

Les applications des animaux génétiquement modifiés (AGM)

Louis-Marie Houdebine

9 allée Georges, 78530 Buc, France

Auteur correspondant : Louis-Marie Houdebine, louis.houdebine@jouy.inra.fr

Reçu le 20 décembre 2008

Résumé – Les premiers animaux transgéniques, des souris, ont été obtenues en 1980. Les techniques de transfert de gène ont dû être adaptées chez une quinzaine d'espèces pour obtenir des rendements de transgénèse acceptables. Lorsque ces rendements sont faibles (faible taux d'intégration aléatoire et intégration ciblée par recombinaison homologue), les transformations génétiques doivent être effectuées dans des cellules intermédiaires capables de participer au développement de chimères transgéniques (cellules ES, cellules EG, cellules somatiques dédifférenciées en cellules iPS) ou dans des cellules somatiques donneuses de noyau pour obtenir des clones transgéniques. Divers outils permettent d'augmenter très notablement la fréquence de la recombinaison homologue (méganucléases et ZFN) et ainsi d'inactiver un gène au niveau de l'ADN (*knock out* direct ou conditionnel) ou au niveau de l'ARN messager (ARN interférents). Des vecteurs permettent une expression de plus en plus fiable des transgènes. Les animaux génétiquement modifiés sont utilisés surtout pour obtenir des informations sur les fonctions biologiques et les maladies humaines. Des animaux transgéniques produisent, dans le lait et bientôt le blanc d'œuf, des protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique. Des porcs dont les organes ont été adaptés pour être tolérés par les patients pourraient commencer à être utilisés dans cinq ans. Les applications de la transgénèse pour améliorer les productions des animaux d'élevage sont actuellement peu nombreuses. Des saumons à croissance accélérée pourraient être mis en vente lorsque leur dissémination sera contrôlée.

Mots clés : Transfert de gène / médecine / élevage

Abstract – Applications of genetically modified animals.

The first transgenic animals, mice, were obtained in 1980. The techniques of gene transfer had to be adapted to obtain transgenic animals with an acceptable yield in about fifteen species. When the yield is low (low rate of random integration and targeted integration *via* homologous recombination), genetic modifications must be achieved in intermediate cells able to participate to the development of chimeric transgenic animals (ES cells, EG cells, iPS obtained by the dedifferentiation of somatic cells) or in somatic cells used as nuclear donor to generate transgenic clones. Various tools make possible a marked increase of homologous recombination efficiency (meganucleases and ZFN), or a gene inactivation at the genome level (direct or conditional knock out) or at the mRNA level (interfering RNAs). Vectors allow a more reliable transgene expression. Genetically modified animals are used mainly to obtain information on biological functions and human diseases. Transgenic animals produce recombinant pharmaceutical proteins in milk and soon in egg white. Pig organs adapted to be tolerated by patients might be tested in humans in five years. The projects based on the use of transgenesis to improve animal production are presently few. Transgenic salmon with accelerated growth might be on the market when their possible escape in oceans will be controlled.

Key words: Gene transfer / medicine / breeding

Les gènes ne se transmettent que très peu spontanément d'un individu à un autre en dehors de la reproduction et des infections virales et encore moins d'une espèce à une autre. Si tel n'était pas le cas, l'intégrité des individus et l'existence des espèces ne seraient pas possibles. Diverses méthodes ont été mises au point au début des années 80 pour transférer des gènes étrangers chez les animaux, et perfectionnées depuis. En pratique, les OGM alimentaires résultent de transferts de gènes dont le processus n'est pas totalement contrôlé, dans la mesure où l'intégration des gènes est plus ou moins aléatoire. Il n'est pas encore possible de cibler en routine et à un coût acceptable l'intégration d'un gène étranger dans les plantes mais cela est possible chez les animaux. Il est par contre tout à fait possible de connaître *a posteriori* le site d'intégration du gène et de vérifier son intégrité ainsi que celle du site d'intégration du transgène. Les méthodes de transfert de gène ont par ailleurs une efficacité relativement limitée. Des dizaines voire des centaines de lignées de plantes transgéniques sont donc préparées et seules quelques-unes d'entre elles, ne présentant aucun défaut décelable, sont conservées pour être exploitées. Chez les animaux, diverses méthodes ont dû être mises au point pour s'adapter aux spécificités biologiques des différentes espèces (Houdebine, 2005). Ces méthodes sont résumées dans la figure 1.

