

La transgénèse animale et ses applications

La transgénèse consiste à ajouter, remplacer ou inactiver un gène particulier. Cette technique permet des progrès considérables dans la connaissance du fonctionnement des gènes et des mécanismes qui gouvernent les fonctions biologiques. Ses applications potentielles pour produire des médicaments, des vaccins, des protéines alimentaires ou en amélioration génétique sont très vastes, mais encore limitées en raison de son coût et de la difficulté de sa mise en œuvre.

Les techniques de génie génétique, qui sont nées pour l'essentiel il y a maintenant 20 ans, ont commencé à se populariser et à envahir les laboratoires il y a un peu plus de 10 ans. Les perspectives qui se sont alors ouvertes ont paru grandioses et un nouveau mot, les biotechnologies, a été créé pour saluer le début de cette ère nouvelle. Ceci a conduit à annoncer la réalisation quasi imminente de projets très profitables pour la médecine et l'agriculture. Cette première période d'euphorie, parfois caractérisée par une assez grande naïveté et surtout par une certaine méconnaissance de ce qu'est la complexité des organismes vivants, a été suivie d'une phase de relative

dépression. Tout paraissait décidément bien plus compliqué que ce que l'on avait imaginé, en particulier dans le domaine animal. Un rythme de croissance plus réaliste a permis depuis de progresser lentement mais sur des bases plus solides qui commencent à porter leurs fruits dans la plupart des domaines.

Il y a cinq ans environ, les biotechnologies animales avaient pu être classées en plusieurs rubriques faisant appel à des techniques ou des interventions sur les animaux de plus en plus complexes, laissant prévoir un ordre chronologique probable des réalisations dans ce domaine (Houdebine 1991). Les interventions faisant appel au transfert de gènes chez les animaux n'ont donné à ce jour qu'un nombre très réduit d'applications agronomiques. Toutefois, la vaccination génétique, qui consiste à protéger définitivement les animaux contre telle ou telle maladie par le transfert d'un gène approprié, est un objectif qui n'est pas du tout hors de portée. La modification de la composition du lait des animaux domestiques par la transgénèse ne paraît pas non plus inaccessible. La modification des fonctions physiologiques des animaux par le transfert de gène est un complément puissant à la sélection génétique. Les réalisations dans ce domaine sont encore très peu nombreuses et elles n'apparaîtront que lentement. La complexité des fonctions biologiques elles-mêmes et, partant, le manque de gènes candidats réellement intéressants, ainsi que la difficulté relative pour obtenir des animaux transgénétiques domestiques sont les causes essentielles de cette lenteur.

La transgénèse animale a maintenant 17 ans. Il est intéressant de tenter de faire le bilan de cette technique appliquée aux animaux d'intérêt agronomique. Ceci doit nous éclairer et nous aider à mieux orienter nos efforts et nos investissements.

Résumé

La transgénèse animale a été réalisée avec succès pour la première fois il y a 17 ans. De nombreuses utilisations de cette technique existent pour la recherche fondamentale. Elles consistent à ajouter, à inactiver ou à remplacer spécifiquement des gènes dans les génomes des animaux. Ces expériences apportent une moisson d'informations incomparables sur le fonctionnement du génome et sur les mécanismes de régulation des fonctions biologiques. De nombreux modèles animaux sont également obtenus pour l'étude de maladies humaines. La production de protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgénétiques est en passe de devenir une réalité industrielle. Le transfert de certains organes (cœur, rein, poumon...) et cellules (pancréas, foie) de porcs transgénétiques à l'espèce humaine est un objectif qui ne paraît plus inaccessible. Les applications de la transgénèse pour l'amélioration des productions animales sont encore à peu près inexistantes. Elles se cantonnent essentiellement à l'obtention de modèles pour des études de gènes et de fonctions biologiques particulières. La difficulté et le coût de la transgénèse chez les animaux domestiques sont une des causes essentielles de la lenteur des applications dans ce domaine. Toutefois, le transfert de gène dans des cellules fœtales cultivées suivi de leur transfert dans des ovocytes énucléés devrait contribuer grandement à améliorer cette situation. La transgénèse appliquée directement aux animaux d'élevage pour obtenir de nouvelles lignées ayant des caractéristiques génétiques intéressantes a toutes les chances de s'imposer dans les années qui viennent. La transgénèse ne saurait toutefois se substituer aux autres techniques (sélection génétique, vaccination, maîtrise de la reproduction...) qui elles-mêmes font de rapides progrès pour améliorer la production animale. La transgénèse doit plutôt être considérée comme une technique supplémentaire pour améliorer les productions animales.

1 / Les techniques de transgénèse

Une protéine peut être produite à partir d'un gène étranger par des bactéries, des levures, des cellules animales en culture ou des animaux transgéniques, pour être étudiée ou pour être utilisée comme agent thérapeutique. Un gène peut être transféré *in vivo* dans les seules cellules somatiques et on procède alors à une thérapie génique. Le gène peut également être transféré dans les cellules germinales, on obtient alors des lignées d'animaux transgéniques (figure 1).

La transgénèse consiste à ajouter un gène étranger au génome d'un organisme vivant ou au contraire à remplacer très précisément un gène endogène par un autre gène. Cette dernière opération, qui implique la mise en œuvre d'un processus de recombinaison homologue, peut conduire en pratique à l'inactivation ou à la mutation d'un gène chez l'animal. Elle permet tout aussi bien de remplacer un gène donné par un tout autre gène. Dans tous les cas, le succès de ces opérations est très intimement lié aux techniques de la reproduction.

1.1 / L'addition de gènes

Les spermatozoïdes mis au contact d'une solution d'ADN puis utilisés pour réaliser des fécondations peuvent véhiculer les gènes jus-

qu'au futur embryon et permettre l'obtention d'animaux transgéniques. Cette approche s'est avérée possible chez le poulet, le poisson zèbre ainsi que chez la vache et le porc. Les taux d'animaux transgéniques obtenus étaient toutefois faibles voire très faibles et les transgènes étaient dans la majorité des cas profondément remaniés (Schellander et Brem 1997, Squires et Drake 1997). Contre toute attente, les spermatozoïdes de mouton mis au contact d'une solution d'ADN ont permis d'obtenir des embryons transgéniques avec un rendement relativement élevé et sans remaniement apparent des transgènes (Sanchez-Putida *et al*, résultats non publiés). Cette approche très simple mérite d'être examinée de manière plus approfondie.

Plusieurs expériences récentes suggèrent fortement que les spermatozoïdes et leurs précurseurs peuvent également être utilisés d'une autre manière pour transférer des gènes. Il a été récemment montré que des cellules précurseurs des spermatozoïdes, isolées à partir de testicules de souris et même de rat, pouvaient achever leur maturation dans des testicules adoptifs de souris jusqu'à devenir parfaitement fonctionnels (Clouthier *et al* 1996). Il est par ailleurs possible de procéder avec succès à des fécondations *in vitro* en injectant les cellules précurseurs des spermatozoïdes, les spermatocytes, dans le cytoplasme d'ovocytes. Il est parfaitement concevable de transférer des gènes, y compris par recombinaison homologue, pendant la culture

Figure 1. Les différentes utilisations du décodage des gènes isolés. Le transfert de gènes dans des cellules ou des organismes entiers permet l'étude des mécanismes de l'expression génétique, la production de protéines recombinantes, la thérapie génique et cellulaire et la transgénèse.

