

## L'impact de la cartographie des génomes, du clonage et de la transgénèse chez les animaux domestiques

Louis-Marie Houdebine

Les techniques traditionnelles d'élevage ont été considérablement modifiées avec la mise en application des lois de la génétique pour la sélection, la vaccination, la maîtrise de certaines étapes de la reproduction et une utilisation plus rationnelle qu'avant des aliments. Les progrès qui en ont découlé sont considérables et des améliorations se manifestent dans tous les domaines. L'avènement des biotechnologies, que l'on peut considérer comme étant essentiellement la maîtrise des génomes, a amené à repenser certains problèmes. Leur évolution, relativement rapide puisqu'elle s'est amorcée au début des années 80, n'est pas encore vraiment perçue comme une révolution mais, paradoxalement, plutôt comme une calamité incontournable. Cette attitude repose principalement sur des malentendus assez compréhensibles. Toute évolution rapide suscite des craintes et les biotechnologies n'échappent pas à cette règle. Les sociétés développées où elles sont nées ne souffrent d'aucune pénurie alimentaire. Leurs problèmes portent au contraire souvent sur des questions relatives à la surproduction et à la compétition entre les marchés. Les choses sont bien entendu perçues de manière toute différente dans les pays où la pénurie alimentaire est chronique. Ils sont parfois

prêts à accepter de façon imprudente les dernières techniques des biotechnologistes, sans pouvoir les acheter ou être capable de les mettre en œuvre. La manière dont les plantes transgéniques sont actuellement imposées aux consommateurs a, dans certains cas, de quoi les irriter, même si les risques que l'on prête aux organismes génétiquement modifiés (OGM) relèvent souvent plus du fantasme que de la réalité.

Pour des raisons techniques, les applications des biotechnologies n'ont encore eu qu'un impact relativement limité dans le domaine des productions animales. Diverses avancées méthodologiques, notamment le clonage des animaux, ont brutalement modifié le panorama car les animaux semblaient jusqu'alors être à l'abri du zèle considéré comme souvent intempestif des biotechnologistes. De réels progrès ont été faits dans plusieurs techniques qui ont commencé à apporter des améliorations des productions animales. Le retard qu'ont pris les animaux par rapport aux plantes tient essentiellement à la nature même des deux catégories d'organismes vivants. La physiologie animale, notamment les mécanismes de la reproduction, est plus complexe et moins malléable que celle des végétaux. De toute façon, les biotechnologies ne sauraient apporter exactement les mêmes bienfaits dans tous les domaines.

Cet article se propose de faire le point sur les biotechnologies animales telles qu'elles se présentent à l'aube du XXI<sup>e</sup> siècle [1].

### Sélection des animaux

La découverte des lois de l'hérédité par Mendel est restée pendant longtemps à peu près inconnue et leurs applications n'ont commencé qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle. Elles se sont rapidement traduites par des améliorations dans les domaines végétal et animal et la sélection a considérablement gagné en efficacité en sortant du pur empirisme. L'amélioration génétique repose, depuis cette période, sur la reproduction privilégiée des animaux présentant les caractéristiques agronomiques les plus intéressantes. Le succès de cette approche dépend donc directement de la rigueur avec laquelle on évalue les performances agronomiques des animaux et de la rapidité avec laquelle les bons gènes peuvent être préférentiellement transmis. La mesure de paramètres biochimiques plutôt que l'évaluation des performances globales permet de gagner en précision. Par ailleurs, la maîtrise de certaines techniques de reproduction comme l'insémination artificielle, le transfert d'embryons et, virtuellement, le clonage oriente et accélère très notablement la sélection des génomes portant les caractères agronomiques les plus désirés.

La plupart des fonctions biologiques que l'on souhaite améliorer par la sélection dépendent de plusieurs gènes indépendants les uns des autres et situés sur des chromosomes différents. Leur sélection s'accompagne inévitablement de celle de gènes voisins dont les effets sont indésirables et peut donc ainsi conduire à une

L.-M. Houdebine : Unité biologie du développement et biotechnologie, INRA, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France.

Tirés à part : L.-M. Houdebine

## Summary

### The impact of selection by genetic markers, cloning and transgenesis on livestock production

L.-M. Houdebine

*Genome knowledge enables selection based on genetic markers, i.e. microsatellites located in the vicinity of genes with interesting characters. In the best cases, genes responsible for the phenotypic property can be identified, isolated and studied. They can also be used for genetic selection, and potentially to produce the corresponding proteins if they have interesting pharmaceutical or veterinary properties. These genes may also in some cases to be used directly for human gene therapy or to generate transgenic animals. Transgenesis has become a routine procedure with many laboratory animals. It involves insertion of foreign genes and host gene replacement by homologous recombination. The latter can be carried out only after long culture of cells in which homologous recombination must take place. These cells can still be utilisable to reconstruct living embryos. Totipotent ES or EG cells are used for this purpose to generate chimeric embryos harbouring mutations, but this can presently only be achieved in mouse. Recent improvements of the cloning technique by nuclear transfer into the cytoplasm of enucleated oocytes could theoretically help accelerate genetic selection. This would be even more efficient if cloning were carried out using cells from adults with known agronomic traits of interest. The yield of this method is still too low to allow the cloning technique to be used to improve animal selection. In its present state, the cloning technique can be used efficiently to introduce foreign genes into foetal cells further used to reconstruct embryos. The same method should allow gene replacement by homologous recombination. The cloning technique already leads to better gene insertion yields than obtained by conventional microinjection. For more than 10 years, transgenesis has been an essential tool for studying the mechanism of action and role of genes in controlling biological functions and the emergence of human diseases. Milk from transgenic animals will soon become an essential source of recombinant proteins for pharmaceutical and veterinary use. It is also quite likely that transgenic pigs will become a source of cells and organs for grafting in humans, even though many theoretical, technical and biosafety problems remain to be solved. Transgenic pigs and fish expressing foreign growth hormone genes are ready to be proposed to consumers. Other transgenic animals with enhanced resistance to diseases, optimized or modified milk composition, or carcasses more adapted to human consumption will become available in the coming decade.*

Cahiers Agricultures 1999 ; 4 : 320-9.

situation incompatible avec les exigences des éleveurs.

La connaissance intime des génomes a commencé à apporter de nouveaux outils plus précis et plus rapidement utilisables qu'avant pour procéder à la sélection des animaux. Dans une situation simple et idéale, une fonction biologique dépend essentiellement d'un gène majeur dont la structure est connue. C'est le cas des protéines du lait, qui jouent un rôle majeur dans l'alimentation humaine. Les différentes isoformes qui sont recherchées par l'industrie laitière sont bien connues. Auparavant, la sélection des animaux porteurs des bons allèles en la matière était possible mais particulièrement lente. La connaissance complète de

la séquence des gènes des protéines du lait a complètement changé cette situation, la recherche des allèles pouvant en effet se faire aisément à partir de très petites quantités d'ADN prélevées à n'importe quel moment de la vie de l'animal. Dans ce type de situation, la sélection est donc rapide et d'une totale précision car le choix de l'allèle d'un gène d'une protéine de lait n'a pas d'effet défavorable sur la physiologie des animaux.

Une telle approche n'est actuellement possible que dans un très petit nombre de cas dans la mesure où le nombre de gènes dont la structure et la fonction sont connues est encore faible. La recherche d'un gène par les méthodes

classiques des biologistes qui partent généralement de la fonction biologique d'une protéine est trop lente pour permettre un examen des génomes autre que partiel. Pour cette raison, une série de méthodes a été mises au point pour aborder l'étude des génomes d'une manière systématique. Il s'agit, essentiellement, de la cartographie des génomes, du séquençage systématique des ARN messagers (séquençage des EST, *expressed sequence tag*), de celui, complet, de certains génomes, de la mesure systématique de l'expression de tous les gènes dans tous les tissus et du transfert ou de l'inactivation de gènes chez des animaux modèles (essentiellement la souris) pour déterminer leur fonction biologique. La cartographie des génomes des principales espèces domestiques a été presque entièrement établie, le séquençage complet étant actuellement réservé aux génomes d'animaux modèles et de l'homme. La mesure systématique de l'expression des gènes dans certains tissus commence à être exploitée chez les animaux domestiques. Toutes ces approches ont clairement pour but d'employer des moyens suffisamment puissants pour identifier et gérer la formidable quantité d'informations que contiennent les génomes.

