

**CELLULES GERMINALES PRIMORDIALES AVIAIRES AU CŒUR DES
AVANCEES DE LA CONSERVATION DES RESSOURCES GENETIQUES ET DE
L'EDITION DES GENOMES. L'EXEMPLE FRANÇAIS.**

**Amélie Juanchich¹, Sabine Alves², Jacky Ezagal¹, Maria Bernard^{3,4}, Christophe Klopp³,
Hervé Acloque⁴, Frédérique Pitel⁵, Christelle Hennequet-Antier¹, Aurélien Brionne¹,
Aurore Jacques², Celeste Le Bourhis⁶, Sylvie Rival-Gervier⁷, Bertrand Pain⁷, Marina
Govoroun²**

¹BOA, INRAE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

²PRC, INRAE, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

³Sigenae, INRAE, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁴GABI, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁵GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31326 Castanet Tolosan, France

⁶PEAT, INRAE, 37380 Nouzilly, France

⁷Univ Lyon, Université Lyon 1, INSERM, INRAE, Stem Cell and Brain Research Institute,
U1208, USC1361, 69500 Bron, France

marina.govoroun@inrae.fr

RÉSUMÉ

Les cellules germinales primordiales (PGCs pour « primordial germ cells ») sont des cellules souches de la lignée germinale, précurseurs des gamètes. Les PGCs aviaires peuvent être isolées grâce à leur accessibilité dans le jeune embryon et chez certaines espèces multipliées *in vitro*. Le progrès réalisé dans le système de culture des PGCs chez le poulet permet leur maintien et leur auto-renouvellement prolongés chez les deux sexes. Cela offre une possibilité de les modifier génétiquement et/ou les cryopréserver en nombre suffisant pour une utilisation ultérieure et notamment les transplanter dans un embryon receveur, où elles peuvent se développer en gamètes fonctionnels et donner une descendance. Grâce au développement de ces étapes, les PGCs de poulet cultivées *in vitro* représentent les cellules reproductrices de choix pour la conservation et restauration des ressources génétiques ainsi que l'édition du génome aviaire. Etant des cellules diploïdes, elles assurent la conservation et la restauration du génome complet des animaux des deux sexes. Dans ce contexte, nous avons développé à INRAE la maîtrise de cette biotechnologie de reproduction basée sur les PGCs chez le poulet et l'avons appliquée à la conservation et à la restauration des ressources génétiques de la Poule Noire du Berry ainsi qu'à l'édition du gène BCMO1. Nous avons réussi pour la première fois à restaurer un génotype en une seule génération ainsi qu'à obtenir les animaux porteurs du KO du gène BCMO1. Nous avons aussi étudié des facteurs qui pourraient lors des étapes *in vitro* impacter l'intégrité des PGCs et leur capacité de donner la descendance.

ABSTRACT

Primordial germ cells (PGCs) are the germ line stem cells, precursors of gametes. In Aves, PGCs can be isolated due to their accessibility in the early embryo and in some species propagated *in vitro*. The progress made in the *in vitro* culture of chicken PGCs allows their prolonged maintenance and self-renewal in both sexes. This offers the possibility to genetically modify and/or cryopreserve them in sufficient numbers for their later use. For example, they could be transplanted into a recipient embryo, where they may develop into functional gametes and produce offspring. Due to the development of these biotechnological steps, chicken PGCs propagated *in vitro* represent the reproductive cells of choice for the conservation and restoration of genetic diversity as well as the edition of avian genome. Being diploid cells, they ensure the conservation and restoration of the entire genome of animals of both sexes. In this context, we have developed at INRAE the reproductive biotechnology based on chicken PGCs and used it for the conservation and restoration of genetic resources of a local breed "la Poule Noire du Berry" as well as for the edition of BCMO1 gene. We succeeded for the first time in reviving a genotype in a single generation and in obtaining animals carrying the KO of BCMO1 gene. We also studied factors that could influence the integrity of PGCs during *in vitro* steps and their reproductive capacities.

INTRODUCTION

La protection des races aviaires anciennes à petits effectifs qui représentent d'une part un réservoir important de la diversité génétique et d'autre part sont menacées d'extinction, des souches commerciales et des lignées expérimentales précieuses nécessite la préservation de l'ensemble du génotype de l'animal. Les ovocytes et les zygotes des oiseaux sont très riches en lipides, ce qui ne permet pas leur cryoconservation. Pour cette raison, la conservation des ressources génétiques aviaires repose essentiellement sur la cryoconservation du sperme. Cependant la restauration du génotype en utilisant la semence cryoconservée n'est pas complète et nécessite de nombreuses générations successives d'insémination (Blesbois *et al.*, 2007). De plus, elle ne permet pas la conservation du chromosome sexuel W spécifique à la femelle. Les particularités de développement de l'ovocyte aviaire ainsi que celle de l'embryon n'ont pas non plus permis le développement de la transgénèse et de la génomique fonctionnelle chez les espèces aviaires à la même échelle que chez les mammifères ou les poissons. Effectivement, le clonage développé chez les mammifères ne peut pas être réalisé de la même manière chez l'oiseau (Panda *et al.*, 2021). La transgénèse par injection d'ADN dans le noyau n'est pas possible dans l'embryon, ni au stade une cellule comme chez les poissons car il est peu accessible et non transférable dans l'animal, ni dans l'embryon plus développé, comme chez les mammifères, puisque l'embryon d'oiseau compte déjà 25000-50000 cellules au moment de la ponte. Seule l'injection de vecteurs lentiviraux à haute concentration dans l'embryon juste après la ponte permet de modifier un maximum de cellules embryonnaires dont les cellules germinales qui représentent environ 0,11% des cellules à ce stade (Tzukenawa *et al.*, 2000), et ainsi obtenir une transmission germinale du transgène (McGrew *et al.*, 2004). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles biotechnologies de reproduction basées sur d'autres types de cellules reproductrices aviaires permettant de conserver efficacement les patrimoines génétiques et d'éditer le génome aviaire (Whyte *et al.*, 2016, Woodcock *et al.*, 2017).