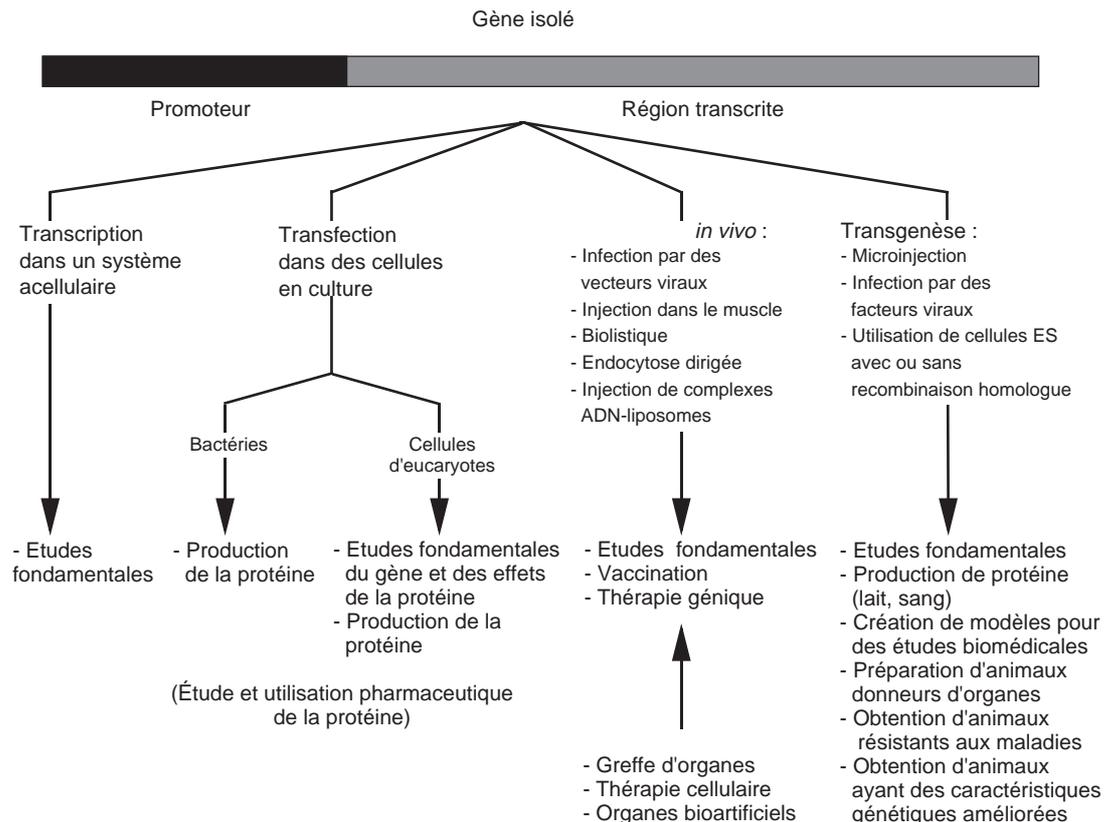
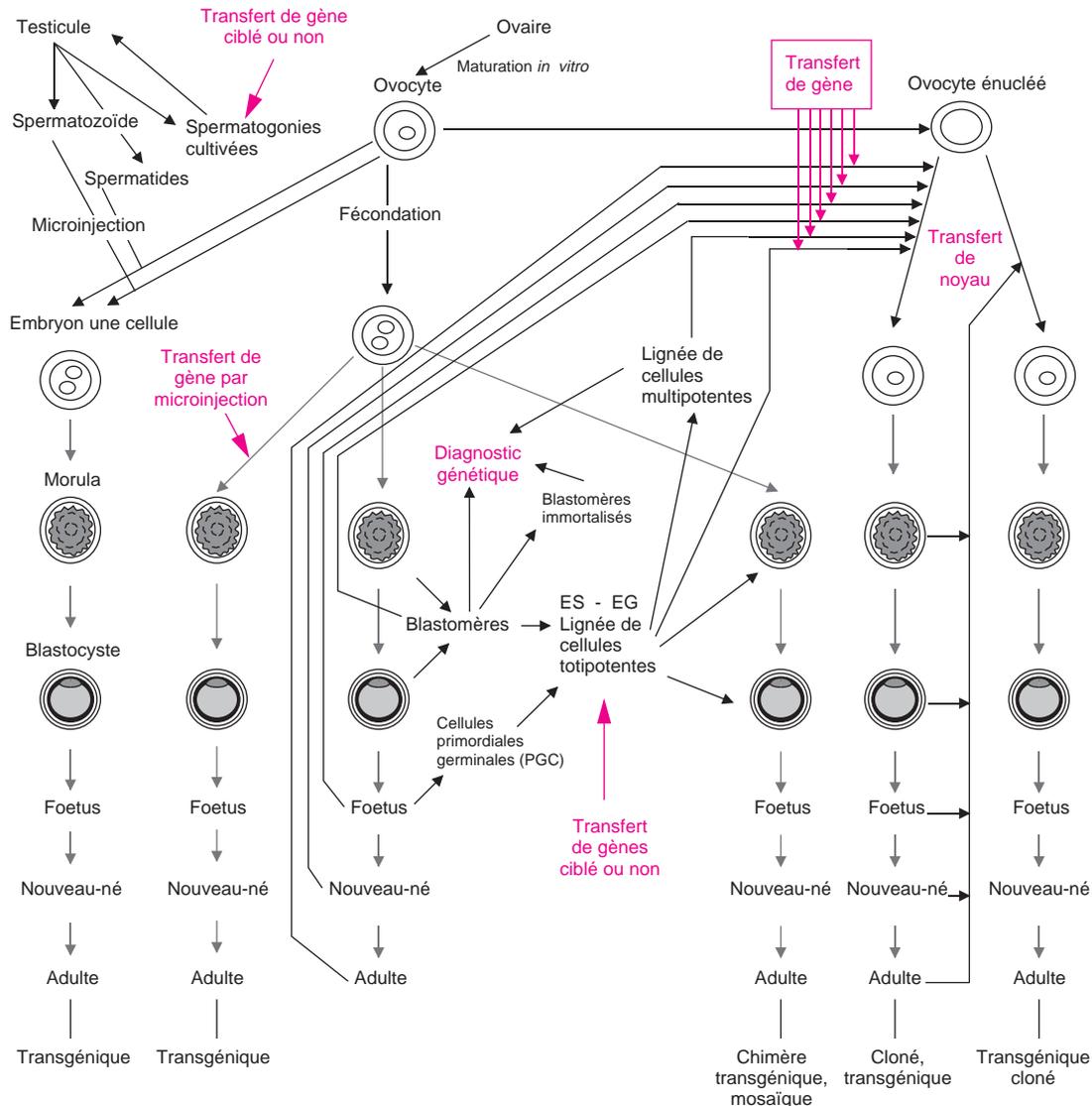


Figure 2. Les différentes utilisations possibles des gamètes, des embryons et des cellules embryonnaires pour transférer des gènes aux animaux. Les gènes étrangers peuvent être en principe introduits dans des gamètes mâles avant la fécondation. La microinjection d'ADN dans un des pronuclei des embryons au stade une cellule est actuellement la seule méthode utilisée en routine. L'utilisation de cellules totipotentes permet en principe d'ajouter ou de remplacer des gènes par recombinaison homologe et d'engendrer des animaux chimères mosaïques pour le transgène à la première génération. La technique de clonage permet en principe l'addition et le remplacement de gène dans des cellules embryonnaires fœtales ou adultes et l'obtention d'animaux portant les informations génétiques exogènes.



Le transfert de gène peut avoir lieu dans les gamètes mâles, dans l'embryon au stade une cellule ou dans des cellules dont le noyau sera transféré dans un ovocyte énucléé.

des cellules précurseurs des spermatozoïdes. Ceci nécessite toutefois au minimum que ces cultures soient bien maîtrisées ce qui n'est pas le cas actuellement.

La technique de transfert de gènes la plus utilisée est la microinjection directe du gène étranger dans les pronoyaux des embryons au stade une cellule lorsque cela est possible (comme cela est le cas chez les mammifères) ou dans le cytoplasme (chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés). La microinjection directe de gène reste peu efficace et donc très onéreuse chez les gros animaux. Il est maintenant devenu possible chez la vache, le mouton et la chèvre de produire à un coût réduit des embryons au stade une cellule totalement *in vitro*, à partir d'ovocytes isolés d'ovaires collectés dans les abattoirs (Crozet

1997). Les embryons peuvent alors subir la microinjection de gène, puis être cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste, pour être ensuite transférés dans des femelles adoptives (figure 2). La maîtrise de ces techniques contribue à améliorer la reproduction des animaux et à rendre plus aisée la transgénèse. Des travaux récents autorisent à penser que l'ensemble de ces techniques peuvent maintenant être également appliquées au porc (M.A. Sirard *et al*, résultats non publiés).

Les vecteurs viraux qui sont en cours de mise au point pour la thérapie génique appliquée à l'espèce humaine sont susceptibles de transférer des gènes dans les embryons. Les vecteurs rétroviraux ont en effet cette propriété mais leur utilisation relativement délicate ne paraît justifiée que pour les oiseaux

chez lesquels la microinjection n'est généralement considérée que comme très difficilement praticable (Ronfort *et al* 1997). Des mises au point récentes indiquent toutefois que la microinjection d'ADN dans les embryons précoces de poulet suivie d'un développement *ex vivo*, permet d'obtenir un rendement très acceptable d'animaux transgéniques (H. Sang *et al*, résultats non publiés).

Les vecteurs adénoviraux sont connus pour infecter efficacement la plupart des cellules, même au repos. Ces génomes viraux sont toutefois normalement maintenus à l'état autonome dans leurs cellules hôtes. Un travail récent vient de montrer que des embryons de souris débarrassés de leur zone pellucide sont infectables par les adénovirus qui s'intègrent ensuite avec une fréquence relativement élevée (20 %) (Tsukui *et al* 1996). Les vecteurs adénoviraux sont bien maîtrisés et leur utilisation a priori possible chez les animaux domestiques ouvre des perspectives intéressantes.

12 / Le remplacement de gène

Lorsqu'un fragment d'ADN est introduit dans une cellule il peut se recombinaison très précisément avec un gène de l'hôte à condition que de longs segments du gène étranger et du gène ciblé aient une séquence identique. Ce processus de recombinaison homologue qui conduit en pratique au remplacement d'un gène cellulaire par un gène étranger est rare dans les cellules de mammifères (au maximum dans 0,1 % des cas). Il fait appel à un processus naturel de réparation de l'ADN et il ne peut se produire que si l'ADN cellulaire se réplique et donc seulement dans des cellules en division. Le remplacement de gène par un gène étranger au niveau d'un animal entier n'est par ailleurs possible que si les cellules qui ont subi le processus de recombinaison homologue peuvent être utilisées pour engendrer un organisme entier et donc donner naissance à un animal dans des conditions normales. Deux approches pour procéder à un remplacement de gène sont actuellement possibles.

a / Utilisation de cellules totipotentes pour engendrer des animaux chimères

L'une de ces approches consiste à utiliser des cellules totipotentes qui, après avoir été introduites dans un embryon précoce, peuvent participer à son développement complet. L'animal obtenu est alors une chimère puisqu'il est formé à partir des cellules provenant de deux animaux différents. Dans le meilleur des cas, les cellules ajoutées à l'embryon et ayant subi au préalable la modification génétique, participent à la formation des gamètes. La modification génétique est alors transmise à la descendance qui est homogène pour la mutation.

