH, Edmund et STEINER, Gerald, 2018. Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane. MISHRA, Yogendra Kumar (éd.), *PLOS ONE*. 23 février 2018. Vol. 13, n° 2, pp. e0192554. DOI 10.1371/journal.pone.0192554.

GAMA SOSA, Miguel A., DE GASPERI, Rita et ELDER, Gregory A., 2010. Animal transgenesis: an overview. *Brain Structure and Function*. mars 2010. Vol. 214, n° 2-3, pp. 91-109. DOI 10.1007/s00429-009-0230-8.

GAO, Yuanpeng, WU, Haibo, WANG, Yongsheng, LIU, Xin, CHEN, Linlin, LI, Qian, CUI, Chenchen, LIU, Xu, ZHANG, Jingcheng et ZHANG, Yong, 2017. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology*. décembre 2017. Vol. 18, n° 1, pp. 13. DOI 10.1186/s13059-016-1144-4.

GARNETT, Tara et GODFRAY, H Charles J, 2012. Sustainable intensification in agriculture. Navigating a course through competing food system priorities. *Food Climate Research Network and the Oxford Martin Programme on the Future of Food*. 2012.

GAUDELLI, Nicole M., KOMOR, Alexis C., REES, Holly A., PACKER, Michael S., BADRAN, Ahmed H., BRYSON, David I. et LIU, David R., 2017. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 23 novembre 2017. Vol. 551, n° 7681, pp. 464-471. DOI 10.1038/nature24644.

GE, Luxing, KANG, Jian, DONG, Xiangchen, LUAN, Deji, SU, Guanghua, LI, Guangpeng, ZHANG, Yong et QUAN, Fusheng, 2021. Myostatin site-directed mutation and simultaneous PPAR γ site-directed knockin in bovine genome. *Journal of Cellular Physiology*. avril 2021. Vol. 236, n° 4, pp. 2592-2605. DOI 10.1002/jcp.30017.

GIM, Gyeong-Min, EOM, Kyeong-Hyeon, KWON, Dong-Hyeok, JUNG, Dae-Jin, KIM, Dae-Hyun, YI, Jun-Koo, HA, Jae-Jung, LEE, Ji-Hyun, LEE, Seong-Beom, SON, Woo-Jae, YUM, Soo-Young, LEE, Won-Wu et JANG, Goo, 2023. Generation of double knockout cattle via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) electroporation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6 août 2023. Vol. 14, n° 1, pp. 103. DOI 10.1186/s40104-023-00902-8.

GIM, Gyeong-Min, KWON, Dong-Hyeok, EOM, Kyeong-Hyun, MOON, JoonHo, PARK, Ji-Hyun, LEE, Won-Wu, JUNG, Dae-Jin, KIM, Dae-Hyun, YI, Jun-Koo, HA, Jae-Jung, LIM, Ka-Yeong, KIM, Jin-Soo et JANG, Goo, 2022. Production of *MSTN* -mutated cattle without exogenous gene integration using CRISPR-Cas9. *Biotechnology Journal*. juillet 2022. Vol. 17, n° 7, pp. 2100198. DOI 10.1002/biot.202100198.

GOLOVAN, Serguei P., MEIDINGER, Roy G., AJAKAIYE, Ayodele, COTTRILL, Michael, WIEDERKEHR, Miles Z., BARNEY, David J., PLANTE, Claire, POLLARD, John W., FAN, Ming Z., HAYES, M. Anthony, LAURSEN, Jesper, HJORTH, J. Peter, HACKER, Roger R., PHILLIPS, John P. et FORSBERG, Cecil W., 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*. 1 août 2001. Vol. 19, n° 8, pp. 741-745. DOI 10.1038/90788.

GOMES, Fernanda et HENRIQUES, Mariana, 2016. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*. avril 2016. Vol. 72, n° 4, pp. 377-382.

DOI 10.1007/s00284-015-0958-8.

GORDON, Doria R., JAFFE, Gregory, DOANE, Michael, GLASER, Aviva, GREMILLION, Thomas M. et HO, Melissa D., 2021. Responsible governance of gene editing in agriculture and the environment. *Nature Biotechnology*. septembre 2021. Vol. 39, n° 9, pp. 1055-1057. DOI 10.1038/s41587-021-01023-1.

GORDON, Jon W. et RUDDLE, Frank H., 1981. Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected into Mouse Pronuclei. *Science*. 11 décembre 1981. Vol. 214, n° 4526, pp. 1244-1246. DOI 10.1126/science.6272397.

GRØNDAHL-NIELSEN, C., SIMONSEN, H.B., DAMKJER LUND, J. et HESSELHOLT, M., 1999. Behavioural, Endocrine and Cardiac Responses in Young Calves Undergoing Dehorning Without and With Use of Sedation and Analgesia. *The Veterinary Journal*. juillet 1999. Vol. 158, n° 1, pp. 14-20. DOI 10.1053/tvj.1998.0284.

GUO, Chunhe, WANG, Min, ZHU, Zhenbang, HE, Sheng, LIU, Hongbo, LIU, Xiaofeng, SHI, Xuan, TANG, Tao, YU, Piao, ZENG, Jianhua, YANG, Linfang, CAO, Yongchang, CHEN, Yaosheng, LIU, Xiaohong et HE, Zuyong, 2019. Highly Efficient Generation of Pigs Harboring a Partial Deletion of the CD163 SRCR5 Domain, Which Are Fully Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 2 Infection. *Frontiers in Immunology*. 8 août 2019. Vol. 10, pp. 1846. DOI 10.3389/fimmu.2019.01846.

HABER, Daniella An, ARIEN, Yael, LAMDAN, Lee Benjamin, ALCALAY, Yehonathan, ZECHARIA, Chen, KRSTICEVIC, Flavia, YONAH, Elad Shmuel, AVRAHAM, Rotem Daniel, KRZYWINSKA, Elzbieta, KRZYWINSKI, Jaroslaw, MAROIS, Eric, WINDBICHLER, Nikolai et PAPATHANOS, Philippos Aris, 2024. Targeting mosquito X-chromosomes reveals complex transmission dynamics of sex ratio distorting gene drives. *Nature Communications*. 11 juin 2024. Vol. 15, n° 1, pp. 4983. DOI 10.1038/s41467-024-49387-7.

HALLERMAN, Eric, BREDLAU, Justin, CAMARGO, Luiz Sergio A., DAGLI, Maria Lucia Zaidan, KAREMBU, Margaret, KOVICH, Daniel, MUIA, Anne Ndanu, MURRONE, Mariana L., ROCHA-SALAVARRIETA, Pedro Jesus, ROMERO-ALDEMITA, Rhodora, TIZARD, Mark, WALTON, Mark et WRAY-CAHEN, Diane, 2024. Enabling regulatory policy globally will promote realization of the potential of animal biotechnology. *CABI Agriculture and Bioscience*. 6 mars 2024. Vol. 5, n° 1, pp. 25. DOI 10.1186/s43170-024-00221-6.

HANZEN, Ch., LAURENT, Y. et WARD, W.R., 1994. Comparison of reproductive performance in Belgian dairy and beef cattle. *Theriogenology*. janvier 1994. Vol. 41, n° 5, pp. 1099-1114. DOI 10.1016/S0093-691X(05)80033-0.

HARUYAMA, Naoto, CHO, Andrew et KULKARNI, Ashok B., 2009. Overview: Engineering Transgenic Constructs and Mice. *Current Protocols in Cell Biology* [en ligne]. mars 2009. Vol. 42, n° 1. [Consulté le 24 juin 2024]. DOI 10.1002/0471143030.cb1910s42. Disponible à l'adresse : <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471143030.cb1910s42>

HASHIMOTO, Masakazu, YAMASHITA, Yukiko et TAKEMOTO, Tatsuya, 2016. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Developmental Biology*. octobre 2016. Vol. 418, n° 1, pp. 1-9. DOI 10.1016/j.ydbio.2016.07.017.

HAUSCHILD, Janet, PETERSEN, Bjoern, SANTIAGO, Yolanda, QUEISSER, Anna-Lisa, CARNWATH, Joseph W., LUCAS-HAHN, Andrea, ZHANG, Lei, MENG, Xiangdong, GREGORY, Philip D., SCHWINZER, Reinhard, COST, Gregory J. et NIEMANN, Heiner, 2011. Efficient generation of a biallelic

knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19 juillet 2011. Vol. 108, n° 29, pp. 12013-12017. DOI 10.1073/pnas.1106422108.

HE, Jin, LI, Qiuyan, FANG, Suyun, GUO, Ying, LIU, Tongxin, YE, Jianhua, YU, Zhengquan, ZHANG, Ran, ZHAO, Yaofeng, HU, Xiaoxiang, BAI, Xueyuan, CHEN, Xiangmei et LI, Ning, 2015. *PKD1* Mono-Allelic Knockout Is Sufficient to Trigger Renal Cystogenesis in a Mini-Pig Model. *International Journal of Biological Sciences*. 2015. Vol. 11, n° 4, pp. 361-369. DOI 10.7150/ijbs.10858.

HE, X. N., SU, F., LOU, Z. Z., JIA, W. Z., SONG, Y. L., CHANG, H. Y., WU, Y. H., LAN, J., HE, X. Y. et ZHANG, Y., 2011. *Ipr1* Gene Mediates RAW 264.7 Macrophage Cell Line Resistance to *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology*. novembre 2011. Vol. 74, n° 5, pp. 438-444. DOI 10.1111/j.1365-3083.2011.02596.x.

HENDERSON, C. R., 1975. Best Linear Unbiased Estimation and Prediction under a Selection Model. *Biometrics*. 1975. Vol. 31, n° 2, pp. 423-447.

HENSCHKE, Adam, 2012. Making Sense of Animal Disenhancement. *NanoEthics*. avril 2012. Vol. 6, n° 1, pp. 55-64. DOI 10.1007/s11569-012-0140-8.

HEYER, Wolf-Dietrich, EHMSSEN, Kirk T. et LIU, Jie, 2010. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 1 décembre 2010. Vol. 44, n° 1, pp. 113-139. DOI 10.1146/annurev-genet-051710-150955.

HILGER, Christiane, JANSSEN-WEETS, Bente et SWIONTEK, Kyra, 2024. Hypoallergenic animals: A promise of hope for allergic patients? *Allergologie select*. 1 janvier 2024. Vol. 8, n° 1, pp. 64-69. DOI 10.5414/ALX02454E.

HILLERTON, J.E. et BERRY, E.A., 2005. Treating mastitis in the cow - a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*. juin 2005. Vol. 98, n° 6, pp. 1250-1255. DOI 10.1111/j.1365-2672.2005.02649.x.

HOBBS, Rod S. et FLETCHER, Garth L., 2008. Tissue specific expression of antifreeze protein and growth hormone transgenes driven by the ocean pout (*Macrozoarces americanus*) antifreeze protein OP5a gene promoter in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Transgenic Research*. février 2008. Vol. 17, n° 1, pp. 33-45. DOI 10.1007/s11248-007-9128-5.

HOCHWALLNER, Heidrun, SCHULMEISTER, Ulrike, SWOBODA, Ines, SPITZAUER, Susanne et VALENTA, Rudolf, 2014. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*. mars 2014. Vol. 66, n° 1, pp. 22-33. DOI 10.1016/j.ymeth.2013.08.005.

HOUDEBINE, Lm, 2000. Modifications génétiques animales et végétales : méthodes de transgénèse et expression des transgènes. *médecine/sciences*. 2000. Vol. 16, n° 10, pp. 1017. DOI 10.4267/10608/1520.

HUANG, Jiao, GUO, Xiaogang, FAN, Nana, SONG, Jun, ZHAO, Bentian, OUYANG, Zhen, LIU, Zhaoming, ZHAO, Yu, YAN, Quanmei, YI, Xiaoling, SCHAMBACH, Axel, FRAMPTON, Jon, ESTEBAN, Miguel A., YANG, Dongshan, YANG, Huaqiang et LAI, Liangxue, 2014. *RAG1/2* Knockout Pigs with Severe Combined Immunodeficiency. *The Journal of Immunology*. 1 août 2014. Vol. 193, n° 3, pp. 1496-1503. DOI 10.4049/jimmunol.1400915.

HUANG, Xian-Ju, ZHANG, Hong-Xiao, WANG, Huili, XIONG, Kai, QIN, Ling et LIU, Honglin, 2014. Disruption of the Myostatin Gene in Porcine Primary Fibroblasts and Embryos Using Zinc-Finger Nucleases. *Molecules and Cells*. avril 2014. Vol. 37, n° 4, pp. 302-306.

DOI 10.14348/molcells.2014.2209.

HÜBNER, Alexandra, PETERSEN, Bjoern, KEIL, Günther M., NIEMANN, Heiner, METTENLEITER, Thomas C. et FUCHS, Walter, 2018. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Scientific Reports*. 23 janvier 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 1449. DOI 10.1038/s41598-018-19626-1.

HUIJPS, Kirsten, LAM, Theo Jgm et HOGEEVEEN, Henk, 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*. février 2008. Vol. 75, n° 1, pp. 113-120. DOI 10.1017/S0022029907002932.

IDOKO-AKOH, Alewo, GOLDHILL, Daniel H., SHEPPARD, Carol M., BIALY, Dagmara, QUANTRILL, Jessica L., SUKHOVA, Ksenia, BROWN, Jonathan C., RICHARDSON, Samuel, CAMPBELL, Ciara, TAYLOR, Lorna, SHERMAN, Adrian, NAZKI, Salik, LONG, Jason S., SKINNER, Michael A., SHELTON, Holly, SANG, Helen M., BARCLAY, Wendy S. et MCGREW, Mike J., 2023. Creating resistance to avian influenza infection through genome editing of the ANP32 gene family. *Nature Communications*. 10 octobre 2023. Vol. 14, n° 1, pp. 6136. DOI 10.1038/s41467-023-41476-3.

JAENISCH, Rudolf, 1976. Germ Line Integration and Mendelian Transmission of the Exogenous Moloney Leukemia Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976. Vol. 73, n° 4, pp. 1260-1264.

JAN VAN AKEN, 2000. *Genetically Engineered Fish: Swimming Against the Tide of Reason*.

JIA, Nan, LI, Bin, ZHU, Jun, WANG, Haifeng, ZHAO, Yuliang et ZHAO, Wenwen, 2023. A Review of Key Techniques for in Ovo Sexing of Chicken Eggs. *Agriculture*. 14 mars 2023. Vol. 13, n° 3, pp. 677. DOI 10.3390/agriculture13030677.

JINEK, Martin, CHYLINSKI, Krzysztof, FONFARA, Ines, HAUER, Michael, DOUDNA, Jennifer A. et CHARPENTIER, Emmanuelle, 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 17 août 2012. Vol. 337, n° 6096, pp. 816-821. DOI 10.1126/science.1225829.

JOZIASSE, D H et ORIOL, R, 1999. Xenotransplantation: the importance of the GalK1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999.

KERR, David E., PLAUT, Karen, BRAMLEY, A. John, WILLIAMSON, Christine M., LAX, Alistair J., MOORE, Karen, WELLS, Kevin D. et WALL, Robert J., 2001. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nature Biotechnology*. janvier 2001. Vol. 19, n° 1, pp. 66-70. DOI 10.1038/83540.

KHAN, Faheem Ahmed, ALI, Azhar, WU, Di, HUANG, Chunjie, ZULFIQAR, Hamza, ALI, Muhammad, AHMED, Bilal, YOUSAF, Muhammad Rizwan, PUTRI, Ezi Masdia, NEGARA, Windu, IMRAN, Muhammad et PANDUPUSPITASARI, Nuruliarizki Shinta, 2024. Editing microbes to mitigate enteric methane emissions in livestock. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. octobre 2024. Vol. 40, n° 10, pp. 300. DOI 10.1007/s11274-024-04103-x.

KHWATENGE, Collins N. et NAHASHON, Samuel N., 2021. Recent Advances in the Application of CRISPR/Cas9 Gene Editing System in Poultry Species. *Frontiers in Genetics*. 19 février 2021. Vol. 12, pp. 627714. DOI 10.3389/fgene.2021.627714.

KIM, Hyun-Joo, CHO, Ki-Hyun, RYU, Ji-Hyoung, JANG, Min-Kyung, CHAE, Ha-Gyeong, CHOI, Ji-Da, NAH, Jin-Ju, KIM, Yong-Joo et KANG, Hae-Eun, 2020. Isolation and Genetic Characterization of African Swine Fever Virus from Domestic Pig Farms in South Korea, 2019. *Viruses*. 30 octobre 2020. Vol. 12, n° 11, pp. 1237. DOI 10.3390/v12111237.

KIM, Y G, CHA, J et CHANDRASEGARAN, S, 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 6 février 1996. Vol. 93, n° 3, pp. 1156-1160. DOI 10.1073/pnas.93.3.1156.

KIM, Yongsub, KWEON, Jiyeon, KIM, Annie, CHON, Jae Kyung, YOO, Ji Yeon, KIM, Hye Joo, KIM, Sojung, LEE, Choongil, JEONG, Euihwan, CHUNG, Eugene, KIM, Doyoung, LEE, Mi Seon, GO, Eun Mi, SONG, Hye Jung, KIM, Hwangbeom, CHO, Namjin, BANG, Duhee, KIM, Seokjoong et KIM, Jin-Soo, 2013. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*. mars 2013. Vol. 31, n° 3, pp. 251-258. DOI 10.1038/nbt.2517.

KISHIGAMI, Satoshi, WAKAYAMA, Sayaka, VAN THUAN, Nguyen, OHTA, Hiroshi, MIZUTANI, Eiji, HIKICHI, Takafusa, BUI, Hong-Thuy, BALBACH, Sebastian, OGURA, Atsuo, BOIANI, Michele et WAKAYAMA, Teruhiko, 2006. Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nature Protocols*. juin 2006. Vol. 1, n° 1, pp. 125-138. DOI 10.1038/nprot.2006.21.

KOMOR, Alexis C., KIM, Yongjoo B., PACKER, Michael S., ZURIS, John A. et LIU, David R., 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 19 mai 2016. Vol. 533, n° 7603, pp. 420-424. DOI 10.1038/nature17946.

KONDO, Kazunari et TAGUCHI, Chie, 2022. Japanese Regulatory Framework and Approach for Genome-edited Foods Based on Latest Scientific Findings. *Food Safety*. 2022. Vol. 10, n° 4, pp. 113-128. DOI 10.14252/foodsafetyfscj.D-21-00016.

KONTOPIDIS, G., HOLT, C. et SAWYER, L., 2004. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*. avril 2004. Vol. 87, n° 4, pp. 785-796. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1.

KOUR, Savleen, SHARMA, Neelesh, N., Balaji, KUMAR, Pavan, SOODAN, Jasvinder Singh, SANTOS, Marcos Veiga Dos et SON, Young-Ok, 2023. Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*. 8 juillet 2023. Vol. 10, n° 7, pp. 449. DOI 10.3390/vetsci10070449.