Les précurseurs de la lignée germinale sont appelés cellules germinales primordiales (PGCs pour « primordial germ cells »). Les PGCs sont des cellules souches destinées à se développer en gamètes au sein de la gonade. Chez les espèces aviaires, grâce à leur formation précoce et à leurs particularités de migration dans l'embryon, les PGCs peuvent être isolées à partir de la structure extra embryonnaire appelée le croissant germinale (Song *et al.*, 2014) et avant la colonisation des gonades lors de leur transit

dans la circulation sanguine de l'embryon, où elles sont particulièrement accessibles pendant quelques heures. Les PGCs aviaires peuvent être également isolées à partir des gonades jusqu'à 9 jours d'incubation de l'embryon chez le poulet (Nakamura *et al.*, 2013). A ces stades embryonnaires, en particulier aux stades prégonadiques, les PGCs sont présents en très petit nombre et doivent être multipliées pour être utilisées efficacement pour les biotechnologies de reproduction. Les PGC isolées du poulet, peuvent être cultivées et amplifiées *in vitro*, cryoconservées et/ou transplantées dans des embryons hôtes. Cette transplantation est effectuée par injection dans l'aorte dorsale, au stade où les PGCs circulent dans le système sanguin et migrent dans les gonades. De même, les PGCs de canard peuvent être isolées, amplifiées et injectées dans des embryons receveurs (Chen *et al.*, 2019). Les PGCs injectées peuvent ensuite se développer en gamètes fonctionnels dans les gonades du receveur (van de Lavoie *et al.*, 2006). Un animal dont les gonades contiennent les cellules germinales d'un autre animal en même temps que ses propres cellules germinales est appelé chimère germinale. Chez la volaille, le développement de ces méthodes rend incontournable l'utilisation des PGCs pour la conservation des ressources génétiques, offrant la possibilité de préserver le génome diploïde complet des deux sexes et de restaurer rapidement les génotypes conservés (Nandi *et al.*, 2016, Woodcock *et al.*, 2019). Ces biotechnologies permettent aussi d'utiliser les PGCs en tant que véhicule efficace pour l'édition du génome aviaire (Woodcock *et al.*, 2017, Panda *et al.*, 2021). Leurs différentes étapes sont présentées sur la Figure 1.

1. LES AVANCEES DE LA GESTION DES RESSOURCES GENETIQUES AVIAIRES EN UTILISANT LES PGCs

1.1 Développement des cultures *in vitro* des PGCs

Le poulet est l'unique espèce pour laquelle les méthodes de culture *in vitro* permettant la multiplication prolongée des PGCs sont bien maîtrisées. Le premier système de culture développé à ces fins était basé sur le milieu conçu initialement pour la croissance des cellules pluripotentes de la souris. Il impliquait l'utilisation des cellules nourricières et la supplémentation par du sérum de veau fœtal (SVF), du sérum de poulet et des facteurs de croissance stem cell factors (SCF) et fibroblast growth factor (FGF) (van de Lavoie *et al.*, 2006). Il a permis de dériver des cultures (i.e. obtenir une culture d'un type de cellules à partir d'un prélèvement biologique contenant plusieurs types cellulaires ou d'un autre type cellulaire) de longue durée des PGCs principalement mâles qui ont donné une descendance

après leur injection dans l'embryon hôte. Cependant, le taux de dérivation des cultures de PGCs à partir des embryons individuels était faible (12,3 % pour les cultures mâles et 1,7 % pour les cultures femelles) et les PGCs femelles ne pouvaient pas être maintenues en culture au-delà de 79-110 jours. Effectivement, comme ont montré les travaux postérieurs d'autres laboratoires, ce milieu de culture et les milieux de culture similaires sont peu ou pas efficaces pour dériver des cultures de PGCs femelles, qui présentent pourtant un intérêt majeur pour cette biotechnologie par rapport à la cryopréservation de sperme. (Macdonald *et al.*, 2010, Song *et al.*, 2014).

Les travaux de l'équipe de M. McGrew ont révolutionné le système de culture des PGCs de poulet en proposant un milieu de culture sans cellules nourricières et sans sérum permettant de dériver et de multiplier indéfiniment les PGCs des deux sexes (Whyte *et al.*, 2015, Nandi *et al.* 2016). Les travaux de cette équipe ont permis d'identifier les facteurs indispensables pour la prolifération des PGCs des deux sexes *in vitro* et la conservation de leur compétence germinale en culture jusqu'à la production de la descendance. Parmi ces facteurs figurent l'osmolarité adaptée aux PGCs du poulet, des concentrations basses en calcium et la supplémentation par de l'héparine pour diminuer l'aggrégation des PGCs femelles, l'ovotransferrine, les facteurs de signalisation FGF, l'activine et/ou BMPs (pour bone morphogenetic protein) et l'insuline pour l'autorenouveau des PGCs. En conclusion ces dernières avancées ont permis l'obtention des cultures de PGCs des deux sexes avec un taux de réussite allant jusqu'à 90%. Nos propres expériences ont permis d'obtenir un taux de dérivation de culture de PGCs des deux sexes à partir des embryons individuels dépassant 90% dans ce dernier milieu de culture. Cependant, selon le fond génétique les variations importantes des taux de dérivation des cultures de PGCs peuvent être également observées (Lázár, *et al.*, 2021).

1.2 Transmission germinale des PGCs dérivées en culture et les facteurs l'influençant.

Le taux de transmission germinale des PGCs dérivées *in vitro* est connu pour être très variable. Ainsi le taux de transmission germinale des PGCs prélevées lors de leur migration dans les gonades et cultivées dans le milieu KO-DMEM conditionné par les cellules nourricières et supplémenté par SVF, SCF et FGF pouvait varier de 1 à 84% pour les PGCs mâles de la même culture et de 1 à 69 % pour les PGCs femelles de la même culture lors des transplantation unisexe (les PGCs donneuses et l'embryon receveur sont de même sexe) (van de Lavoie *et al.*, 2006). Les