Des lignées de cellules totipotentes peuvent être obtenues à partir des embryons précoces.

On les appelle alors des cellules ES (embryonnaires souches). D'autres lignées ayant des caractéristiques à peu près semblables peuvent être obtenues à partir des cellules primordiales germinales (PGC). Ces cellules sont alors appelées EG (embryonnaires germinales).

Chez la souris, plusieurs lignées de cellules ES ont été établies. Jusqu'à ce jour l'utilisation de cellules ES, et donc le remplacement d'un gène, n'est possible que chez la souris. Pour des raisons inconnues, en effet, chez les autres espèces, les cellules embryonnaires cultivées se différencient rapidement et deviennent incapables de participer à la formation de chimères germinales. Chez les oiseaux, il a été possible d'obtenir des chimères porteuses de gènes étrangers à partir de cellules embryonnaires (Thoraval *et al* 1994, Etches *et al* 1997). Des expériences récentes montrent également que des lignées de cellules totipotentes fonctionnelles ont pu être utilisées avec succès chez le poulet (Pain *et al* 1996).

Plusieurs publications ont montré que les cellules germinales primordiales (PGC) pouvaient être cultivées sous forme de lignées et participer, comme les cellules ES, au développement d'animaux chimères (Donovan *et al* 1997). La manipulation de ces cellules ne paraît pas aisée et elle reste possible essentiellement chez la souris. Des cellules ES ainsi que des cellules EG (lignées totipotentes dérivées des cellules germinales primordiales) ont toutefois été obtenues récemment chez le porc. Ces cellules ont donné naissance à des animaux chimères. La transmission germinale du nouveau génome ainsi acquis n'a pas été démontrée à ce jour (Anderson 1996).

b / Utilisation de cellules multipotentes ou somatiques pour engendrer des animaux clonés

Chez la plupart des espèces, les cellules embryonnaires cultivées pendant plusieurs semaines ont perdu leur totipotence. Elles sont partiellement différenciées et qualifiées de multipotentes. Ces cellules sont devenues progressivement incapables de participer au développement d'embryons chimères.

La technique de clonage des animaux dans sa version classique consiste à introduire un noyau de cellule embryonnaire non cultivée dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé. Il est généralement admis que les cellules embryonnaires cultivées et devenues multipotentes et, a fortiori, les cellules somatiques différenciées ne peuvent assurer le développement complet d'un embryon reconstitué par transfert de noyau. Une étude systématique a démontré que des cellules multipotentes de mouton maintenues à l'état de quiescence en retirant le sérum de leur milieu de culture sont capables de donner naissance à des agneaux après transfert dans le cytoplasme d'ovocytes énucléés (Campbell *et al* 1996). La même approche expérimentale a également démontré que des cellules fœtales ainsi que des cel-

lules somatiques prélevées chez des animaux adultes peuvent donner naissance à des agneaux (Wilmot *et al* 1997). Le laboratoire d'Edimbourg qui a mis au point ces techniques a récemment démontré que des fibroblastes fœtaux de moutons ayant reçu *in vitro* un gène étranger par les techniques classiques de transfection peuvent donner ainsi naissance à des agneaux transgéniques. Le rendement de la technique de clonage utilisé est relativement faible. Il apparaît toutefois d'ores et déjà que l'addition de gène est plus facile par ce procédé que par la technique classique de microinjection dans les pronuclei des embryons. Cet ensemble de techniques doit pouvoir être étendu rapidement aux autres ruminants domestiques ainsi qu'au lapin et au porc. Le remplacement de gène par recombinaison homologue peut avoir lieu en principe dans n'importe quel type de cellules cultivées. Le transfert du noyau de ces cellules doit donc permettre de remplacer des gènes très spécifiquement chez toutes les espèces chez lesquelles le clonage à partir de cellules somatiques est possible.

2 / Les applications de la transgénèse

La possibilité d'ajouter, de muter ou de retirer un gène dans un animal entier offre aux expérimentateurs des possibilités sans précédent. Les animaux transgéniques sont devenus des outils irremplaçables pour étudier le fonctionnement des gènes et les mécanismes qui gouvernent les fonctions biologiques. Il est même parfois judicieux de créer des animaux spécifiquement pour des études particulières, par exemple de toxicologie (voir l'article de Pineau 1998, dans ce numéro).

L'INRA est actuellement en France la seule structure qui permet de réaliser des expérimentations, comme la transgénèse, sur les animaux domestiques de grand format. Cette situation confère à cet institut des devoirs. Il se trouve ainsi sollicité par les autres instituts de recherche et par l'industrie pharmaceutique pour obtenir des modèles animaux destinés à réaliser des études biomédicales, à préparer des protéines recombinantes et à tenter de modifier des organes de porcs destinés à la greffe chez l'homme. Des lapins transgéniques permettant d'étudier l'athérosclérose (Duverger *et al* 1997) et le Sida (Dunn *et al* 1995) ont ainsi été obtenus. L'INRA est également impliqué dans des recherches qui visent à rendre les organes de porc tolérables par l'homme. Ces projets impliquent le transfert de gènes étrangers chez le porc (Malassagne *et al* 1996).

La modification du lait destiné à la consommation humaine ou animale est un objectif réalisable dont l'enjeu est important. Les projets sont de trois types. Le lait peut être modifié en tant que nourriture classique (Mercier et Vilotte 1997). Il peut également être complété par des protéines qui ne s'y trouvent

pas naturellement. Ces protéines peuvent contribuer à protéger le tractus digestif des consommateurs contre des agents pathogènes. Le lait est par ailleurs devenu une source de protéines d'intérêt pharmaceutique.

La lutte contre les maladies reste un souci constant dans les élevages. La transgénèse peut apporter des solutions originales qui sont discutées plus loin. La lutte contre le virus de la septicémie hémorragique chez le lapin et la truite paraît possible par ces techniques.

L'amélioration des fonctions biologiques essentielles (reproduction, croissance musculaire, etc.) peut évidemment en principe être obtenue par la transgénèse. La méconnaissance des gènes impliqués et le coût de la transgénèse limitent encore la mise en œuvre de tels projets.

2.1 / La lutte contre les maladies

L'éradication et la sélection génétique sont deux moyens pour lutter contre certaines maladies. La vaccination est un autre moyen qui peut bénéficier d'une manière considérable des apports du génie génétique (voir l'article de Eloit 1998, dans ce numéro).

Des peptides obtenus par synthèse chimique ou des protéines obtenues après transfert du gène codant pour un antigène vaccinant dans des cellules appropriées (bactéries, levures, plantes, cellules animales) peuvent conduire à l'obtention de vaccins efficaces et parfaitement sûrs. Des observations récentes ont montré que des extraits de plantes et même des plantes entières transgéniques synthétisant un antigène viral connu pour être actif par voie orale étaient capables d'induire la formation d'anticorps et une certaine protection contre le virus chez des souris (Mason *et al* 1996). Cette expérience ouvre des perspectives intéressantes pour la vaccination en masse et à des prix très bas chez l'homme et chez les animaux. Une telle méthode n'est évidemment exploitable que dans le cas où un antigène a un pouvoir vaccinant par voie orale.

a / Vaccination par l'ADN nu

Des expériences réalisées en partie fortuitement ont montré, contre toute attente, que de l'ADN nu sous forme plasmide (*ie* molécule d'ADN circulaire) était capable de pénétrer dans les cellules musculaires après simple injection de la solution d'ADN. Cet ADN peut se maintenir pendant au moins un an et diriger la synthèse en continu de la protéine correspondante, ce qui conduit à la formation d'anticorps contre cette protéine. Cette observation a été répétée de nombreuses fois avec toutes sortes de variantes. Un traitement nécosant préalable du muscle est souvent nécessaire pour favoriser la pénétration de l'ADN (Ladenheim 1995). Des pistolets utilisant des billes d'or ou de platine chargées d'ADN (biolistique) ou de simples jets à haute vitesse d'ADN en solution permettent égale-