KREUGER, Johan et O'CALLAGHAN, Paul, 2016. Failure to Genotype: A Cautionary Note on an Elusive loxP Sequence. ANDERSON, Michael G (éd.), *PLOS ONE*. 21 octobre 2016. Vol. 11, n° 10, pp. e0165012. DOI 10.1371/journal.pone.0165012.

KUZMA, Jennifer et CUMMINGS, Christopher L., 2021. Cultural Beliefs and Stakeholder Affiliation Influence Attitudes Towards Responsible Research and Innovation Among United States Stakeholders Involved in Biotechnology and Gene Editing. *Frontiers in Political Science*. 24 juin 2021. Vol. 3, pp. 677003. DOI 10.3389/fpos.2021.677003.

KYROU, Kyros, HAMMOND, Andrew M, GALIZI, Roberto, KRANJC, Nace, BURT, Austin, BEAGHTON, Andrea K, NOLAN, Tony et CRISANTI, Andrea, 2018. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nature Biotechnology*. novembre 2018. Vol. 36, n° 11, pp. 1062-1066. DOI 10.1038/nbt.4245.

LAIBLE, G., COLE, S.-A., BROPHY, B., WEI, J., LEATH, S., JIVANJI, S., LITTLEJOHN, M. D. et WELLS, D. N., 2021. Holstein Friesian dairy cattle edited for diluted coat color as a potential adaptation to climate change. *BMC Genomics*. 26 novembre 2021. Vol. 22, n° 1, pp. 856. DOI 10.1186/s12864-021-08175-z.

LAMB, Brian M., MERCER, Andrew C. et BARBAS, Carlos F., 2013. Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases. *Nucleic Acids Research*. novembre 2013. Vol. 41, n° 21,

pp. 9779-9785. DOI 10.1093/nar/gkt754.

LEAHY, Sinead C., KELLY, William J., ALTERMANN, Eric, RONIMUS, Ron S., YEOMAN, Carl J., PACHECO, Diana M., LI, Dong, KONG, Zhanhao, MCTAVISH, Sharla, SANG, Carrie, LAMBIE, Suzanne C., JANSSEN, Peter H., DEY, Debjit et ATTWOOD, Graeme T., 2010. The Genome Sequence of the Rumen Methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* Reveals New Possibilities for Controlling Ruminant Methane Emissions. AHMED, Niyaz (éd.), *PLoS ONE*. 28 janvier 2010. Vol. 5, n° 1, pp. e8926. DOI 10.1371/journal.pone.0008926.

LEDERMANN, Birgit, 2000. Embryonic Stem Cells and Gene Targeting. *Experimental Physiology*. novembre 2000. Vol. 85, n° 6, pp. 603-613. DOI 10.1111/j.1469-445X.2000.02105.x.

LEDESMA, Alba V. et VAN EENENNAAM, Alison L., 2024. Global status of gene edited animals for agricultural applications. *The Veterinary Journal*. juin 2024. Vol. 305, pp. 106142. DOI 10.1016/j.tvjl.2024.106142.

LEE, Donghee, LEE, Jungeun, YOON, Jong-Kwang, KIM, Na Young, KIM, Gye-Woong, PARK, Chankyu, OH, Yu-Kyoung et KIM, Young Bong, 2011. Rapid Determination of Perv Copy Number From Porcine Genomic DNA by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Animal Biotechnology*. octobre 2011. Vol. 22, n° 4, pp. 175-180. DOI 10.1080/10495398.2011.595294.

LEE, Hong Jo, YOON, Jong Won, JUNG, Kyung Min, KIM, Young Min, PARK, Jin Se, LEE, Kyung Youn, PARK, Kyung Je, HWANG, Young Sun, PARK, Young Hyun, RENGARAJ, Deivendran et HAN, Jae Yong, 2019. Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development. *The FASEB Journal*. juillet 2019. Vol. 33, n° 7, pp. 8519-8529. DOI 10.1096/fj.201802671R.

LEE, Sang Ryeul, LEE, Kyung-Lim, SONG, Seok-Hwan, JOO, Myeong-Don, LEE, Seo-Hyun, KANG, Ji-Su, KANG, Seon-Min, IDREES, Muhammad, KIM, Jae-Wook et KONG, Il-Keun, 2024. Generation of Fel d 1 chain 2 genome-edited cats by CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*. 29 février 2024. Vol. 14, n° 1, pp. 4987. DOI 10.1038/s41598-024-55464-0.

L'Europe dévore la planète, 2022. . WWF (World Wide Fund for Nature).

LI, Guoling, LIU, Dewu, ZHANG, Xianwei, QUAN, Rong, ZHONG, Cuili, MO, Jianxin, HUANG, Yaoqiang, WANG, Haoqiang, RUAN, Xiaofang, XU, Zheng, ZHENG, Enqin, GU, Ting, HONG, Linjun, LI, Zicong, WU, Zhenfang et YANG, Huaqiang, 2018. Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. juin 2018. Vol. 99, pp. 154-160. DOI 10.1016/j.biocel.2018.04.011.

LI, Hui-shang, HU, Chen-pei, LÜ, Zheng, LI, Mei-qi et GUO, Xin-zhu, 2021. African swine fever and meat prices fluctuation: An empirical study in China based on TVP-VAR model. *Journal of Integrative Agriculture*. août 2021. Vol. 20, n° 8, pp. 2289-2301. DOI 10.1016/S2095-3119(20)63307-X.

LI, Ming, YANG, Ting, KANDUL, Nikolay P, BUI, Michelle, GAMEZ, Stephanie, RABAN, Robyn, BENNETT, Jared, SÁNCHEZ C, Héctor M, LANZARO, Gregory C, SCHMIDT, Hanno, LEE, Yoosook, MARSHALL, John M et AKBARI, Omar S, 2020. Development of a confinable gene drive system in the human disease vector *Aedes aegypti*. *eLife*. 21 janvier 2020. Vol. 9, pp. e51701. DOI 10.7554/eLife.51701.

LI, Ping, ESTRADA, Jose L., BURLAK, Christopher et TECTOR, A. Joseph, 2013. Biallelic knockout of the α -1,3 galactosyltransferase gene in porcine liver-derived cells using zinc finger nucleases. *Journal of Surgical Research*. mai 2013. Vol. 181, n° 1, pp. e39-e45. DOI 10.1016/j.jss.2012.06.035.

LI, Ting, HUANG, Sheng, ZHAO, Xuefeng, WRIGHT, David A., CARPENTER, Susan, SPALDING, Martin H., WEEKS, Donald P. et YANG, Bing, 2011. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 1 août 2011. Vol. 39, n° 14, pp. 6315-6325. DOI 10.1093/nar/gkr188.

LI, Zhen-Hua, WANG, Jun, XU, Jing-Ping, WANG, Jian et YANG, Xiao, 2023. Recent advances in CRISPR-based genome editing technology and its applications in cardiovascular research. *Military Medical Research*. 10 mars 2023. Vol. 10, n° 1, pp. 12. DOI 10.1186/s40779-023-00447-x.

LILLICO, Simon G., PROUDFOOT, Chris, KING, Tim J., TAN, Wenfang, ZHANG, Lei, MARDJUKI, Rachel, PASCHON, David E., REBAR, Edward J., URNOV, Fyodor D., MILEHAM, Alan J., MCLAREN, David G. et WHITELAW, C. Bruce A., 2016. Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing. *Scientific Reports*. 22 février 2016. Vol. 6, n° 1, pp. 21645. DOI 10.1038/srep21645.

LIN, Jason C. et VAN EENENNAAM, Alison L., 2021. Electroporation-Mediated Genome Editing of Livestock Zygotes. *Frontiers in Genetics*. 13 avril 2021. Vol. 12, pp. 648482. DOI 10.3389/fgene.2021.648482.

LIN, Steven, STAAHL, Brett T, ALLA, Ravi K et DOUDNA, Jennifer A, 2014. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*. 15 décembre 2014. Vol. 3, pp. e04766. DOI 10.7554/eLife.04766.

LIU, Botao, YU, Kaifeng, AHMED, Imtiaz, GIN, Karina, XI, Beidou, WEI, Zimin, HE, Yiliang et ZHANG, Bo, 2021. Key factors driving the fate of antibiotic resistance genes and controlling strategies during aerobic composting of animal manure: A review. *Science of The Total Environment*. octobre 2021. Vol. 791, pp. 148372. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.148372.

LIU, Xu, WANG, Yongsheng, TIAN, Yuchen, YU, Yuan, GAO, Mingqing, HU, Guangdong, SU, Feng, PAN, Shaohui, LUO, Yan, GUO, Zekun, QUAN, Fusheng et ZHANG, Yong, 2014. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β -casein locus using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 7 avril 2014. Vol. 281, n° 1780, pp. 20133368. DOI 10.1098/rspb.2013.3368.

LIU, Yuan, LIU, Shuang, SHENG, Hui, FENG, Xue, WANG, Shuzhe, HU, Yamei, ZHANG, Lingkai, CAI, Bei et MA, Yun, 2024. Revolutionizing cattle breeding: Gene editing advancements for enhancing economic traits. *Gene*. novembre 2024. Vol. 927, pp. 148595. DOI 10.1016/j.gene.2024.148595.

LONG, Jason S, IDOKO-AKOH, Alewo, MISTRY, Bhakti, GOLDHILL, Daniel, STALLER, Ecco, SCHREYER, Jocelyn, ROSS, Craig, GOODBOURN, Steve, SHELTON, Holly, SKINNER, Michael A, SANG, Helen, MCGREW, Michael J et BARCLAY, Wendy, 2019. Species specific differences in use of ANP32 proteins by influenza A virus. *eLife*. 4 juin 2019. Vol. 8, pp. e45066. DOI 10.7554/eLife.45066.

LOZA-RUBIO, Elizabeth et ROJAS-ANAYA, Edith, 2018. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). In : MACDONALD, Jacqueline (éd.), *Prospects of Plant-Based Vaccines in Veterinary Medicine* [en ligne]. Cham : Springer International Publishing. pp. 267-281. [Consulté le 29 juillet 2024]. ISBN 978-3-319-90136-7. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-90137-4_13

LUJAN, Milthon, 2018. Camino libre para la producción de una tilapia editada genéticamente en Argentina. *AquaHoy*. 2018.

LUTZ, Andrew J., LI, Ping, ESTRADA, Jose L., SIDNER, Richard A., CHIHARA, Ray K., DOWNEY, Susan M., BURLAK, Christopher, WANG, Zheng-Yu, REYES, Luz M., IVARY, Bess, YIN, Fuqin,

BLANKENSHIP, Ross L., PARIS, Leela L. et TECTOR, A. Joseph, 2013. Double knockout pigs deficient in N -glycolylneuraminic acid and G alactose α -1,3- G alactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation*. janvier 2013. Vol. 20, n° 1, pp. 27-35. DOI 10.1111/xen.12019.

MARQUETTE, Gabriela A., RONAN, Stephanie et EARLEY, Bernadette, 2023. Calf disbudding – animal welfare considerations. *Journal of Applied Animal Research*. 31 décembre 2023. Vol. 51, n° 1, pp. 616-623. DOI 10.1080/09712119.2023.2264912.

MARUYAMA, Takeshi, DOUGAN, Stephanie K, TRUTTMANN, Matthias C, BILATE, Angelina M, INGRAM, Jessica R et PLOEGH, Hidde L, 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology*. mai 2015. Vol. 33, n° 5, pp. 538-542. DOI 10.1038/nbt.3190.

MATSUO, Makiko et TACHIKAWA, Masashi, 2022. Implications and Lessons From the Introduction of Genome-Edited Food Products in Japan. *Frontiers in Genome Editing*. 21 juin 2022. Vol. 4, pp. 899154. DOI 10.3389/fgeed.2022.899154.

MAXMEN, Amy, 2015. Three technologies that changed genetics. *Nature*. décembre 2015. Vol. 528, n° 7580, pp. S2-S3. DOI 10.1038/528S2a.

MCCLEARY, Stephen, STRONG, Rebecca, MCCARTHY, Ronan R., EDWARDS, Jane C., HOWES, Emma L., STEVENS, Lisa M., SÁNCHEZ-CORDÓN, Pedro J., NÚÑEZ, Alejandro, WATSON, Samantha, MILEHAM, Alan J., LILLICO, Simon G., TAIT-BURKARD, Christine, PROUDFOOT, Chris, BALLANTYNE, Maeve, WHITELAW, C. Bruce A., STEINBACH, Falko et CROOKE, Helen R., 2020. Substitution of warthog NF- κ B motifs into RELA of domestic pigs is not sufficient to confer resilience to African swine fever virus. *Scientific Reports*. 2 juin 2020. Vol. 10, n° 1, pp. 8951. DOI 10.1038/s41598-020-65808-1.

MCPHERRON, Alexandra C, LAWLERT, Ann M et LEE, Se-Jin, 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. . 1997.

MEDUGORAC, Ivica, GRAF, Alexander, GROHS, Cécile, ROTHAMMER, Sophie, ZAGDSUREN, Yondon, GLADYR, Elena, ZINOVIEVA, Natalia, BARBIERI, Johanna, SEICHTER, Doris, RUSS, Ingolf, EGGEN, André, HELLENTHAL, Garrett, BREM, Gottfried, BLUM, Helmut, KREBS, Stefan et CAPITAN, Aurélien, 2017. Whole-genome analysis of introgressive hybridization and characterization of the bovine legacy of Mongolian yaks. *Nature Genetics*. mars 2017. Vol. 49, n° 3, pp. 470-475. DOI 10.1038/ng.3775.

MEDUGORAC, Ivica, SEICHTER, Doris, GRAF, Alexander, RUSS, Ingolf, BLUM, Helmut, GÖPEL, Karl Heinrich, ROTHAMMER, Sophie, FÖRSTER, Martin et KREBS, Stefan, 2012. Bovine Polledness – An Autosomal Dominant Trait with Allelic Heterogeneity. ZHAO, Shuhong (éd.), *PLoS ONE*. 21 juin 2012. Vol. 7, n° 6, pp. e39477. DOI 10.1371/journal.pone.0039477.

MEKONNEN, Mesfin M. et HOEKSTRA, Arjen Y., 2012. A Global Assessment of the Water Footprint of Farm Animal Products. *Ecosystems*. avril 2012. Vol. 15, n° 3, pp. 401-415. DOI 10.1007/s10021-011-9517-8.

MENCHACA, A., DOS SANTOS-NETO, P.C., MULET, A.P. et CRISPO, M., 2020. CRISPR in livestock: From editing to printing. *Theriogenology*. juillet 2020. Vol. 150, pp. 247-254. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.01.063.

MIAO, Xiangyang, 2013. Recent advances in the development of new transgenic animal technology.

Cellular and Molecular Life Sciences. mars 2013. Vol. 70, n° 5, pp. 815-828. DOI 10.1007/s00018-012-1081-7.

MISHRA, Sonal, GUPTA, Amit, UPADHYE, Vijay, SINGH, Suresh C., SINHA, Rajeshwar P. et HÄDER, Donat-P., 2023. Therapeutic Strategies against Biofilm Infections. *Life*. 6 janvier 2023. Vol. 13, n° 1, pp. 172. DOI 10.3390/life13010172.

MIWA, Yuko, KOBAYASHI, Takaaki, NAGASAKA, Takaharu, LIU, DaGe, YU, Ma, YOKOYAMA, Itsuo, SUZUKI, Akemi et NAKAO, Akimasa, 2004. Are N-glycolylneuraminic acid (Hanganutziu–Deicher) antigens important in pig-to-human xenotransplantation? *Xenotransplantation*. mai 2004. Vol. 11, n° 3, pp. 247-253. DOI 10.1111/j.1399-3089.2004.00126.x.

MODZELEWSKI, Andrew J, CHEN, Sean, WILLIS, Brandon J, LLOYD, K C Kent, WOOD, Joshua A et HE, Lin, 2018. Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. *Nature Protocols*. juin 2018. Vol. 13, n° 6, pp. 1253-1274. DOI 10.1038/nprot.2018.012.

MONTANER-TARBES, Sergio, DEL PORTILLO, Hernando A., MONTOYA, María et FRAILE, Lorenzo, 2019. Key Gaps in the Knowledge of the Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus (PRRSV). *Frontiers in Veterinary Science*. 20 février 2019. Vol. 6, pp. 38. DOI 10.3389/fvets.2019.00038.

MUKAE, Takehiro, YOSHII, Kyoko, WATANOBE, Takuma, TAGAMI, Takahiro et OISHI, Isao, 2021. Production and characterization of eggs from hens with ovomucoid gene mutation. *Poultry Science*. février 2021. Vol. 100, n° 2, pp. 452-460. DOI 10.1016/j.psj.2020.10.026.

MURRAY, J. D. et MAGA, E. A., 2016. A new paradigm for regulating genetically engineered animals that are used as food. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 29 mars 2016. Vol. 113, n° 13, pp. 3410-3413. DOI 10.1073/pnas.1602474113.

MUZYKINA, Larysa, BARRADO-GIL, Lucía, GONZALEZ-BULNES, Antonio, CRESPO-PIAZUELO, Daniel, CERÓN, Jose Joaquin, ALONSO, Covadonga et MONTOYA, María, 2024. Overview of Modern Commercial Kits for Laboratory Diagnosis of African Swine Fever and Swine Influenza A Viruses. *Viruses*. 26 mars 2024. Vol. 16, n° 4, pp. 505. DOI 10.3390/v16040505.

NA, Lei, SUN, Liuke, YU, Mengmeng, ZHANG, Yingzhi, ZHANG, Yuan, ZHANG, Zhenyu, ZHANG, Haili, QI, Ting, GUO, Wei, GUO, Xing, WANG, Shida, WANG, Jingfei, LIN, Yuezhi et WANG, Xiaojun, 2024. Avian ANP32A incorporated in avian influenza A virions promotes interspecies transmission by priming early viral replication in mammals. *Science Advances*. 2 février 2024. Vol. 10, n° 5, pp. eadj4163. DOI 10.1126/sciadv.adj4163.

NARDONE, A., RONCHI, B., LACETERA, N., RANIERI, M.S. et BERNABUCCI, U., 2010. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science*. mai 2010. Vol. 130, n° 1-3, pp. 57-69. DOI 10.1016/j.livsci.2010.02.011.

NATHUES, H., ALARCON, P., RUSHTON, J., JOLIE, R., FIEBIG, K., JIMENEZ, M., GEURTS, V. et NATHUES, C., 2017. Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level – An economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*. juillet 2017. Vol. 142, pp. 16-29. DOI 10.1016/j.prevetmed.2017.04.006.

NAYAK, Dipti D. et METCALF, William W., 2017. Cas9-mediated genome editing in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 14 mars 2017. Vol. 114, n° 11, pp. 2976-2981. DOI 10.1073/pnas.1618596114.

NEMUDRYI, A. A., VALETDINOVA, K. R., MEDVEDEV, S. P. et ZAKIAN, S. M., 2014. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*. 15 septembre 2014. Vol. 6,

n° 3, pp. 19-40. DOI 10.32607/20758251-2014-6-3-19-40.