variations similaires ont été rapportées pour les cultures de PGCs prélevées du croissant germinales et des gonades (Song *et al.*, 2014). Le taux de transmission germinale pour différentes cultures de PGCs est également connu pour être variable. Par exemple, pour 7 cultures différentes de PGCs mâles du poulet Barred Plymouth Rock (BPR), la transmission germinale maximale variait de 1 à 86 % et pour 2 cultures différentes de PGCs femelles BPR elle variait de 12 à 69% pour la même quantité de PGCs injectées dans l'embryon hôte lors des transplantations unisexes (van de Lavoie *et al.*, 2014). Les variations observées pour une même culture peuvent dépendre de la qualité d'injection et de la compétition des PGCs donneuses avec les PGCs endogènes de différents hôtes. Celles observées pour les cultures de PGCs différentes, peuvent dépendre des particularités intrinsèques (génétique, épigénétique) de chaque culture ainsi que du contexte de l'hôte. Des variations des taux de transmission germinale des PGCs dérivées dans le milieu KO DMEM aviaire, supplémenté en sérum de poulet, insuline, Activine A et FGF ont également été observées. Pour les PGCs femelles cultivées dans ce milieu, cryopréservées et réamplifiées *in vitro* dans le même milieu ce taux variait de 44 à 134% pour la même culture et pour les PGCs mâles il était de 5% lors des transplantations unisexes (Whyte *et al.*, 2015). Cela indique que le milieu de culture pourrait influencer de manière sexe spécifique la capacité des PGCs à entrer en compétition avec les cellules endogènes de l'hôte. En comparaison avec cette étude, des différences dans les taux de transmission germinale entre les PGCs mâles et femelles n'ont pas été observées pour le milieu décrit par van de Lavoie (van de Lavoie *et al.*, 2006, Song *et al.*, 2014). En revanche, la fréquence de dérivation des cultures de PGCs mâles dans ce dernier milieu était plus importante que celle des PGCs femelles. Ces données suggèrent que les différents milieux de culture peuvent affecter différemment la qualité des PGCs en fonction de leur sexe. D'autres facteurs peuvent influencer le taux de transmission germinale tels que la durée de culture qui conditionne le nombre de divisions que les PGCs subissent en culture. Il a été montré que les PGCs femelles après 6 mois de culture se développaient moins bien que les PGCs femelles après 3 mois ou moins de cultures après leur injection dans le même embryon hôte et contribuait très peu à la descendance (Woodcock *et al.*, 2019). Les PGCs mâles cultivées pendant 3 mois se développaient dans la gonade hôte jusqu'aux gamètes, mais n'étaient pas capable de concourir avec les gamètes endogènes pour fertiliser l'ovocyte et donner une descendance. Il a aussi été montré que si les PGCs des poulets de chair dérivées en culture étaient injectées dans les embryons hôtes des lignées pondeuses elles n'étaient pas capables de donner une descendance (Woodcock *et al.*, 2019). Le taux de transmission germinale par les PGCs dérivées *in vitro* lors de la transplantation

unisexe est donc une valeur assez aléatoire et la nature de ce phénomène semble être multifactorielle et dont les mécanismes ne sont pas bien compris. Lors de la transplantation intersexe des PGCs dérivées *in vitro* dans la plupart des cas décrits, la descendance du donneur n'a pas été obtenue. Cependant, les PGCs des donneurs ZZ dérivées *in vitro* se différenciaient en ovocytes fonctionnels et produisaient une progéniture après transplantation dans un embryon hôte ZW partiellement stérilisé (Liu *et al.*, 2017). Les différents exemples cités montrent que le taux de transmission germinale des PGCs dérivées *in vitro* dépend des facteurs environnementaux *in vitro* et *in vivo* et des facteurs intrinsèques des PGCs. On peut penser que ces différents facteurs affectent finalement la capacité des PGCs du donneur à concurrencer les PGCs endogènes de l'hôte à différents stades du développement postnatal jusqu'à la production des gamètes et pour les spermatozoïdes jusqu'à la fertilisation.

1.3 Développement des hôtes stériles pour la transplantation des PGCs exogènes.

Pour pallier au problème de compétition avec les PGCs endogènes et améliorer la transmission germinale du matériel génétique du donneur, il est pertinent d'éliminer les PGCs de l'hôte en le rendant stérile. Des oiseaux stériles peuvent être obtenus naturellement par croisement entre différentes espèces (ex. canard mulard, hybrides faisan-poulet, pintade-poulet). Ces hybrides présentent un intérêt en tant que hôtes potentiels pour les PGCs exogènes. La colonisation des gonades des embryons hybrides pintade-poulet par des PGCs de poulet dérivées *in vitro* et leur développement jusqu'au jour 18 d'incubation a été montré mais leur descendance n'a pas été décrite (Molnár *et al.*, 2019). Récemment deux types d'hôtes stériles ont été créés par édition du génome. Le premier est le résultat du Knock-Out (KO) du gène DEAD-Box Helicase 4 (DDX4) spécifique à la lignée germinale et localisé sur le chromosome Z (Taylor *et al.*, 2017, Woodcock *et al.*, 2019). Les coqs portent cette modification génétique à l'état hétérozygote (Z+Z-) et sont fertiles, tandis que chez les poules le KO est total (Z-W) conduisant à leur stérilité complète. Les femelles stériles (Z-W) utilisées en tant que hôtes pour les PGCs du donneur produisent la descendance 100% issus du donneur. Le deuxième hôte stérile contient une modification génétique Knock-In (KI) consistant en l'insertion du transgène codant pour la protéine caspase 9 humaine inductible (iCaspase 9) sous le contrôle du locus du gène DAZL spécifique des cellules germinales. L'induction de l'iCaspase 9 provoque la mort des PGCs endogènes aux stades embryonnaires précoces conduisant à la stérilité chez les deux sexes (Ballantyne *et al.*, 2021). L'utilisation de cet hôte

stérile a permis d'obtenir 100% de la descendance issue des PGCs du donneur chez les deux sexes. De plus, un receveur stérile permet de multiplier les génotypes des PGCs transplantées et obtenir une descendance issue de différents génotypes donneurs. Cela offre un grand potentiel pour la gestion des ressources génétiques aviaires en permettant de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés comme receveurs, ainsi que le nombre de leurs descendants pour restaurer un génotype étant donné que toute la descendance sera issue de PGCs du donneur. Cela permet aussi de s'affranchir de lourdes procédures de génotypage, onéreuses et pas toujours faciles à mettre en œuvre chez certaines espèces aviaires. Les receveurs stériles iCaspase 9 permettent aussi le développement et la différenciation des PGCs issues d'un donneur de sexe différent de celui du receveur. Effectivement, les PGCs des donneurs mâles se développent dans les gonades des receveurs iCaspase 9 femelles en ovocytes fonctionnelles pouvant donner la descendance. De même, les PGCs des donneurs femelles se développent dans les gonades des receveurs iCaspase 9 mâles en spermatozoïdes fonctionnelles pouvant donner une descendance, mais uniquement mâles, suggérant que les spermatozoïdes W sont soit absents soit non fonctionnels (Ballantyne *et al.*, 2021).