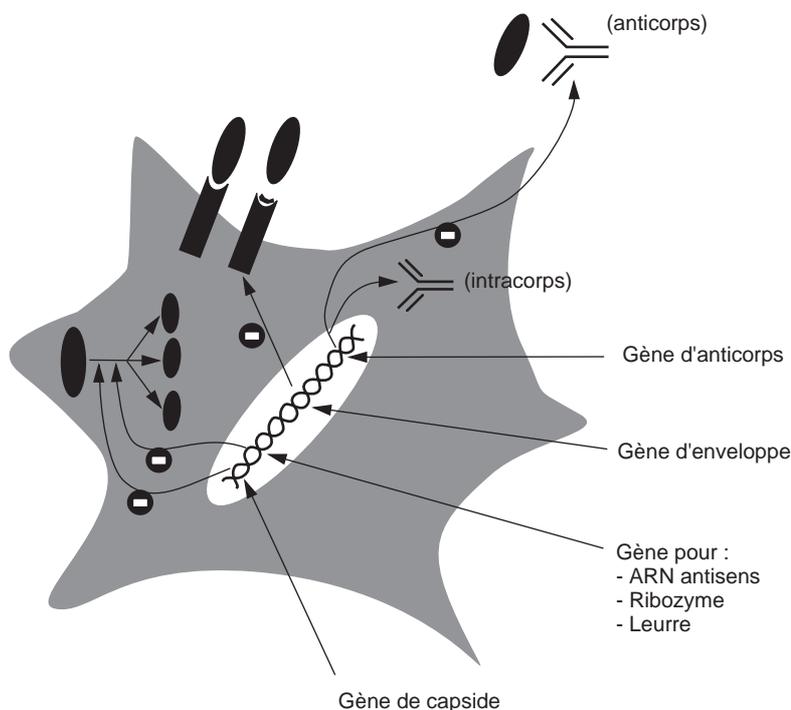
Il est possible de fabriquer des vaccins en modifiant les gènes des microorganismes pathogènes, mais on peut aussi envisager de transférer à l'animal des gènes de résistance aux maladies.

ment de manière particulièrement simple de faire pénétrer des gènes étrangers dans les tissus animaux et d'induire la formation d'anticorps (Furth *et al* 1995). L'injection simultanée d'un plasmide codant pour l'interleukine 2 stimule localement le système immunitaire et vient ainsi renforcer notablement la production d'anticorps (Kumar et Sercarz 1996). Des injections intradermiques d'ADN sont également très efficaces (Davis *et al* 1996).

Une des caractéristiques de cette méthode est la qualité de la réponse immunitaire, qui semble le plus souvent impliquer très fortement les mécanismes cellulaires de défense (Kumar et Sercarz 1996). C'est semble-t-il la manière dont sont présentés les antigènes, par la cellule qui contient l'ADN étranger, qui conditionne la qualité de la réponse.

Plusieurs problèmes restent à résoudre avant que cette méthode ne devienne une pratique courante dans les élevages. Il faut tout d'abord noter que les réponses aux injections d'ADN, même si elles ont été obtenues par de nombreux laboratoires, sont variables. Une standardisation de la méthode est indispensable pour qu'elle soit réellement exploitable. Un autre problème concerne la biosécurité. Les plasmides utilisés ne présentent pas de risques particuliers. Il est toutefois nécessaire que l'ADN injecté ne se retrouve pas dans les tissus destinés à la consommation humaine ni dans les cellules germinales. L'utilisation d'ARNm codant pour des antigènes plutôt que d'ADN pourrait résoudre le problème car ils sont instables dans les cellules. Encore faut-il

Figure 3. Les différentes stratégies possibles pour inhiber la propagation d'un virus par vaccination génétique et plus généralement d'inhiber l'expression d'un gène cellulaire. La surexpression de certains gènes viraux (enveloppe, capsid...) peut perturber l'infection ou l'assemblage des particules virales. Les produits de divers gènes (anticorps, ARN antisens, ribozyme, leurre...) peuvent inhiber une étape de la multiplication du virus.



prouver qu'ils sont aussi efficaces que l'ADN, que leur prix de revient est acceptable et que leur manipulation n'est pas trop délicate.

b / Vaccination génétique

Le vocable de vaccination génétique regroupe toute une série de techniques qui reposent sur la transgénèse. Elles consistent à transférer aux animaux des gènes qui confèrent de manière définitive une résistance constitutive ou induite à des maladies données. Ces gènes de résistance agissent indépendamment du système immunitaire et l'effet de protection n'est donc pas au sens strict le résultat d'une vaccination.

Les gènes de résistance peuvent être des gènes naturels identifiés chez les individus d'une espèce animale naturellement résistants à la maladie. Ces gènes peuvent également être ceux qui codent pour des anticorps monoclonaux, sécrétés ou non (intracorps) (Jones et Marasco 1997), qui se lient à l'agent pathogène et l'inactivent. Les produits de certains gènes peuvent interférer avec les mécanismes de réplication des virus. C'est le cas des gènes « enveloppe » pour les rétrovirus. L'enveloppe surproduite par la cellule occupe le récepteur du virus et empêche ainsi sa liaison et son entrée dans la cellule (Salter et Crittenden 1989). Les protéines de capsid surproduites par les cellules perturbent la formation des particules virales. Les ARN antisens et les ribozymes peuvent annihiler ou détruire les ARNm viraux. Les ARN antisens peuvent également dans certains cas former des triples hélices avec l'ADN et inhiber la transcription du gène ainsi ciblé. La surproduction d'une séquence d'ARN viral ayant un rôle clef (la séquence liant l'ARN polymérase virale par exemple) peut servir de leurre pour les protéines virales qui se fixent massivement sur le leurre et délaissent les ARN viraux (figure 3).

Les applications de ces méthodes aux animaux domestiques sont à peu près inexistantes. Les mises au point sont si lourdes et onéreuses que peu de tentatives ont été conduites jusqu'à leur terme. Les résultats obtenus avec les systèmes modèles et chez les plantes ne laissent que peu de doute sur la puissance de ces techniques.

2.2 / La sécrétion de protéines recombinantes dans le lait

Le lait représente 30 % des protéines consommées par les pays riches. Pour cette raison, la lactation a depuis longtemps fait l'objet d'études diverses tendant à augmenter la production laitière et à améliorer la qualité du lait. Ces études vont de la sélection génétique à la physiologie en passant par la pathologie et la nutrition. La sélection génétique a à la fois conduit à des augmentations très importantes de production et au changement de composition du lait. L'utilisation de l'hormone de croissance (BST) est susceptible d'augmenter rapidement et de manière souple

la production d'un lait de bonne qualité chez toutes les races de ruminants domestiques sans en altérer significativement la composition. Les études de nutrition permettent d'optimiser l'expression des meilleurs patrimoines génétiques et de tirer le meilleur parti de l'action des hormones. Les pathologies de la glande mammaire restent un problème préoccupant qui tend à s'accroître avec l'augmentation de la productivité des animaux.

Les techniques de génie génétique ont permis ces dernières années d'isoler puis d'étudier les gènes des principales protéines du lait des animaux domestiques. La maîtrise de ces techniques ouvre des perspectives intéressantes qui redonnent au lait une nouvelle importance. La connaissance détaillée des structures des gènes des protéines du lait permet désormais une sélection précise et relativement simple des allèles les plus intéressants (Grosclaude *et al* 1994). Elle va également autoriser des approches totalement nouvelles dont les retombées devraient être très substantielles. La possibilité désormais devenue une réalité d'exprimer une protéine étrangère dans le lait va conduire à la mise en œuvre de nouveaux projets qui sont de trois types différents : 1) la modification des composants naturels du lait, 2) l'addition de nouveaux composants dans le lait destinés à la consommation humaine ou animale 3) la production de protéines ayant un intérêt pharmaceutique ou vétérinaire. Tous ces projets reposent sur les mêmes principes techniques (figures 4 et 5).

Figure 4. La sécrétion d'une protéine recombinante dans le lait après transfert d'un gène étranger. Une construction de gène comprenant le promoteur d'un gène d'une protéine du lait et le gène d'intérêt est microinjecté dans l'embryon. Le gène étranger intégré se transmet à toutes les cellules de l'organisme et à ses descendants. Ils s'expriment spécifiquement dans le lait des femelles en lactation.

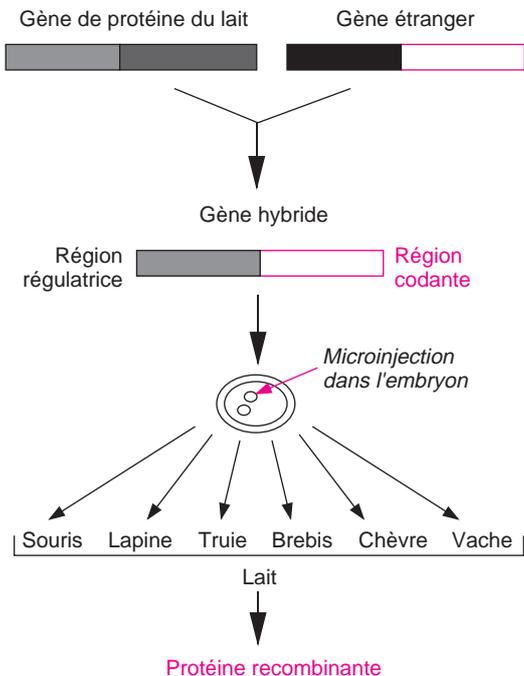
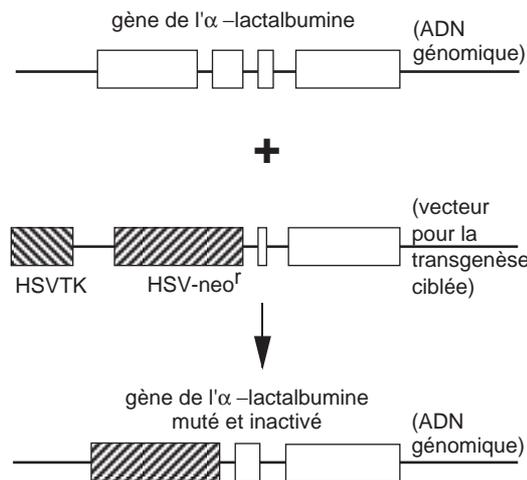