Les génomes des organismes supérieurs contiennent un grand nombre de séquences considérées comme non indispensables car non directement fonctionnelles. Parmi elles se trouvent des éléments répétés comme les minisatellites et les microsatellites, des génomes rétroviraux, des pseudogènes, etc. Les microsatellites ont plus particulièrement retenu l'attention des biologistes. Ces séquences sont relativement courtes, polymorphes et largement répandues dans les génomes. Un microsatellite particulièrement fréquent dans les génomes des animaux supérieurs est composé des bases GC rejetées. Les microsatellites ne sont pas des éléments mobiles des génomes (comme le sont les transposons) mais le résultat d'erreurs non corrigées dans la réplication de l'ADN. Ces séquences ont des longueurs variables allant de 15 à 25 nucléotides environ. Elles sont héréditaires mais peu conservées d'une génération à l'autre et constituent donc des marqueurs très utiles. Par les méthodes classiques de clonage, il a été possible de positionner différents microsatellites sur les chromosomes. Leur séquence ainsi que celle de l'ADN qui les entoure ont pu être établies. Plusieurs centaines de marqueurs microsatellites ont aussi été

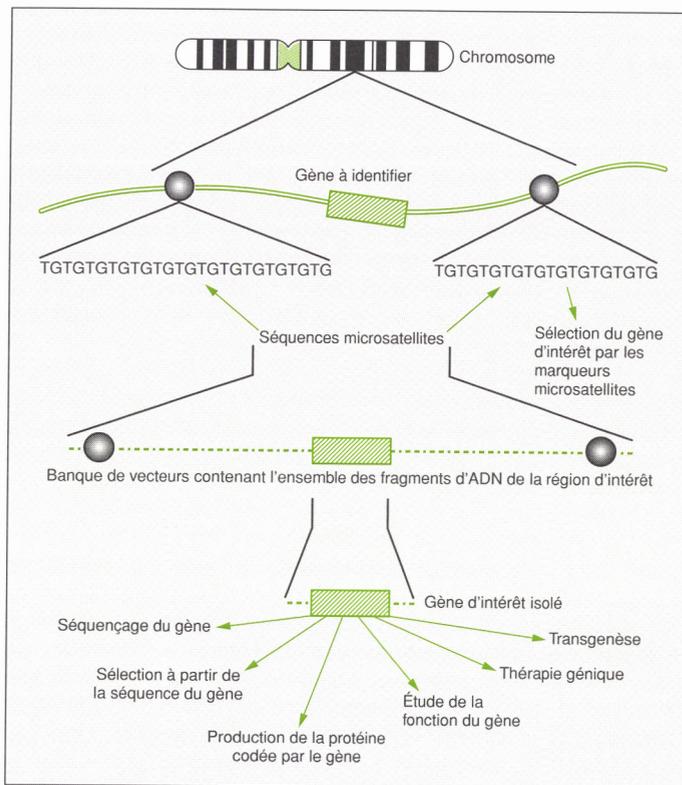


Figure 1. La sélection par marqueurs génétiques.

Figure 1. Selection by genetic markers.

en plaçant de manière ordonnée les différents fragments du génome (les contigs) clonés dans des vecteurs portés par des bactéries ou des levures (figure 1). La présence des microsatellites voisins du gène d'intérêt sur un contig conduit progressivement à l'identification de ce gène. C'est ainsi que sont périodiquement identifiés les gènes responsables de certaines maladies humaines héréditaires. Ce même procédé a permis récemment d'identifier deux gènes responsables du caractère culard (hypertrophie musculaire) du bovin. L'inactivation de l'un d'entre eux, celui de la myostatine [2], est responsable de l'hypertrophie musculaire. L'autre est très probablement celui d'un facteur de croissance, l'IGF<sub>2</sub> (*insulin-like growth factor 2*) [3, 4]. Le gène booroola, responsable de l'hyperprolificité de certaines races de moutons, devrait être prochainement identifié.

La connaissance du gène responsable d'un caractère génétique donné permet de procéder à une sélection parfaitement précise fondée sur la séquence des différents allèles, comme cela est déjà le cas pour les gènes des protéines du lait. Le gène peut également être utilisé pour produire et utiliser la protéine correspondante. Il peut en principe être introduit dans les cellules somatiques des patients pour réaliser une thérapie génique ou dans l'embryon des animaux pour créer de nouvelles lignées d'individus porteurs du caractère d'intérêt par transgénèse (figure 1). L'utilisation de marqueurs est donc intéressante à plusieurs titres pour procéder à l'amélioration génétique des animaux.

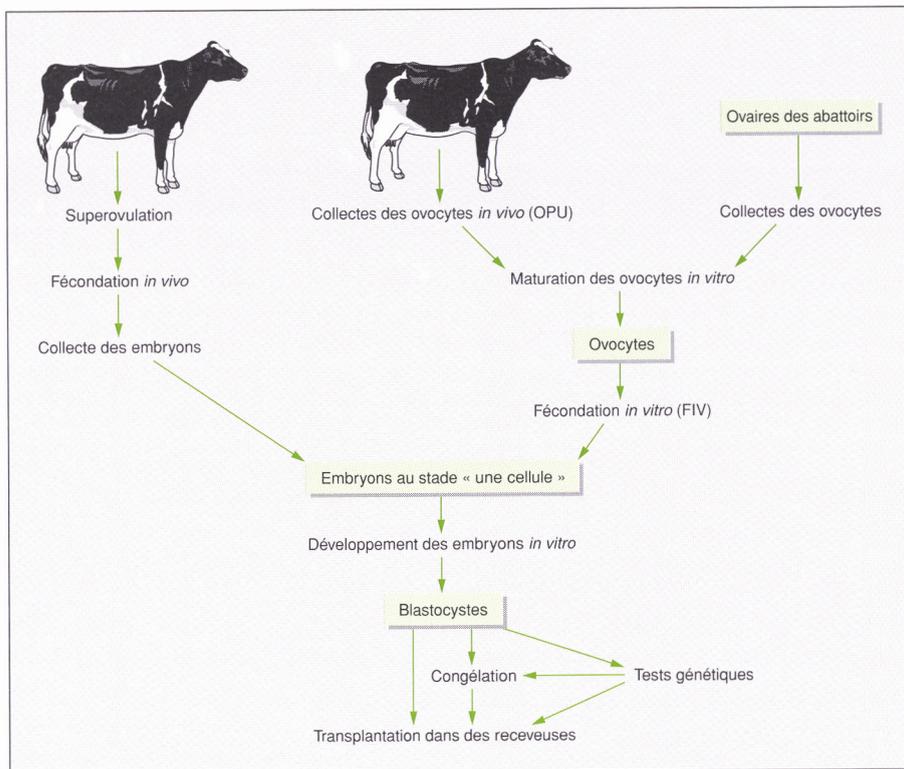
## Maîtrise de la reproduction

La maîtrise de la reproduction animale a commencé, avec l'élevage, par le choix des reproducteurs. L'étape suivante, bien ultérieure, est l'insémination artificielle suivie du transfert d'embryons. Un progrès important a été ensuite fait avec la préparation des embryons *in vitro* à partir d'ovocytes matures, obtenus dans les abattoirs, et fécondés *in vitro* (figure 2). Les ovaires contiennent suffisamment d'ovocytes en cours de maturation pour permettre des fécondations *in vitro* en grand nombre, ce qui peut également être fait en recueillant les ovocytes par

identifiés dans le génome de la vache et du porc. La même opération est en cours chez le poulet, le mouton, la chèvre, les salmonidés, etc. Le positionnement de marqueurs génétiques, de microsatellites, mais aussi de gènes codant pour des protéines connues, constitue la cartographie génétique des génomes.