Cependant, un seul laboratoire dans le monde dispose actuellement de ces animaux édités pour être stérile. Se pose également la question d'acceptation par la société de l'utilisation d'animaux transgéniques pour la restauration de ressources génétiques avicoles aussi bien d'élevage que sauvage. Dans ce contexte, il est nécessaire de faire un travail de vulgarisation et d'explication des avantages pour l'éthique animale, notamment concernant la règle des 3 R (Réduction, Remplacement, Raffinement) de l'utilisation d'animaux stérilisés par ingénierie génétique. Il faut aussi expliquer qu'il n'existe pas de risques concernant la transmission potentielle d'un transgène ou de la mutation à leurs descendances, puisque les PGCs du donneur ne sont pas génétiquement modifiées. En attendant de pouvoir utiliser ces animaux stériles, il faut continuer à explorer comment améliorer la transmission germinale des PGCs du donneur transplantées dans un hôte génétiquement non modifié et donc produisant ses propres gamètes. Il serait intéressant dans ce contexte de repérer des lignées/souches qui ont naturellement des problèmes de fertilité et tester si nous pourrions améliorer la transmission germinale des PGCs des donneurs en utilisant ces animaux comme receveurs.

2. EXEMPLE FRANÇAIS : CONSERVATION DE LA POULE NOIRE DU BERRY.

Ces dernières années, nous avons mis en place à INRAE un dispositif complet de conservation et de restauration des ressources génétiques du poulet, basé sur les PGCs dérivées *in vitro* et cryoconservées à travers les projets nationaux et internationaux (VALBIODI - projet région Centre, CRB ANIM - projet national infrastructure, IMAGE - H2020). Le modèle utilisé est la Poule Noire du Berry (NB), une race locale à petit effectif, en danger de disparition, de valeur mixte domestiqué et implantée dans la région Centre-Val de Loire depuis plus de 100 ans.

2.1 Etapes *in vitro*. L'impact sur l'intégrité des PGCs.

Nous avons développé des cultures de PGCs NB pérennes en utilisant le milieu de culture compatible avec la prolifération des PGCs des deux sexes (Whyte *et al.*, 2015) avec des modifications mineures. Nous avons dérivé des dizaines de cultures de PGCs mâles et femelles à partir des embryons individuels et optimisé la procédure qui nous a permis d'obtenir le taux de dérivation de culture allant au-delà de 90%. Ces cellules exprimaient les marqueurs des cellules germinales et souches et montraient une bonne efficacité de colonisation des gonades. Comme les étapes *in vitro* sont susceptibles d'influencer la qualité des PGCs, c'est-à-dire leur aptitude à se développer jusqu'aux gamètes fonctionnels et donner une descendance, nous avons étudié leur impact sur l'intégrité moléculaire des PGCs. Nous avons mis en évidence par le séquençage du transcriptome (RNAseq) et l'analyse du méthylome par RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) que la durée de culture (plus de 6 mois en culture) affectait le transcriptome et la méthylation de l'ADN des PGCs et que cet effet était significativement plus marqué chez les PGCs mâles que chez les PGCs femelles. Il est intéressant de noter que les PGCs mâles dérivés dans le même milieu de culture que les PGCs femelles ont montré un taux de transmission germinale plus faible que ces dernières. Il est donc possible que les PGCs mâles soient plus sensibles à ce milieu de culture que les PGCs femelles. Pour comprendre les mécanismes moléculaires qui pourraient être impliqués dans ce phénomène, nous avons comparé le phénotype moléculaire des PGCs mâles et femelles. Nous avons montré grâce à une étude protéomique que malgré l'état indifférencié bipotentiel des PGCs prégonadiques au regard du sexe, elles présentaient des différences importantes d'abondance de protéines entre les deux sexes. Ainsi nous avons mis en évidence l'identité sexuelle précoces des PGCs prégonadiques indépendante des hormones sexuelles et du contexte gonadique et mis en avant le rôle des chromosomes sexuels dans ce phénomène (Soler *et al.*, 2021). Les analyses du transcriptome par RNAseq et de la méthylation de l'ADN par RRBS ont montré que les différences sexuelles des PGCs prégonadiques étaient présentes aussi aux niveaux du transcriptome

et du méthylome et qu'elles variaient en fonction de la durée de culture. Ces données renforcent l'hypothèse que les PGCs peuvent présenter une sensibilité différente envers le milieu de culture en fonction du sexe, ce qui peut avoir un impact sur leur capacité de procréation. Nous avons également étudié l'effet de la cryopréservation sur l'intégrité moléculaire des PGCs. Sous le terme cryopréservation nous incluons l'ensemble des quatre étapes : la congélation des PGCs, le stockage des PGCs congelées, leur décongélation et leur réamplification en culture. Nous avons montré que la cryopréservation n'avait que très peu d'impact sur le transcriptome des PGCs, et peu d'impact sur la méthylation de leur ADN. Ces résultats suggèrent que les étapes *in vitro* doivent être mieux adaptées au sexe des PGCs à travers notamment l'étude de la fonction des gènes dont l'expression change durant les cultures.

2.2 Etapes *in vivo*. Restauration du génotype

Nous avons mis en place un dispositif fonctionnel d'obtention de la descendance à partir des PGCs NB cryopréservées. Les chimères germinales ont été obtenues par injection de PGCs NB dérivées *in vitro* et cryopréservées dans des embryons hôtes Rhode Island (RI). Pour cela, des PGCs issus de 12 cultures ont été injectées dans les embryons RI dont trois cultures de PGCs mâles et trois cultures de PGCs femelles cryopréservées après 1 et 9 mois de culture chacune. L'éclosabilité des poussins chimères germinales potentielles était en moyenne de 30%. Pour évaluer le taux de transmission germinale des PGCs NB les chimères germinales NB-RI potentielles ont été croisées à l'âge de la maturité sexuelle avec les animaux RI. La couleur noire des animaux NB est dominante dans ce croisement, donc les poussins noirs nés de ce croisement sont hybrides et contiennent la moitié du génome des PGCs NB. 18 à 50% des chimères germinales potentielles femelles unisexes selon la culture injectée ont eu une partie de leur descendance de la couleur noire. Une chimère germinale femelle intersexe sur l'ensemble des chimères germinales potentielles femelles intersexes testées a donné un poussin noir. Parmi les chimères germinales potentielles mâles unisexes 0 à 100% d'animaux selon la culture injectée ont produit une partie de la descendance de la couleur noire. Aucune chimère germinale potentielle mâle intersexe n'a produit de poussins noirs. La transmission germinale moyenne des PGCs NB femelles après 1 mois de culture par les chimères germinales unisexes variait de 12 à 74 % selon la culture et en moyenne était de 52%. En revanche la transmission germinale des cultures de PGCs femelles après 9 mois de culture variait de 3,8 à 33% selon la culture et en moyenne étaient de 14,7%. Cela suggère que la durée de culture affecte non seulement leur intégrité moléculaire, mais également leur capacité de produire une descendance dans l'environnement de la gonade hôte. La