Figure 5. L'inactivation du gène de l' α -lactalbumine de souris. Un gène délété analogue à celui de la souris vient remplacer le gène sauvage par recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires souches (ES). Ces cellules, réintroduites dans un embryon précoce, participent à la formation de l'organisme qui se voit doté du gène muté. Les gènes *neo* et *HSVTK* codent pour des protéines qui permettent respectivement le tri des cellules résistantes à la généticine et sensibles au gancyclovir. Cette double sélection permet d'éliminer les cellules qui ont intégré le gène par un processus de recombinaison hétérologue.



a / Modification des composants naturels du lait

La composition du lait des animaux domestiques, tel qu'il nous est prodigué par la nature, n'est pas idéale dans tous les cas pour la consommation humaine. La sélection génétique va permettre de bénéficier de meilleurs allèles mais évidemment pas de modifier fondamentalement la composition du lait. Il est bien connu qu'une proportion importante de l'humanité ne tolère pas le lactose et qu'un certain nombre de personnes présentent des allergies à la β -lactoglobuline et à certaines caséines. La composition du lait des ruminants domestiques n'est par ailleurs pas optimum pour la transformation du lait par l'industrie laitière. Des projets visant à optimiser la composition des laits sont ainsi en cours de réalisation (Mercier 1986, Vilotte et Mercier 1997).

La suppression du lactose du lait a pu être obtenue chez la souris. Le remplacement du gène de l' α -lactalbumine par un homologue muté et inactif a supprimé l'activité lactose synthétase et, partant, la synthèse du lactose (Stinnakre *et al* 1994, Stacey *et al* 1995). Il a même été possible de remplacer le gène de l' α -lactalbumine de souris par son homologue humain (Stacey *et al* 1994). Ce gène étranger fonctionne parfaitement bien, au point même de s'exprimer à un taux plus élevé que le gène de souris, respectant ainsi le statut du gène chez les deux espèces. La suppression du gène de l' α -lactalbumine est en réalité un procédé

L'inactivation ou le remplacement de gènes des protéines du lait permettent désormais de modifier sa composition, notamment en faisant produire à l'animal des protéines qui ne s'y trouvent pas naturellement.

trop efficace. L'absence de lactose se traduit en effet par un déficit d'eau qui rend le lait difficilement sécrétable. L'atténuation du taux de sécrétion du lactose par l'utilisation d'ARN ou de ribozymes dirigés contre l'ARN de l' α -lactalbumine est possible (L'Huillier *et al* 1997).

Une augmentation de la sécrétion de caséine κ est susceptible de changer la taille et la stabilité des micelles de caséines et d'augmenter ainsi la masse et la qualité de la pâte à fromage. Le clonage et l'expression du gène de la caséine κ de chèvre et de vache ont été obtenus chez la souris (Persuy *et al* 1995, Gutierrez *et al* 1996). A titre de modèle, la surexpression du gène de la caséine κ de lapin chez des lapins transgéniques est également en cours de réalisation (Bösze *et al* 1996). Cette approche peut permettre de prévoir ce que l'on obtiendra chez des chèvres transgéniques surexprimant leur propre gène de la caséine κ .

Dans le même ordre d'idée, un lait enrichi en caséine- β donne une pâte à fromage de meilleure qualité. Le gène de la caséine- β a été isolé et il s'exprime de manière abondante chez des souris (Persuy *et al* 1992). Il peut donc être transféré à des chèvres pour tenter de surproduire cette protéine.

Il est également concevable de modifier quelques acides aminés dans certaines caséines pour augmenter leur sensibilité aux protéases et accélérer ainsi la maturation de la pâte à fromage.

La modification de certaines enzymes de la glande mammaire peut conduire à un changement des composés non protéiques du lait. C'est le cas du gène de l' α -lactalbumine qui contrôle la synthèse du lactose mais aussi de l'acétyl-CoA carboxylase et de la Δ_2 désaturase dont la surexpression peut induire un changement de la composition des lipides du lait.

Dans le même ordre d'idée, il est intéressant de noter que l'expression d'un transgène contenant le promoteur du gène WAP de souris et l'ADNc de la glycosyltransférase humaine, dans la glande mammaire de souris se traduit par une modification de la glycosylation des protéines ainsi que par une sécrétion d'oligosaccharides dont la synthèse chimique est très complexe et dont les activités biologiques sont potentiellement très intéressantes (Prieto *et al* 1995).

La modification de la composition du lait par transgénèse est donc possible. Elle implique l'addition, l'inactivation ou la substitution d'un gène par un autre. Ces techniques sont maîtrisées pour l'essentiel chez la souris mais chez aucune autre espèce (Mercier et Vilotte 1997). L'inactivation ou le remplacement d'un gène par un autre n'est en effet possible à l'échelle d'un organisme animal entier que si l'on dispose des cellules embryonnaires dans lesquelles peut avoir lieu une recombinaison homologue et qui sont capables de régénérer d'une manière ou d'une autre un animal entier. Les succès dans ce

domaine n'arrivent donc que lentement et ce d'autant plus que, même en cas de succès dans les opérations de génie génétique, il faudra un laps de temps relativement grand pour évaluer l'ensemble des effets des nouveaux gènes et assurer leur diffusion dans les troupeaux d'élevage.

b / Addition de composants nouveaux dans le lait destiné à la consommation humaine et animale

Une opération plus volontaire peut consister à ajouter dans le lait des protéines qui ne s'y trouvent pas normalement, ces protéines pouvant ou non être naturellement présentes dans le lait selon les espèces animales. C'est le cas de la lactoferrine humaine qui peut être sécrétée dans le lait de vache grâce au transfert du gène correspondant (Krimpenfort *et al* 1991). Cette opération a pour but essentiel d'ajouter au lait de vache une protéine importante du lait humain. La lactoferrine est en effet une protéine transporteuse de fer. Elle peut donc apporter du fer aux nourrissons (ou aux petits animaux) mais aussi réduire le taux de fer circulant. La lactoferrine (comme la transferrine) est en effet sécrétée dans un état où elle n'est pas complètement chargée en fer. Elle capte donc avidement le fer libre et réduit ainsi très notablement le développement des bactéries donc la croissance dépend de cet ion métallique. La lactoferrine pourrait donc assurer une protection du tractus digestif des nourrissons. Si les effets de la lactoferrine ont été bien étudiés *in vitro*, ils ont bien moins connus *in vivo*. Cette protéine est par ailleurs sensible à la chaleur, l'indispensable pasteurisation du lait destiné à la consommation humaine risque donc d'en annuler les effets.

Dans le même ordre d'idée, le gène de la transferrine de lapin a été cloné (Thépot *et al*, résultats non publiés). Ce gène est très fortement exprimé dans la glande mammaire de lapin tout au long de la lactation (Puissant *et al* 1994) alors qu'il ne l'est qu'à la parturition et au sevrage chez les rongeurs et pas du tout semble-t-il chez les autres espèces. La lapine n'allaite naturellement ses petits qu'une fois par jour sans souffrir particulièrement de mammites. L'accumulation de lait pendant 24 heures est pourtant une situation idéale pour déclencher des infections bactériennes dans la glande mammaire. Le transfert du gène de la transferrine de lapin chez le porc permettrait peut-être de protéger la glande mammaire chez cette espèce animale, d'apporter aux porcelets le fer que le lait de leur mère ne leur donne pas spontanément et de protéger le tractus digestif des mêmes porcelets contre certaines infections bactériennes.

D'autres protéines protectrices comme le lysozyme humain peuvent également être produites dans la glande mammaire de vache. Leurs effets réels ne sont actuellement pas connus.

Plus généralement, rien ne s'oppose à ce que des anticorps monoclonaux soient sécrétés en masse dans le lait. Cette expérience a été réalisée avec succès par plusieurs groupes. Ces anticorps peuvent être humanisés dans leur partie variable et être pleinement actifs chez l'homme. Ils peuvent appartenir aux différentes catégories d'anticorps (IgG, IgA...) et avoir des effets inhibiteurs sur le développement de divers agents pathogènes. De tels laits pourraient ainsi posséder des effets protecteurs significatifs contre des virus et des bactéries du tractus digestif dont pâtissent l'espèce humaine aussi bien que les animaux.

Un certain nombre d'antigènes sont actifs par voie orale. Leur présence à l'état de protéines recombinantes dans des plantes transgéniques induit la formation d'anticorps et une protection immunitaire chez des souris qui ont absorbé ces plantes par voie orale (Mason *et al* 1996). Le lait d'animaux transgéniques pourrait contenir de tels antigènes et donc constituer un vaccin dans certains cas.