La carte des génomes peut être utilisée pour procéder à la sélection d'animaux portant tel ou tel caractère d'intérêt agronomique. Il faut, pour cela, tout d'abord obtenir des lignées d'animaux exprimant ou non le caractère d'intérêt puis établir une corrélation entre la longueur des microsatellite en un site donné et le caractère génétique (figure 1) : la cartographie des génomes a permis de positionner des microsatellites tout au long du génome ; des corrélations entre leur longueur en des sites donnés et une propriété biologique des animaux permet de procéder à une sélection directement à partir des marqueurs, d'isoler les gènes responsables des effets observés puis de les utiliser pour une sélection directe ou pour la transgénèse. Cette approche a un sens dans la mesure où les microsatellites ont une longueur très variable d'une génération à l'autre. Le gène responsable du caractère d'intérêt a statistiquement toujours un microsatellite dans son voisinage et sa sélection s'accompagne donc

de la co-sélection des marqueurs microsatellites voisins. L'examen d'un nombre suffisant de microsatellites permet ainsi d'établir une corrélation fiable entre la longueur de quelques microsatellites et la présence de l'allèle donné d'un gène d'intérêt. La sélection peut dès lors être faite en utilisant les marqueurs microsatellites dont l'examen ne nécessite qu'une toute petite quantité d'ADN prélevée à n'importe quel moment de la vie de l'animal. La sélection devient donc plus simple qu'avant, très rapide et plus précise si les microsatellites sont suffisamment rapprochés du gène d'intérêt. Dans ce cas, elle est moins réductrice de biodiversité puisqu'un plus petit nombre de gènes non concernés se retrouvent cosélectionnés avec le gène d'intérêt. Il est bien évident que l'utilisation de marqueurs génétiques est d'autant plus efficace que la fonction biologique sélectionnée ne dépend que d'un petit nombre de gènes ayant un effet intense. Le processus de sélection garde toute sa complexité pour les caractères hautement polygéniques. Dans certains cas, il est souhaitable d'identifier le gène responsable du caractère recherché, ce qui peut être fait par les techniques classiques de la biologie moléculaire. Pour certains génomes, une carte physique des gènes a pu être établie



**Figure 2.** La manipulation des embryons pour la sélection génétique. Les embryons peuvent être obtenus *in vivo* après superovulation ou *in vitro* après maturation des ovocytes (MIV) et fécondation (FIV). Les ovocytes peuvent être collectés dans les abattoirs ou directement *in vivo* (ovum pick up, OPU) à l'aide de sondes.

**Figure 2.** Embryo manipulation for genetic selection. The embryos can be obtained *in vivo* after superovulation or *in vitro* after oocyte maturation and fertilization. The oocytes can be obtained from slaughterhouse or directly *in vivo* by ovum pick up (OPU) using probes.

ponction sur des animaux vivants. Plusieurs collectes hebdomadaires peuvent être réalisées sur un animal ayant de hautes performances génétiques et un même animal peut ainsi être à l'origine de plusieurs centaines d'embryons. L'accélération du progrès génétique peut, de cette manière, se rééquilibrer en partie en faveur des génomes femelles, même si l'insémination artificielle continue de favoriser grandement la dissémination des génomes mâles.

Le clonage des animaux peut en principe faire progresser la génétique encore plus rapidement et en l'orientant encore mieux dans le sens souhaité. Le succès obtenu par le clonage pratiqué massivement chez les plantes est là pour témoigner de l'intérêt de la méthode. Chez beaucoup de plantes, le marcottage naturel, le bouturage expérimental ou industriel et le clonage permettent une reproduction à l'identique sans difficulté. Le clonage consiste à reconstruire un organisme entier à partir d'une cellule soma-

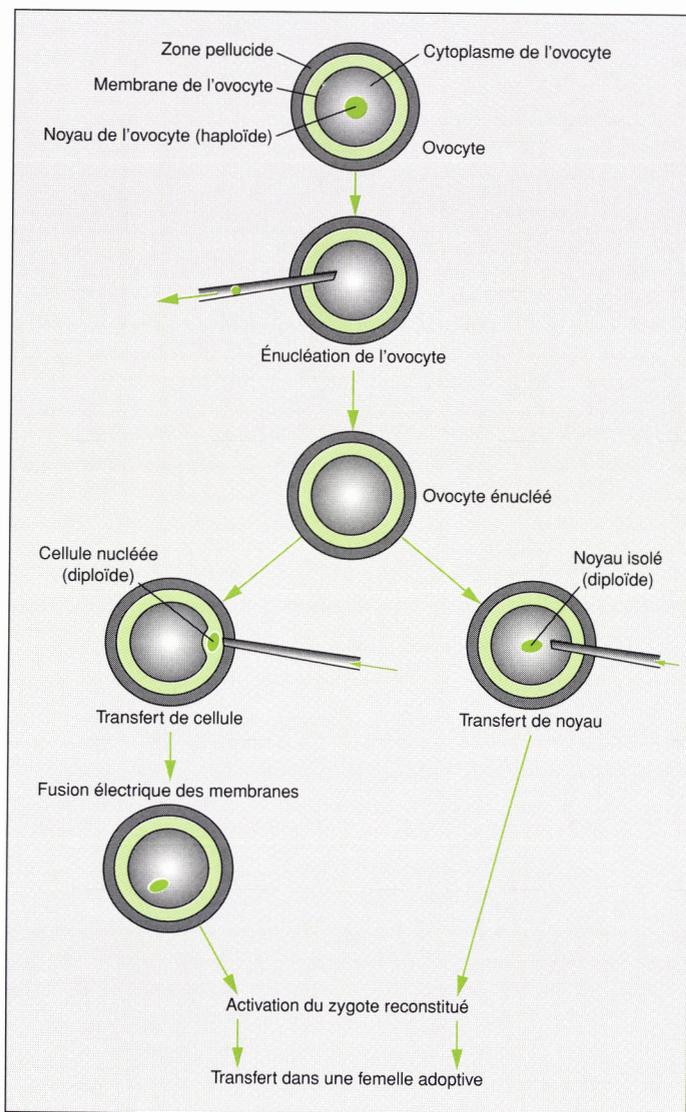
tique plus ou moins différenciée, ce qui est obtenu assez aisément avec certaines plantes en cultivant des cellules somatiques dans les conditions expérimentales appropriées. Les cellules retrouvent ainsi un état équivalent à celui d'un embryon. Leur développement conduit alors à l'obtention d'une multitude de plantes génétiquement identiques à l'organisme d'origine.