transmission germinale des PGCs mâles après 1 mois de culture étaient plus modeste. Elle variait de 3,8 à 43% et en moyenne était de 13,8 %, donc nettement inférieure à celle des PGCs femelles après 1 mois de culture. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents décrits pour le milieu de culture similaire à celui utilisé pour les PGCs NB (Whyte *et al.*, 2015). En se basant sur nos données, nous n'avons pas pu conclure sur l'influence de la durée de culture sur le taux de transmission germinale des PGCs mâles aux vues des effectifs faibles de chimères germinales potentielles mâles qui ont été obtenus.

Pour explorer la possibilité de restauration du génotype en une seule génération nous avons croisé une chimère germinale femelle avec une chimère germinale mâle qui ont montré au préalable les taux de transmission germinale les plus élevées pour les PGCs NB. Sur 23 poussins nés de ce croisement 7 poussins étaient noirs. Parmi ces derniers un poussin a été confirmé être homozygote par génotypage. C'est la première fois que le génotype complet du donneur a été obtenu en utilisant uniquement les PGCs cryoconservées et transplantées dans un hôte non stérile.

L'ensemble de ces résultats montre que les PGCs cultivées *in vitro* et cryopréservées représentent un dispositif efficace pour conserver et restaurer les ressources génétiques du poulet et offrent une possibilité de restaurer le génotype en une seule génération. Cependant plusieurs facteurs comme la durée de culture de PGCs et leur compétition avec les cellules germinales endogènes de l'hôte doivent être pris en compte et être explorés pour améliorer l'efficacité de cette nouvelle biotechnologie de la reproduction.

2.3 Exemple de la stratégie de conservation de la Poule Noire du Berry basée sur les PGCs: du terrain à la cryobanque nationale.

La Poule Noire du Berry est la première race à bénéficier d'une stratégie de conservation par les cellules germinales diploïdes PGCs, qui ont complété la collection de la semence de la poule NB de la cryobanque nationale. Pour cela nous avons choisi deux approches. La première consistait à choisir des animaux pour les accouplements, à produire les embryons à partir de chaque couple identifié, à dériver les cultures de PGCs à partir de ces embryons, à les sexer et cryopréserver. Ainsi nous avons cryoconservé sous forme de PGCs 24 embryons issus de 6 couples différents. Cette approche a été appliquée aux animaux qui étaient reproduits à INRAE pendant 6 générations et étaient bien habitués à l'insémination artificielle. Nous avons conservé aussi l'ADN des parents de chaque embryon ayant servi à la production des cultures des PGCs pour assurer le traçage du pedigree. Cette approche est

intéressante pour conserver des animaux particuliers avec des performances intéressantes préalablement connues. Cependant pour conserver la diversité génétique il peut y avoir aussi un intérêt de conserver des animaux de petits élevages, élevés en plein air et qui ne sont pas habitués aux manipulations et à l'insémination artificielle. Nous avons donc réalisé une deuxième approche toujours sur le modèle NB, dans laquelle les animaux ont été fournis par la ferme de Plume-Cane à INRAE à l'âge de la maturité sexuelle. Les animaux se sont accouplés naturellement et les œufs ont été régulièrement ramassés pour prélèvement et culture des PGCs. Ainsi 12 embryons mâles et 12 embryons femelles ont été cryoconservés sous forme de PGCs. Les animaux après avoir passé 2 mois à INRAE ont été rendus à la ferme. En principe, les œufs peuvent être ramassés directement sur le terrain et envoyés pour la conservation des PGCs au laboratoire.

En conclusion l'approche de conservation des ressources génétiques par PGCs offre en plus d'une restauration rapide du génotype à 100%, une souplesse de collecte du matériel sur le terrain et peut donc servir aux différents objectifs de la conservation.

3. DEVELOPPEMENT DE L'EDITION DU GENOME CHEZ LE POULET GRACE A L'UTILISATION DES PGCS

3.1 Etat des lieux dans le domaine

3.1.1 L'édition du génome par le système CRISPR

En 2012, les laboratoires d'Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna ont publié la fonctionnalité du système CRISPR dans les cellules eucaryotes (Jinek, M. *et al.*, 2012). Depuis, le champ d'application de cette technologie pour la modification du génome a explosé. De nombreuses revues sur le sujet permettent d'avoir une vision générale de la technologie et de ses applications (Ducos *et al.*, 2018 ; Komor A. *et al.*, 2017 ; Zhang F., 2019). La technologie d'édition génomique CRISPR repose sur l'utilisation d'une nucléase bactérienne guidée par une molécule d'ARN guide vers un site génomique où elle effectue une coupure double-brin de l'ADN. Différentes nucléases peuvent être utilisées (Cas9, Cpf1...) en fonction de la séquence génomique à cibler et du type de mutation recherchée. La cellule va alors réparer cette coupure en suivant le plus souvent les deux mécanismes suivants (Ceccaldi R. *et al.*, 2016) :

- le mécanisme NHEJ (Non Homologous End Joining) où la réparation de la coupure s'effectue

en ligant les extrémités de l'ADN. Ce processus conduit fréquemment à des erreurs de réparation et introduit des mutations aléatoires appelées indels (insertions ou délétions). Ce mécanisme est utilisé pour l'invalidation de gènes (KO).

- le mécanisme de recombinaison homologue (Homology Directed Repair ou HDR) par lequel la cellule utilise une matrice d'ADN comme modèle de réparation. L'HDR est utilisé pour l'introduction de manière ciblée dans le génome de mutations ponctuelles ou l'insertion de petites séquences (KI) en fournissant des ADN matrices (Yang H. *et al.*, 2014).