Toutes ces perspectives tendent à faire du lait une nourriture-médicament ou alicament. Les réalisations dans ce domaine seront relativement lentes dans la mesure où elles ne peuvent que résulter d'une longue étude des effets des protéines recombinantes et aussi en raison des investissements importants que nécessite le transfert de gènes chez les animaux domestiques.

c / Production de protéines ayant un intérêt pharmaceutique ou vétérinaire

De manière assez attendue c'est la production de protéines d'intérêt pharmaceutique qui est le plus avancé des trois types projets. Cette production ne nécessite en effet que relativement peu d'animaux et elle est potentiellement la source de retours financiers élevés. A l'heure actuelle plus de 50 protéines étrangères ont ainsi été produites dans le lait et, pour autant, aucune n'est encore sur le marché. Le déroulement des choses depuis environ 6-7 ans lorsque l'idée d'utiliser la glande mammaire comme fermenteur vivant s'est imposée, a été relativement rapide. Mener à bien de tels projets supposait que soit maîtrisé un certain nombre de techniques. Le premier problème concerne les promoteurs des gènes capables de diriger la synthèse d'une protéine étrangère dans la glande mammaire. En effet, à l'heure actuelle essentiellement cinq promoteurs semblent exploitables : ceux des gènes des caséines α_S et β des ruminants, de la β -lactoglobuline, de la WAP (Whey Acidic Protein) des rongeurs et surtout de lapin et de l' α -lactalbumine humaine. Les autres promoteurs actuellement isolés ne fonctionnent qu'à un taux trop faible pour permettre d'envisager aussi aisément une exploitation industrielle (Houdebine 1994 et 1995).

La glande mammaire ne procède pas toujours de manière satisfaisante aux maturations post-traductionnelles des protéines et ce d'une manière peu prévisible. Ainsi, l' α 1-anti-

trypsin et l'antithrombine III humaines synthétisées par la glande mammaire de la brebis et de la chèvre ne sont pas complètement glycosylées. L'antithrombine III n'a en particulier pas tous les acides sialiques à l'extrémité des chaînes glycidiques latérales.

La protéine-C n'est que très partiellement clivée par les enzymes de la cellule mammaire de truie pour former les sous-unités qui composent la molécule fonctionnelle. Le transfert du gène de la furine placé sous la dépendance du promoteur du gène WAP de souris, permet la maturation complète de la protéine (Drews *et al* 1995). La glande mammaire peut donc être modifiée par transgénèse pour optimiser ses capacités à synthétiser des protéines recombinantes fonctionnelles.

La superoxydedismutase humaine produite dans le lait de lapins transgéniques est active, sous forme dimérique, normalement glycosylée et associée à l'ion cuivre (Strömqvist *et al* 1997).

La plupart des protéines recombinantes produites à ce jour sont destinées à l'homme. Elles sont de ce fait le plus souvent actives chez les animaux qui peuvent en pâtir. Ainsi, le gène de l'hormone de croissance humaine (Devinoy *et al* 1994) associé au promoteur du gène de la WAP de lapin s'exprime suffisamment en dehors de la glande mammaire pour perturber la croissance et la reproduction des animaux. De même, le gène de l'érythropoïétine humaine dans les mêmes conditions altère gravement la santé des lapins (Masoud *et al* 1996). Certaines protéines ne peuvent donc pas être produites par ce procédé.

Les protéines produites dans le lait le sont à un prix 50 fois inférieur à celles produites dans des fermenteurs cellulaires classiques qui sont par ailleurs peu souples dans leur fonctionnement en comparaison des animaux. La méthode paraît donc s'être imposée. Les cellules animales en culture et les plantes transgéniques peuvent toutefois être plus intéressantes dans certains cas.

L'INRA est impliqué dans cette recherche non typiquement agronomique. La production de protéines recombinantes ayant un intérêt vétérinaire n'a encore été que peu tentée jusqu'à maintenant. Cet état de choses vient sans doute du manque de projets réellement pertinents mais aussi du fait que les protéines doivent être produites à un coût très bas pour avoir quelque chance d'être utilisées pour les animaux contrairement à celles destinées à l'espèce humaine. On peut mentionner que des expériences visant à produire l'hormone de croissance bovine chez des vaches transgéniques sont actuellement réalisées en Pologne avec une construction de gène obtenue à l'INRA de Jouy-en-Josas. La préparation d'hormones gonadotropes animales est également envisagée. Ce savoir-faire acquis doit logiquement être transféré à des partenaires industriels. Il paraît raisonnable de penser que la méthode, même au moment de son plein développement, ne concernera au mieux qu'une fraction assez négligeable des animaux d'élevage.

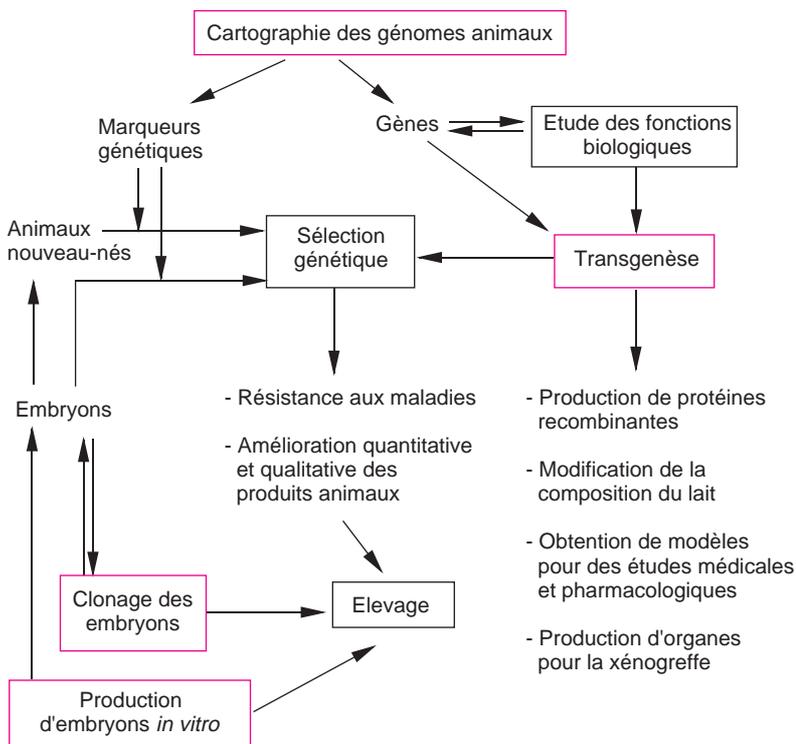
Actuellement plus de 50 protéines étrangères d'intérêt pharmaceutique ont pu être produites dans le lait de différentes espèces.

2.3 / Amélioration génétique par la transgénèse

La cartographie des génomes constitue un apport décisif à plus d'un titre. L'utilisation des marqueurs génétiques, essentiellement les microsatellites, est envisagée dans les schémas de sélection (voir l'article de Boichard *et al* 1998, dans ce numéro). Les marqueurs génétiques donnent également la possibilité d'accéder aux gènes responsables des effets biologiques souhaités. La pratique, maintenant bien établie dans le domaine médical, qui consiste à rechercher systématiquement des gènes responsables de maladies héréditaires ou acquises ne peut toutefois laisser planer aucun doute sur la difficulté de l'entreprise mais aussi sur la puissance de la méthode.

La connaissance précise d'un gène permet d'en étudier les effets physiologiques. Dans le meilleur des cas, le gène peut s'avérer avoir un rôle-clé dans le contrôle d'une fonction biologique et son transfert dans les animaux pour en améliorer leurs performances agronomiques peut alors être justifié. La complémentarité des techniques de la reproduction et de la sélection apparaît ici clairement. L'ensemble des opérations montrées dans la figure 6 montre l'interpénétration idéale de ces techniques. Ce schéma est déjà une réalité pour un certain nombre de plantes chez lesquelles la transgénèse ainsi que le clonage sont aisément réalisables. L'amélioration récente des techniques de clonage chez les animaux domestiques devrait rendre la transgénèse beaucoup plus exploitable.

Figure 6. L'utilisation coordonnée de la cartographie des génomes, des techniques de la reproduction et de la transgénèse.