NISHU, Nishu, MASIH, Shet, KAMAL, Shivali, JAIN, Pooja et KHAN, Zafar K., 2020. Transgenic animals in research and industry. In : *Animal Biotechnology* [en ligne]. Elsevier. pp. 463-480. [Consulté le 3 juillet 2024]. ISBN 978-0-12-811710-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128117101000215>

NIU, Dong, MA, Xiang, YUAN, Taoyan, NIU, Yifan, XU, Yibin, SUN, Zhongxin, PING, Yuan, LI, Weifen, ZHANG, Jufang, WANG, Tao et CHURCH, George M., 2021. Porcine genome engineering for xenotransplantation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. janvier 2021. Vol. 168, pp. 229-245. DOI 10.1016/j.addr.2020.04.001.

NIU, Dong, WEI, Hong-Jiang, LIN, Lin, GEORGE, Haydy, WANG, Tao, LEE, I-Hsiu, ZHAO, Hong-Ye, WANG, Yong, KAN, Yinan, SHROCK, Ellen, LESHA, Emal, WANG, Gang, LUO, Yonglun, QING, Yubo, JIAO, Deling, ZHAO, Heng, ZHOU, Xiaoyang, WANG, Shouqi, WEI, Hong, GÜELL, Marc, CHURCH, George M. et YANG, Luhan, 2017. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 22 septembre 2017. Vol. 357, n° 6357, pp. 1303-1307. DOI 10.1126/science.aan4187.

NORMAND, Valérie et LEBRET, Arnaud, 2014. PRRSV infection in France: clinical and economic impact. *333 Pig Health* [en ligne]. 22 décembre 2014. [Consulté le 30 juillet 2024]. Disponible à l'adresse : https://www.pig333.com/articles/prrsv-infection-in-france-clinical-and-economic-impact_9563/

OISHI, Isao, YOSHII, Kyoko, MIYAHARA, Daichi, KAGAMI, Hiroshi et TAGAMI, Takahiro, 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*. 6 avril 2016. Vol. 6, n° 1, pp. 23980. DOI 10.1038/srep23980.

OKOLI, Arinze S., BLIX, Torill, MYHR, Anne I., XU, Wenteng et XU, Xiaodong, 2022. Sustainable use of CRISPR/Cas in fish aquaculture: the biosafety perspective. *Transgenic Research*. février 2022. Vol. 31, n° 1, pp. 1-21. DOI 10.1007/s11248-021-00274-7.

OLESEN, Ann Sofie, BRUUN RASMUSSEN, Thomas, SAXMOSE NIELSEN, Søren, BELSHAM, Graham J., BOKLUND, Anette, PLOEGAERT, Tosca, MOONEN-LEUSEN, Bernie, BLOME, Sandra et BØTNER, Anette, 2022. A Multi-Laboratory Comparison of Methods for Detection and Quantification of African Swine Fever Virus. *Pathogens*. 7 mars 2022. Vol. 11, n° 3, pp. 325. DOI 10.3390/pathogens11030325.

ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE (éd.), 2013. *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Rome : FAO. ISBN 978-92-5-107920-1. 628.53

P. E HILLMAN, C. N LEE, J. R CARPENTER, K. S BAEK, et A PARKHURST, 2001. Impact of Hair Color on Thermoregulation of Dairy Cows to Direct Sunlight. In : *2001 Sacramento, CA July 29-August 1, 2001* [en ligne]. American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2001. [Consulté le 23 août 2024]. Disponible à l'adresse : <http://elibrary.asabe.org/abstract.asp?JID=5&AID=23648&CID=sca2001&T=1>

PALGRAVE, Christopher J., GILMOUR, Linzi, LOWDEN, C. Stewart, LILLICO, Simon G., MELLENCAMP, Martha A. et WHITELAW, C. Bruce A., 2011. Species-Specific Variation in RELA Underlies Differences in NF- κ B Activity: a Potential Role in African Swine Fever Pathogenesis. *Journal of Virology*. 15 juin 2011. Vol. 85, n° 12, pp. 6008-6014. DOI 10.1128/JVI.00331-11.

PALMITER, Richard D., BRINSTER, Ralph L., HAMMER, Robert E., TRUMBAUER, Myrna E.,

- ROSENFELD, Michael G., BIRNBERG, Neal C. et EVANS, Ronald M., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes. *Nature*. décembre 1982. Vol. 300, n° 5893, pp. 611-615. DOI 10.1038/300611a0.
- PARK, Tae Sub, LEE, Hong Jo, KIM, Ki Hyun, KIM, Jin-Soo et HAN, Jae Yong, 2014. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2 septembre 2014. Vol. 111, n° 35, pp. 12716-12721. DOI 10.1073/pnas.1410555111.
- PATIENCE, Clive, TAKEUSHI, Yasuhiro et WEISS, Robin, 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medicine*. 1997. Vol. 3, n° 3.
- PAVLETICH, Nikola P. et PABO, Carl O., 1991. Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å. *Science*. 10 mai 1991. Vol. 252, n° 5007, pp. 809-817. DOI 10.1126/science.2028256.
- PEACOCK, Thomas P., SHEPPARD, Carol M., STALLER, Ecco et BARCLAY, Wendy S., 2019. Host Determinants of Influenza RNA Synthesis. *Annual Review of Virology*. 5 juillet 2019. Vol. 6, pp. 215-233.
- PENRITH, Mary Louise et KIVARIA, Fredrick Mathias, 2022. One hundred years of African swine fever in Africa: Where have we been, where are we now, where are we going? *Transboundary and Emerging Diseases* [en ligne]. septembre 2022. Vol. 69, n° 5. [Consulté le 12 août 2024]. DOI 10.1111/tbed.14466. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.14466>
- PIKALO, Jutta, PORFIRI, Luca, AKIMKIN, Valerij, ROSZYK, Hanna, PANNHORST, Katrin, KANGETHE, Richard Thiga, WIJEWARDANA, Viskam, SEHL-EWERT, Julia, BEER, Martin, CATTOLI, Giovanni et BLOME, Sandra, 2022. Vaccination With a Gamma Irradiation-Inactivated African Swine Fever Virus Is Safe But Does Not Protect Against a Challenge. *Frontiers in Immunology*. 26 avril 2022. Vol. 13, pp. 832264. DOI 10.3389/fimmu.2022.832264.
- PILERI, Emanuela et MATEU, Enric, 2016. Review on the transmission porcine reproductive and respiratory syndrome virus between pigs and farms and impact on vaccination. *Veterinary Research*. décembre 2016. Vol. 47, n° 1, pp. 108. DOI 10.1186/s13567-016-0391-4.
- PLAZA, Pablo I. et LAMBERTUCCI, Sergio A., 2024. Unsustainable production patterns and disease emergence: The paradigmatic case of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1. *Science of The Total Environment*. août 2024. pp. 175389. DOI 10.1016/j.scitotenv.2024.175389.
- PORTEUS, Matthew H., 2006. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Molecular Therapy*. février 2006. Vol. 13, n° 2, pp. 438-446. DOI 10.1016/j.ymthe.2005.08.003.
- PORTEUS, Matthew H et CARROLL, Dana, 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology*. août 2005. Vol. 23, n° 8, pp. 967-973. DOI 10.1038/nbt1125.
- POWELL, A.M., TALBOT, N.C., WELLS, K.D., KERR, D.E., PURSEL, V.G. et WALL, R.J., 2004. Cell Donor Influences Success of Producing Cattle by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biology of Reproduction*. 1 juillet 2004. Vol. 71, n° 1, pp. 210-216. DOI 10.1095/biolreprod.104.027193.
- PRATHER, Randall S., ROWLAND, Raymond R. R., EWEN, Catherine, TRIBLE, Benjamin, KERRIGAN, Maureen, BAWA, Bhupinder, TESON, Jennifer M., MAO, Jiude, LEE, Kiho, SAMUEL, Melissa S., WHITWORTH, Kristin M., MURPHY, Clifton N., EGEN, Tina et GREEN, Jonathan A., 2013. An Intact Sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) Is Not Required for Attachment/Internalization of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Virology*. septembre 2013. Vol. 87, n° 17, pp. 9538-9546. DOI 10.1128/JVI.00177-13.

PUCHTA, Holger, 2023. Regulation of gene-edited plants in Europe: from the valley of tears into the shining sun? *aBIOTECH*. 28 décembre 2023. Vol. 5, n° 2, pp. 231-238. DOI 10.1007/s42994-023-00130-8.

RAINARD, P., FOUCRAS, G., FITZGERALD, J. R., WATTS, J. L., KOOP, G. et MIDDLETON, J. R., 2018. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*. mai 2018. Vol. 65, pp. 149-165. DOI 10.1111/tbed.12698.

RASUL, Mohammed Fatih, HUSSEN, Bashdar Mahmud, SALIHI, Abbas, ISMAEL, Bnar Saleh, JALAL, Paywast Jamal, ZANICHELLI, Anna, JAMALI, Elena, BANIAHMAD, Aria, GHAFOURI-FARD, Soudeh, BASIRI, Abbas et TAHERI, Mohammad, 2022. Strategies to overcome the main challenges of the use of CRISPR/Cas9 as a replacement for cancer therapy. *Molecular Cancer*. 3 mars 2022. Vol. 21, n° 1, pp. 64. DOI 10.1186/s12943-021-01487-4.

REES, Holly A. et LIU, David R., 2018. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nature Reviews Genetics*. décembre 2018. Vol. 19, n° 12, pp. 770-788. DOI 10.1038/s41576-018-0059-1.

RENKEN, C., NATHUES, C., SWAM, H., FIEBIG, K., WEISS, C., EDDICKS, M., RITZMANN, M. et NATHUES, H., 2021. Application of an economic calculator to determine the cost of porcine reproductive and respiratory syndrome at farm-level in 21 pig herds in Germany. *Porcine Health Management*. décembre 2021. Vol. 7, n° 1, pp. 3. DOI 10.1186/s40813-020-00183-x.

REVILLA, Yolanda, CALLEJO, Mario, RODRÍGUEZ, Javier M., CULEBRAS, Esther, NOGAL, María L., SALAS, María L., VIÑUELA, Eladio et FRESNO, Manuel, 1998. Inhibition of Nuclear Factor κ B Activation by a Virus-encoded I κ B-like Protein. *Journal of Biological Chemistry*. février 1998. Vol. 273, n° 9, pp. 5405-5411. DOI 10.1074/jbc.273.9.5405.

REXROAD, Caird, VALLET, Jeffrey, MATUKUMALLI, Lakshmi Kumar, REECY, James, BICKHART, Derek, BLACKBURN, Harvey, BOGGESS, Mark, CHENG, Hans, CLUTTER, Archie, COCKETT, Noelle, ERNST, Catherine, FULTON, Janet E., LIU, John, LUNNEY, Joan, NEIBERGS, Holly, PURCELL, Catherine, SMITH, Timothy P. L., SONSTEGARD, Tad, TAYLOR, Jerry, TELUGU, Bhanu, EENENNAAM, Alison Van, TASSELL, Curtis P. Van et WELLS, Kevin, 2019. Genome to Phenome: Improving Animal Health, Production, and Well-Being – A New USDA Blueprint for Animal Genome Research 2018–2027. *Frontiers in Genetics*. 16 mai 2019. Vol. 10, pp. 327. DOI 10.3389/fgene.2019.00327.

REYES, Luz M., ESTRADA, Jose L., WANG, Zheng Yu, BLOSSER, Rachel J., SMITH, Rashod F., SIDNER, Richard A., PARIS, Leela L., BLANKENSHIP, Ross L., RAY, Caitlin N., MINER, Aaron C., TECTOR, Matthew et TECTOR, A. Joseph, 2014. Creating Class I MHC–Null Pigs Using Guide RNA and the Cas9 Endonuclease. *The Journal of Immunology*. 1 décembre 2014. Vol. 193, n° 11, pp. 5751-5757. DOI 10.4049/jimmunol.1402059.

REYON, Deepak, TSAI, Shengdar Q, KHAYTER, Cyd, FODEN, Jennifer A, SANDER, Jeffry D et JOUNG, J Keith, 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*. mai 2012. Vol. 30, n° 5, pp. 460-465. DOI 10.1038/nbt.2170.

RICHER, Étienne, 2005. *Régulation de l'expression du gène NRAMP1 au cours de la différenciation*. INRS Institut Armand Frappier.

ROBERTSON, Elizabeth, BRADLEY, Allan, KUEHN, Michael et EVANS, Martin, 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*. 1986. Vol. 323.

ROLLIN, E., DHUYVETTER, K.C. et OVERTON, M.W., 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*. décembre 2015. Vol. 122, n° 3, pp. 257-264. DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.11.006.

ROSTAMABADI, Hadis, CHAUDHARY, Vandana, CHHIKARA, Navnidhi, SHARMA, Nitya, NOWACKA, Małgorzata, DEMIRKESEN, Ilkem, RATHNAKUMAR, Kaavya et FALSAFI, Seid Reza, 2023. Ovalbumin, an outstanding food hydrocolloid: Applications, technofunctional attributes, and nutritional facts, A systematic review. *Food Hydrocolloids*. mai 2023. Vol. 139, pp. 108514. DOI 10.1016/j.foodhyd.2023.108514.

ROUX, Françoise A., SAÏ, Pierre et DESCHAMPS, Jack-Yves, 2007. Xenotransfusions, past and present. *Xenotransplantation*. mai 2007. Vol. 14, n° 3, pp. 208-216. DOI 10.1111/j.1399-3089.2007.00404.x.

SAEED, Shamsaldeen Ibrahim, KAMARUZZAMAN, Nor Fadhilah, GAHAMANYI, Noel, NGUYEN, Thi Thu Hoai, HOSSAIN, Delower et KAHWA, Ivan, 2024. Confronting the complexities of antimicrobial management for *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis: an innovative paradigm. *Irish Veterinary Journal*. 28 février 2024. Vol. 77, n° 1, pp. 4. DOI 10.1186/s13620-024-00264-1.

SALAT, Olivier, LEMAIRE, Guillaume, DUREL, Luc et PERROT, Florent, 2023. Etiology of severe mastitis in French dairy herds. GERMON, Pierre (éd.), *PLOS ONE*. 14 décembre 2023. Vol. 18, n° 12, pp. e0295614. DOI 10.1371/journal.pone.0295614.

SALVESEN, Hamish A., GRUPEN, Christopher G. et MCFARLANE, Gus R., 2024. Tackling mosaicism in gene edited livestock. *Frontiers in Animal Science*. 3 juin 2024. Vol. 5, pp. 1368155. DOI 10.3389/fanim.2024.1368155.

SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, Jose Manuel, MARTÍNEZ-LÓPEZ, Beatriz, MARTÍNEZ-AVILÉS, Marta, MARTINS, Carlos, BOINAS, Fernando, VIALC, Laurence, MICHAUD, Vincent, JORI, Ferran, ETTER, Eric, ALBINA, Emmanuel et ROGER, François, 2009. Scientific review on African Swine Fever. *EFSA Supporting Publications* [en ligne]. novembre 2009. Vol. 6, n° 8. [Consulté le 7 août 2024]. DOI 10.2903/sp.efsa.2009.EN-5. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/sp.efsa.2009.EN-5>

SANDØE, P., BORCHERSEN, S., DEAN, W., HYTTEL, P., SØRENSEN, L.P. et PALMER, C., 2021. Hornless cattle – is gene editing the best solution? In : *Justice and food security in a changing climate* [en ligne]. Fribourg, Switzerland : Wageningen Academic Publishers. 14 juin 2021. pp. 324-330. [Consulté le 1 septembre 2024]. ISBN 978-90-8686-362-4. Disponible à l'adresse : https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/978-90-8686-915-2_50

SANDØE, Peter, CHRISTIANSEN, Stine B et GAMBORG, Christian, 2008. Staying good while playing God – Looking after animal welfare when applying biotechnology. . 2008.

SATYARAJ, Ebenezer, LI, Qinghong, SUN, Peichuan et SHERRILL, Scott, 2019. Anti-Fel d1 immunoglobulin Y antibody-containing egg ingredient lowers allergen levels in cat saliva. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. octobre 2019. Vol. 21, n° 10, pp. 875-881. DOI 10.1177/1098612X19861218.

SCHMID-BURGK, Jonathan L, SCHMIDT, Tobias, KAISER, Vera, HÖNING, Klara et HORNUNG, Veit, 2013. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature Biotechnology*. janvier 2013. Vol. 31, n° 1, pp. 76-81. DOI 10.1038/nbt.2460.

SCHMUTZ, Sheila M. et DREGER, Dayna L., 2013. Interaction of *MC1R* and *PMEL* alleles on solid

coat colors in Highland cattle. *Animal Genetics*. février 2013. Vol. 44, n° 1, pp. 9-13. DOI 10.1111/j.1365-2052.2012.02361.x.

SCHULTZ-BERGIN, Marcus, 2014. Making Better Sense of Animal Disenhancement: A Reply to Henschke. *NanoEthics*. avril 2014. Vol. 8, n° 1, pp. 101-109. DOI 10.1007/s11569-014-0190-1.

SCHUSTER, Felix, ALDAG, Patrick, FRENZEL, Antje, HADELER, Klaus-Gerd, LUCAS-HAHN, Andrea, NIEMANN, Heiner et PETERSEN, Björn, 2020. CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. *Scientific Reports*. 11 août 2020. Vol. 10, n° 1, pp. 13570. DOI 10.1038/s41598-020-70531-y.

SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY (éd.), 2000. *Cartagena protocol on biosafety to the Convention on Biological Diversity: text and annexes*. Montreal : Secretariat of the Convention on Biological Diversity. ISBN 978-92-807-1924-6.

SEMAAN, Marwan, IVANUSIC, Daniel et DENNER, Joachim, 2015. Cytotoxic Effects during Knock Out of Multiple Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Sequences in the Pig Genome by Zinc Finger Nucleases (ZFN). *PLOS ONE*. 24 avril 2015. Vol. 10, n° 4, pp. e0122059. DOI 10.1371/journal.pone.0122059.

SHANMUKHAPPA, Kumar, KIM, Jeong-Ki et KAPIL, Sanjay, 2007. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology Journal*. décembre 2007. Vol. 4, n° 1, pp. 62. DOI 10.1186/1743-422X-4-62.

SHI, Chongxu, LIU, Yali, DING, Yaozhong, ZHANG, Yongguang et ZHANG, Jie, 2015. PRRSV receptors and their roles in virus infection. *Archives of Microbiology*. mai 2015. Vol. 197, n° 4, pp. 503-512. DOI 10.1007/s00203-015-1088-1.

SHIN, Dongyoung, MORI, Akio et SEVERSON, David W., 2012. Genetic Mapping a Meiotic Driver That Causes Sex Ratio Distortion in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Heredity*. 1 mars 2012. Vol. 103, n° 2, pp. 303-307. DOI 10.1093/jhered/esr134.