Rien de tel n'est possible avec les animaux chez lesquels le retour en arrière du génome d'une cellule différenciée, que l'on qualifie en général de reprogrammation du génome, n'est possible qu'en présence du cytoplasme d'un ovocyte. Celui-ci est capable de programmer les génomes de l'ovocyte et du spermatozoïde pour permettre le développement de l'embryon après la fécondation. L'opération de clonage définie il y a 40 ans chez un batracien de laboratoire, le xénope, consiste à introduire le noyau d'une cellule plus ou moins différenciée dans le cytoplasme d'un ovocyte préala-

blement énucléé par microchirurgie (figure 3). La technique utilisée chez les ruminants domestiques depuis 15 ans consiste à introduire une cellule totipotente fraîchement prélevée sur un embryon précoce entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte énucléé. Une fusion électrique fait ensuite pénétrer le noyau de la cellule dans le cytoplasme de l'ovocyte. Cette technique a été récemment étendue aux cellules pluripotentes (cellules embryonnaires cultivées et ayant perdu leur totipotence) [5], ainsi qu'aux cellules fœtales et adultes différenciées [6]. Pour des raisons inconnues, cette méthode s'est d'abord révélée inapplicable chez la souris, mais des travaux récents ont ensuite montré que, chez cette espèce, le transfert du noyau isolé dans le cytoplasme de l'ovocyte pouvait conduire à l'obtention de clones à condition de soumettre le nouveau zygote ainsi reconstitué à des traitements particuliers [7]. Cette technique a été appliquée avec succès à la vache [8-10]. Ces résultats indiquent sans ambiguïté que le génome d'un animal n'est pas fondamentalement changé lors de la différenciation des cellules. Ils démontrent également que l'expression des gènes est beaucoup plus malléable qu'on ne l'imaginait.

Le procédé qui a conduit à la naissance de la brebis Dolly [6] mettait en œuvre des cellules en phase G<sub>0</sub> dont la croissance est complètement arrêtée par l'absence de sérum dans les milieux de culture. Les expériences ultérieures tendent à montrer qu'une des clés du succès de l'opération est la coïncidence des phases du cycle cellulaire entre la cellule donneuse de noyau et l'ovocyte receveur, et non pas tellement l'état quiescent des cellules donneuses de noyau.

L'avancée technique du clonage peut en principe favoriser la sélection génétique. Il est en effet désormais possible, théoriquement, de multiplier ainsi des animaux adultes dont le patrimoine génétique est intéressant d'un point de vue agronomique (figure 4). La réalité est différente car le rendement du clonage est en effet très faible, et ce d'autant plus que la cellule est issue d'un organisme adulte. Il est possible que les cellules somatiques d'un animal adulte aient subi des mutations de gènes nécessaires au développement embryonnaire. Il est en tout cas probable que la reprogrammation des noyaux par le cytoplasme des ovocytes ne soit pas bien contrôlée. Entre 30 et 40 % des animaux clonés naissent



**Figure 3.** Les techniques de clonage des animaux. Une cellule diploïde est introduite entre la zone pellucide d'un ovocyte énucléé. Sous l'action d'un champ électrique, les membranes des deux cellules fusionnent. Le nouvel embryon ainsi formé est activé et se développe. Chez la souris, le transfert direct de noyau isolé dans le cytoplasme suivi d'une activation biochimique du nouvel embryon permet d'obtenir des animaux clonés.

**Figure 3.** Cloning techniques in animals. A diploid cell is introduced between the zona pellucida and the membrane of an enucleated oocyte. An electric field induces fusion of both membranes and activation of the newly formed embryo, leading to its development. In mouse, the direct transfer of an isolated nucleus into the cytoplasm of an enucleated oocyte followed by biochemical activation of the newly formed zygote leads to development of the embryo.

## Modification génétique des animaux

### Applications de la transgénèse

La modification génétique d'un organisme vivant peut se faire théoriquement en ajoutant à son génome un gène étranger ou en remplaçant spécifiquement un de ses gènes par un autre, inactif ou ayant une autre activité. Les raisons qui justifient la modification des génomes sont multiples [11]. Ajouter ou retrancher un gène à un génome est un moyen indispensable et très largement utilisé pour comprendre le fonctionnement et le rôle des gènes. Ce fait est devenu si évident que les pays qui ont une recherche développée se dotent de plus en plus d'animaux importantes spécialement consacrées aux animaux transgéniques. Les espèces utilisées pour des recherches cognitives sont essentiellement la souris, une mouche (*Drosophila*), un vers nématode (*Caenorhabditis elegans*) et à un moindre degré un poisson (le medaka), le rat, le lapin et le porc.

L'étude des maladies humaines a de plus en plus besoin de modèles animaux. La disponibilité croissante des gènes humains permet d'envisager une utilisation intense des animaux transgéniques, en particulier des souris, pour étudier des situations pathologiques expérimentales. Le besoin d'organes et de cellules pour les patients va croissant avec l'allongement de la durée de la vie et avec l'avènement de nouvelles techniques de transplantation. L'utilisation des animaux comme sources de cellules et d'organes pour l'espèce humaine est un objectif reconnu actuellement comme essentiel mais les mécanismes de rejet, multiples et puissants, interdisent encore une telle pratique. La transgénèse commence à apporter aux organes animaux une résistance contre les attaques du complément et du système immunitaire humains. Il est donc vraisemblable que des cellules et des organes de porcs seront un jour utilisés en routine pour pallier le manque de matériel d'origine humaine. De nombreuses études sont encore nécessaires avant que soient obtenus les porcs dont les organes sont résistants aux divers mécanismes de rejet et qui ne risquent pas de transmettre leur rétrovirus à leurs hôtes humains.

L'industrie pharmaceutique commence à bénéficier directement de la transgé-

avant terme, meurent peu après leur naissance ou ont des défauts de développement (des systèmes immunitaire et circulatoire notamment) qui les rendent inexploitable. Ces observations posent des questions fondamentales importantes et rendent inutilisable, actuellement, la technique de clonage pour procéder à une accélération du progrès génétique. Les succès remportés avec la naissance de Dolly [6], de Marguerite [8] et des souris clonées ont profondément éveillé l'intérêt des biologistes et certains d'entre eux vont consacrer une part croissante de leur activité à étudier les événements qui

accompagnent le clonage des animaux. De ces études devraient sortir des solutions intéressantes pour les élevages, mais beaucoup reste à faire, notamment parce que les problèmes sont complexes et n'ont été traités que par quelques laboratoires jusqu'à une époque très récente. Il reste ainsi particulièrement difficile de cloner des porcs et des lapins. Les enjeux pour multiplier les animaux mais aussi pour les rendre transgéniques sont tels que des moyens très substantiels, notamment privés, sont actuellement mis à la disposition des chercheurs.