Les méthodes de transfert de gène

La microinjection directe du gène dans un des pronoyaux des embryons avant la première division est utilisable chez les mammifères mais avec des rendements très variables allant de 2 % chez la souris à moins de 0,1 % chez la vache. Chez les oiseaux, les vertébrés inférieurs et les invertébrés, les pronoyaux ne sont pas visibles et le gène doit être injecté en plus grande quantité dans le cytoplasme de l'embryon avec des rendements très variables selon les espèces (figure 1, méthode 1). Pour augmenter la fréquence des intégrations, il est possible d'introduire le gène d'intérêt dans un transposon (figure 1, méthode 2) (Moisyadi *et al.*, 2009) ou un vecteur lentiviral (figure 1, méthode 3) (Pfeifer, 2006). Les transposons et les vecteurs lentiviraux ne peuvent véhiculer des fragments d'ADN dont la taille est supérieure respectivement à 3 kb et 8 kb. L'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) est une méthode de fécondation particulièrement efficace et maîtrisée chez plusieurs espèces. Elle est utilisée pour transférer des gènes dans les embryons. En pratique, elle consiste à congeler et décongeler des spermatozoïdes pour rompre leur membrane plasmique, à les incuber en présence du gène et

à les microinjecter dans le cytoplasme des ovocytes (figure 1, méthode 4) (Moreira *et al.*, 2007).

Lorsque la transformation génétique a un très faible rendement, il est nécessaire de passer par des cellules intermédiaires capables de participer au développement d'un embryon. Les premières cellules utilisées à cette fin, dès 1986, sont des cellules ES (embryonnaires souches) qui dérivent de la masse cellulaire interne des embryons au stade blastocyste. Ces cellules sont pluripotentes (capables de participer au développement de n'importe quel organe après réintroduction dans un blastocyste adoptif mais incapables d'assurer seules le développement d'un embryon) et de telles lignées n'ont pu être obtenues que chez la souris (figure 1, méthode 5). Plus récemment, des lignées de cellules multipotentes ont pu être établies à partir des gonades fœtales de poulet (cellules EG, figure 1, méthode 5) (van de Lavoie *et al.*, 2006). Plus récemment encore, il a été montré que des cellules somatiques différenciées pouvaient retrouver leur pluripotence après transfert de trois gènes exogènes dont l'expression caractérise les cellules pluripotentes naturelles (cellules iPS : *induced Pluripotent Cells*, figure 1, méthode 5) (Pera & Hasegawa, 2008). Les cellules pluripotentes sont utilisées pour l'addition non ciblée de gènes lorsque les méthodes 1–4 sont inopérantes et lorsqu'une intégration ciblée par recombinaison homologue est visée pour invalider spécifiquement le gène ciblé (*knock out*) ou pour cibler l'intégration du gène étranger dans un site spécifique du génome (*knock in*). Le gène peut également être intégré dans une cellule somatique dont le noyau est ensuite transféré dans le cytoplasme pour donner naissance à un clone transgénique. Cette méthode (figure 1, méthode 6) permet l'introduction aléatoire de gène, l'invalidation de gène et l'intégration ciblée de gène.

La recombinaison homologue utilisée pour cibler l'intégration ou le remplacement de gène est un phénomène dont la fréquence est faible. Elle peut être très notablement augmentée en clivant l'ADN génomique au site où doit avoir lieu le ciblage du gène. Un tel clivage peut être réalisé par des enzymes de restriction appelées méganucléases qui reconnaissent spécifiquement des régions de l'ADN relativement longues (environ 20 paires de bases) (Cohen-Tannoudji *et al.*, 1998) ou des ZFN (*Zinc Finger Nuclease*). Des données récentes indiquent que des méganucléases peuvent être ingénierisées pour reconnaître un site choisi du génome. Plusieurs centaines de telles méganucléases capables de reconnaître spécifiquement un site naturel et choisi du génome humain sont actuellement disponibles (Porteus & Carroll, 2005). La transgénèse ciblée a ainsi pu être obtenue chez un poisson de laboratoire, le médaka (Woods & Schier, 2008). Les mêmes outils peuvent induire une