SINGINA, G. N., SERGIEV, P. V., LOPUKHOV, A. V., RUBTSOVA, M. P., TARADAJNIC, N. P., RAVIN, N. V., SHEDOVA, E. N., TARADAJNIC, T. E., POLEJAEVA, I. A., DOZEV, A. V., BREM, G., DONTSOVA, O. A. et ZINOVIEVA, N. A., 2021. Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. mai 2021. Vol. 496, n° 1, pp. 48-51. DOI 10.1134/S1607672921010099.

SONG, Jun, YANG, Dongshan, XU, Jie, ZHU, Tianqing, CHEN, Y. Eugene et ZHANG, Jifeng, 2016. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nature Communications*. 28 janvier 2016. Vol. 7, n° 1, pp. 10548. DOI 10.1038/ncomms10548.

SONG, Kwon-Ho, KANG, Yun-Jeong, JIN, Un-Ho, PARK, Yong-Il, KIM, Sung-Min, SEONG, Hwan-Hoo, HWANG, Seongsoo, YANG, Boh-Suk, IM, Gi-Sun, MIN, Kwan-Sik, KIM, Jin-Hoi, CHANG, Young-Chae, KIM, Nam-Hyung, LEE, Young-Choon et KIM, Cheorl-Ho, 2010. Cloning and functional characterization of pig CMP- *N*-acetylneuraminic acid hydroxylase for the synthesis of *N*-glycolylneuraminic acid as the xenoantigenic determinant in pig-human xenotransplantation. *Biochemical Journal*. 1 avril 2010. Vol. 427, n° 1, pp. 179-188. DOI 10.1042/BJ20090835.

SORIANO, Victoria, LEE, Hiu Yan, DHARMAGE, Shyamali C., PERRETT, Kirsten, PETERS, Rachel L. et KOPLIN, Jennifer J., 2023. Prevalence and risk factors of cow's milk sensitization and allergy in southeast Australia. *The journal of allergy and clinical immunology*. 2023. Vol. 11, n° 11, pp. 3541-3543. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2023.07.003>.

STEINFELD, Henning, GERBER, Pierre, WASSENAAR, Tom, CASTEL, Vincent, ROSALES, Mauricio et DE HAAN, Cees, 2006. 978-92-5-105571-7 : *Livestock's long shadow : Environmental issues and options*. Rome : Food and Agriculture Organization.

STOCUM, David, 2023. Somatic Cell Nuclear Transfer. *Somatic Cell Nuclear Transfer*. 2023. Vol. Britannica Online Encyclopedia.

SUN, Zhaolin, WANG, Ming, HAN, Shiwen, MA, Shuangyu, ZOU, Zhiyuan, DING, Fangrong, LI, Xinrui, LI, Ling, TANG, Bo, WANG, Haiping, LI, Ning, CHE, Huilian et DAI, Yunping, 2018. Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA. *Scientific Reports*. 18 octobre 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 15430. DOI 10.1038/s41598-018-32024-x.

SWARTS, Daan C., VAN DER OOST, John et JINEK, Martin, 2017. Structural Basis for Guide RNA Processing and Seed-Dependent DNA Targeting by CRISPR-Cas12a. *Molecular Cell*. avril 2017. Vol. 66, n° 2, pp. 221- 233.e4. DOI 10.1016/j.molcel.2017.03.016.

TAN, Wenfang, PROUDFOOT, Chris, LILLICO, Simon G. et WHITELAW, C. Bruce A., 2016. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Research*. juin 2016. Vol. 25, n° 3, pp. 273-287. DOI 10.1007/s11248-016-9932-x.

TANG, Lin, BONDAREVA, Alla, GONZÁLEZ, Raquel, RODRIGUEZ-SOSA, Jose R., CARLSON, Daniel F., WEBSTER, Dennis, FAHRENKRUG, Scott et DOBRINSKI, Ina, 2018. TALEN-mediated gene targeting in porcine spermatogonia. *Molecular Reproduction and Development*. mars 2018. Vol. 85, n° 3, pp. 250-261. DOI 10.1002/mrd.22961.

TANNENBAUM, Jerrold et BENNETT, B Taylor, 2015. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2015. Vol. 54, n° 2.

TASHAKKORI, Niloufar, KHORAMIAN, Babak, FARHOODI MOGHADAM, Mehran, HEIDARPOUR, Mohamad, MASHAYEKHI, Komeil et FARZANEH, Nima, 2020. Evaluating the effectiveness of two bovine mastitis vaccines and their influences on oxidant and antioxidant capacities of milk. *Tropical Animal Health and Production*. mai 2020. Vol. 52, n° 3, pp. 1493-1501. DOI 10.1007/s11250-019-02156-x.

TEARLE, R.G., TANGE, M.J., ZANNETTINO, Z.L., KATERELOS, M., SHINKEL, T.A. et VAN DENDEREN, B.J., 1996. The alpha-1,3 galactosyltransferase knockout mouse. Implications for xenotransplantation. *Transplantation*. 1996. Vol. 61. DOI 10.1097/00007890-199601150-00004.

THOMPSON, Paul B., 2008. The Opposite of Human Enhancement: Nanotechnology and the Blind Chicken Problem. *NanoEthics*. décembre 2008. Vol. 2, n° 3, pp. 305-316. DOI 10.1007/s11569-008-0052-9.

TRAN, Xuan Hanh, PHUONG, Le Thi Thu, HUY, Nguyen Quang, THUY, Do Thanh, NGUYEN, Van Dung, QUANG, Pham Hào, NGÕN, Quách Võ, RAI, Ayushi, GAY, Cyril G., GLADUE, Douglas Paul et BORCA, Manuel Victor, 2022. Evaluation of the Safety Profile of the ASFV Vaccine Candidate ASFV-G-ΔI177L. *Viruses*. 25 avril 2022. Vol. 14, n° 5, pp. 896. DOI 10.3390/v14050896.

URAKAWA, Megumi, ZHUANG, Tao, SATO, Hidetoshi, TAKANASHI, Satoru, YOSHIMURA, Kozue, ENDO, Yuma, KATSURA, Tepei, UMINO, Tsuyoshi, TANAKA, Koutaro, WATANABE, Hitoshi, KOBAYASHI, Hiroko, TAKADA, Naokazu, KOZUTSUMI, Tomoyuki, KUMAGAI, Hiroaki, ASANO, Takafumi, SAZAWA, Kohko, ASHIDA, Nobuhisa, ZHAO, Guoqi, ROSE, Michael T., KITAZAWA, Haruki,

SHIRAKAWA, Hitoshi, WATANABE, Kouichi, NOCHI, Tomonori, NAKAMURA, Takehiko et ASO, Hisashi, 2022. Prevention of mastitis in multiparous dairy cows with a previous history of mastitis by oral feeding with probiotic *BACILLUS SUBTILIS*. *Animal Science Journal*. janvier 2022. Vol. 93, n° 1, pp. e13764. DOI 10.1111/asj.13764.

UTSUNOMIYA, Yuri Tani, TORRECILHA, Rafaela Beatriz Pintor, MILANESI, Marco, PAULAN, Silvana De Cássia, UTSUNOMIYA, Adam Taiti Harth et GARCIA, José Fernando, 2019. Hornless Nellore cattle (*Bos indicus*) carrying a novel 110 kbp duplication variant of the *polled* locus. *Animal Genetics*. avril 2019. Vol. 50, n° 2, pp. 187-188. DOI 10.1111/age.12764.

VAN EENENNAAM, Alison L., 2023. New Genomic Techniques (NGT) in animals and their agri/food/feed products. *EFSA Supporting Publications* [en ligne]. septembre 2023. Vol. 20, n° 9. [Consulté le 9 mai 2024]. DOI 10.2903/sp.efsa.2023.EN-8311. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/sp.efsa.2023.EN-8311>

VAN REE, Ronald, VAN LEEUWEN, W.Astrid, BULDER, Ingrid, BOND, Julian et AALBERSE, Rob C., 1999. Purified natural and recombinant Fel d 1 and cat albumin in in vitro diagnostics for cat allergy☆☆☆★. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. décembre 1999. Vol. 104, n° 6, pp. 1223-1230. DOI 10.1016/S0091-6749(99)70017-5.

VENKATESWARAN, Dhithya, PRAKASH, Anwasha, NGUYEN, Quynh Anh, SALMAN, Muhammad, SUNTISUKWATTANA, Roypim, ATTHAAPA, Waranya, TANTITUVANONT, Angkana, LIN, Hongyao, SONGKASUPA, Tapanut et NILUBOL, Dachrit, 2024. Comprehensive Characterization of the Genetic Landscape of African Swine Fever Virus: Insights into Infection Dynamics, Immunomodulation, Virulence and Genes with Unknown Function. *Animals*. 26 juillet 2024. Vol. 14, n° 15, pp. 2187. DOI 10.3390/ani14152187.

WAKITA, Takaji, TAYA, Choji, KATSUME, Asao, KATO, Junko, YONEKAWA, Hiromichi, KANEGAE, Yumi, SAITO, Izumu, HAYASHI, Yukiko, KOIKE, Morio et KOHARA, Michinori, 1998. Efficient Conditional Transgene Expression in Hepatitis C Virus cDNA Transgenic Mice Mediated by the Cre/loxP System. *Journal of Biological Chemistry*. avril 1998. Vol. 273, n° 15, pp. 9001-9006. DOI 10.1074/jbc.273.15.9001.

WALL, Robert J, POWELL, Anne M, PAAPE, Max J, KERR, David E, BANNERMAN, Douglas D, PURSEL, Vernon G, WELLS, Kevin D, TALBOT, Neil et HAWK, Harold W, 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology*. 1 avril 2005. Vol. 23, n° 4, pp. 445-451. DOI 10.1038/nbt1078.

WANG, Guan-Hong, GAMEZ, Stephanie, RABAN, Robyn R., MARSHALL, John M., ALPHEY, Luke, LI, Ming, RASGON, Jason L. et AKBARI, Omar S., 2021. Combating mosquito-borne diseases using genetic control technologies. *Nature Communications*. 19 juillet 2021. Vol. 12, n° 1, pp. 4388. DOI 10.1038/s41467-021-24654-z.

WANG, Lu et LI, Defa, 2024. — Invited Review — Current status, challenges and prospects for pig production in Asia. *Animal Bioscience*. 1 avril 2024. Vol. 37, n° 4, pp. 742-754. DOI 10.5713/ab.23.0303.

WANG, Yong, DU, Yanan, SHEN, Bin, ZHOU, Xiaoyang, LI, Jian, LIU, Yu, WANG, Jianying, ZHOU, Jiankui, HU, Bian, KANG, Nannan, GAO, Jimin, YU, Liqing, HUANG, Xingxu et WEI, Hong, 2015. Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. *Scientific Reports*. 5 février 2015. Vol. 5, n° 1, pp. 8256. DOI 10.1038/srep08256.

WARREN, Christopher M., SEHGAL, Shruti, SICHERER, Scott H. et GUPTA, Rushi S., 2024.

Epidemiology and the Growing Epidemic of Food Allergy in Children and Adults Across the Globe. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2024. Vol. 24, pp. 95-106. DOI <https://doi.org/10.1007/s11882-023-01120-y>.

WATANABE, Masahito, NAKANO, Kazuaki, MATSUNARI, Hitomi, MATSUDA, Taisuke, MAEHARA, Miki, KANAI, Takahiro, KOBAYASHI, Mirina, MATSUMURA, Yukina, SAKAI, Rieko, KURAMOTO, Momoko, HAYASHIDA, Gota, ASANO, Yoshinori, TAKAYANAGI, Shuko, ARAI, Yoshikazu, UMEYAMA, Kazuhiro, NAGAYA, Masaki, HANAZONO, Yutaka et NAGASHIMA, Hiroshi, 2013. Generation of Interleukin-2 Receptor Gamma Gene Knockout Pigs from Somatic Cells Genetically Modified by Zinc Finger Nuclease-Encoding mRNA. WILBER, Andrew C. (éd.), *PLoS ONE*. 9 octobre 2013. Vol. 8, n° 10, pp. e76478. DOI 10.1371/journal.pone.0076478.

WEAVER, Thomas R. D. et HABIB, Najibullah, 2020. *Evaluating Losses Associated with African Swine Fever in the People's Republic of China and Neighboring Countries* [en ligne]. Asian Development Bank. [Consulté le 8 août 2024]. Disponible à l'adresse : <https://www.adb.org/publications/losses-african-swine-fever-prc-neighboring-countries>

WEI, Jingwei, WAGNER, Stefan, MACLEAN, Paul, BROPHY, Brigid, COLE, Sally, SMOLENSKI, Grant, CARLSON, Dan F., FAHRENKRUG, Scott C., WELLS, David N. et LAIBLE, Götz, 2018. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin. *Scientific Reports*. 16 mai 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 7661. DOI 10.1038/s41598-018-25654-8.

WELLS, Kevin D., BARDOT, Rachel, WHITWORTH, Kristin M., TRIBLE, Benjamin R., FANG, Ying, MILEHAM, Alan, KERRIGAN, Maureen A., SAMUEL, Melissa S., PRATHER, Randall S. et ROWLAND, Raymond R. R., 2017. Replacement of Porcine CD163 Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 with a CD163-Like Homolog Confers Resistance of Pigs to Genotype 1 but Not Genotype 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. PERLMAN, Stanley (éd.), *Journal of Virology*. 15 janvier 2017. Vol. 91, n° 2, pp. e01521-16. DOI 10.1128/JVI.01521-16.

WENG, Changjiang, 2024. Current research progress on the viral immune evasion mechanisms of African swine fever. *Animal Diseases*. 31 mai 2024. Vol. 4, n° 1, pp. 18. DOI 10.1186/s44149-024-00123-0.

WESTHOEK, Henk, LESSCHEN, Jan Peter, ROOD, Trudy, WAGNER, Susanne, DE MARCO, Alessandra, MURPHY-BOKERN, Donal, LEIP, Adrian, VAN GRINSVEN, Hans, SUTTON, Mark A. et OENEMA, Oene, 2014. Food choices, health and environment: Effects of cutting Europe's meat and dairy intake. *Global Environmental Change*. mai 2014. Vol. 26, pp. 196-205. DOI 10.1016/j.gloenvcha.2014.02.004.

WHITELAW, C Bruce A, SHEETS, Timothy P, LILLICO, Simon G et TELUGU, Bhanu P, 2016. Engineering large animal models of human disease. *The Journal of Pathology*. janvier 2016. Vol. 238, n° 2, pp. 247-256. DOI 10.1002/path.4648.

WHITWORTH, Kristin M., LEE, Kiho, BENNE, Joshua A., BEATON, Benjamin P., SPATE, Lee D., MURPHY, Stephanie L., SAMUEL, Melissa S., MAO, Jiude, O'GORMAN, Chad, WALTERS, Eric M., MURPHY, Clifton N., DRIVER, John, MILEHAM, Alan, MCLAREN, David, WELLS, Kevin D. et PRATHER, Randall S., 2014. Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos¹. *Biology of Reproduction* [en ligne]. 1 septembre 2014. Vol. 91, n° 3. [Consulté le 1 septembre 2024]. DOI 10.1095/biolreprod.114.121723. Disponible à l'adresse : <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.114.121723>

WHITWORTH, Kristin M, ROWLAND, Raymond R R, EWEN, Catherine L, TRIBLE, Benjamin R, KERRIGAN, Maureen A, CINO-OZUNA, Ada G, SAMUEL, Melissa S, LIGHTNER, Jonathan E,

MCLAREN, David G, MILEHAM, Alan J, WELLS, Kevin D et PRATHER, Randall S, 2016. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nature Biotechnology*. janvier 2016. Vol. 34, n° 1, pp. 20-22. DOI 10.1038/nbt.3434.

WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 4: Treatment: drug-resistant tuberculosis treatment, 2022. . 2022 update. Geneva, Switzerland : World Health Organization. ISBN 978-92-4-006312-9.

WILKINSON, Gerald S, SWALLOW, John G, CHRISTENSEN, Sarah J et MADDEN, Kevin, 2003. Phylogeography of sex ratio and multiple mating in stalk-eyed flies from southeast Asia. . 2003.

WILLETT, Walter, ROCKSTRÖM, Johan, LOKEN, Brent, SPRINGMANN, Marco, LANG, Tim, VERMEULEN, Sonja, GARNETT, Tara, TILMAN, David, DECLERCK, Fabrice, WOOD, Amanda, JONELL, Malin, CLARK, Michael, GORDON, Line J, FANZO, Jessica, HAWKES, Corinna, ZURAYK, Rami, RIVERA, Juan A, DE VRIES, Wim, MAJELE SIBANDA, Lindiwe, AFSHIN, Ashkan, CHAUDHARY, Abhishek, HERRERO, Mario, AGUSTINA, Rina, BRANCA, Francesco, LARTEY, Anna, FAN, Shenggen, CRONA, Beatrice, FOX, Elizabeth, BIGNET, Victoria, TROELL, Max, LINDAHL, Therese, SINGH, Sudhvir, CORNELL, Sarah E, SRINATH REDDY, K, NARAIN, Sunita, NISHTAR, Sania et MURRAY, Christopher J L, 2019. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*. février 2019. Vol. 393, n° 10170, pp. 447-492. DOI 10.1016/S0140-6736(18)31788-4.

WILSON, Kimberly A, MCEWEN, Abbye E, PRUETT-MILLER, Shondra M, ZHANG, Jiuli, KILDEBECK, Eric J et PORTEUS, Matthew H, 2013. Expanding the Repertoire of Target Sites for Zinc Finger Nuclease-mediated Genome Modification. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2013. Vol. 2, pp. e88. DOI 10.1038/mtna.2013.13.

WODZINSKI, R.J. et ULLAH, A. H., 1996. Phytase. In : *Advances in Applied Microbiology* [en ligne]. pp. 263-302. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)70375-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70375-7)

WOLF, Steven E. et WOODSIDE, Kenneth J., 2005. Transgenic and gene knock-out techniques and burn research. *Journal of Surgical Research*. février 2005. Vol. 123, n° 2, pp. 328-339. DOI 10.1016/j.jss.2004.06.001.

WONG, Richard Wing-Chuen, SHAM, Mai-Har, LAU, Yu-Lung et CHAN, Siu-Yuen, 2000. An Efficient Method of Generating Transgenic Mice by Pronuclear Microinjection. *Molecular Biotechnology*. 2000. Vol. 15, n° 2, pp. 155-160. DOI 10.1385/MB:15:2:155.

WORLD BANK, 2018. ISBN 978-1-4648-1360-3 : *Piecing together the poverty puzzle*. Washington DC : World Bank.