3.1.2 Dernières avancées de l'édition de génome chez le poulet dans le monde

L'édition du génome chez la volaille, en particulier chez le poulet, est principalement effectuée à l'aide de PGCs cultivées *in vitro* (PGC) (Figure 1). En effet, les PGCs dérivées *in vitro* peuvent être éditées, puis sélectionnées pour la présence de la mutation, clonées. Les clones peuvent ensuite être amplifiés et cryopréservés. Par la suite, les PGCs modifiées sont injectées dans l'embryon hôte afin d'obtenir un animal édité, porteur de la mutation, en suivant les mêmes étapes utilisées pour la restauration des ressources génétiques décrites dans la section 1 (Figure 1). La maîtrise de la culture *in vitro* des PGCs est donc absolument essentielle à la réussite de l'édition du génome chez le poulet et les autres espèces d'oiseaux.

Récemment, à l'aide de PGCs cultivées et du système CRISPR, l'édition du génome du poulet a été réalisée avec succès par différentes équipes de recherche dans le monde. Le premier poulet dont le génome a été modifié par le système CRISPR/Cas9 a été signalé en 2016. Dans cette étude, l'ovomucoïde (OVM), un allergène majeur du blanc d'œuf, a été éliminé chez le poulet à l'aide de CRISPR/Cas9 (Oishi I. *et al.*, 2016). Cette étude a démontré que la mutagenèse ciblée médiée par le système CRISPR/Cas9 pouvait être réalisée avec succès dans les PGC de poulet, entraînant une production efficace de poulets dont le génome était modifié. Par la suite, le knock-out de la myostatine (MSTN) et du gène de commutation G0/G1 (G0S2) chez le poulet a été réalisé à l'aide du système CRISPR/Cas9 (Park T.S. *et al.*, 2019 ; Kim G.D *et al.*, 2020). En parallèle, l'introduction de cassettes de gènes exogènes par HDR a été réalisée avec succès chez le poulet en utilisant aussi le système CRISPR/Cas9. En 2016, un site loxP a été introduit dans la région variable de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH) à l'aide de la HDR médiée par CRISPR/Cas9, et un poulet édité a été produit

(Dimitrov L. *et al.*, 2016). Cette étude a été la première à montrer que le ciblage génique médié par HDR peut être réalisé avec succès dans les PGC de poulet à l'aide de CRISPR/Cas9. Par la suite, en 2018, l'introduction du gène codant pour l'interféron β humain (hIFN- β) a été ciblée sur le locus de l'ovalbumine par HDR médiée par CRISPR/Cas9, ce qui a conduit à l'accumulation de hIFN- β dans le blanc d'œuf des poules porteuses de cette modification (Oishi I. *et al.*, 2018). Chez la volaille, le knock-in médié par NHEJ a été signalé pour la première fois en 2018. Dans cette étude, une cassette d'expression de la protéine fluorescente verte (GFP) a été ciblée sur un locus entre la sous-famille A, membre 1 de l'homologue DNAJ (DNAJA1) et le régulateur de réplication de l'ADN et le facteur spliceosomal. (SMU1) du chromosome Z, résultant en la production réussie de poulets exprimant la GFP qui peuvent être utilisés comme modèle de sexage aviaire (Lee H.J *et al.*, 2019). Très récemment, le KI inducible d'iCaspase 9 humaine réalisé grâce à la technologie CRISPR a été rapporté (Ballantyne M. *et al.*, 2021). Les animaux présentent une stérilité inducible femelle et mâle dont l'utilité a été décrite précédemment. Ainsi, ces études ont montré que l'édition du génome médiée par CRISPR/Cas9, y compris la mutagenèse ciblée et le ciblage génique médié par HDR/NHEJ, pouvait être menée avec succès dans des PGC cultivées pour produire de la volaille à génome modifié. Un résumé des différentes études est présenté dans le tableau 1.

3.1.3 Enjeux pour la recherche et la durabilité des élevages

Bien que la question de l'utilisation des « New Breeding Technologies (NBTs) » en élevage ne soit pas d'actualité en Europe et encore moins en France, la recherche doit aujourd'hui maîtriser ces techniques pour pouvoir les évaluer de façon critique mais aussi les utiliser comme outil puissant d'amélioration des connaissances sur les mécanismes d'élaboration des phénotypes. Si le développement des productions animales a pendant longtemps été porté par l'amélioration des caractères de productivité, l'analyse de leur durabilité met aujourd'hui en exergue la nécessité d'améliorer d'autres types de critères liés à la robustesse de l'animal (capacité à vivre et à se reproduire en bonne santé) et à la qualité de ses produits. Les études scientifiques utilisant l'édition du génome se portent donc naturellement vers ce type de caractères. La résistance aux maladies est un enjeu important de l'élevage avicole dans un contexte de grippe aviaire périodique mais aussi d'autres maladies ayant des impacts importants sur le rendement économique des élevages. Dans ce contexte, l'édition du génome peut apporter un certain nombre de solutions.

3.2 Développement en France : l'exemple du projet INRAE CRISP'CHICK

3.2.1 Objectifs du projet

L'objectif du projet CRISP'CHICK est de faire la démonstration de la maîtrise fonctionnelle des outils d'édition du génome chez le poulet à INRAE en caractérisant *in vivo* quelques-uns des acteurs moléculaires impliqués dans différents phénotypes d'intérêt. Pour cela, le projet rassemble des expertises complémentaires en génétique moléculaire, biotechnologies de la reproduction, expérimentation et phénotypage. Plusieurs gènes candidats issus des travaux des équipes ont été choisis pour cette étude pilote, et le projet commence par l'invalidation du gène BCMO1 chez le poulet.

3.2.2 Premiers résultats : production d'une lignée éditée pour le gène BCMO1

Le rôle principal de BCMO1 est la conversion des β -caroténoïdes au niveau intestinal. En effet, BCMO1 code pour une enzyme clé de la voie majeure de conversion du β -carotène en vitamine A. Il a aussi été identifié comme gène candidat pour le déterminisme de la couleur de la viande du poulet (Le Bihan Duval E. *et al.*, 2011 ; Jlali M. *et al.*, 2014). Différents polymorphismes en lien avec le caractère ont été identifiés chez le poulet. Si des régulations au niveau intestinal ont été mises à jour *in vitro* (Praud C. *et al.*, 2017), le mode d'action du gène et les effets biologiques associés restent à être élucidés *in vivo*. De plus, le gène BCMO1 se trouve dans une région QTL identifiée en lien avec l'efficacité digestive illustrant ses effets pléiotropes. Ce gène apparaît comme un excellent candidat pour l'étude des interactions entre la capacité digestive, le métabolisme des caroténoïdes et plus largement des lipides, et la qualité des produits.