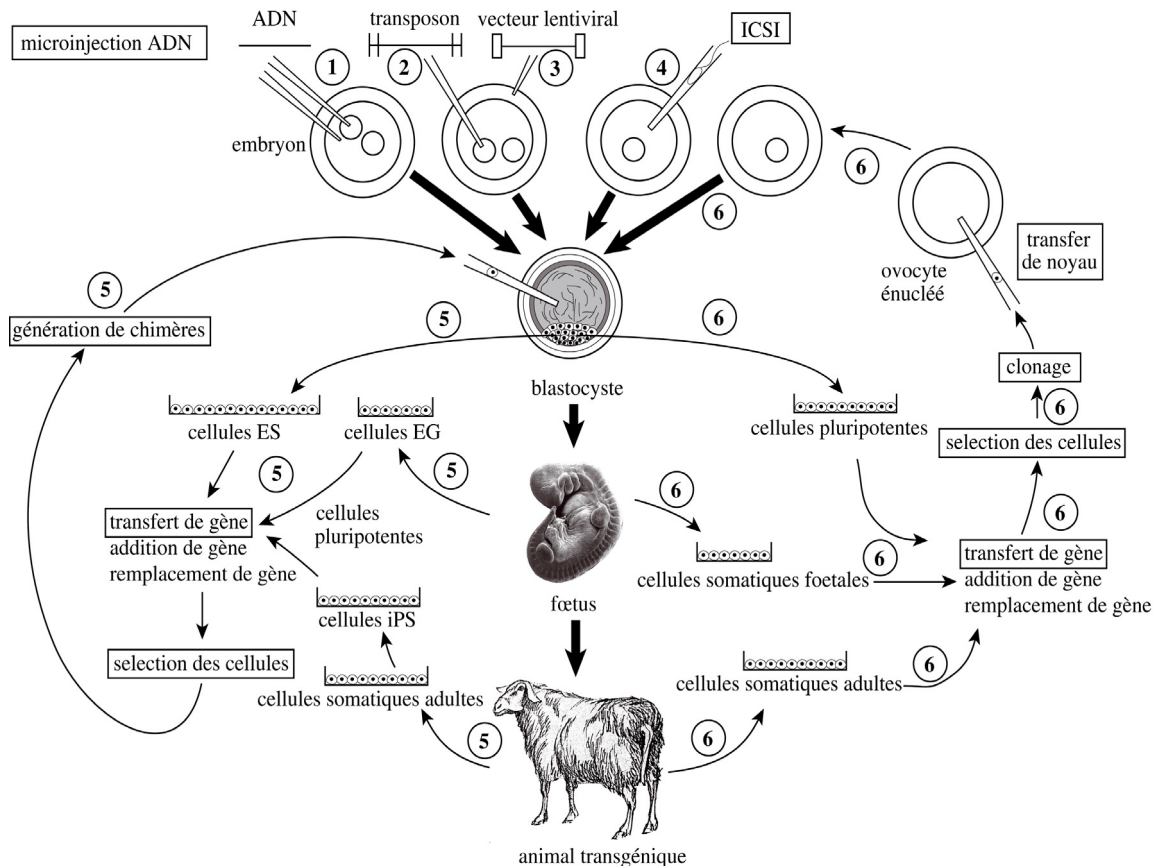


Fig. 1. Les différentes méthodes pour l'obtention d'animaux transgéniques. Ces méthodes sont détaillées dans la partie « Les méthodes de transfert de gène » du texte.

invalidation ciblée d'un gène dans un génome. Pour ce faire, une méganucléase reconnaissant le site choisi est introduite dans une cellule, y compris chez un embryon, sans y adjoindre un fragment d'ADN capable de provoquer le remplacement de gène par recombinaison homologue. L'ADN est ainsi clivé au site ciblé et il est soumis à une réparation imparfaite spontanée qui crée des mutations locales aléatoires. Ce phénomène appelé NHEJ (*Non Homologous End Joining*) conduit à une invalidation de gène ciblée (Wilson, 2008) mais aussi dans certains cas à la restauration d'un gène naturellement muté et devenu inactif. Ces méthodes peuvent en principe être appliquées à des embryons mais aussi à des cellules pluripotentes ou encore à des cellules somatiques utilisées ultérieurement pour obtenir des clones transgéniques. Ces méthodes devraient pouvoir être utilisées chez les végétaux.

L'utilisation des animaux transgéniques

L'addition ou l'inactivation d'un gène chez un animal est un des moyens essentiels pour déterminer le fon-

ctionnement ainsi que le rôle de ce gène et en particulier son éventuelle implication dans une maladie humaine (Houdebine, 2006a). Les AGM sont donc depuis le début utilisés très majoritairement par les biologistes pour des études fondamentales.