WU, Haibo, WANG, Yongsheng, ZHANG, Yan, YANG, Mingqi, LV, Jiaying, LIU, Jun et ZHANG, Yong, 2015. TALE nickase-mediated *SP110* knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en ligne]. 31 mars 2015. Vol. 112, n° 13. [Consulté le 30 avril 2024]. DOI 10.1073/pnas.1421587112. Disponible à l'adresse : <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1421587112>

XEPAPADAKI, P., FIOCCHI, A., GRABENHENRICH, L., ROBERTS, G., GRIMSHAW, K. E. C., FIANDOR, A., LARCO, J. I., SIGURDARDOTTIR, S., CLAUSEN, M., PAPADOPOULOS, N. G., DAHDAH, L., MACKIE, A., SPRIKELMAN, A. B., SCHOEMAKER, A. A., DUBAKIENE, R., BUTIENE, I., KOWALSKI, M. L., ZEMAN, K., GAVRILI, S., KEIL, T. et BEYER, K., 2016. Incidence and natural history of hen's egg allergy in the first 2 years of life—the EuroPrevall birth cohort study. *Allergy*. mars 2016. Vol. 71, n° 3, pp. 350-357. DOI 10.1111/all.12801.

XIAOSHUAI, Li, QIUSHI, Wang et RUI, Wang, 2022. Advantages of CRISPR-Cas9 combined organoid model in the study of congenital nervous system malformations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2 septembre 2022. Vol. 10, pp. 932936. DOI 10.3389/fbioe.2022.932936.

XIN, Jige, YANG, Huaqiang, FAN, Nana, ZHAO, Bentian, OUYANG, Zhen, LIU, Zhaoming, ZHAO, Yu, LI, Xiaoping, SONG, Jun, YANG, Yi, ZOU, Qingjian, YAN, Quanmei, ZENG, Yangzhi et LAI, Liangxue, 2013. Highly Efficient Generation of GGTA1 Biallelic Knockout Inbred Mini-Pigs with TALENs. TIAN, Xiuhcun (Cindy) (éd.), *PLoS ONE*. 17 décembre 2013. Vol. 8, n° 12, pp. e84250. DOI 10.1371/journal.pone.0084250.

XU, Kui, ZHOU, Yanrong, MU, Yulian, LIU, Zhiguo, HOU, Shaohua, XIONG, Yujian, FANG, Liurong, GE, Changli, WEI, Yinghui, ZHANG, Xiuling, XU, Changjiang, CHE, Jingjing, FAN, Ziyao, XIANG, Guangming, GUO, Jiankang, SHANG, Haitao, LI, Hua, XIAO, Shaobo, LI, Julang et LI, Kui, 2020. CD163 and pAPN double-knockout pigs are resistant to PRRSV and TGEV and exhibit decreased susceptibility to PDCoV while maintaining normal production performance. *eLife*. 2 septembre 2020. Vol. 9, pp. e57132. DOI 10.7554/eLife.57132.

YANG, Dongshan, YANG, Huaqiang, LI, Wei, ZHAO, Bentian, OUYANG, Zhen, LIU, Zhaoming, ZHAO, Yu, FAN, Nana, SONG, Jun, TIAN, Jiangtian, LI, Feng, ZHANG, Jifeng, CHANG, Lin, PEI, Duanqing, CHEN, Y Eugene et LAI, Liangxue, 2011. Generation of PPAR γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Research*. juin 2011. Vol. 21, n° 6, pp. 979-982. DOI 10.1038/cr.2011.70.

YANG, Huaqiang, ZHANG, Jian, ZHANG, Xianwei, SHI, Junsong, PAN, Yongfei, ZHOU, Rhong, LI, Guoling, LI, Zicong, CAI, Gengyuan et WU, Zhenfang, 2018. CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Research*. 2018.

YANG, Luhan, GÜELL, Marc, NIU, Dong, GEORGE, Haydy, LESHAN, Emal, GRISHIN, Dennis, AACH, John, SHROCK, Ellen, XU, Weihong, POCHI, Jürgen, CORTAZIO, Rebeca, WILKINSON, Robert A., FISHMAN, Jay A. et CHURCH, George, 2015. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*. 27 novembre 2015. Vol. 350, n° 6264, pp. 1101-1104. DOI 10.1126/science.aad1191.

YAO, Jing, HUANG, Jiaojiao, HAI, Tang, WANG, Xianlong, QIN, Guosong, ZHANG, Hongyong, WU, Rong, CAO, Chunwei, XI, Jianzhong, YUAN, Zengqiang et ZHAO, Jianguo, 2014. Efficient bi-allelic gene knockout and site-specific knock-in mediated by TALENs in pigs. *Scientific Reports*. 5 novembre 2014. Vol. 4, n° 1, pp. 6926. DOI 10.1038/srep06926.

YOON, Seungwon, LEE, Seulgi, PARK, Chungyu, CHOI, Hyunyong, YOO, Minwoo, LEE, Sang Chul, HYUN, Cheol-Ho, KIM, Nameun, KANG, Taeyoung, SON, Eugene, GHOSH, Mrinmoy, SON, Young-Ok et HUR, Chang-Gi, 2022. An Efficacious Transgenic Strategy for Triple Knockout of Xeno-Reactive Antigen Genes GGTA1, CMAH, and B4GALNT2 from Jeju Native Pigs. *Vaccines*. 8 septembre 2022. Vol. 10, n° 9, pp. 1503. DOI 10.3390/vaccines10091503.

YU, Mengmeng, QU, Yuxing, ZHANG, Haili et WANG, Xiaojun, 2022. Roles of ANP32 proteins in cell biology and viral replication. *Animal Diseases*. 11 octobre 2022. Vol. 2, n° 1, pp. 22. DOI 10.1186/s44149-022-00055-7.

YU, Shengli, LUO, Junjie, SONG, Zhiyuan, DING, Fangrong, DAI, Yunping et LI, Ning, 2011. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Research*. novembre 2011. Vol. 21, n° 11, pp. 1638-1640. DOI 10.1038/cr.2011.153.

YUNES, Maria Cristina, OSÓRIO-SANTOS, Zimbábwe, VON KEYSERLINGK, Marina A. G. et

HÖTZEL, Maria José, 2021a. Gene Editing for Improved Animal Welfare and Production Traits in Cattle: Will This Technology Be Embraced or Rejected by the Public? *Sustainability*. 28 avril 2021. Vol. 13, n° 9, pp. 4966. DOI 10.3390/su13094966.

YUNES, Maria Cristina, OSÓRIO-SANTOS, Zimbábwe, VON KEYSERLINGK, Marina A. G. et HÖTZEL, Maria José, 2021b. Gene Editing for Improved Animal Welfare and Production Traits in Cattle: Will This Technology Be Embraced or Rejected by the Public? *Sustainability*. 28 avril 2021. Vol. 13, n° 9, pp. 4966. DOI 10.3390/su13094966.

ZHANG, Feng, WEN, Yan et GUO, Xiong, 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*. 15 septembre 2014. Vol. 23, n° R1, pp. R40-R46. DOI 10.1093/hmg/ddu125.

ZHANG, Hewei, XIA, Mingqi, WANG, Wei, JU, Decai, CAO, Long, WU, Bai, WANG, Xin, WU, Ying, SONG, Ni, HU, Jiabin, TIAN, Changxiao, ZHANG, Shucheng et WU, Hua, 2018. An Attenuated Highly Pathogenic Chinese PRRS Viral Vaccine Confers Cross Protection to Pigs against Challenge with the Emerging PRRSV NADC30-Like Strain. *Virologica Sinica*. avril 2018. Vol. 33, n° 2, pp. 153-161. DOI 10.1007/s12250-018-0027-0.

ZHANG, Xianwei, LI, Zicong, YANG, Huaqiang, LIU, Dewu, CAI, Gengyuan, LI, Guoling, MO, Jianxin, WANG, Dehua, ZHONG, Cuili, WANG, Haoqiang, SUN, Yue, SHI, Junsong, ZHENG, Enqin, MENG, Fanming, ZHANG, Mao, HE, Xiaoyan, ZHOU, Rong, ZHANG, Jian, HUANG, Miaorong, ZHANG, Ran, LI, Ning, FAN, Mingzhe, YANG, Jinzeng et WU, Zhenfang, 2018. Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact. *eLife*. 22 mai 2018. Vol. 7, pp. e34286. DOI 10.7554/eLife.34286.

ZHANG, Xuemei, WANG, Liqin, WU, Yangsheng, LI, Wenrong, AN, Jing, ZHANG, Fuchun et LIU, Mingjun, 2016. Knockout of Myostatin by Zinc-finger Nuclease in Sheep Fibroblasts and Embryos. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 12 mai 2016. Vol. 29, n° 10, pp. 1500-1507. DOI 10.5713/ajas.16.0130.

ZHAO, Yuefang, YANG, Lei, SU, Guanghua, WEI, Zhuying, LIU, Xuefei, SONG, Lishuang, HAI, Chao, WU, Di, HAO, Zhenting, WU, Yunxi, ZHANG, Li, BAI, Chunling et LI, Guangpeng, 2022. Growth Traits and Sperm Proteomics Analyses of Myostatin Gene-Edited Chinese Yellow Cattle. *Life*. 23 avril 2022. Vol. 12, n° 5, pp. 627. DOI 10.3390/life12050627.

ZHENG, Zezhong, XU, Lei, DOU, Hongwei, ZHOU, Yixuan, FENG, Xu, HE, Xiangjun, TIAN, Zhen, SONG, Lingling, GAO, Yangbin, MO, Guolong, HU, Jiapan, ZHAO, Hongye, WEI, Hongjiang, CHURCH, George M. et YANG, Luhan, 2024. Testing multiplexed anti-ASFV CRISPR-Cas9 in reducing African swine fever virus. JONES, Clinton J. (éd.), *Microbiology Spectrum*. 2 avril 2024. pp. e02164-23. DOI 10.1128/spectrum.02164-23.

ZHOU, Di, WANG, Yan, YANG, Rong, WANG, Fu, ZHAO, Zhonghai, WANG, Xin, XIE, Lingling, TIAN, Xingzhou, WANG, Guoze, LI, Bo et GONG, Yu, 2022. The MyoD1 Promoted Muscle Differentiation and Generation by Activating CCND2 in Guanling Cattle. *Animals*. 26 septembre 2022. Vol. 12, n° 19, pp. 2571. DOI 10.3390/ani12192571.

ZHOU, Wenjun, WAN, Yongjie, GUO, Rihong, DENG, Mingtian, DENG, Kaiping, WANG, Zhen, ZHANG, Yanli et WANG, Feng, 2017. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. SUN, Qing-Yuan (éd.), *PLOS ONE*. 10 octobre 2017. Vol. 12, n° 10, pp. e0186056. DOI 10.1371/journal.pone.0186056.

ZHOU, Xiaoqing, XIN, Jige, FAN, Nana, ZOU, Qingjian, HUANG, Jiao, OUYANG, Zhen, ZHAO, Yu,

ZHAO, Bentian, LIU, Zhaoming, LAI, Sisi, YI, Xiaoling, GUO, Lin, ESTEBAN, Miguel A., ZENG, Yangzhi, YANG, Huaqiang et LAI, Liangxue, 2015. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. mars 2015. Vol. 72, n° 6, pp. 1175-1184. DOI 10.1007/s00018-014-1744-7.

ANNEXE : Bilan de la réflexion sur l'édition des génomes par l'Espace de Réflexion Éthique Étudiant d'Occitanie



ÉDITION DU GÉNOME

CHEZ LA PLANTE, L'ANIMAL ET L'HOMME

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 3 |
| Édition du génome végétal | 4 |
| Espèces végétales cultivées | 4 |
| Espèces végétales sauvages | 11 |
| Conclusion | 13 |
| Édition du génome animal | 14 |
| Applications jugées recevables | 15 |
| Applications faisant débat | 17 |
| Applications jugées délétères | 18 |
| Réglementation autour de la mise sur le marché | 19 |
| Conclusion | 19 |
| Édition du génome humain | 20 |
| Applications thérapeutiques | 21 |
| Modification du patrimoine génétique | 24 |
| Autres questionnements | 27 |
| Applications en recherche | 29 |
| Conclusion | 31 |
| Conclusion générale | 33 |

Introduction

L'édition génomique correspond à l'ensemble des modifications du génome aboutissant au remaniement de l'information génétique d'une cellule, quel qu'en soit son type. Ces modifications à l'aide de ciseaux moléculaires précis soulèvent de nombreux questionnements scientifiques, techniques, éthiques et sociétaux.

“ Ce n'est pas parce que nous pouvons le faire que nous devons le faire. ”

“ Ce n'est pas parce que nous réussissons que nous savons ce que nous faisons. ”

“ À qui appartient le produit ? À qui en revient le profit ? ”

Telles sont les questions posées par les étudiants de l'Espace de Réflexion Éthique étudiant d'Occitanie.

Sur le plan mondial, l'inclusion des citoyens à ce débat éthique sur l'édition des génomes prend la forme du projet « Global Citizen's Assembly on Genome Editing ».

La participation française au projet, l'Inserm a sollicité les Espaces de Réflexion Éthique Régionaux afin d'organiser des consultations citoyennes sur l'édition du génome, comme cela avait été fait dans le cadre des États généraux de la Bioéthique en 2018. Les Espaces de Réflexion Éthique Régionaux ont fait le choix d'une méthode de débat public responsable, transparente et concertée, affirmée dans le cadre d'une Charte qui a vocation à être validée par les participants au débat.

Dans un premier temps, des étudiants sensibilisés par leur cursus scolaire scientifique aux problématiques posées ont été réunis afin d'aborder les enjeux et applications potentielles de l'édition du génome végétal, animal et humain.

Ce comité de réflexion s'est composé d'étudiants vétérinaires de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (Chloé BUI, Jean GINISTY, Adrien TEMPLE et Marie ZARADER) ; d'étudiants du département de Pharmacie de Toulouse (Camille BLOT, Matthis LINGUA, Amaël NARRAN, Wesley NGOUKA, Enzo PELISSOU, Louise PONTIES) et d'étudiants de l'École d'ingénieurs de Purpan à Toulouse (Gabin ARMAND, Alexandre BENOIST, Margaux BUFFO, Maxime DUCROHET, Perrine LESNIAREK, Laurie PONS, Romain SCHERPEREEL, Marie-Caroline WEISSE, Marielle ZAYANA).

ÉDITION DES GÉNOMES VÉGÉTAUX

Séance du lundi 4 avril 2022

Le groupe s'est réuni le lundi 4 avril 2022 pour discuter de l'édition du génome chez les espèces végétales. La séance s'est articulée en deux temps :

- Réflexion sur l'édition du génome chez les espèces végétales **cultivées**
- Réflexion sur l'édition du génome chez les espèces végétales **sauvages**

ESPÈCES VÉGÉTALES CULTIVÉES

1. **L'édition du génome est-elle indispensable pour répondre à la problématique agroécologique « Nourrir la planète », compte-tenu des prévisions concernant l'augmentation démographique mondiale ?**
2. **CRISPR-Cas9 pourrait être indétectable au niveau moléculaire. Comment discriminer les plantes génétiquement modifiées des plantes non modifiées ?**
3. **Est-il raisonnable d'autoriser la commercialisation de plantes génétiquement modifiées si un cadre législatif et des moyens de régulation sont anticipés ?**
4. **La culture d'espèces génétiquement modifiée sera-t-elle accessible à tous ? Quelles questions sont soulevées par la brevetabilité des espèces modifiées ?**
5. **Avons-nous un recul suffisant sur l'introduction d'espèces génétiquement modifiées dans les écosystèmes terrestres ?**

1. L'édition du génome comme réponse à la problématique « Nourrir la planète »

Plusieurs idées de réponse à cette question ont été évoquées durant la séance :

- **L'édition du génome pourrait être une solution, à court terme, aux problématiques agroécologiques que posent le modèle d'agriculture actuel.**

Le système actuel ne nous permettrait pas de nourrir la population grandissante, si nous continuons ce schéma qui réserve la majorité des surfaces agricoles disponibles à la culture pour l'élevage.

L'édition du génome, notamment par CRISPR-Cas9, permettrait d'améliorer les rendements en quantité et qualité nutritive. Pour autant, nourrir la planète est-elle une tâche qui incombe à l'édition du génome ? N'avons-nous pas d'autres leviers d'action pour la réalisation de cet objectif ?

Nous avons utilisé d'autres outils pour augmenter les rendements par le passé. Prenons l'exemple du glyphosate, produit phytosanitaire destiné à éliminer les espèces adventices dans des systèmes en monoculture ou sur des rotations courtes. Le RoundUp™ a été perçu comme révolutionnaire à sa sortie et son utilisation en masse a pourtant conduit à une impasse. En effet, l'émergence d'espèces végétales résistantes à ce produit a prouvé que ce moyen n'était efficace qu'à court terme. Ne sommes-nous pas sur ce même schéma avec l'édition du génome ? La génomique ne pourrait-elle pas se révéler comme délétère pour les cultures dans quelques années ? Cette technique représenterait-elle une solution durable aux problématiques agroécologiques actuelles ?

Aujourd'hui nous pouvons citer deux utilisations de l'édition génomique qui n'ont fait que poursuivre un schéma agronomique désuet, favorisant la surproduction. Même si grâce aux avancées de l'agriculture la population mondiale s'est vu augmenter sa ration alimentaire et ses richesses par notamment la Révolution Verte en Asie. Celle-ci a permis de combattre la famine et de nombreuses disparités mais a cependant aidé à l'augmentation de la malnutrition (obésité). De plus, les modèles agronomiques utilisés ont associé la technologie CRISPR et les produits phytosanitaires rendant à jamais certains sols impropres à l'agriculture, détruisant aussi la biodiversité. Et si les révolutions technologiques n'étaient pas tout aussi néfastes pour l'humanité ?

- **L'édition du génome n'est qu'un moyen de retarder l'inévitable idée qu'il faut changer de modèle agricole.**

L'agriculture de ces dernières années s'est reposée sur un objectif purement productiviste, utilisant la science comme outil. Pourtant, cette approche ne s'est pas inscrite dans une démarche plus globale de préservation des écosystèmes et de la biodiversité sur Terre. Elle a, au contraire, conduit à une dégradation des sols par érosion et une perte de biodiversité par sélection d'espèces végétales présentant des avantages dans les cultures suivant le modèle de l'agriculture intensive. Ne faudrait-il pas plutôt changer de système d'agriculture et de mode de consommation pour une résolution durable des problématiques alimentaires que pose la croissance de la population mondiale ?

Aux premiers égards, nous pourrions imaginer utiliser la génomique pour améliorer la capacité de la plante à restaurer le sol, leur rendement, la qualité nutritionnelle d'une variété ou même restaurer la diversité génétique d'une espèce végétale dans un système agronomique durable. L'édition du génome représenterait ici un moyen de rectifier les dégradations du modèle agricole actuel.

- **L'édition du génome est-elle une solution durable ?**

Le système actuel privilégie la monoculture, c'est-à-dire la culture d'une seule espèce végétale sur une surface agricole. Or, depuis quelques années, nous savons que cette pratique intensive appauvrit le sol : il y a une perte de matière organique, qui est pourtant nécessaire pour la captation des gaz à effet de serre. La fertilité du sol s'en trouve modifiée, ainsi que sa porosité et sa structure. L'utilisation d'engins tasse les sols, ce qui entraîne une diminution des capacités d'aération et d'infiltration des sols.