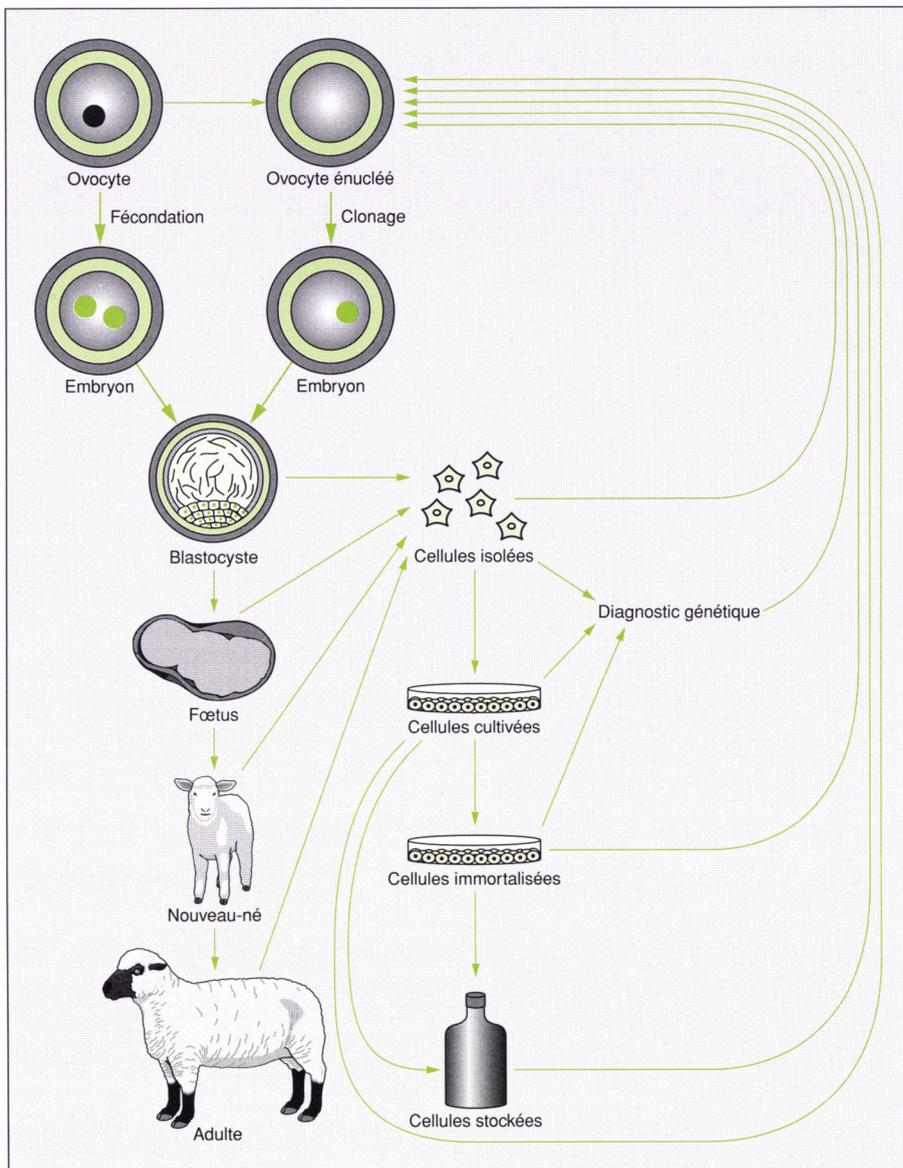


Figure 4. L'utilisation du clonage pour l'amélioration génétique.

Figure 4. The use of cloning for genetic selection.

nèse. Des lapins, des porcs, des chèvres, des moutons et des vaches transgéniques sont en effet utilisés comme sources de protéines recombinantes (produites dans leur lait) d'intérêt pharmaceutique [12]. La première protéine préparée avec ce procédé à partir du lait de chèvre, l'antithrombine-III humaine, devrait être mise sur le marché en 2000 ou 2001. Des dizaines d'autres et, notamment, de nombreux anticorps monoclonaux devraient suivre. De tels anticorps sont des outils essentiels pour poser des diagnostics *in vitro* et *in vivo* ainsi que, potentielle-

ment, pour cibler des tumeurs en leur apportant des agents cytotoxiques comme des éléments radioactifs ou des gènes codant pour des protéines létales pour les cellules.

### Techniques permettant d'obtenir des animaux transgéniques

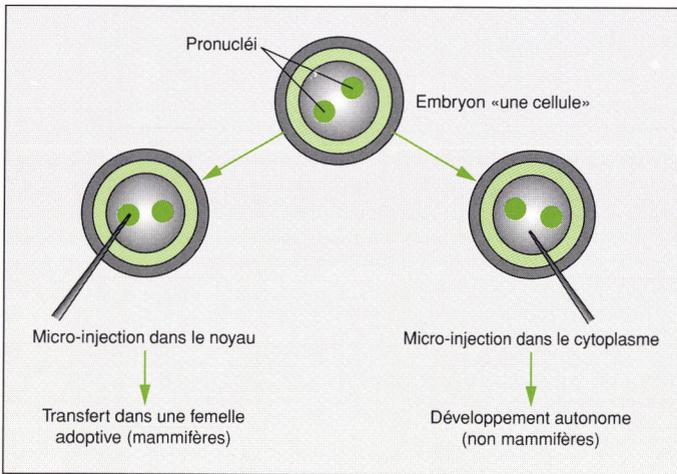
Les transferts de gène dans les cellules en culture est une pratique très courante depuis plus de 15 ans. Les différentes méthodes utilisées sont relativement peu

efficaces mais parfaitement suffisantes dans la plupart des cas. Les limites viennent du fait qu'une faible proportion de cellules capturent et intègrent le gène étranger véhiculé par un agent transfectant.

Ces méthodes ne sont donc pas applicables aux organismes entiers. Une lignée d'animaux transgéniques ne peut être établie que si le gène est présent dans l'embryon au stade 1 cellule ou dans les gamètes.

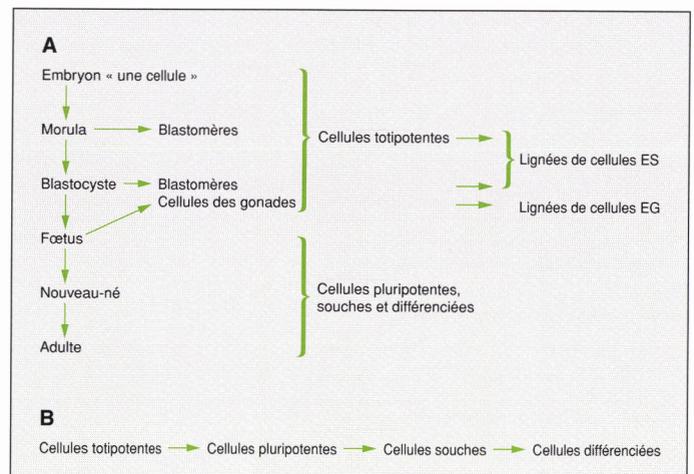
En pratique, chez les mammifères, la micro-injection directe d'une solution de gène (de 1 000 à 5 000 copies du gène) dans un des pronucléus de l'embryon au stade 1 cellule est la méthode de référence la plus utilisée (figure 5). Cette technique ne permet pas d'obtenir en routine plus de 2 à 5 souris transgéniques pour 100 embryons manipulés et les taux de réussite sont encore plus faibles pour les autres mammifères, en particulier pour les ruminants. Le faible rendement observé dans tous les cas vient en partie du fait que l'ADN injecté est mutagène et létal pour les embryons. Par ailleurs, ceux des ruminants, notamment de la vache, semblent peu capables d'incorporer l'ADN étranger. Il se pourrait que les mécanismes de réparation de l'ADN qui sont impliqués dans l'intégration de l'ADN étranger soient moins actifs chez les ruminants que chez la souris. Chez la vache, l'obtention des embryons *in vitro* (figure 2) suivie d'une culture jusqu'au stade blastocyste et, éventuellement, d'une identification des embryons transgéniques permet de se passer de femelles donneuses d'embryons et de n'avoir recours qu'à un très petit nombre de femelles receveuses. En pratique, une équipe entraînée peut obtenir ainsi une dizaine de veaux transgéniques en manipulant environ 30 000 embryons pendant une période de 7 à 8 mois [13]. Chez les vertébrés inférieurs (poissons en particulier) et les invertébrés, la micro-injection ne peut être réalisée que dans le cytoplasme des embryons au stade 1 cellule. Chez les espèces qui se développent hors de l'utérus maternel, les œufs ont en effet une coque et contiennent du vitellus qui interdisent un accès aisé au noyau (figure 5).

Chez les oiseaux, la transgénèse reste un exercice particulièrement ingrat en raison de la difficulté qu'il y a à manipuler les embryons. Il est possible de collecter un embryon au stade 1 cellule, de procéder à une micro-injection de gènes dans le cytoplasme puis de permettre son déve-



**Figure 5.** L'obtention d'animaux transgéniques par micro-injection de gène. Chez les mammifères, la micro-injection peut être faite dans l'un des pronucléus des embryons au stade une cellule. Chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés, la micro-injection ne peut avoir lieu que dans le cytoplasme car les pronucléi ne sont pas visibles. Ces méthodes ont des rendements faibles et variables selon les espèces.

**Figure 5.** The generation of transgenic animals by gene microinjection. In mammals, microinjection can be done into pronuclei at the one cell stage. In lower vertebrates and invertebrates, microinjection can be done only into the cytoplasm since the pronuclei are not visible. These techniques have a low yield which is different according to species.