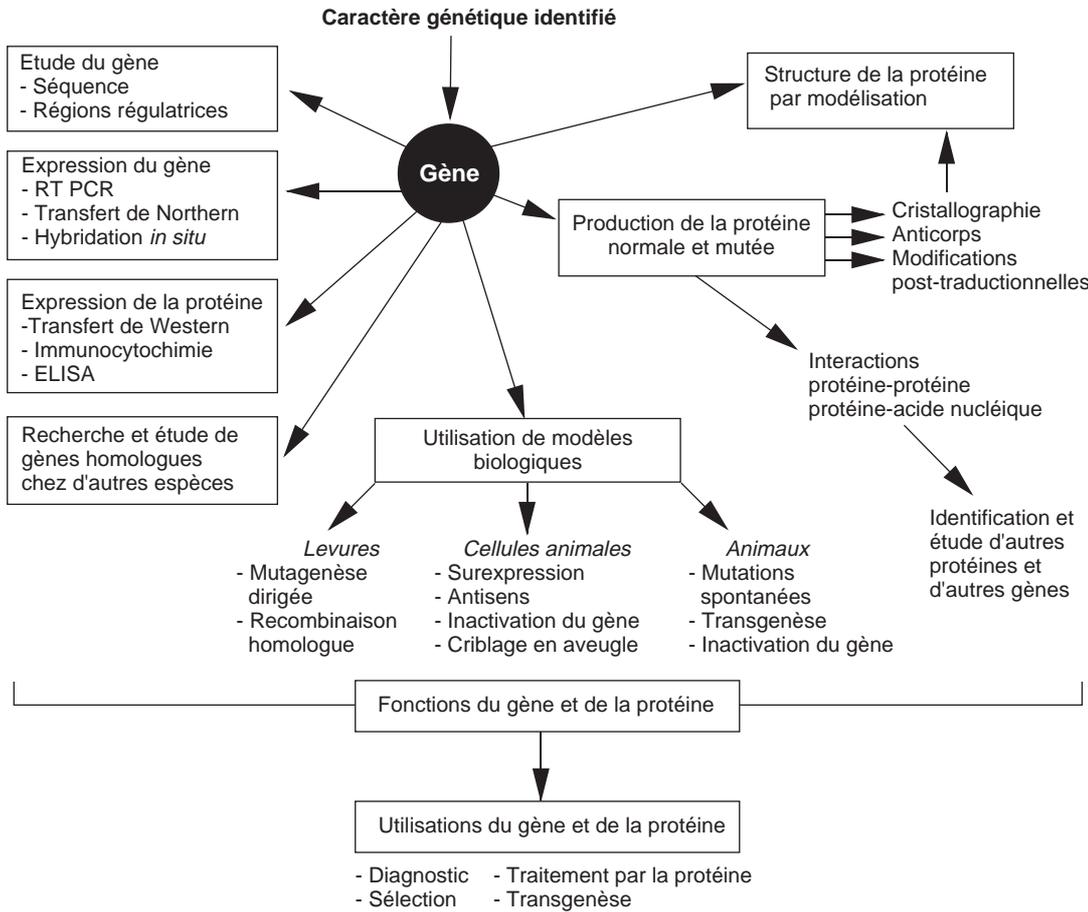


Il ne fait pas de doute que la cartographie des génomes va conduire à l'identification puis à l'isolement de nouveaux gènes d'intérêt agronomique. Cette approche puissante ne va pas pour autant devenir la seule source de gènes inconnus. L'identification et l'isolement complets d'un gène sur la base des informations obtenues à partir de marqueurs microsatellites sont des opérations si lourdes qu'elles ne seront certainement pas justifiées dans bien des cas, contrairement à ce que l'on fait dans le domaine médical. L'étude classique des fonctions biologiques doit logiquement rester une démarche essentielle pour l'identification de gènes potentiellement intéressants pour des applications agronomiques.

Des expériences encore peu nombreuses mais concluantes ont montré que de longs fragments d'ADN contenus dans des vecteurs de type P1, BAC (bacteria artificial chromosome), YAC (yeast artificial chromosome) (qui contiennent de 100 à 1 000 kilobases d'ADN) et MAC (mammalian artificial chromosome) qui peuvent contenir des fragments de chromosomes de très grande taille) peuvent être directement utilisés pour transférer des gènes aux animaux. Des souris et des lapins transgéniques ont ainsi pu être obtenus. Le rendement des microinjections est toutefois en général plus faible lorsque des grands fragments d'ADN sont utilisés. La démonstration qu'un fragment de génome contenu dans un YAC contient un gène intéressant ne suffira pas dans beaucoup de cas pour justifier l'obtention d'animaux transgéniques à partir de ce fragment. Le vecteur a en effet toutes les chances de contenir plusieurs gènes dont certains peuvent être indésirables. La simple supplémentation d'un génome animal par un gène à l'état natif peut de plus s'avérer n'être suivie d'aucun effet particulier. L'étude du gène lui-même et de ses effets biologiques précis est le plus souvent indispensable et il serait très imprudent d'en faire l'économie. En effet, beaucoup de gènes ont plusieurs fonctions dans l'organisme et les fonctions biologiques sont contrôlées par une multitude de gènes qui interfèrent de manière complexe. Un gène peut par ailleurs n'avoir d'intérêt en tant que transgène que s'il est surexprimé dans tel ou tel tissu à tel ou tel moment de la vie de l'animal. L'identification et l'isolement d'un gène doivent donc le plus souvent être suivis d'autres étapes qui sont résumées dans la figure 7. Ensuite seulement, la transgénèse peut s'avérer justifiée chez l'animal d'intérêt agronomique.

Les interactions entre les gènes sont trop complexes pour que les effets biologiques résultant de l'introduction d'un gène étranger dans un génome puissent être totalement prévisibles. Les actions d'un transgène dépendent par ailleurs inévitablement du fond génétique de l'hôte. L'insertion d'un fragment d'ADN étranger dans un site inconnu d'un génome peut perturber plus particulièrement le fonctionnement d'un gène qui se trouve dans ce site ou dans son voisinage. L'observation des nombreuses souris transgéniques

Figure 7. Les stratégies de « l'après-gène ». L'obtention d'un gène doit être le plus souvent suivie d'une étude de ses effets. Ces études peuvent être longues et complexes. Elles sont un prélude le plus souvent indispensable à une utilisation pertinente du gène.



obtenues depuis plus de quinze ans n'incite toutefois pas à être particulièrement inquiet à ce sujet. Le fait que 5 % seulement du génome de mammifère porte des informations génétiques rend les risques relativement faibles. L'introduction de gènes étrangers par recombinaison homologue ne résout qu'une partie du problème. Les effets de ce remplacement de gène ne peuvent être totalement prévus ou presque que si l'on substitue un gène donné par un allèle bien identifié dont les effets biologiques sont déjà connus. Cette démarche a le gros avantage de permettre l'introduction précise d'un caractère génétique unique de manière indépendante dans plusieurs lignées d'animaux. Dans la très grande majorité des cas, les animaux transgéniques doivent donc être considérés a priori comme en partie génétiquement inconnus (Gavora *et al* 1995). Leur dissémination dans les troupeaux d'élevage ne peut donc être envisagée qu'après une observation approfondie de leurs propriétés biologiques. Il n'y a aucune raison fondamentale à considérer cette situation comme différente de celles créées par des mutations spontanées.

La connaissance des gènes va donc donner des outils puissants pour l'amélioration génétique des espèces domestiques. La stratégie à suivre ne peut certainement pas se définir selon un schéma standard. Au cas par cas, il

faudra déterminer si la sélection par marqueur est suffisante, si la séquence primaire du gène est souhaitable pour procéder à une identification précise des allèles chez chaque animal ou si seule la transgénèse peut permettre d'apporter le gain que l'on attend de ce gène. La cartographie des génomes et l'identification de gènes inconnus vont donc contribuer à rendre efficace le transfert de gène mais elles vont aussi parfois la rendre inutile en permettant une sélection plus fine des animaux.

Les premiers essais de transgénèse avec le gène d'hormone de croissance (GH) chez le porc n'avaient conduit qu'à l'obtention d'animaux maigres mais en mauvaise santé. La sélection des individus qui expriment le gène GH à des taux modérés a permis aux Australiens d'établir des lignées de porcs chez lesquels la croissance est un peu accélérée et la viande plus riche en muscle et moins grasse. Ces animaux semblent faire en plus une meilleure utilisation de leur ration alimentaire. Des porcs obtenus aux USA expriment le gène IGF1 spécifiquement dans le muscle. Ces animaux ont un développement musculaire augmenté sans effet secondaire apparent. Des saumons et des poissons-chats transgéniques ont également une croissance accélérée après l'introduction du gène de l'hormone de croissance.

La cartographie génétique va conduire à identifier des gènes d'intérêt zootechnique qui pourront éventuellement être transférés et contribuer ainsi à l'amélioration génétique d'une population.

Dans le même ordre d'idée, un groupe de Néo-Zélandais a obtenu des lignées de moutons chez lesquels la croissance de la laine est augmentée de 5 %. Le gène d'un facteur de croissance, l'IGF1, exprimé spécifiquement dans le follicule pileux favorise la croissance de la laine sans altérer du tout la santé des animaux (Bullock *et al* 1997). Ces animaux présentent ainsi des caractéristiques qui n'auraient pu être obtenues qu'après une longue et coûteuse sélection génétique.

Ces quelques exemples indiquent que le succès n'est en rien impossible dans ce domaine dès lors que des choix judicieux ont été faits et que des investissements suffisants ont été mis au service de ces projets. Des rapports rédigés par J. Mallard et par D. Boichard, M. Bonneau, D. Chourrout, G. Dambrine, L.-M. Houdebine et P. Monget résument les projets dans lesquels l'INRA s'est engagé d'une manière ou d'une autre.