Devons-nous adapter les plantes à cette terre appauvrie par l'édition du génome ? Ou ne devrions-nous pas plutôt changer nos pratiques pour restaurer la fertilité de ces sols ? Ou encore pouvons-nous par l'édition génomique des plantes retrouver cette fertilité ?

Nous pouvons citer en guise d'exemples d'augmenter la rétention d'eau par les racines de l'espèce végétale modifiée, ou de limiter l'évaporation en diminuant la taille des feuilles.

Néanmoins, l'édition du génome risquerait d'alimenter le cercle vicieux que représente l'agriculture intensive avec des plantes plus performantes qui appauvrissent plus encore le sol. Cultiver des plantes OGM ne semble pas viable. Cette agriculture ne représenterait peut-être qu'un moyen de prolonger un modèle à bout de souffle et même un frein à la réflexion sur les alternatives possibles.

Une expérience au Burkina Faso a même prouvé l'effet néfaste de la culture d'un coton génétiquement modifié pour être résistant aux insectes nuisibles menaçant la filière, appelé Bollgard II et commercialisé par Monsanto. Ce coton représentait, en 2015, trois quarts de la production du pays. Les professionnels du secteur ont dénoncé les résultats médiocres de la variété : seulement 21% de la récolte atteignait la qualité du coton conventionnel. Le Burkina Faso perd sa première place de producteur de coton en Afrique de l'Ouest. L'objectif était de ne produire plus aucun gramme de coton génétiquement modifié à partir de 2018. Le contrat avec Monsanto n'a pas été renouvelé.

Une utilisation de l'édition génomique dans les cultures se doit d'être étudiée sous tout aspect pour en vérifier la pertinence, la qualité, et surtout l'innocuité pour l'environnement dans lequel l'espèce prendra place.

- **L'édition du génome est-elle la seule solution ?**

Le groupe de réflexion s'est interrogé sur la question suivante : une étude a-t-elle été menée pour réaliser un inventaire de solutions possibles aux problématiques agroécologiques actuelles ? L'entreprise associative toulousaine Solagro, dans leur scénario Afterres 2050, propose plusieurs leviers d'action :

- L'évolution du régime alimentaire : diminuer la consommation de viande et produits laitiers pour réduire notre empreinte carbone.
- L'évolution des systèmes et pratiques agricoles : se baser sur des facteurs biologiques plutôt que chimiques pour la préservation de la matière organique des sols (rotations plus longues, généralisation des couverts d'interculture, palette de productions plus diversifiée).
- L'évolution des systèmes d'import/export : si la part de viande diminue dans les assiettes, une partie des terres allouées à l'alimentation des cheptels se trouvent libres et permettent d'assurer une sécurité alimentaire mondiale avec exportation des céréales vers les pays qui en ont besoin. Par ce moyen, nous nous affranchissons des importations massives de tourteaux de soja des Amériques notamment.

Dans un contexte où seule l'édition du génome représenterait une solution, le groupe s'accorde à dire que son emploi est nécessaire. Néanmoins, nous constatons qu'en lisant les plans élaborés par Solagro pour l'avenir, d'autres solutions sont envisageables. Ce fait considéré, le groupe d'étudiants de ce comité de réflexion éthique citoyenne s'exprime plutôt en défaveur de l'utilisation de cette technique de biologie moléculaire chez les espèces végétales cultivées.

Utiliser l'édition du génome en s'inscrivant dans une politique raisonnée pourrait être acceptable si elle ne demeure pas un moyen de prolonger des pratiques actuelles néfastes ou d'éviter une remise en cause de nos modes de production et de consommation.

2. Comment discriminer les plantes génétiquement modifiées des plantes non modifiées ?

L'édition du génome est une technique peu coûteuse et simple à réaliser, dont les modifications effectuées sont indétectables si aucun marqueur n'est ajouté sur l'ADN. Elle est déjà largement accessible et croire que nous pourrions marquer les modifications paraîtrait idéaliste.

Compte-tenu du caractère indécélable de la technique, le groupe d'étudiants s'accorde à dire qu'il nous serait impossible de discriminer les plantes génétiquement modifiées des plantes non modifiées si la technique venait à être autorisée. Elle doit alors faire l'objet d'une réglementation consciencieuse et d'une vigilance assidue. Cette question est abordée au point suivant.

3. Pouvons-nous autoriser la technique si elle fait l'objet d'un cadre législatif et de moyens de régulation ?

Une absence de cadre législatif sur l'édition du génome végétal entraînerait une perte de contrôle sur les caractères modifiés, en risquant alors un impact significatif sur l'écosystème dans lequel s'inscrit la plante génétiquement modifiée.

Si nous cherchons à légiférer, il faudrait que l'utilisation de la technique soit justifiée et pertinente. Ainsi, la modification d'une plante pour conduire à une variété d'ores-et-déjà existante serait prohibée. Cette règle respecte la diversité déjà présente dans la Nature.

Une interrogation subsiste : la France devrait-elle exercer un cadre législatif strict sur les OGM alors que d'autres pays ne le font pas ? Dans un contexte de mondialisation des marchés, la France se trouverait alors très peu compétitive. Si l'avenir est à l'édition du génome, la France a tout intérêt à s'adapter pour demeurer économiquement un pays fort de son agriculture.

C'est en ce sens que nous ne nous questionnons pas d'autoriser ou non la technique mais plutôt de la meilleure façon de l'encadrer.

À ce jour, la commission européenne autorise l'importation d'espèces OGM : le maïs, le soja, le colza, le coton et la betterave sucrière. Pour rappel, deux tiers des terres cultivables sur la planète sont alloués à l'alimentation des animaux d'élevage.

Le soja, sous la forme de tourteau, représente l'essentiel de l'alimentation du bétail. Ce soja OGM, que nous achetons actuellement, est donc essentiel pour le rendement en sous-produits animaux français.

Il serait paradoxal d'autoriser l'importation de produits OGM tout en interdisant l'édition du génome pour la production de nos propres OGM sur le territoire. La question serait de distinguer dans la loi les produits aujourd'hui appelés OGM des produits issus de l'édition génomique.

La mise en culture de ces espèces demeure interdite dans les pays de l'Union Européenne, elle l'est depuis 2008 en France.

Dans les points qui devront être abordés par la législation si l'autorisation est prononcée, nous comptons la vigilance sur les produits issus d'édition du génome. Tels les principes de pharmacovigilance appliqués sur le médicament, l'innocuité du produit à la préparation ou la consommation doit être assidûment étudiée. La sécurité alimentaire doit être assurée avant et après commercialisation du produit.

4. La culture d'espèces génétiquement modifiées sera-t-elle accessible à tous ? Qu'en est-il des produits de ces cultures ? Que penser des brevets sur les semences modifiées ?

L'édition du génome chez les espèces végétales cultivées est une technique dont l'utilisation repose sur un unique but : nourrir la planète. Notre interrogation est la suivante : qu'en serait-il de l'accessibilité des produits génétiquement modifiés ? Y aurait-il une distribution inégale de ces ressources sur le globe ? Cette réflexion est nourrie par le fait suivant : « Deux tiers des Brésiliens ne mangeraient pas à leur faim alors qu'ils produisent de quoi alimenter le monde. ».

Nous ne voulons pas nourrir ceux qui ne manquent pas mais ceux qui ont faim. Or, une réglementation stricte sur cette technique restreindrait son accessibilité aux multinationales. Les petites coopératives qui voudraient modifier les espèces à des fins nobles se verraient acculer par le prix exorbitant que coûterait l'ensemble du chemin jusqu'à commercialisation du produit breveté fini. Le prix des semences serait fixé librement par ces multinationales.

Pour autant, des semences rendues accessibles à tous reviendrait à abaisser leurs prix. Or, il apparaît immoral pour l'inventeur de la semence que de ne pas bénéficier des fruits de son invention. Peut-être faudrait-il proposer un modèle de revenu similaire à celui évoqué pour les vaccins : ces derniers seraient rendus publics et accessibles aux autres laboratoires dès lors que le laboratoire-mère rentrerait dans les frais engagés pour la découverte.

D'autre part, quel risque représente une grande accessibilité de la technique pour les écosystèmes ? Il nous faudrait des moyens de modéliser l'impact d'une plante modifiée dans un écosystème donné avant de pouvoir en autoriser la commercialisation mais cela n'est déjà pas mis en place pour les OGM importés. Pourquoi la France s'engagerait-elle à de lourdes procédures quand d'autres pays ne s'y engagent pas ?

5. Avons-nous un recul suffisant sur l'introduction d'espèces génétiquement modifiées dans les écosystèmes terrestres ?

Une dernière question demeure : avons-nous un recul suffisant permettant l'autorisation sécurisée des plantes éditées ? Quel en serait l'impact sur la faune et la flore environnante ?

Par le passé, les Etats-Unis ont utilisé en masse une découverte biotechnologique qui faisait fureur : le Roundup. Aujourd'hui, nous recensons plus d'une cinquantaine d'espèces d'adventices naturellement résistantes au glyphosate. C'est bien la preuve que les nouvelles biotechnologies doivent être employées avec mesure et raison.

Le groupe s'accorde à dire que si nous devons un jour autoriser l'édition du génome chez les espèces végétales cultivées, une évaluation de sa place et l'impact d'une modification dans la biodiversité est indispensable.

Néanmoins, nous pouvons nous interroger : n'est-ce pas présomptueux de penser que nous sommes en mesure d'une telle évaluation ? Au contraire, sommes-nous dans l'illusion de penser que les éditions génomiques effectuées auraient un réel effet sur l'écosystème de l'espèce modifiée ?

Une balance bénéfice-risque doit être déterminée pour décider de l'utilisation de la biotechnologie dans les cultures françaises. Le contrôle devrait se poursuivre pour

s'assurer, après avoir commercialisé et mis en culture des semences modifiées, de leur innocuité pour l'environnement et pour la consommation humaine et animale.

Un objectif de restauration de la diversité génétique des espèces végétales cultivées serait-il envisageable ? L'édition du génome pourrait-elle servir aux plans de sauvegarde des espèces menacées ?

Si la réponse à ces questions est positive, le groupe envisagerait CRISPR/Cas9 comme solution à ces problématiques agroécologiques.

ESPÈCES VÉGÉTALES SAUVAGES

Pour discuter de l'édition du génome végétal chez les espèces sauvages, il nous a fallu réfléchir dans un premier temps à la définition même du sauvage. Nous nous sommes ensuite questionnés sur les applications possibles et leur pertinence de l'édition génomique chez ces espèces.

1. Qu'est-ce que le sauvage ?

Pour pouvoir légiférer l'utilisation de l'édition génomique sur les espèces végétales sauvages, il faut tout d'abord déterminer ce que le terme "sauvage" désigne.

Pour les pays anglo-saxons, le terme sauvage signifie tout ce qui n'a pas été touché par l'être humain. Le sauvage végétal est alors représenté par les forêts primaires par exemple.

D'autres définissent ce terme comme tout ce qui n'est pas concerné par une activité productive ou lucrative visible. Un jardin, une forêt gérée ou même un pré peuvent donc correspondre à cette définition. Nous nous interrogeons alors : où se situe la limite entre le sauvage et le domestiqué ?

Certaines populations d'Asie, d'Afrique et diverses communautés autochtones ne définissent pas le mot "sauvage". Il fait partie de l'environnement qui nous entoure et s'entremêle avec nos modes de vie. On observe même des phénomènes de coévolution, formes d'adaptabilité entre les mœurs de l'homme et les moyens de survie de l'espèce végétale.

2. Quelles seraient les applications de l'édition génomique sur les espèces végétales sauvages ?

Le groupe d'étudiants s'accorde à dire que le fonctionnement des écosystèmes est complexe, nous manquons encore de connaissances pour savoir si une édition aurait seulement un impact sur l'écosystème ou si elle mènerait à la perte complète de ce dernier. Nous n'aurions alors aucune valeur prédictive sur notre expérience.

La technique ne pourrait-elle pas nous échapper si nous n'en connaissons pas les tenants et aboutissants ? Pouvons-nous envisager une maîtrise raisonnée ou aurions-nous une maîtrise effrénée de la biotechnologie ?

Une des utilisations possibles serait la sauvegarde d'espèces menacées, en les rendant justement plus résistantes face à ce qui les met en péril d'extinction.

Mais sommes-nous seulement dans notre bon droit quand nous faisons le choix de modifier le sauvage ? Une plante peut-elle être considérée comme intacte, fidèle et de même appartenance à son modèle si elle est modifiée par mutagenèse dirigée indétectable ?

Le groupe se révèle très réservé sur la modification génomique des espèces végétales dites sauvages. Néanmoins, des questionnements sur les applications dans la protection de l'environnement se soulèvent : pourrions-nous envisager par exemple un meilleur stockage du carbone ?

Nous nous accordons à dire que les connaissances demeurent insuffisantes quant aux conséquences sur les équilibres écosystémiques de l'introduction d'une espèce végétale sauvage modifiée pour permettre une utilisation raisonnée de la technique.

CONCLUSION SUR LES ESPÈCES VÉGÉTALES

Le comité étudiant s'exprime en défaveur de l'utilisation de l'édition génomique si elle s'inscrit dans un objectif de prolongation d'un système agricole déséquilibré. Elle doit plutôt servir une politique de réponse aux besoins mondiaux.

En toute logique, il faut donc établir un inventaire exhaustif de ces dits besoins. L'évaluation semble complexe mais nécessaire pour se prononcer en faveur ou défaveur de l'utilisation de l'édition génomique chez les espèces végétales : voulons-nous revoir entièrement le système agricole actuel ou le prolonger ? Quelle serait la durabilité de la voie choisie ? Quelle est la place des nouvelles biotechnologies dans ces modèles ?

D'autre part, nous ne voudrions pas, en privilégiant cette solution aux problématiques agroécologiques actuelles, sacrifier la recherche d'alternatives moins radicales.

ÉDITION DES GÉNOMES ANIMAUX

Séance du lundi 11 avril 2022

Le groupe s'est réuni le 11 avril 2022 pour discuter de l'édition du génome chez les espèces animales. L'article *Towards progressive regulatory approaches for agricultural applications of animal biotechnology*¹ liste les objectifs de l'édition du génome animal dans l'élevage :

- Réduire les impacts environnementaux :
 - Utilisation des surfaces agricoles
 - Émission de gaz à effet de serre
- Améliorer le bien-être animal :
 - Animaux plus robustes, moins sensibles aux affections
 - Naissance d'animaux sans corne pour abolir la pratique d'écornage
- Limiter l'impact du réchauffement climatique : animaux thermotolérants
 - Toison de densité réduite
 - Toison de couleur claire
- Obtenir des produits adaptés à la consommation humaine : éviter les allergies
 - Retirer la bêta-lactoglobuline du lait de vache
 - Retirer l'ovalbumine des œufs de poule

Aujourd'hui, l'élevage demeure indispensable pour nourrir la population mondiale et plus encore au vu de la constante augmentation de la demande en produits animaux. Nous recherchons donc à produire en grandes quantités avec le minimum de ressources, c'est-à-dire un gain sur le rendement pour nourrir la planète avec moins de surface et plus de contraintes écologiques.

C'est en ce sens que l'édition génomique serait envisagée, si les alternatives déjà décrites se révèlent trop lentes à mettre en place ou trop inefficaces.

¹ Hallerman EM. et al., *Towards progressive regulatory approaches for agriculture applications of animal biotechnology*, 2022

Le comité étudiant a tenté lors de cette séance de classer : les applications jugées recevables ; les applications faisant débat et les applications jugées délétères. Les difficultés potentielles devant la mise sur le marché de produits édités ont également été abordées.

1. Applications jugées recevables

L'idée d'apporter des modifications au génome des animaux de rente (bovins, ovins, caprins, porcins et volailles) peut effrayer, par la perte du caractère "naturel" de la naissance et de la loterie génétique qu'elle représente. Néanmoins, la technique Crispr-Cas9 permettrait d'induire des mutations ponctuelles de l'ADN, mutations qui pourraient donc émerger naturellement chez un individu donné. La technique catalyse un phénomène qui arriverait peut-être dans des siècles futurs.

À titre d'exemple, nous pouvons citer le gène "sans cornes" naturellement présent chez l'Angus (bovin). Ce gène, transposé à d'autres races, offre plusieurs avantages : il évite les blessures, que ce soit pour l'éleveur ou pour l'entièreté du troupeau. Nous pourrions alors clamer son utilité pour le bien-être animal.

Néanmoins, les difficultés que rencontrent les systèmes d'élevage actuels ne peuvent pas tous être enrayés à coup de biotechnologies. La caudophagie chez les porcins ne saurait trouver une solution raisonnée dans un gène "sans queue". En effet, ce comportement est exprimé de façon plus intense lorsque la densité de population est grande. Les bêtes se mutilent entre elles en réponse au stress engendré. Le cœur du problème ne serait pas résolu, seulement les difficultés conséquentes à ce problème. Pour apporter une solution durable, encore faudrait-il envisager un changement drastique dans la pratique de l'élevage porcin.

Nous trouvons d'autres applications pertinentes pour Crispr-Cas9 comme le sexage *in ovo* des descendants de poules pondeuses. Actuellement en filière pondeuse, les poussins sont triés peu après la naissance : les femelles sont gardées et croissent pour devenir de nouvelles poules pondeuses ; les mâles sont sacrifiés par broyage. Cette pratique fait polémique, surtout après la diffusion de vidéos de ce procédé par des associations de protection animale il y a quelques années. Dans une politique de lutte pour le bien-être animal, le sexage *in ovo* se pose comme solution : par Crispr-Cas9 nous pourrions modifier un gène sexuel afin qu'il exprime une protéine fluorescente et ainsi différencier les mâles des femelles dès l'œuf, et pouvoir écarter les œufs plutôt que de procéder au triage post-natal.

Nous pourrions également envisager des élevages mixtes où les femelles ont un bon rendement en ponte et les mâles un bon rendement en chair). Nous porterions une grande attention à la conservation d'une diversité génétique intra-race, afin de ne pas reproduire, par exemple, la perte de diversité génétique, induite par sélection depuis des décennies, chez les vaches Prim Holstein.

Une autre application a déjà été expérimentée dans l'élevage porcin : rendre les porcs résistants au Syndrome Dysgénésique Respiratoire Porcin (SDRP). Cette affection virale ne fait actuellement l'objet d'aucun vaccin ou traitement. Pourtant, elle engendre une mortalité prématurée et est la cause d'une utilisation massive d'antibiotiques dans la lutte contre les infections conséquentes. Nous sommes d'ores-et-déjà capable d'invalider le gène codant la protéine d'ancrage à la surface des macrophages du virus responsable du SDRP, permettant d'en bloquer l'expression. L'édition génomique représenterait donc une grande amélioration en termes de bien-être, de santé et de rendement économique des élevages.