Il est en principe possible d'adapter les organes de porc pour qu'ils puissent être transplantés à des receveurs humains sans être puissamment rejetés. Des progrès dans ce sens sont encourageants mais la mise en œuvre de ces outils reste incertaine (Houdebine, 2006b).

Le transfert d'un gène dans une cellule ou un organisme vivant conduit à la synthèse de la protéine codée par le transgène. Une protéine ainsi obtenue est qualifiée de recombinante. Le lait ou le blanc d'œuf d'animaux portant un gène codant pour une protéine d'intérêt pharmaceutique peuvent être une source abondante et peu coûteuse de ce nouveau type de médicaments. Les protéines candidates sont de types très variés, comme des facteurs sanguins (facteurs de coagulation, albumine...), des enzymes, des vaccins, des anticorps anti-cancer, des hormones

(hormone de croissance, insuline, EPO...), des protéines de structure (collagène, fibrinogène...), des facteurs de croissance, des médiateurs cellulaires, etc. Une protéine humaine préparée à partir du lait de chèvres transgéniques (l'antithrombine III dont le nom commercial est l'ATryn) a reçu en 2006 l'autorisation de mise sur le marché par l'agence européenne du médicament, l'EMA. Les feuilles ou les graines des plantes peuvent être utilisées dans le même but mais avec quelques restrictions. Certaines protéines humaines ne sont pas synthétisées sous une forme satisfaisante par les cellules végétales, elles ne sont en particulier pas convenablement glycosylées. Certaines plantes cultivées en plein champ peuvent laisser échapper de petites quantités des protéines recombinantes qu'elles contiennent, ce qui pourrait induire une réaction immunitaire chez les personnes se trouvant à leur contact et provoquer chez elles des réactions auto-immunes. Une alternative en cours d'étude serait d'utiliser des algues microscopiques ou des lentilles d'eau qui peuvent être cultivées en toute sécurité dans des bassins confinés (Houdebine, 2008, 2009).

Une série de projets en cours a pour but d'obtenir des lignées d'animaux de ferme génétiquement améliorés (Laible, 2009). Des vaches et des chèvres sécrétant dans leur lait diverses protéines antibactériennes, lysozyme humain, lactoférine humaine et lysostaphine bactérienne (Maga *et al.*, 2006; van Berkel *et al.*, 2002; Wall *et al.*, 2005) ou des anticorps monoclonaux ayant des actions anti-virales (Castilla *et al.*, 1998; Kolb *et al.*, 2001) pourraient protéger les consommateurs animaux et humains contre ces agents pathogènes infectieux par voie orale. Des vaches dépourvues du gène PrP, et donc insensibles aux prions, ont été obtenues et sont en cours d'étude (Richt *et al.*, 2007). Des poissons-chats d'élevage exprimant un peptide d'insecte anti-bactérien, la cécropine B, sont devenus résistants à des bactéries (Dunham, 2009). Des souris surexprimant la partie soluble du récepteur du virus de la maladie d'Aujeszky des porcs sont devenues résistantes au virus (Ono *et al.*, 2004; Ono *et al.*, 2006).

Des vaches, des chèvres et des souris dont le lait a été modifié pour diminuer son contenu en protéines allergènes indésirables (en particulier la β -lactoglobuline, Li *et al.*, résultats non publiés) ou en lactose qui induit une intolérance pénible chez de nombreux humains (Jost *et al.*, 1999) sont en cours d'étude. Des vaches dont la teneur du lait en caséine- β et en caséine- κ a été modifiée ont été obtenues dans le but d'améliorer la préparation de certains produits, les fromages notamment (Brophy *et al.*, 2003). Le lait de truies transgéniques enrichi en α -lactalbumine d'origine bovine et en IGF1 a une meilleure valeur nutri-

tive et permet de diminuer significativement les pertes de porcelets (Wheeler *et al.*, 2001).

Des souris et des porcs exprimant des gènes d'acide gras-désaturase ont une teneur en lipides de type oméga-3 augmentée dans leur lait et leur graisse corporelle, et moins de lipides polyinsaturés que l'on sait néfastes pour la santé humaine (Reh *et al.*, 2003; Saeki *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2006).

Des porcs transgéniques produisant moins de phosphate polluant dans leurs urines et leur fèces sont également disponibles. Ceci a été rendu possible en faisant sécréter dans leur salive une enzyme bactérienne, la phytase, qui dégrade l'acide phytique riche en phosphate des végétaux de la ration alimentaire des porcins alors que ces animaux ne sont pas naturellement capables de digérer ce composé (Golovan *et al.*, 2001).