**Figure 6.** Les différentes étapes de la différenciation des cellules au cours du développement. Les lignées de cellules ES et EG deviennent respectivement des embryons et des cellules primordiales germinales des fœtus. Le processus conduisant des cellules totipotentes aux cellules souches puis aux cellules différenciées n'est pas ou peu réversible dans les conditions naturelles.

**Figure 6.** The different steps of cell differentiation during development. The ES and EG cell lines are derived from embryos and primordial germ cells respectively. The process leading from totipotent cells to stem, and finally differentiated cells is not (or only slightly) reversible in natural conditions.

veloppement en le remplaçant dans le jaune d'un œuf, mais ce procédé ne permet d'obtenir qu'un nombre très faible d'animaux transgéniques. L'utilisation d'un transposon ayant pour origine un insecte permet d'obtenir une intégration beaucoup plus efficace dans un embryon de poulet [14], de poisson [15] et, probablement, de mammifère.

Les vecteurs rétroviraux permettent d'emporter des gènes étrangers jusqu'au génome des cellules infectées. De tels vecteurs introduits à proximité des cellules primordiales germinales des embryons de poulet permettent d'obtenir des animaux transgéniques en petit nombre. Ceux-ci sont très mosaïques du fait que le transgène n'a pu au mieux atteindre, *via* l'infection, qu'une petite partie des cellules germinales [16]. Le même type de vecteurs rétroviraux a récemment été utilisé pour infecter des ovocytes, avec un rendement très élevé d'animaux transgéniques dans la mesure où le vecteur viral a un libre accès au génome lorsque la membrane du noyau de l'ovocyte disparaît [17]. Le nombre d'animaux qui survivent à ce traitement est très faible et il n'est pas certain que ce procédé ait une supériorité réelle sur les autres.

Le transfert des gènes dans les spermatozoïdes ou leurs précurseurs constitue une

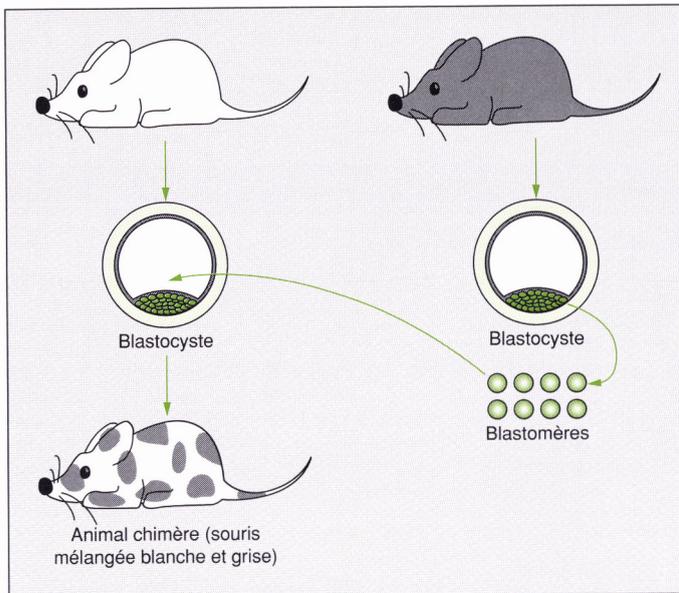
approche séduisante mais qui s'est révélée n'être que d'une très faible efficacité et conduire à un remaniement profond de l'ADN étranger [18]. Chez le xénope, une décondensation de la chromatine du spermatozoïde suivie d'une incubation avec l'ADN et d'une fécondation par micro-injection dans l'ovocyte permet d'obtenir des animaux transgéniques d'une manière satisfaisante [19].

Une étude récente a montré que des spermatozoïdes de souris dont la membrane a été endommagée par congélation-décongélation ou après un traitement par un détergent apolaire sont capables de fixer de l'ADN en solution. Ils ont perdu toute capacité à féconder spontanément mais peuvent, en revanche, donner naissance à des souris transgéniques lorsqu'ils sont introduits dans des ovocytes par micro-injection [20]. Cette technique de fécondation utilisée par l'espèce humaine et appelée ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) est donc susceptible de remplacer la micro-injection classique dans les pronoyaux. Le rendement final de l'opération n'est toutefois pas supérieur à la micro-injection d'ADN chez la souris. Son intérêt va donc dépendre de l'efficacité de l'ICSI chez les différentes espèces. Une solution de remplacement à l'introduction des gènes étrangers dans les

gamètes ou les embryons consiste à utiliser des cellules capables ensuite de reconstruire des embryons viables.

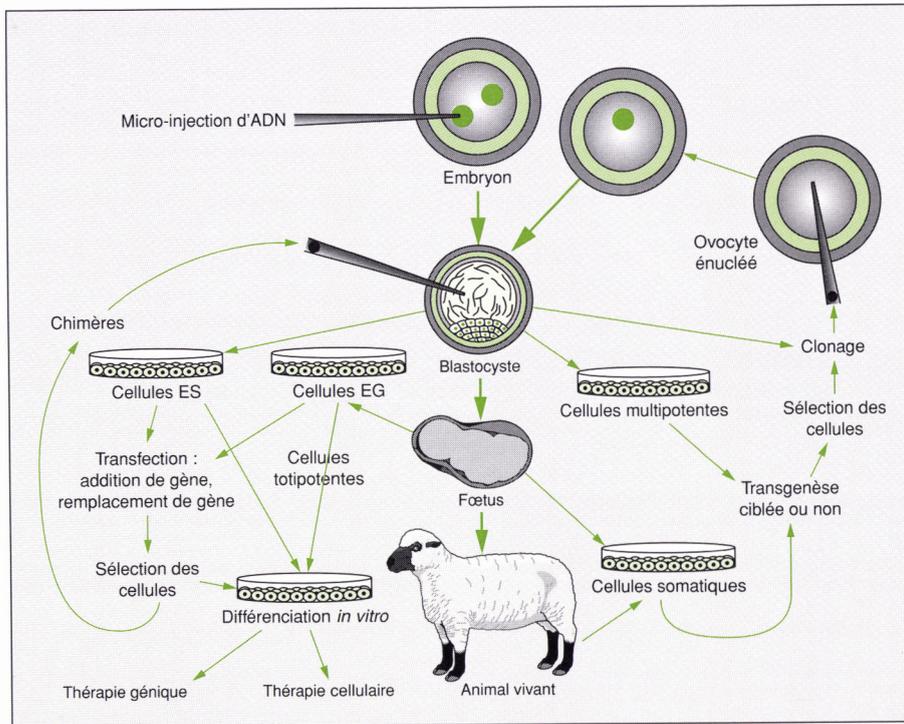
Les cellules des embryons précoces ne sont pas différenciées. On dit qu'elles sont totipotentes (*figure 6*). Quand elles sont réintroduites précocement dans un embryon, elles peuvent participer à son développement pour donner des animaux chimères (*figure 7*). Pour des raisons inconnues, les cellules embryonnaires et les cellules primordiales germinales (*primordial germ cells*, PGC), qui sont naturellement totipotentes, perdent spontanément cette propriété pour devenir pluripotentes et n'ont plus, alors, leur capacité à participer au développement embryonnaire et surtout à la formation des gamètes. Seules quelques lignées de cellules totipotentes de souris obtenues à partir des embryons (cellules ES embryonnaires souches) ou des gonades primordiales fœtales (cellules EG) gardent leur capacité de participer à la formation des gamètes de l'embryon chimère reconstitué. Les lignées de cellules ES de poulet récemment établies paraissent prometteuses à cet égard mais rien ne prouve encore qu'elles ont gardé leur capacité à engendrer des gamètes [21].