Le projet se décline donc en plusieurs étapes : la production des cellules reproductrices (cellules germinales primordiales ou PGCs) exprimant la GFP et éditées pour le gène d'intérêt, l'injection de ces cellules dans des embryons receveurs, l'éclosion et l'élevage des animaux dont la première génération F0 est porteuse germinale de la mutation, et dont les générations suivantes sont porteuses germinales et somatiques de la mutation. Le projet permet ainsi la création de lignées expérimentales en vue de la caractérisation fine du phénotype en lien avec la mutation chez le poulet.

Les PGCs de la lignée expérimentale INRAE X33 (souche Label) ont été dérivées *in vitro* selon le protocole décrit par Whyte J. *et al.*, 2015. Le gène codant pour la GFP ainsi qu'une cassette d'antibiorésistance Hygromicine ont été introduits aléatoirement dans le génome des cellules par transfection chimique (Lipofectamine, Invitrogen). La fluorescence a été observée dans les cellules, celles-ci étant sélectionnées grâce à la cassette d'antibiorésistance Hygromicine. Les PGCs GFP positives ont été utilisées comme support pour l'édition du gène BCMO1. L'invalidation du gène BCMO1 a été réalisée par l'électroporation conjointe de deux ARN guides ciblant le gène BCMO1 et la nucléase CPF1. Les PGCs électroporées ont été isolées par dilution sériée, une par puit de culture distincts afin de pouvoir produire des lignées de PGCs indépendantes et porteuses de la mutation de façon clonale. Chaque lignée a été séquencée pour la présence de la mutation dans le gène BCMO1. Une lignée femelle et une lignée mâle ont été sélectionnées pour la production d'animaux édités *in vivo*. Les PGCs d'intérêt ont aussi été cryoconservées.

Les deux lignées mâles et femelles de PGCs ont été injectées dans des embryons receveurs (Figure 1). Les poussins issus de ces embryons sont donc potentiellement porteurs germinales de la mutation BCMO1. Ce sont les animaux F0 du projet, qui ont été croisés pour produire des animaux F1, porteurs germinales et somatiques de la mutation. La présence du gène GFP dans l'ADN des spermatozoïdes des coqs F0 a été détectée par PCR pour optimiser les croisements et ainsi la transmission germinale des PGCs injectées. Le gène a été détecté chez les 16 coqs mais la quantité de GFP était variable entre les coqs. Chaque semaine, les coqs ayant le plus de spermatozoïdes avec de la GFP dans leur semence ont été sélectionnés pour les inséminations artificielles. Les poussins F1 issus du croisement des animaux F0 ont été génotypés pour la présence dans leur génome du gène GFP, présent seulement dans les PGCs éditées. Nous avons obtenu 62 animaux F1 édités, 29 femelles et 33 mâles ; et 24 animaux témoins (même procédure mais non porteur de la mutation sur le gène BCMO1). Le taux de transmission germinale est de 30,0% et 28,2% pour les animaux témoins et les animaux édités respectivement. Actuellement, les animaux F1 sont au stade jeune et leur reproduction permettra la production d'animaux F2, homozygotes et hétérozygotes pour le KO de BCMO1. Ces animaux seront largement phénotypés pour mieux comprendre le rôle de BCMO1 chez le poulet.

CONCLUSION

Les travaux de ces dernières années montrent que les biotechnologies de reproduction chez le poulet basées

sur les PGCs cultivées *in vitro* représentent un outil puissant pour la conservation et la restauration des ressources génétiques ainsi que pour l'édition du génome. Le développement de ces outils en France ouvre des perspectives de conservation et de restauration des génotypes qui était jusqu'ici impossible en utilisant uniquement la semence. Pour la première fois en France, nous avons conservé et restauré le génotype en une seule génération grâce aux PGCs dérivées en culture en utilisant comme modèle la poule Noire du Berry. Des recherches sont encore nécessaires pour améliorer la transmission germinale

des PGCs et favoriser leur développement dans l'organisme hôte. En parallèle, nous avons aussi réalisé pour la première fois en France l'édition du génome chez le poulet jusqu'aux étapes *in vivo* en utilisant les PGCs cultivées et obtenu les premiers poussins édités pour le gène BCMO1. Les lignées ainsi créées seront de nouveaux modèles expérimentaux et pourront être utilisées dans le futur notamment pour des études des fonctions et de leur régulation à l'échelle de l'organisme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ballantyne M., Taylor L., Hu T, Meunier D., Nandi S., Sherman A., Flack B., Henshall J.M., Hawken R.J., McGrew M.J., 2021. *Front Cell Dev Biol.*, (29), 726827.
- Ballantyne M., Woodcock M., Doddamani D., Hu T., Taylor L., Hawken R.J., McGrew M.J., 2021. *Nat. Commun.*, 12(1), 1-10
- Blesbois E., Seigneurin, F., Grasseau, I., Limouzin, C., Besnard, J., Gourichon, D., Coquerelle, G., Rault, P., Tixier-Boichard, M., 2007. *Poultry sci.*, (86), 555-564.
- Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A. D., 2016. *Trends Cell Biol.*, 26, 52–64
- Chen Y.C., Lin S.P., Chang Y.Y., Chang W.P., Wei L.Y., Liu H.C., Huang J.F., Pain B., Wu S.C., 2019. *Poult Sci.* (98),1820-1832.
- Dimitrov L., Pedersen D., Ching K.H., Yi H., Collarini E.J., Izquierdo S., van de Lavoie M.C., Leighton P.A., 2016. *PLoS One.*, (11),e0154303
- Ducos A., Bed'hom B., Acloque H., Pain, B., 2018. *INRA Prod. Anim.*, 30, 3–18
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E., 2012. *Science.*, (337),816-21
- Jlali M., Graulet B., Chauveau-Duriot B., Godet E., Praud C., Nunes C.S, Le Bihan-Duval E., Berri C., Duclos M.J., 2014. *Br J Nutr.*, (111),2079-88
- Kim GD, Lee JH, Song S, Kim SW, Han JS, Shin SP, Park BC, Park TS., 2020. *FASEB J.* 34(4):5688-5696.
- Komor, A. C., Badran, A. H. & Liu, D. R., 2017. *Cell* 168, 20–36
- Lázár B., Molnár M., Sztán N., Végi B., Drobnyák Á., Tóth R., Tokodyné Szabadi N., McGrew M.J., Gócza E., Patakiné Várkonyi E., 2021. *Poult Sci*, (100),101207
- Le Bihan-Duval E., Nadaf J, Berri C., Pitel F., Graulet B., Godet E., Leroux S.Y., Demeure O., Lagarrigue S., Duby C., Cogburn L.A., Beaumont C.M., Duclos M.J., 2011., *PLoS One*, (7), e14825
- Lee H.J., Yoon J.W., Jung K.M., Kim Y.M., Park J.S., Lee K.Y., Park K.J., Hwang Y.S., Park Y.H., Rengaraj D., Han J.Y., 2019. *FASEB J.*, (33),8519-8529
- Liu C., Chang I.K., Khazanehdari K.A., Thomas S., Varghese P., Baskar V., Alkhatib R., Li W., Kinne J., McGrew M.J., Wernery U., 2017. *Biol Reprod.* (96), 686-693
- Macdonald, J., Glover, J.D., Taylor, L., Sang, H.M. & McGrew M.J., 2010. *PloS one* (5), e15518.McGrew M.J., Sherman A., Ellard F.M., Lillico S.G., Gilhooley H.J., Kingsman A.J., Mitrophanous K.A., Sang H., 2004. *EMBO Rep.*, (5),728-33.
- Molnár M., Lázár B., Sztán N., Végi B., Drobnyák Á., Tóth R., Liptói K., Marosán M., Gócza E., Nandi S., McGrew M.J., Várkonyi E.P., 2019. *Sci Rep.* (9):14284.
- Nakamura, Y., Kagami, H. & Tagami, T., 2013. *Dev Growth Differ.* (55), 20-40.
- Nandi S., Whyte J., Taylor L., Sherman A., Nair V., Kaiser P. and McGrew M.J., 2016. *Poult Sci.*, (95), 1905-11.
- Oishi I., Yoshii K., Miyahara D., Kagami H., Tagami T., 2016. *Sci Rep.*, (6), 23980
- Oishi I., Yoshii K., Miyahara D., Tagami T., 2018. *Sci Rep.*, (8),10203