L'impact des AGM destinés à l'alimentation humaine

Aucun des projets décrits plus haut n'a encore reçu l'autorisation pour développer l'élevage et la mise sur le marché d'AGM. Le projet le plus avancé est celui qui concerne des saumons à croissance accélérée. Ces animaux sont intéressants d'un point de vue commercial et environnemental dans la mesure où ils consomment un peu moins de nourriture et occupent moins longtemps les cages où ils sont élevés. Leur élevage commercial n'est pas encore autorisé et le restera tant que les aquaculteurs n'auront pas donné la preuve qu'ils ont trouvé des moyens pour empêcher l'évasion incontrôlée de ces saumons dans la mer ou pour rendre impossible le croisement avec leurs homologues sauvages. Il est probable que les saumons transgéniques n'auraient pas un impact négatif significatif sur les saumons sauvages. Les saumons à croissance accélérée ont en effet un métabolisme très stimulé par l'hormone de croissance mais pas une capacité accrue pour se procurer de la nourriture. Les études réalisées dans des conditions mimant autant que possible le milieu marin suggèrent qu'ils sont défavorisés en milieu sauvage. Ceci ne peut toutefois pas être prouvé formellement à l'aide de modèles expérimentaux et, en cas de problème, le mal serait très difficilement réversible étant donné les espaces immenses et incontrôlables que constituent les océans (Kaputichinsky *et al.*, 2007).

Les projets les plus séduisants sont actuellement ceux qui concernent les maladies des animaux. Des animaux devenus génétiquement résistants à des maladies limiteraient en effet l'usage de substances pharmaceutiques, les pertes inutiles, la souffrance des animaux, les inquiétudes des éleveurs et la transmission de certaines de ces maladies à l'homme.

La situation est de toute évidence très différente en ce qui concerne l'utilisation des plantes et des

animaux génétiquement modifiés pour l'alimentation humaine. Ceci tient à la relative difficulté et au coût d'obtention des animaux transgéniques fondateurs. Ce fait limite le nombre de lignées qui peut être obtenu. Le développement de lignées de gros animaux d'élevage est lui-même soumis à la lenteur naturelle de leur reproduction. La maîtrise des techniques de la reproduction est capable de réduire ces délais mais pas de les abolir. Les essais qui peuvent être réalisés sont et resteront moins nombreux que chez les végétaux. Les transgènes doivent donc être porteurs d'une amélioration substantielle pour que leur usage soit justifié.

Les projets en cours ne se développent que relativement lentement. Le coût élevé de l'expérimentation impliquant de gros animaux est une des causes de cette lenteur. La dissémination incontrôlée dans l'environnement de la majorité des animaux d'élevage ne pose pas de problème. Le soupçon qui pèse sur les OGM en tant que tels nuit à l'étude de faisabilité des projets concernant les AGM. La pertinence de certains projets est contestée avant même qu'ils aient pu atteindre un stade autorisant l'évaluation des avantages et des risques qu'ils comportent (Kang & Leaf, 2007).

Les animaux d'élevage posent des problèmes qui ne concernent pas les plantes. Les méthodes d'élevage actuelles ne sont pas toutes optimales pour préserver le bien-être des animaux. Des réglementations, en particulier européennes, améliorent progressivement le sort des animaux d'élevage. Il est largement admis que les modifications génétiques d'animaux destinés à l'alimentation humaine ne devraient en aucun cas s'accompagner d'une diminution de leur bien-être.