Une autre manière de reconstituer un organisme entier à partir d'une cellule



**Figure 7.** L'obtention d'animaux chimères par introduction de cellules totipotentes dans les embryons précoces.

**Figure 7.** The generation of chimeric animals by the introduction of totipotent cells into early embryos.



**Figure 8.** Les différentes méthodes de transfert de gènes.

**Figure 8.** Different gene transfer techniques.

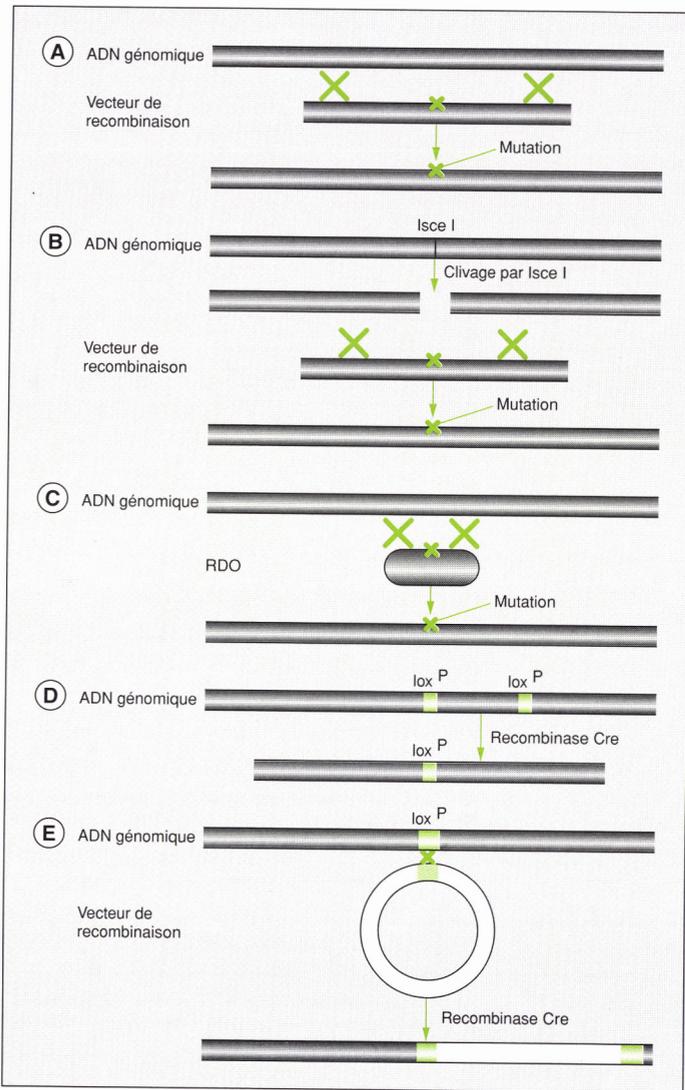
consiste bien évidemment à utiliser la technique du clonage. Des cellules embryonnaires, fœtales ou adultes, sont en principe utilisables à cette fin (figure 8). Le transfert de gène devient possible ainsi chez toutes les espèces où le clonage l'est. En pratique, l'addition de gène *via* les cellules ES ou EG ne se fait pas chez la

souris, la micro-injection étant plus simple et au moins aussi efficace. En revanche, elle est possible par la technique de clonage (figure 8) et, de toute évidence, avantageuse, au moins chez les ruminants. Une expérience innovante a ainsi montré qu'il fallait environ 2,5 fois moins de brebis pour obtenir un nombre

donné d'animaux transgéniques par la technique de clonage plutôt que par la micro-injection [22].

Le véritable intérêt qu'offre la reconstitution d'un embryon à partir de cellules cultivées ne réside pas tant dans la possibilité d'ajouter un gène étranger que dans celle de procéder au remplacement d'un gène de l'hôte par un processus de recombinaison homologue (figure 9). L'ajout d'une séquence d'ADN identique à un gène cellulaire en induit une qui se traduit de cette manière par un remplacement très précis du gène endogène par le gène étranger. Cette opération peut devenir encore plus efficace si l'on coupe au préalable l'ADN en un site rare comme celui reconnu par l'enzyme *Isce I* déjà introduit dans le génome. La séquence *lox<sup>P</sup>* se recombine très efficacement et très spécifiquement avec une autre séquence *lox<sup>P</sup>* en présence d'une recombinase particulière appelée *Cre*. Cela permet l'excision précise d'un fragment d'ADN bordé par deux séquences *lox<sup>P</sup>* ou l'introduction en un site *lox<sup>P</sup>* d'un gène étranger contenant la même séquence *lox<sup>P</sup>* (figure 9E). Des structures mixtes ARN-ADN, appelées RDO (RNA-DNA oligonucléotides), sont capables de se combiner avec une très haute efficacité avec un gène homologue cellulaire (figure 9C).

Ces outils et quelques autres permettent non seulement d'ajouter des informations génétiques étrangères à un génome mais de procéder à une chirurgie moléculaire d'une parfaite précision conduisant au remplacement d'un allèle par un autre sans altérer du tout le reste du génome. De telles approches ont des implications potentielles importantes pour des recherches cognitives mais également pour des applications de caractère agronomique. Dans ces conditions, les effets des transgènes ne sont plus dus à leurs interférences intempestives avec le génome en raison de leur effet mutagène potentiel résultant d'une introduction au hasard. Ces techniques permettent, par exemple, d'envisager l'obtention de lignées de vaches portant les meilleures allèles des gènes des protéines du lait, sécrétant du lait dépourvu de bêta-lactoglobuline, connue pour ses effets allergènes, ou appauvri en lactose mal toléré par une large proportion de consommateurs dans le monde. Le remplacement de gène par recombinaison homologue laisse entrevoir la possibilité



**Figure 9.** La modification des génomes par recombinaison homologue. Des séquences identiques se recombinent de manière spécifique. Cela peut conduire à un remplacement de gènes (A). La coupure des deux brins de l'ADN en un site unique (Isce I) préalablement introduit dans le génome augmente très notablement la fréquence de recombinaison homologue (B). Des structures composées de ribonucléotides et de déoxyribonucléotides (RDO) induisent une mutation du gène correspondant avec une haute fréquence (C). La séquence  $lox^P$  du phage bactérien P1 se recombine très spécifiquement et très efficacement en présence de la recombinase Cre du phage P1. Ceci peut conduire à l'éjection d'un fragment d'ADN bordé par la séquence  $lox^P$  (D) ou par l'introduction ciblée d'un gène étranger (E).

**Figure 9.** Modification of genomes by homologous recombination. Identical sequences can recombine in a specific manner. This can lead to a gene replacement (A). The cleavage of the two DNA strands at a specific site (Isce I) previously introduced in the genome considerably enhances the recombination frequency (B). Structures composed of ribo and deoxyribonucleotides (RDO) induce high frequency mutation of the corresponding gene (C). The  $lox^P$  sequence from P1 phage can recombine with itself specifically and efficiently. This may lead to elimination of a DNA fragment bordered by the  $lox^P$  sequence (D) or to a specific integration of a foreign gene at the  $lox^P$  site (E).

d'obtenir des animaux (vache et mouton) chez lesquels le gène PrP, impliqué dans les maladies à prion (vache folle,

scrapie), aura été inactivé. De tels animaux ont en effet, en principe, perdu toute réceptivité à ce type de maladie.