Références bibliographiques

- Anderson G.B., 1996. Molecular aspects of embryo development. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 24, 184-190.
- Boichard D., Le Roy P., Levéziel H., Elsen J.M., 1998. Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale. *INRA Prod. Anim.*, 11, 67-80.
- Bösze Z., Devino E., Puissant C., Fontaine M.L., Houdebine L.M., 1996. Characterization of rabbit κ -casein cDNA : control of κ -casein gene expression *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Endocr.*, 11, 9-17.
- Bullock D.W., Damak S., Jay N.P., Su H.Y., Barrell G.K., 1997. Improved wool production from insulin-like growth factor I targeted to the wool follicle in transgenic sheep. In : L.-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*, 507-509. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Campbell K.H.S., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I., 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64.
- Clouthier D.E., Avarbock M.R., Maika S.D., Hammer R.E., Brinster R.L., 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 381, 418.
- Crozet N., 1997. *In vitro* generation of one cell embryos in sheep and goat. In : L.-M. Houdebine (ed), *Transgenic Animals : Generation and Use*, 45-50. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Davis H.L., McCluskie M.J., Gerin J.L., Purcell R.H., 1996. DNA vaccine for hepatitis B : evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7213-7218.
- Devino E., Thépot D., Pavirani A., Stinnakre M.G., Fontaine M.L., Grabowski H., Houdebine L.M., 1994. High level production of human growth hormone in the milk of transgenic milk : the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression of the mammary gland. *Trans. Res.*, 3, 79-89.
- Donovan P.J., Resnick J.L., Cheng L., Lock L.F., 1997. Towards the use of primordial germ cells for germline modification. In : L.-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*, 179-188. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Draws R., Pal.Eyanda R.K., Lee T.K., Chang R.R., Rehemtulla A., Kaufman R.J., Drohan W.N., Lubon H., 1995. Proteolytic maturation of protein C upon engineering the mouse mammary gland to express furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10462-10466.
- Dunn C.S., Mehtali L.M., Houdebine L.M., Gut J.P., Kirn A., Aubertin A.M., 1995. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4 transgenic rabbits. *J. General Virol.*, 76, 1327-1336.
- Duverger N., Kruth H., Emmanuel F., Caillaud J.M., Viglietta C., Castro G., Tailleur A., Fievet C., Fruchart J.C., Houdebine L.M., Denèfle P., 1997. Inhibition of a atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I transgenic rabbits. *Thrombosis and Vasc. Biol.*, (sous presse).
- Eloit M., 1998. Vaccins traditionnels et vaccins recombinants. *INRA Prod. Anim.*, 11, 5-13.
- Etches R.J., Clark M.E., Verrinder Gibbins A.M., Cochran M.B., 1997. Production of chimeric chickens as intermediates for gene transfer. In : L.-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*, 75-82. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Furth P.A., Kerr D., Wall R., 1995. Gene transfer by jet injection into differentiated tissues of living animals and in organ culture. *Mol. Biotechnol.*, 1995, 4, 121-127.
- Gavora J.S., Benkel B., Spencer J.L., Gagnon C., Crittenden L.B., 1995. Influence of the alv6 recombinant avian leukosis virus transgene on production traits and infection with avian tumor viruses in chickens. *Poultry Science*, 74, 852-863.
- Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L., Bouillon J., 1994. Du gène au fromage : le polymorphisme de la caséine α_S1 caprine, ses effets, son évolution. *INRA Prod. Anim.*, 7, 3-19.
- Gutierrez A., Meade H.M., Ditullio P., Pollock D., Harvey M., Jimenez-Flores R., Anderson G.B., Murray J.D., Medrano J.F., 1996. Expression of a bovine κ -CN cDNA in the mammary gland of transgenic mice utilizing a genomic milk protein gene as an expression cassette. *Trans. Res.*, 5, 271-279.
- Houdebine L.M., 1991. Les biotechnologies animales. *INRA Prod. Anim.*, 4, 81-88.
- Houdebine L.M., 1994. Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *J. Biotech.*, 34, 269-287.
- Houdebine L.M., 1995. The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals. *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 609-617.
- Jones S.D., Marasco W.A., 1997. Intracellular antibodies (intrabodies) : potential applications in transgenic animal research and engineered resistance to pathogens. In : L.-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., Van Der Schans A., Van Der Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R., De Boer H., 1991. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Biol. Tech.*, 9, 844-847.

- Kumar V., Sercarz E., 1996. Genetic vaccination : the advantages of going naked. *Nature Med.*, 2, 857-859.
- Ladenheim R., 1995. Les vaccins à ADN nu. *Biofutur*, mai, 15-21.
- Lhuillier P., Soulier S., Stinnakre M.G., Lepoury L., Davis S.R., Mercier J.C., Vilotte J.L., 1997. Efficient and specific ribozyme-mediated reduction of bovine α -lactalbumin expression in double transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, submitted.
- Malassagne B., Taboit F., Houdebine L.M., Attal J., Housin D., Weill B., 1996. Applications de la transgénèse à la xénotransplantation. *La Presse Médicale*, 25, 1247-1250.
- Mason H.S., Ball J.M., Shi J.J., Jiang X., Estes M.K., Arntzen C.J., 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5335-5340.
- Massoud M., Attal J., Thépot D., Pointu H., Stinnakre M.G., Théron M.C., Lopez C., Houdebine L.M., 1996. The deleterious effect of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Repr. Nutr. Dev.*, 36, 555-563.
- Mercier J.C., 1986. Genetic engineering applied to milk producing animals : some expectations. In : C. Smith, JWB King and JC McKay (eds), *Exploiting New Technologies in Animals Breeding*, 122-131. Oxford University Press, Oxford.
- Mercier J.C., Vilotte J.L., 1997. The modification of milk protein composition through transgenesis : progress and problems. In : L-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*, 473-482. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Pain B., Clark M.E., Shen M., Nakazawa H., Sakurai M., Samarut J., Etches R.J., 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 122, 2339-2348.
- Persuy M.A., Stinnakre M.G., Printz C., Mahé M.F., Mercier J.C., 1992. High expression of the caprine β -casein gene in transgenic mice. *Eur. J. Biochem.*, 205, 887-893.
- Persuy M.A., Legrain S., Printz C., Stinnakre M.G., Lepoury L., Brignon G., Mercier J.C., 1995. High-level, stage- and mammary-tissue-specific expression of a caprine κ -casein-encoding minigene driven by a β -casein promoter in transgenic mice. *Gene*, 165, 291-296.
- Pineau T., 1998. Apport des biotechnologies en pharmacologie et toxicologie. *INRA Prod. Anim.*, 11, 95-100.
- Prieto P.A., Mukerji P., Kelder B., Erney R., Gonzal. Ez D., Yun J.S., Smith D.F., Moremen K.W., Nardelli C., Pierce M., Li Y., Chen X., Wagner T.E., Cummings R.D., Kopchick J.J., 1995. Remodeling of mouse milk glycoconjugates by transgenic expression of a human glycosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 270, 29515-29519.
- Puissant C., Bayat-Sarmadi M., Devinoy E., Houdebine L.M., 1994. Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy-lactation-weaning cycle and in cultured mammary cells. A Comparison with the other major milk protein mRNAs. *Eur. J. Endocr.*, 130, 522-529.
- Ronfort C.M., Legras C., Verdier G., 1997. The use of retroviral vectors for gene transfer into bird transfer. In : L-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*, 83-94. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Salter D.W., Crittenden L.B., 1989. Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken. *Theoretical and Applied Genetics*, 77, 457-461.
- Schellander K., Brem G., 1997. The direct gene transfer through mammal spermatozoa. In : L-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*, 41-44. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Squires E.J., Drake D., 1997. Transgenic chickens by liposome-sperm-mediated gene transfer. In : L-M. Houdebine (ed), *Transgenic animals : Generation and Use*, 95-99. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Stacey A., Schnieke A., McWhir J., Cooper J., Colman A., Melton D.W., 1994. Use of double-replacement gene targeting to replace the murine α -lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol. Cell Biol.*, 14, 1009-1016.
- Stacey A., Schnieke A., Kerr M. *et al.*, 1995. Lactation is disrupted by α -lactalbumin deficiency and can be restored by human α -lactalbumin gene replacement in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2835-2839.
- Stinnakre M.G., Vilotte J.L., Soulier S., Mercier J.C., 1994. Creation and phenotype analysis of α -lactalbumin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6544-6548.
- Strömqvist M., Houdebine L.M., Andersson J., Edlund A., Johansson T., Viglietta C., Puissant C., Hansson L., 1997. Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res.* (sous presse).
- Thoraval P., Lasserre F., Coudert F., Dambrine G., 1994. Production of germline chimeras obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cells. *Poultry Sci.*, 73, 1897-1905.
- Tsukui T., Kanegae Y., Saito I., Toyoda Y., 1996. Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs. *Nature Biotech.*, 14, 982-995.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-813.

Abstract

Animal transgenesis.

Transgenic animals were obtained for the first time 17 years ago. This technique is widely used in basic research. Genes can be added, inactivated or specifically replaced in the genome of animals. This technical approach brings invaluable and numerous informations on the genome working and on the control mechanisms of biological functions. The production of recombinant proteins in the milk of transgenic animals is about to become an industrial activity. The transfer of organs (heart, kidney, lung...) and cells (pancreas, liver...) from transgenic pigs to humans seems no more inaccessible. The use of transgenesis to improve animal production is still almost inexistent. It is restricted essentially to the obtention of models to study particular genes and biologi-

cal functions. The technical difficulty and the cost to generate transgenic farm animals remain one of the major limitations for the applications in this field. However, gene transfer into cultured fetal cells followed by their transfer into enucleated oocytes to generate living animals should greatly contribute to improve this situation. Transgenic farm animals having interesting genetic traits should be obtained in the coming years. However, transgenesis will not be used instead of other methods (selection, vaccination, control of reproduction...) which are also making quite significant progress. Transgenesis is rather an additional technique to improve animal production.

Houdebine L.-M., 1998. La transgénèse animale et ses applications. *INRA Prod. Anim.*, 11, 81-94.