Références

- Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P., Laible G., Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol*, 2003, 21, 157–162.
- Castilla J., Pintado B., Sola I., Sanchez-Morgado J.M., Enjuanes L., Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nat Biotechnol*, 1998, 16, 349–354.
- Cohen-Tannoudji M., Robine S., Choulika A., Pinto D., El Marjou F., Babinet C., Louvard D., Jaisser F., I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 1998, 18, 1444–1448.
- Dunham R.A., Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32, 139–161.
- Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., Plante C., Pollard J.W., Fan M.Z., Hayes M.A., Laursen J., Hjorth J.P., Hacker R.R., Phillips J.P., Forsberg C.W., Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol*, 2001, 19, 741–745.
- Houdebine L.M., Les applications de la transgénèse animale. *Bull Acad Vet France*, 2005, 158, 487–498.
- Houdebine L.M., Transgenic animal models and target validation. *Methods in Molecular Biology*, 2006a, 360, 163–202.
- Houdebine L.M., Les interventions de la transgénèse sur la xénogreffe. *Biofutur*, 2006b, 21, 28–31.
- Houdebine L.M., Préparation de protéines thérapeutiques à partir des animaux transgéniques. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 2008, 20, 1–8.
- Houdebine L.M., Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32, 107–121.
- Jost B., Vilotte J.L., Duluc I., Rodeau J.L., Freund J.N., Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland. *Nat Biotechnol*, 1999, 17, 160–164.
- Kang J.X., Leaf A., Why the omega-3 piggy should go to market? *Nat Biotechnol*, 2007, 25 : 505–506.
- Kaputchinsky A.R., Hayes K.R., Li S., Dana G., (Ed.). Environmental risk assessment of genetically modified organisms. Volume 3. *Methodologies for transgenic fish*. CAB International Publisher, 2007.
- Kolb A.F., Pewe L., Webster J., Perlman S., Whitelaw C.B.A., Siddell S.G., Virus-neutralizing monoclonal antibody expressed in milk of transgenic mice provides full protection against virus-induced encephalitis. *J Virol*, 2001, 75, 2803–2809.
- Lai L., Kang J.X., Li R., Wang J., Witt W.T., Yong H.Y., Hao Y., Wax D.M., Murphy C.N., Rieke A., Samuel M., Linville M.L., Korte S.W., Evans R.W., Starzl T.E., Prather R.S., Dai Y., Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24, 435–436.
- Laible G., Enhancing livestock through genetic engineering – recent advances and future prospects. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32, 123–137.
- Maga E.A., Walker R.L., Anderson G.B., Murray J.D., Consumption of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation of intestinal microflora. *Transgenic Res*, 2006, 15, 515–519.
- Moreira P.N., Pozueta J., Pérez-Crespo M., Valdivieso F., Gutiérrez-Adán A., Montoliu L., Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. *Transgenic Res*, 2007, 16, 163–168.
- Moisyadi S., Kaminski J.M., Yanagimachi R., Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 47–60.

- Ono E., Amagai K., Taharaguchi S., Tomioka Y., Yoshino S., Watanabe Y., Chere P., Houdebine L.-M., Adam M., Eloit M., Inobe M., Uede T., Transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/herpesvirus entry mediator C as a model for pseudorabies-resistant livestock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 16150–16155.
- Ono E., Tomioka Y., Taharaguchi S., Cherel P., Comparison of protection levels against pseudorabies virus infection of transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/HveC and vaccinated mice. *Vet Microbiol*, 2006, 114, 327–330.
- Pera M.F., Hasegawa K., Simpler and safer cell reprogramming. *Nat Biotechnol*, 2008, 26, 59–60.
- Pfeifer A., Lentiviral transgenesis – a versatile tool for basic research and gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2006, 6, 535–542.
- Porteus M.F., Carroll D., Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2005, 23, 967–973.
- Reh W.A., Maga E.A., Collette N.M., Moyer A., Conrad-Brink J.S., Taylor S.J., DePeters E.J., Oppenheim S., Rowe J.D., BonDurant R.H., Anderson G.B., Murray J.D., Hot topic : using a stearyl-CoA desaturase transgene to alter milk fatty acid composition. *J Dairy Sci*, 2004, 87, 3510–3514.
- Richt J.A., Kasinathan P., Hamir A.N., Castilla J., Sathiyaseelan T., Vargas F., Wu H., Matsushita H., Koster J., Kato S., Ishida I., Soto C., Robl J.M., Kuroiwa Y., Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol*, 2007, 25, 132–138.
- Saeki K., Matsumoto K., Kinoshita M., Suzuki I., Tasaka Y., Kano K., Taguchi Y., Mikami K., Hirabayashi M., Kashiwazaki N., Hosoi Y., Murata N., Iritani A., Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 6361–6366.
- 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., Etches R.J., Germ line transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 2006, 441, 766–769.
- van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H., Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol*, 2002, 20, 484–487.
- Wall R.J., Powell A.M., Paape M.J., Kerr D.E., Bannerman D.D., Pursel V.G., Wells K.D., Talbot N., Hawk H.W., Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*, 2005, 23, 445–451.
- Wheeler M.B., Bleck G.T., Donovan S.M., Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. *Reprod*, Suppl 2001, 58, 313–324.
- Wilson J.H., Knockout punches with a fistful of zinc fingers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 5653–5654.
- Woods I.G., Schier A.F., Targeted mutagenesis in zebrafish. *Nat Biotechnol*, 2008, 26, 650–651.