## Conclusions et perspectives

Les biotechnologies animales n'ont encore porté que des fruits relativement modestes. Il ne fait pas de doute que l'utilisation des marqueurs génétiques va permettre d'affiner très notablement la sélection des animaux. Elle va également permettre de déterminer les gènes impliqués dans le contrôle des fonctions biologiques d'intérêt agronomique. Le temps où le clonage permettra une accélération effective du progrès génétique n'est pas encore venu. Cette technique a, en revanche, toutes les chances d'être adoptée pour l'ajout et le remplacement de gènes chez les gros animaux. La transgénèse elle-même paraît incontournable tant ses apports potentiels semblent intéressants. Il est bien évident qu'elle ne saurait remplacer la sélection mais qu'elle va, au contraire, la compléter. Elle permet en effet de s'affranchir de la barrière d'espèce et d'utiliser des gènes qui n'existent pas dans la nature. Cela est particulièrement vrai pour les gènes destinés à la lutte contre certaines maladies. Des ARN antisens, des ribozymes, des ARN formant des triples hélices avec l'ADN ainsi que des protéines ayant une activité transdominante négative [23] peuvent s'opposer à la réplication d'un virus pathogène ou, plus généralement, à l'expression d'un gène cellulaire.

Cette panoplie de techniques, bien qu'encore imparfaite, a tout lieu d'enthousiasmer les biotechnologistes qui se voient virtuellement capables de résoudre un grand nombre de problèmes restés sans solution. Le contraste avec l'opinion publique actuelle sur ces questions est frappant. Le retour strict à la tradition en matière d'agriculture et d'élevage ne saurait être une solution aux excès parfois insupportables de certaines techniques aujourd'hui utilisées pour leur seule rentabilité. Une amélioration de la situation peut, dans certains cas, s'appuyer sur un retour à des pratiques anciennes et, dans d'autres, tout au contraire sur la mise en œuvre de techniques sophistiquées, y compris de la transgénèse. L'utilisation des OGM résistant aux maladies constitue souvent une lutte biologique par excellence. Il est infiniment souhaitable que le débat sur les biotechnologies, et notamment sur les OGM, se recentre sur les vrais pro-

## Résumé

### L'impact de la cartographie des génomes, du clonage et de la transgénèse chez les animaux domestiques

L.-M. Houdebine

La connaissance des génomes permet de procéder à une sélection animale fondée sur des marqueurs génétiques, notamment sur des microsatellites, situés au voisinage des gènes responsables de caractères génétiques intéressants. Dans le meilleur des cas, ceux-ci peuvent être identifiés, isolés et étudiés. Ils peuvent également être utilisés pour réaliser une sélection génétique précise, et éventuellement pour produire les protéines correspondantes si elles ont des propriétés pharmacologiques ou vétérinaires intéressantes. Les gènes peuvent être utilisés directement pour des thérapies géniques en médecine humaine ou pour réaliser des opérations de transgénèse chez les animaux ; pour certains animaux, l'utilisation de la transgénèse est une opération de routine. Celle-ci implique l'addition de gènes étrangers mais également le remplacement de gènes de l'hôte par recombinaison homologe. Les cellules totipotentes ES ou EG sont utilisées dans ce but pour engendrer des embryons chimères, mais uniquement chez la souris. L'amélioration de la technique de clonage par transfert de noyau dans le cytoplasme d'ovocytes énucléés permet d'envisager une accélération du progrès génétique. Cela sera d'autant plus vrai que le clonage est réalisé à partir d'animaux adultes dont les caractéristiques agronomiques sont connues. Le rendement actuel du clonage reste trop faible pour en permettre l'utilisation dans les élevages. Dans son état actuel, il permet de procéder à l'ajout de gènes dans des cellules fœtales qui sont ensuite utilisées pour produire des embryons. Ce même procédé devrait permettre de procéder à des remplacements de gènes par recombinaison homologe. Il s'avère d'ores et déjà plus intéressant que la micro-injection classique pour les ruminants. La transgénèse est, depuis plus de 14 ans, un outil essentiel pour étudier le fonctionnement et le rôle des gènes dans le contrôle des fonctions biologiques et le déclenchement des maladies humaines. Le lait d'animaux transgéniques est en train de devenir une source industrielle de protéines d'intérêt pharmaceutique ou vétérinaire, tandis que les porcs transgéniques vont vraisemblablement devenir la source de cellules et d'organes pour des greffes à l'homme même si de nombreux problèmes théoriques, techniques ainsi que de biosécurité restent non résolus. Des porcs et diverses espèces de poissons transgéniques exprimant des gènes de l'hormone de croissance seront bientôt proposés à la consommation humaine. D'autres animaux, notamment résistants aux maladies, ayant une composition du lait optimisée, voire modifiée, ou des carcasses plus adaptées à la nutrition humaine devraient être obtenus prochainement.

blèmes et que soient pris en compte au cas par cas les avantages et les inconvénients d'une méthode quelle qu'elle soit. Il faudrait pour cela que les biotechnologies aient eu le temps, avec un minimum de sérénité, d'obtenir quelques succès réellement intéressants pour les consommateurs. La situation actuelle est encore confuse. Elle a le mérite de respecter les principes démocratiques. Elle ne peut qu'inciter les biotechnologistes à affiner leurs projets et à expliquer ce qu'ils font en jouant la transparence ■

### Références

- Houdebine LM. Les biotechnologies animales : nécessité ou révolution inutile. Paris : Éditions France Agricole, 1998 ; 160 p.
- Westhusin M. From mighty mice to mighty cows. *Nature Genet* 1997 ; 17 : 4-5.
- Nezer C, Moreau L, Brouwers B, et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2* locus in pig. *Nature Genet* 1999 ; 21 : 155-6.
- Jeon JT, Calborg O, Tornsten A, et al. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus. *Nature Genet* 1999 ; 21 : 157-8.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996 ; 380 : 64-6.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997 ; 385 : 810-3.
- Wakayama T, Perry ACF, Zucotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998 ; 394 : 369-74.
- Vignon X, Chesné P, Le Bourhis D, et al. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *CR Acad Sci* 1998 ; 321 : 735-45.
- Robl JM. Development and application of technology for large scale cloning of cattle. *Theriogenology* 1999 ; 51 : 499-508.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998 ; 282 : 2095-8.
- Houdebine LM. *Les animaux transgéniques*. Paris : Lavoisier, 1998 ; 181 p. (collection Génie génétique).
- Houdebine LM. Recombinant proteins from domestic animals. In : Colloque OCDE, Paris 29-31 mars 1999 (sous presse).
- Eyestone WH. Production of transgenic cattle expressing a recombinant protein of milk. In : Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, McGloughlin MM, eds. *Transgenic animals in agriculture*. Wallingford : CABI Publishing, 1999 ; 177-92.
- Shermann A, Dawson A, Mather C, et al. Transposition of the *Drosophila* element mariner into the chicken germ line. *Nature Biotechnol* 1998 ; 16 : 1050-3.
- Hackett PB, Izsvak Z, Ivics Z, et al. Development of genetic tools for transgenic fish. In : Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, McGloughlin MM, eds. *Transgenic animals in agriculture*. Wallingford : CABI Publishing, 1999 ; 19-36.
- Ronfort CM, Legras C, Verdier G. The use of retroviral vectors for gene transfer into bird embryo. In : Houdebine LM, ed. *Transgenic animal generation and use*. Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997 : 83-95.
- Chan AWS, Homan EJ, Ballou LU, et al. Transgenic cattle produce reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 14028-33.
- Squires EJ, Drake D. Transgenic chickens by liposome-sperm-mediated gene transfer. In : Houdebine LM, ed. *Transgenic animal generation and use*. Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1997 : 95-100.
- Kroll KL, Amaya E. Transgenic xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 1996 ; 122 : 3173-83.
- Perry A, Wakayama T, Kishikawa H, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999 ; 284 : 1180-3.
- Pain B, Clark ME, Shen M, et al. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenic potentialities. *Development* 1996 ; 122 : 2339-48.
- Schnieke A, Kind AJ, Ritchie WA, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997 ; 278 : 2130-3.
- Houdebine LM. L'amélioration des productions animales par la transgénèse. *CR Acad Agric Fr* 1998 ; 84 : 99-108.