Rendre les animaux de rente résistants à des pathogènes apparaît comme très attrayant : nous éviterions par exemple les épizooties d'influenza aviaire qui déciment les élevages de volaille et dont le virus, nous le rappelons, est zoonotique. En 2021, pas moins de dix millions de poulets et canards infectés ont été abattus pour cette raison. La santé des humains, la santé des animaux et l'économie de la filière avicole profiteraient de l'utilisation des ciseaux moléculaires.

Toutefois, il existe d'autres techniques de biologie moléculaire pour lutter contre cette maladie, comme la technologie d'interférence à l'ARN. Une équipe de l'Université de Cambridge, en étroite collaboration avec l'institut Roslin et l'Université d'Edinburgh, a travaillé à l'élaboration d'un ARN bloquant la transmission du virus influenza aviaire d'un individu à l'autre². Les animaux contaminés succombent de la maladie mais n'infectent pas leurs congénères. CRISPR-Cas9 pourrait donc ne pas être indispensable pour la préservation de la santé publique.

L'idée qui émane de la réflexion entre étudiants est donc que l'on peut considérer l'édition comme une solution éthiquement recevable si des alternatives ont été envisagées et déclinées pour leur insuffisance à répondre rapidement et à elles-seules aux besoins sociétaux. Une utilisation conjointe de ces alternatives et de l'édition est également à imaginer. Crispr-Cas9 ne sera pas une solution universelle à tous les enjeux auxquels font face nos systèmes d'élevage actuels mais demeure un outil qui mérite notre attention.

² Lyall J. et al. 2011, *Suppression of avian influenza transmission in genetically modified chickens*.

Les étudiants de l'Espace de Réflexion Éthique Occitanie s'accordent à dire qu'il est primordial de conserver un contrôle de la technique, c'est-à-dire qu'elle ne nous échappe pas. Les individus génétiquement modifiés ne doivent pas risquer, par une introduction accidentelle dans la faune sauvage, de déséquilibrer des écosystèmes.

Prenons en guise d'illustration les modifications génétiques faites sur les poissons d'élevage. Si ces poissons sont amenés à fuir d'une quelconque manière leur bassin, alors ils pourraient, en croisant des poissons sauvages de même espèce, engendrer une descendance transgénique. Une idée facilement réalisable et se posant comme solution à ce problème est de rendre les poissons génétiquement modifiés stériles, ce que nous créons d'ores-et-déjà en aquaculture avec des individus rendus triploïdes par des procédés spécifiques.

Un autre point soulevé lors de cette séance a été la résurrection d'espèces. En effet, est-il possible par édition génomique sur une autre espèce similaire de reconstituer une espèce disparue ? Pour autant, une espèce réintroduite dans un écosystème qu'elle a quitté ne serait-il pas source de déséquilibre ? Nous supposons ici que si une telle application venait à voir le jour, alors elle devrait se restreindre aux espèces très récemment éteintes et dont l'écosystème existe toujours. Des études sur l'impact du rétablissement de l'espèce dans son écosystème d'origine nous semblent nécessaires.

2. Applications faisant débat

Les opinions sur l'utilisation des biotechnologies divergent selon l'espèce-cible. En effet, Crispr-Cas9 est un outil qu'envisage aisément le citoyen lambda quand il concerne les animaux de rente. L'avis est partagé quant à son emploi sur les animaux de compagnie. Ce débat se rapporte donc plus globalement à la différence de rapports qu'on entretient avec les animaux de rente et avec les animaux de compagnie.

Un autre sujet de débat est l'usage de l'édition génomique dans la lutte contre les espèces invasives. Le *gene drive* en est une démonstration : il s'agit d'une propagation rapide d'une modification génétique au sein d'une population. Elle est notamment expérimentée chez les moustiques du genre *Anopheles*, espèces transmettant à l'homme l'agent de paludisme. En 2020, 627 000 décès ont été recensés. Par *gene drive*, les moustiques donnent lieu à une descendance stérile ou un défaut de développement de l'embryon menant à terme à l'extinction totale de l'espèce.

Le groupe de réflexion émet une certaine réserve à cette application : peut-on prédire l'impact de la disparition de cette espèce sur les écosystèmes dans lesquels elle s'inscrit ? Ne risque-t-on pas l'émergence d'un nouvel hôte pour le *Plasmodium* plus délétère encore pour l'homme ?

Enfin, le dernier point sur lequel l'avis du groupe est mitigé est sur l'application en médecine humaine, et plus particulièrement en ce qui concerne la greffe d'organes. Modifier un organe de porc et le transplanter en garantissant son innocuité pour le receveur serait une application louable. En demeure le problème d'accessibilité de la technique, par son coût, et la question du devenir de ses animaux ? Seront-ils disponibles à la consommation humaine ? Comment serait assurée la biosécurité alimentaire ?

De nombreuses applications font débat au sein même de notre modeste groupe d'étudiants. Nous ne doutons pas qu'elles susciteraient les mêmes interrogations à plus grande échelle. Nous ne nous prononçons ni en faveur ni en défaveur de l'emploi des ciseaux moléculaires dans ce cadre.

3. Applications jugées délétères

Ce point a été abordé très succinctement lors de la séance. La conclusion a été que l'édition génomique ne saurait être tolérée si son résultat est jugé malfaisant ou délétère pour l'animal, et l'est plus que la sélection génétique classiquement pratiquée.

Par exemple, le caractère culard a été sélectionné dans un objectif de rendement en chair : les bovins développent une plus grande masse musculaire. Le prix à payer pour un tel rendement n'est pas négligeable : ce phénotype implique un défaut de conformation pour une mise bas naturelle. La césarienne en devient quasiment systématique. Les races porteuses de la mutation "culard" sont d'ailleurs interdites dans certains pays comme la Norvège, la Suède et la Suisse.

4. Réglementation autour de la mise sur le marché

La politique de mise sur le marché de produits issus d'animaux génétiquement modifiés dépend du pays. Seuls deux pays dans le monde autorisent la vente pour la consommation humaine de tels animaux, le saumon AquAdvantage créé par la société AquaBounty Biotechnologies pour ne citer que cet exemple. Ces pays sont les États-Unis et le Canada. Des essais sont en cours au Brésil et en Argentine.

De nouveaux projets sont régulièrement proposés mais n'aboutissent pas. Nous pouvons évoquer le projet du porc Enviropig débuté en 2001 au Canada et abandonné en 2012 faute d'accord à la commercialisation pour la consommation humaine. Ce porc présentait la particularité, acquise par édition du génome, de produire des phytases salivaires digérant les phytates. Ces dernières sont des molécules composées de phosphore et responsables de pollution environnementale par leur grande quantité dans les effluents d'élevages.

CONCLUSION SUR LES ESPÈCES ANIMALES

Les idées d'applications ne manquent pas. Pourtant, le comité étudiant s'accorde à dire qu'une charte éthique semble essentielle afin d'éviter les dérives, élaborée à la suite de consultations citoyennes permettant d'évaluer la recevabilité de chaque application et la mise en place d'un cadre législatif universel et univoque.

Pour une opinion publique favorable, des études de toxicité des produits animaux pour l'homme doivent être menées en amont. Par ailleurs, le consommateur s'intéressera certainement à la préservation du bien-être de l'animal cible, c'est-à-dire que la modification du génome n'altère pas son confort de vie actuel.

Édition du génome des humains

La réflexion du groupe a abordé la question de l'édition du génome dans le cadre thérapeutique, et notamment par modification du patrimoine génétique de la lignée germinale. Par ailleurs, l'utilisation de ces biotechnologies à d'autres fins que médicales a été discutée. Enfin, les applications dans la recherche ont été évoquées.

Un point de vocabulaire a été fait lors de cette séance afin d'éclaircir et accorder les différentes visions. On distingue alors les termes : "améliorer", "soigner" et "guérir".

Soigner consiste à apporter des soins en vue de diminuer la douleur, de l'amélioration de la santé ou, idéalement, de la guérison.

Améliorer un être humain, c'est lui apporter une modification afin de le rendre meilleur et plus performant.

Guérir éliminer la maladie en assurant au malade un retour à une condition proche de son état antérieur.

La frontière entre ces trois notions est ténue. Quand on soigne quelqu'un, on lui apporte une correction et donc une amélioration au niveau individuel. En effet, sa version soignée est une meilleure version de sa version malade. On soigne une personne par rapport à une norme établie par la société. Par exemple, à partir d'un certain seuil de glycémie, on est considéré diabétique et donc malade. À l'aide de traitements médicamenteux, on abaisse le taux de sucre pour qu'il atteigne la norme établie. Cette norme est subjective : elle est fixée selon une moyenne populationnelle et n'est pas adaptée à tous les individus qui composent cette population.

Ainsi, comment décider si une personne voit sa maladie corrigée ou représente une version augmentée de l'homme ? Dans la mesure où on arriverait à maîtriser les techniques d'édition du génome, il serait facile de passer d'une démarche de soin à une démarche normative voire eugéniste tournée vers l'amélioration.

Dans l'hypothèse où toutes les maladies sont résolues par édition génomique, de quoi allons-nous mourir ?

D'autres questions doivent également être soulevées : peut-on et doit-on définir des maladies concernées par l'édition du génome ? Cela concernerait les maladies héréditaires, ou acquises (tumeurs), ou les deux ? Dans quel but doit-on l'utiliser ? Soigner, guérir, améliorer ou encore prévenir ? Ainsi, doit-on modifier une personne susceptible d'être malade mais qui ne l'est pas encore ?

Applications thérapeutiques

1. La thérapie génique et la thérapie cellulaire ?

La thérapie génique comprend l'ensemble des modifications génétiques ciblées sur les gènes de cellules somatiques *in vivo* ou *in vitro*. Ces altérations ne sont pas transmissibles à la descendance.

Les membres de la concertation n'expriment pas de réticence à l'emploi de la thérapie génique, cela paraît éthiquement recevable. La thérapie génique à des fins de soigner et guérir est une technique déjà employée. L'édition génomique permettrait d'élaborer des substrats de thérapie génique plus efficaces encore et en ce sens, l'opinion du comité est favorable à son utilisation.

Cependant, en se concentrant sur la thérapie génique, ne risquons-nous pas de lever le pied sur la recherche d'alternatives médicales, ou de médicaments ? Ce développement de nouvelles techniques pourrait impacter négativement le domaine de la recherche alternative, médicamenteuse.

La thérapie génique pourrait être utilisée en complément des thérapies alternatives et des médicaments qui ont déjà prouvé leur efficacité. Cependant, il faut garder à l'esprit que cette offre de soin serait potentiellement source de fractures socio-économiques car très onéreuse à la réalisation. L'inégalité d'accès aux soins a été une préoccupation soulevée lors de cette séance.

2. Soins *in vivo* et *ex vivo* pour tout type de maladie ou individu ?

Peut-on utiliser la thérapie génique dans le but de soigner tous types de maladies comme l'asthme ou la grippe ?

Toutes les maladies ne se valent pas en termes de sévérité des signes cliniques et de pronostic, y compris au sein même des maladies génétiques. Par exemple, le daltonisme n'est pas une affection débilante pour le patient. Serait-ce donc une bonne indication pour de la mutagenèse dirigée ? Où se situe le seuil de gravité déterminant l'autorisation ou l'interdiction d'une prise en charge par édition génomique ?

L'utilisation de cette technique dans le cadre de maladies "bénignes" nous apparaît donc discutable. Une analyse au cas par cas nous semble indiquée.

Il faut également prendre en compte la variabilité inter-individuelle concernant l'opinion sur une maladie donnée ou sur sa modification. Nous ne portons pas tous le même regard sur la sévérité ou l'impact d'une édition du gène d'intérêt. On ne peut pas réduire l'édition du génome à juste la maladie au sens strict du terme. Pour le comité, une prise en compte du patient et de son environnement permet une analyse plus précise de la recevabilité d'une application d'édition du génome.

- **Doit-on "soigner" les individus sains et faire de l'édition du génome à titre préventif ?**

Un obstacle important est la part génétique au déterminisme de la maladie. Certains marqueurs génétiques n'ont qu'une valeur prédictive limitée. De nombreuses pathologies sont multifactorielles : influencées par notre patrimoine génétique et notre environnement.

Plusieurs études s'interrogent sur l'intérêt de rechercher à titre systématique des anomalies génétiques dans une population d'individus « sains »³. Les résultats sont équivoques et, le bénéfice de la prévention du risque et les conséquences psychiques et sociales est incertain. En revanche, l'intervention préventive chez un individu dont le patrimoine prédispose au développement d'une maladie génétique débilante mérite d'être considérée.

³ De Los Campos, et al. 2010, *Predicting genetic predisposition in humans: the promise of whole-genome markers*.

Ainsi, donner actuellement une réponse globale à un recours à l'édition génomique nous paraît prématuré. Une position plus générale devra attendre que nous ayons une connaissance plus approfondie du fonctionnement du génome et des mécanismes des affections dont le soin ou la prévention sont envisagés.

Malgré tout, la thérapie génique pourrait, selon son efficacité, être une thérapie de choix pour les maladies rares et orphelines de traitement. De plus, utiliser l'édition génomique pourrait aider à libérer des fonds pour la recherche dans d'autres maladies.

Le groupe de réflexion se prononce plutôt en faveur de l'utilisation de la thérapie génique sur des maladies monogéniques bien ciblées, plutôt que des affections mal connues et surtout polygéniques (impliquant plusieurs gènes). Cependant, il estime que l'usage des outils d'édition génomique à titre préventif sur des individus sains n'est pas recevable devant le risque de dérives.

- **Dans quelles conditions, les modifications ciblées du génome peuvent-elles être appliquées ? Doit-on les limiter à l'action de guérison ou accepter leur emploi dans le soin ?**

Si on prend l'exemple de la maladie de Duchenne, les patients souffrent principalement de troubles musculaires dus à une mutation sur le gène *DMD*. Les déficiences intellectuelles engendrées dépendent de la nature et de la position des mutations au sein de ce gène. La modification de ce gène rétablirait éventuellement les fonctions motrices et permettrait de limiter les difficultés intellectuelles rencontrées chez certains patients.

Dans ce cas, le groupe serait plutôt favorable à cette application. Néanmoins, il estime que la modification génomique doit être rigoureusement étudiée afin d'en prédire avec précision les effets. Par ailleurs, les risques liés à la pratique d'une telle intervention doivent être discutés avec le patient afin d'obtenir son consentement éclairé.

Enfin, l'amélioration éventuelle des fonctions cognitives d'un individu ne saurait trouver un avis favorable puisqu'elle représenterait l'élaboration d'un surhomme et donc exposerait l'humanité à un risque de dérive sans précédent.

3. Transplantation ou “réparation” d’organes ?

La possibilité de modifier *ex vivo* des organes provenant de donneurs pourrait être une solution pour lutter contre la pénurie d'organes liée à l'histocompatibilité.

Cette technique permettrait donc une suppléance de l'organe défaillant. De plus, cette manière de faire serait plus égalitaire, réduisant les listes de priorité de receveurs. Ces derniers n'auraient pas à attendre.

En cas d'état de mort cérébrale, il a été envisagé de modifier l'antigénicité des personnes pour modifier les organes en vue de dons pour les adapter au receveur. Aujourd'hui, nous n'avons pas le savoir ou les outils suffisants à l'élaboration de tels organes.

L'édition du génome pourrait trouver une application dans la médecine régénérative. En effet, il pourrait être envisagé, à partir de cellules souches, de générer un organe entier. De la même façon, cela pourrait être une alternative intéressante au don d'organes. Pour l'instant, une telle manœuvre n'est pas possible devant la complexité des processus impliqués.

Modification transmissible du patrimoine génétique

1. Une maladie peut-elle justifier la modification génétique de l'embryon ?

Légalement, un embryon est défini comme tel jusqu'à la dixième semaine d'aménorrhée. À partir de la dixième semaine, on parle de fœtus. Il n'existe pas, à ce jour, de liste de maladies et pathologies qui justifieraient une intervention sur un embryon. Au contraire, les modifications génétiques sur l'embryon sont pour le moment formellement interdites.

Les premières modifications ayant donné naissance aux jumelles Lulu et Nana en Chine en 2018 ont été lourdement critiquées. He Jiankui, le chercheur chinois à l'origine de cette utilisation prohibée de Crispr-Cas9, a d'ailleurs été condamné à trois ans de prison.

- **L'édition génomique embryonnaire comme une alternative à l'interruption volontaire de grossesse (IVG) pour motif médical ?**

Aujourd'hui en France, les femmes ont la possibilité d'avoir recours à une interruption volontaire de grossesse (IVG). L'IVG est autorisée jusqu'à la fin de la septième semaine de grossesse lorsqu'elle est médicamenteuse, et jusqu'à la fin de la quatorzième semaine de grossesse lorsqu'elle est chirurgicale.

Lorsque le motif de l'interruption de grossesse est de nature médicale, la Loi française ne précise pas de limite de terme avant l'accouchement.

Aucune affection *in utero* n'oblige la mère à pratiquer une interruption de grossesse. Pour certaines maladies génétiques, un diagnostic prénatal peut être réalisé à la demande du couple en cas de risque avéré de transmission. Le diagnostic génétique prédit alors le statut du futur bébé. Lorsqu'il est diagnostiqué porteur de l'affection recherchée, une demande d'interruption de grossesse peut alors être formulée librement par la femme enceinte.

La fécondation *in vitro* consiste aujourd'hui en le tri des embryons. Ceux porteurs de la mutation responsable de la maladie et délétère pour l'organisme sont écartés. L'édition du génome pourrait éviter d'avoir recours à l'IVG en premier lieu. On procéderait par une fécondation *in vitro* de la même façon que pour un diagnostic préimplantatoire à la correction par édition génomique d'un embryon viable et à son implantation consécutive.

Cependant, il faudra prendre garde aux dérives possibles : certains caractères phénotypiques (physiques, cognitifs, etc.) pourraient être recherchés par les parents si la législation en vigueur leur en laisse la possibilité. Le film de science-fiction dystopique *Bienvenue à Gattaca*, réalisé par Andrew Niccol en 1997, en dépeint d'ailleurs un tableau troublant de réalisme.

L'expérience chez l'homme demeure très limitée. La biologie du développement embryonnaire est mal connue et si la dernière version des Lois de Bioéthique autorise la culture expérimentale des embryons humains à visée de recherche, les conséquences des modifications même ponctuelles du génome humain sur le développement restent parcellaires.

2. Quel principe de responsabilité pour l'embryon modifié ?

Le groupe de réflexion s'est interrogé sur l'acteur endossant la responsabilité de la modification génétique sur le futur enfant. Serait-ce le médecin qui a pratiqué ladite modification ou le parent qui en aurait fait la demande ?

Une modification génétique n'est pas anodine et les effets sur le long terme sont incertains devant le manque de connaissances sur toutes les fonctions des gènes. En effet, l'édition génomique pourrait par exemple intervenir sur un gène impliqué dans plus de fonctions physiologiques que ce que la science serait en mesure de prédire actuellement. L'enfant modifié pourrait-il porter plainte pour cela ? Qui serait alors la cible de cette plainte ?