- Panda S.K., McGrew M.J., 2021. Lab Anim., (10), 23677221998400.
- Park T.S., Park J., Lee J.H., Park J.W., Park B.C., 2019. FASEB J., (33) ,1188-1198
- Praud C., Al Ahmadiéh S., Voldoire E., Le Vern Y., Godet E., Couroussé N., Graulet B., Le Bihan Duval E., Berri C., Duclos M.J., 2017. Exp Cell Res.,(358),:140-146
- Soler L., Alves S., Brionne A., Jacques A., Guérin V., Cherif-Feildel M., Combes-Soia L., Fouchécourt S., Thélie A., Blesbois E., McGrew M.J., Labas V., Govoroun M.S., 2021. Sci Rep., (11),19236
- Song Y., Duraisamy S, Ali J, Kizhakkayil J., Jacob V.D., Mohammed M.A., Eltigani M.A., Amisetty S., Shukla M.K., Etches R.J. and de Lavoie M.C., 2014. Biol Reprod., (90), 15, 1-8
- Taylor L., Carlson D.F., Nandi S., Sherman A., Fahrenkrug S.C., McGrew M.J., 2017. Development. Mar, 928-934.
- Tsunekawa N., Naito M., Sakai Y., Nishida T., Noce T., 2000. Development. (12), 2741-50.
- van de Lavoie M.C., Diamond J.H., Leighton P.A., Mather-Love C., Heyer B.S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L.T., Gessaro T.M., Swanberg S.E., Delany M.E. and Etches R.J., 2006. Nature, (441), 766-9.
- Yang, H., Wang, H., Jaenisch, R., 2014. Nat. Protoc., (9), 1956–1968
- Zhang, F., 2019. Q. Rev. Biophys., (52), e6
- Whyte J., Glover J.D., Woodcock M., Brzeszczynska J., Taylor L., Sherman A., Kaiser P. and McGrew M.J., 2015. Stem Cell Reports., (5), 1171-1182.
- Whyte J., Blesbois E., and McGrew M.J., 2016. In : Poultry sciences symposium, (31) (CABI Publishing edit), UK, pp214.
- Woodcock M.E., Idoko-Akoh A. and McGrew M.J., 2017. Mamm Genome, (28), 315-323.
- Woodcock M.E., Gheyas A.A., Mason A.S., Nandi S., Taylor L., Sherman A., Smith J., Burt D.W., Hawken R. and McGrew M.J., 2019. Proc Natl Acad Sci U S A, (116), 20930-20937.

Tableau 1. Exemples d'utilisation de l'édition du génome chez le poulet

Objectifs	Phenotype	Référence
KO inductible du gène iCaspase	Stérilité inductible chez les deux sexes	Ballantyne et al., 2021
KO du gène myostatine	Augmentation de la masse musculaire	Kim et al., 2020
Deletion W38 dans Na ⁺ /H ⁺ exchanger type 1	Résistance au virus leucémogène (sous-groupe J)	Koslová et al., 2020
KI de la GFP sur le chromosome Z	Expression de la GFP pour du sexage	Lee et al., 2019
KO du gène G0/G1 switch gene 2	Réduction du dépôt de gras abdominal	Park et al., 2019
KI de l'interféron β humain dans le locus de l'ovalbumine	Production de l'interféron β humain dans le blanc d'oeuf	Oishi et al., 2018
KO de la région variable de la chaîne lourde de l'immunoglobuline	Insertion du site loxP dans la région VH	Dimitrov et al., 2016
KO du gène ovomucoïde	Mutation du gène ovomucoïde	Oishi et al., 2016
KO du gène DEAD-box hélicase 4	Stérilité femelle	Taylor et al., 2017
KO du gène ovalbumine	Mutation du gène ovalbumine	Park et al., 2014
KO de la chaîne légère de l'immunoglobuline	Niveau faible des anticorps et des cellules périphérique B	Schusser et al., 2016
KO du segment J de la chaîne lourde de l'immunoglobuline	Suppression des anticorps et cellules périphérique B	Schusser et al., 2013

Figure 1. En pratique, l'utilisation des PGCs pour la conservation des espèces et l'édition du génome chez le poulet