De plus, l'emploi de Crispr-Cas9 pose des problématiques sociales conséquentes. Devons-nous informer l'individu modifié qu'il est le fruit de biologie moléculaire ? Quelle serait la place des personnes génétiquement modifiées dans la société ? Quel serait le regard de cette société sur ces organismes génétiquement modifiés ? Quid du ressenti personnel de l'individu sur sa propre condition d'être "non naturel" ?

3. Au-delà de la réparation, avons-nous un recul suffisant sur les effets de modifications du génome ?

Dans les paragraphes précédents, il est surtout question de modifier ou supprimer un gène qui dysfonctionne, ce qui serait finalement l'équivalent accéléré de mutations génétiques naturelles et/ou épigénétiques que nous subissons au cours de l'évolution.

- **Cependant, qu'en est-il de l'ajout de nouveaux gènes ?**

L'introduction synthétique de nouveaux gènes pourrait avoir des impacts insoupçonnés. Nous manquons de recul sur toutes les fonctions des gènes ciblés. Intervenir sur le génome pourrait se révéler risqué.

Une des idées avancées à l'occasion de cette séance de réflexion sur l'édition du génome humain, et déjà abordée lors des séances sur le génome végétal et le génome animal, serait de se limiter à corriger des anomalies pathogènes, de s'interdire des mutations qui ne sont pas naturelles chez l'homme.

A fortiori, l'introduction de gènes exogènes aurait d'une part des impacts trop aléatoires et d'autre part s'écartent de la notion de soin pour rejoindre celle de la modification de l'espèce que nous aborderons plus loin.

Une dernière conséquence d'une utilisation abusive de l'édition du génome serait la perte de diversité. Comme on l'a vu dans le cas des plantes et des animaux, modifier notre génome peut diminuer nos capacités naturelles de lutte contre une multitude de maladies. Corriger des gènes nous empêcherait de nous adapter correctement à notre environnement.

Autres questionnements au-delà du soin

1. Les dérives transhumanistes et eugénistes ?

La technique d'édition du génome est-elle utile voire indispensable pour les aspects esthétiques et de performance ? Où est la limite ? Où se situe le seuil entre guérison et amélioration de l'individu ?

On sait aujourd'hui que les progrès technologiques passent par d'autres aspects que par la génétique. On peut déjà améliorer l'Homme sans passer par la manipulation du génome. Par exemple, les prothèses permettent aux athlètes des jeux paralympiques de battre des records de vitesse et de dépasser les performances des athlètes disposant de leurs deux jambes. Si des prothèses permettent de courir plus vite, des sportifs de haut niveau se feraient-ils amputer les jambes pour gagner des courses ?

L'histoire l'a prouvé, nous sommes déjà en mesure de faire des surhommes en les entraînant dès la naissance, sans qu'aucune modification de leur patrimoine génétique n'ait été effectuée. Serena et Venus Williams, joueuses de tennis de renommée mondiale, en sont une parfaite illustration. Des individus seraient-ils prêts à faire usage de modifications ciblées génomiques pour améliorer leurs compétences ? Celles de leurs enfants ?

Un autre point peut être soulevé : celui de la chirurgie esthétique. Aujourd'hui très développée, elle constitue une méthode abordable et légale de modifier son apparence, offrant à l'individu le choix de disposer de lui-même et de son corps et une grande liberté dans les modifications qu'il pourrait lui apporter.

Si des modifications purement esthétiques venaient à être autorisées sur l'embryon, par exemple la couleur des yeux, ne serait-ce pas un moyen égoïste de satisfaire les envies des parents alors même que cela concerne un individu qui n'est même pas encore né et n'est donc pas sensible à des effets de mode ?

Le franchissement de la frontière des modifications non vitales, guidées par des désirs esthétiques ou de performances physiques ou intellectuelles ne nous ferait-il pas basculer dans une société eugéniste et transhumaniste ?

2. Les troubles identitaires ?

Certaines anomalies génétiques viables sont considérées par certains groupes sociaux comme une caractéristique les définissant et faisant partie de leur identité. Une modification de cette caractéristique phénotypique serait perçue comme une dénaturation et un désir d'émancipation de cette communauté partageant ce trait.

Par exemple, certaines familles ne se constituent que de personnes malentendantes. Nous pourrions imaginer que c'est une maladie que nous éviterions aisément par édition du génome, mais si l'affection n'est pas assimilée à une pathologie mais une marque de naissance, quel serait le coût psychique de cette réparation ? Pouvons-nous encore parler de réparation lorsque ce trait n'est pas considéré comme une défaillance pour l'individu qui le porte ? Comment recueillir le consentement de l'individu concerné qui n'est pas encore né pour procéder à une telle rectification d'un caractère qui pourrait ne pas être vu comme une tare ?

Un des risques de l'utilisation à grande échelle de l'édition du génome est que cela devienne une norme sociétale. Chaque individu de cette société pourrait être libre d'opérer sur sa descendance des changements drastiques sur leur patrimoine génétique. Plus grossièrement, nous le ferions car les autres le feraient.

La thérapie génique ne serait plus un choix mais une nécessité pour convenir au modèle sociétal défini comme "idéal" : tous les traits pourraient être sujets à modification. Où serait la limite ? Pour étayer nos propos, nous avons mentionné durant la séance des affections dont la perception variait considérablement d'un individu concerné à l'autre comme certaines formes de cécité, de surdité, de nanisme... Pour certains, l'altération du gène responsable n'empêche pas l'accomplissement de leur vie.

Ces communautés sont à elles seules des réserves de diversité et si elles sont poussées à s'uniformiser via une pression sociale alors on perdrait cette diversité. Ainsi, le groupe s'accorde à dire que l'édition du génome peut s'avérer pertinente pour un individu qui en fait la demande et à des fins thérapeutiques pour éviter à la descendance des pathologies altérant les fonctions vitales et ne permettant pas un bien-être individuel suffisant, et si d'autres alternatives qui auraient pu s'avérer satisfaisantes ont échoué.

3. Le génome, patrimoine commun mondial, un profit ?

Les membres de ce groupe de réflexion éthique d'Occitanie se rejoignent sur l'opinion suivante : le génome humain est un patrimoine commun mondial et est donc non brevetable. Seules les techniques employées pour sa modification le sont. Les entreprises n'ont-elles pas tout intérêt à diriger leur recherche fondamentale et clinique vers la thérapie génique et l'édition du génome ?

Le groupe a tout de même émis une crainte quant au fait que certaines entreprises industrielles et pharmaceutiques pourrait se partager le monopole des modifications humaines thérapeutiques et pourquoi pas transhumanistes et devienne ainsi le grand ordonnateur planétaire impliquant une discrimination d'accès.

Applications en recherche

1. La recherche, un moyen d'amélioration ?

L'édition du génome à des fins d'amélioration de performance physique n'est pas quelque chose que le groupe de réflexion cautionne. Nous avons évoqué l'idée que l'amélioration des performances humaines était déjà possible par l'usage de prothèse ou d'exosquelettes. Cette augmentation des capacités intrinsèques de l'individu est d'ores-et-déjà une démarche transhumaniste dont l'idée ne séduit pas ce comité étudiant.

Cependant, nous ignorons à ce jour une grande partie de la recherche sur ce sujet, et notamment lorsqu'elle concerne les applications militaires. Nous n'avons pas eu l'occasion d'étayer nos propos sur ce sujet par manque de temps, bien que nous aurions jugé pertinent de le faire.

2. La recherche sur l'embryon est-elle recevable ?

Une étude de l'article de loi relative à la bioéthique sur la recherche sur l'embryon et les cellules souches peut s'avérer pertinente et apporter des éléments de réponse à nos interrogations, bien qu'elle puisse être remise en cause. Cet article mentionne notamment que la recherche sur les cellules souches humaines est autorisée depuis 2013, sous réserve d'une déclaration auprès de l'Agence de biomédecine. La recherche sur l'embryon, quant à elle, nécessite la soumission d'un projet et son autorisation pour débiter.

Néanmoins, aucune modification ne doit être entreprise sur la lignée germinale et un embryon faisant l'objet de recherche ne peut être implanté dans un utérus et doit être supprimé au bout de 14 jours après la fécondation. Des gamètes peuvent être créés à partir de cellules souches mais une fécondation à partir de ces gamètes est interdite : aucun embryon ne sera engendré par des cellules souches modifiées.

Ainsi une question subsiste : jusqu'à quelle semaine serait-il acceptable d'apporter des modifications sur l'embryon et le fœtus si tant est que la technique de Crispr-Cas9 obtienne son autorisation en embryologie humaine ?

Cette interrogation rejoint la controverse de la définition de l'embryon, doit-on le considérer comme un amas de cellules facilement modifiable ou comme un projet parental ? À partir de quel nombre de cellules considérons-nous que l'embryon représente un individu disposant de droits prédominant le droit de ses parents ?

Pour la thérapie par modification génomique ciblée la question ne se pose pas en ces termes. Si l'on veut modifier le génome de toutes les cellules, il faut générer la correction sur la première cellule, le zygote.

Pourtant, à 14 jours post-fécondation, l'embryon n'a pas encore commencé le développement du système nerveux. Aucune recherche sur les pathologies nerveuses n'est donc permise. Nous pourrions envisager de prolonger ce délai encadrant la recherche sur embryon humain. Mais, si nous pouvons le faire, le devons-nous pour autant ?

Le groupe n'a pas réussi à s'accorder sur cette question. Les risques de dérives sont le premier frein pour une opinion univoque sur l'utilisation de l'édition génomique sur l'embryon dans le cadre de la recherche.

CONCLUSION SUR LE GÉNOME HUMAIN

Le groupe d'étudiants s'exprime en défaveur de l'utilisation de l'édition génomique si elle s'inscrit dans un objectif d'amélioration des capacités humaines. Elle doit plutôt être encadrée et usée en cas de dernier recours pour soigner et guérir les pathologies qu'on identifiera comme telles.

La limite pour certains étudiants du comité s'arrête à la prise en charge, à l'heure actuelle, de maladies "monogéniques", afin d'introduire la technique de façon contenue et restreinte. La sévérité clinique d'une maladie qui guiderait la recevabilité d'une édition génomique pour s'en prémunir demeure une question en suspens.

Dresser une liste des applications pertinentes de la technique nous paraît être une tâche impossible aujourd'hui.

Le groupe s'accorde à dire, néanmoins, qu'une actualisation du cadre juridique autour des manipulations des génomes est essentielle.

Dans une ère en plein bouleversement des lois de bioéthique, surtout après l'affaire des jumelles modifiées en Chine, il est nécessaire d'opérer des révisions des lois en vigueur de façon très régulière et rigoureuse. Pour l'instant, une législation sur le travail sur l'embryon et les cellules souches semble complexe à élaborer si bien que le groupe ne se prononce pas sur l'édition génomique dans ce cadre.

À notre sens, un accord mondial sur les approches à mener vis-à-vis de Crispr-Cas9 est indispensable pour éviter une quelconque déviance de la technique à des fins purement esthétiques ou de performance de l'homme.

Si nous devons imaginer un texte encadrant les applications de l'édition du génome humain, nous citerions les points suivants :

- L'utilisation de la technique doit se faire en dernier recours, après échec des alternatives moins radicales. La priorité sera donnée à d'autres outils biotechnologiques (interférence à l'ARN, etc.).
- L'accessibilité à la technique doit être universelle : des inégalités socio-économiques ne sauraient être tolérées.
- Une évaluation de la balance bénéfico-risque doit nécessairement être effectuée avant chaque manipulation sur le génome.

- L'édition du génome doit s'inscrire dans un objectif thérapeutique et non pas préventif : des gènes prédisposants à une maladie ne seront pas la cible de modifications. Seuls les gènes dont la présence a un effet délétère avéré chez le porteur en feront l'objet.
- En cas de transgénèse additive, seuls des gènes déjà existants dans l'espèce-cible seront insérés ; aucun gène de synthèse ne serait ajouté. De cette manière, aucune nouvelle fonction ne serait introduite.
- Des essais cliniques sur un nombre limité de patients dans un premier temps sont à réaliser, avec une uniformisation du protocole employé pour des résultats significatifs.
- Une liste d'affections concernées par l'édition du génome doit être déterminée à l'échelle internationale.
- Un consentement libre et éclairé doit être recueilli auprès des individus qui auraient recours à la technique pour eux-mêmes ou leur progéniture.
- Des tests et accompagnements psychologiques des individus ayant recours à la technique ou des individus génétiquement modifiés doivent être prévus.

À ce jour, il n'existe pas de droit international sur ce sujet. Nous envisagerions un sommet planétaire sur l'édition du génome, soutenu par des organismes tel que l'UNESCO, pour garantir une unicité des politiques de bioéthique entre les pays.

Enfin, et nous rejoignons ce que nous avons pu évoquer pour le génome végétal et le génome animal, nous ne voudrions pas sacrifier la recherche d'alternatives moins radicales par l'emploi de l'édition du génome à des fins de préservation de la santé humaine.

Conclusion générale

Beaucoup de points abordés dans ce rapport sont, à ce jour, non réalisables, mais le groupe a choisi délibérément d'en discuter afin d'anticiper la réflexion citoyenne sur ces questions. La technologie évoluant extrêmement rapidement, il nous a paru prudent de ne pas parler que d'un futur à court terme mais aussi d'un potentiel à plus long terme. Les thématiques évoquées ont été traitées sans prendre en compte l'aspect de faisabilité technologique.

Le groupe a plusieurs fois exprimé une inquiétude face aux dérives possibles, qu'elles concernent les génomes végétaux, animaux ou humains. Une volonté de maîtrise a été prononcée. Un des points sur lesquels le groupe a insisté est l'accessibilité de ces applications. Une fracture socio-économique autour de ces innovations serait évitable à condition de ne pas les confier librement aux multinationales qui exerceraient du lobbying.

L'idée qui émane de notre réflexion est donc que l'on peut considérer l'édition comme une solution éthiquement acceptable si des alternatives ont été envisagées et déclinées pour leur insuffisance à répondre rapidement et à elles seules aux besoins sociétaux. Afin de ne pas chercher que les moyens de faciliter et récurrents, que ce soit chez les plantes, les animaux et l'humain. Car la technologie ne se posera pas comme solution à tous les enjeux, il faut pallier les possibles dérives. Il faut éviter de proposer une technique juste parce que celle-ci est dite "plus simple" sans prendre en compte les options moins radicales et celle avec lesquelles nous avons le recul suffisant.

Les idées d'applications ne manquent pas, la limite demeure l'acceptation sociétale et la mise en place d'un cadre couvrant celles qui sont envisageables.

L'importance de l'accès et la nécessité d'une gestion de l'édition du génome est apparue comme plus que nécessaire voire obligatoire quel que soit l'être vivant concerné et quel que soit les fins (utiles, de confort, de préservation, etc.).

La gestion passe par un suivi des effets, car la modification du vivant peut engendrer des effets imprévisibles.

Si la faisabilité est confirmée, que la technologie fonctionne, elle sera potentiellement applicable et donc une régulation est nécessaire.

Un texte de loi international sur le sujet a donc peu de chance d'être concluant. C'est pour cela qu'émane l'idée d'une charte éthique, basée sur les avis citoyens et de la communauté scientifique. La mise en place d'un garde-fou, d'une institution pour honorer cette charte et procéder à la gestion de l'accès à ces biotechnologies en toute transparence pour les citoyens nous a semblé primordial.

Enfin, si l'on conclut sur le point de vue du groupe de réflexion face au sujet abordé, il en ressort une expérience enrichissante.

L'opportunité que l'ERE Occitanie a offerte aux étudiants de pouvoir engager une discussion interdisciplinaire en réunissant différents corps de métier, a permis au groupe de grandir dans les connaissances techniques des procédés, dans des domaines extérieurs au champ de compétence étudié, mais également d'un point de vue citoyen. En tant que citoyens sensibilisés au thème du vivant, cela a permis d'axer le débat sur un point de vue purement éthique. Ces débats ont permis de prendre conscience, de façon plus concrète, de la multitude des enjeux et problématiques propres à chaque domaine.

L'utilité de ce papier, à son écriture, a été questionnée. Est-ce qu'un débat citoyen peut s'avérer pertinent en guise de garde-fou ? Mais cela reste et restera pour les membres de ce groupe, une réflexion citoyenne pertinente pour leur avenir. Pour la plupart, en tant que futur professionnel, avoir un avis critique est essentiel, et cela passe par des réflexions avec des pairs et des individus sensibilisés dans d'autres secteurs de connaissance pour avoir une ouverture d'esprit suffisante.

C'est une grande chance d'avoir eu l'occasion de pouvoir s'exprimer sur un sujet qui sera au centre des débats à l'avenir. En effet, nous serions les futurs applicateurs de ces techniques. Les modérateurs, que nous remercions fortement, ont permis un enrichissement de ces discussions et réflexions grâce à leur expérience.

La considération des avis citoyens, via plusieurs groupes de réflexion, servira de moteur de régulation pour les applications d'édition génomique à venir.

Titre : Édition des génomes animaux : état des lieux des applications, des évaluations éthiques, de la réglementation et des controverses

Auteur : Marie ZARADER

La modification du génome animal, en particulier par CRISPR-Cas9, représente une avancée majeure dans les domaines de la santé animale et publique, de la production agricole et de la biodiversité. Cette thèse présente un état des lieux des applications actuelles de ces techniques d'édition génomique dans les élevages, en se concentrant sur les aspects éthiques et la réglementation en vigueur. Bien que ces innovations puissent améliorer la résistance aux maladies et la productivité, elles soulèvent des préoccupations quant à la brevetabilité des espèces modifiées et aux impacts potentiels de leur dissémination sur les écosystèmes. De plus, les différences réglementaires entre l'Europe et d'autres régions, comme les États-Unis, révèlent la nécessité d'adapter rapidement les cadres législatifs à ces technologies émergentes. Enfin, cette recherche souligne l'importance d'un débat inclusif pour équilibrer les bénéfices technologiques avec les enjeux sociaux et environnementaux.

Mots-clés : CRISPR-Cas9, édition génomique, animaux génétiquement modifiés, réglementation, éthique, bien-être animal, biodiversité.

Title: Animal genome editing: Overview of applications, ethical evaluations, regulation, and controversies

Author: Marie ZARADER

Animal genome editing, particularly through CRISPR-Cas9, represents a major advancement in animal and public health, agricultural production, and biodiversity. This thesis provides an overview of the current applications of these genomic editing techniques in livestock, focusing on ethical aspects and current regulations. While these innovations may enhance disease resistance and productivity, they raise concerns about the patentability of modified species and the potential impacts of their dissemination on ecosystems. Additionally, regulatory differences between Europe and other regions, such as the United States, highlight the need to rapidly adapt legislative frameworks to these emerging technologies. Finally, this research emphasizes the importance of an inclusive debate to balance technological benefits with social and environmental challenges.

Keywords: CRISPR-Cas9, genome editing, genetically modified animals, regulation, ethics, animal welfare, biodiversity.