

## Les manipulations génétiques : comment améliorer la croissance

L'injection d'hormone de croissance accélère la croissance et augmente la taille finale de certains animaux comme la souris et le saumon. Chez d'autres espèces comme le porc, l'hormone de croissance n'augmente que très faiblement la masse corporelle totale. En revanche, elle réduit la proportion de lipides et elle augmente la masse musculaire. La transgénèse qui permet d'introduire et de faire exprimer le gène de l'hormone de croissance reproduit les effets des injections d'hormones. Toutefois, cette méthode ne sera satisfaisante que lorsqu'une bonne maîtrise de l'expression du gène transféré permettant de se rapprocher des conditions physiologiques aura été obtenue.

La modulation de l'activité d'une fonction physiologique chez un organisme pluricellulaire pose plusieurs questions d'ordre théorique et technique. Une fonction physiologique telle que la croissance n'est en effet pas modulée par une seule hormone, mais par une série de facteurs agissant en cascade, en synergie ou en antagonisme avec des boucles de régulation

permettant au système hormonal de s'autolimiter. Par ailleurs, l'évolution a fait qu'un agent régulateur n'agit pas en général sur une seule fonction biologique, mais sur plusieurs simultanément ou séquentiellement. Une hormone doit donc être sécrétée à certaines périodes de la journée ou de l'année et à des taux modérés pour stimuler au maximum un tissu cible donné sans perturber plus ou moins gravement les autres fonctions biologiques qui sont également sous sa dépendance. Un animal sauvage et, le plus souvent également un animal domestique, ne sont pas au maximum de leurs possibilités et la plupart de leurs fonctions biologiques peuvent être plus ou moins surstimulées par des injections d'hormones. Une telle méthode a l'avantage d'être très simple puisque l'on peut théoriquement injecter des quantités variables d'hormones à des fréquences elles-mêmes variables. Ceci suppose évidemment que l'hormone soit disponible en grande quantité et implique que des interventions répétées, le plus souvent coûteuses, aient lieu sur les animaux.

### Résumé

Les récents développements de la génétique moléculaire offrent désormais la possibilité d'isoler virtuellement n'importe quel gène, de le muter *in vitro*, de modifier ses éléments régulateurs, de le réintroduire dans des cellules ou des organismes entiers (transgénèse) et donc, de moduler à volonté une fonction physiologique donnée. Ces possibilités ont été et sont encore appliquées à la fonction de croissance. Ainsi, les gènes du GRF (Growth Releasing Factor), de la GH (Growth Hormone) et de l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor) ont été introduits dans des embryons de divers animaux. Ces transgènes se sont exprimés et ont conduit à une accélération de la croissance et à une augmentation de la taille des animaux accompagnée d'un assez profond changement de leur métabolisme. L'incapacité de moduler finement l'expression des transgènes chez les animaux transgéniques se traduit par une sécrétion exacerbée des hormones qui, elle-même, induit une série de désordres physiologiques rendant les animaux transgéniques peu performants. La transgénèse, si elle est devenue une routine chez la souris dans un certain nombre de laboratoires, reste difficilement réalisable à grande échelle chez la plupart des animaux domestiques. Des études approfondies sur les mécanismes de contrôle de l'expression des transgènes et sur les méthodes de transgénèse doivent donc être menées à bien pour que les manipulations génétiques deviennent une réalité dans les techniques d'élevage.

Un moyen de s'affranchir des interventions répétées sur les animaux consiste à procéder à une sélection génétique. Les méthodes traditionnelles de sélection génétique sont relativement lentes puisque strictement liées aux caprices de l'évolution et aux lenteurs du cycle de reproduction. Elles procèdent par ailleurs en grande partie en aveugle dans la mesure où le

critère de sélection est généralement la performance globale de l'animal sélectionné, sans référence particulière ou obligatoire à une fonction biologique donnée. Un avantage certain de cette approche traditionnelle est qu'elle procède à une élimination continue des animaux qui pourraient avoir les performances recherchées, mais qui pourraient présenter des tares variées dues au hasard ou au processus de sélection lui-même.

Un autre moyen radicalement différent de s'affranchir des injections répétées d'une hormone peut consister à introduire dans l'animal le gène de l'hormone, de manière à ce qu'il s'y exprime et qu'il soit transmis à sa descendance. Cette opération, que l'on appelle la transgénèse, est désormais possible et applicable dans des buts expérimentaux à la fonction de croissance. Ce présent rapport se propose de faire le point sur les travaux réalisés et en cours ainsi que sur les perspectives qui s'ouvrent dans ce domaine.

## Quelle hormone utiliser pour stimuler la croissance

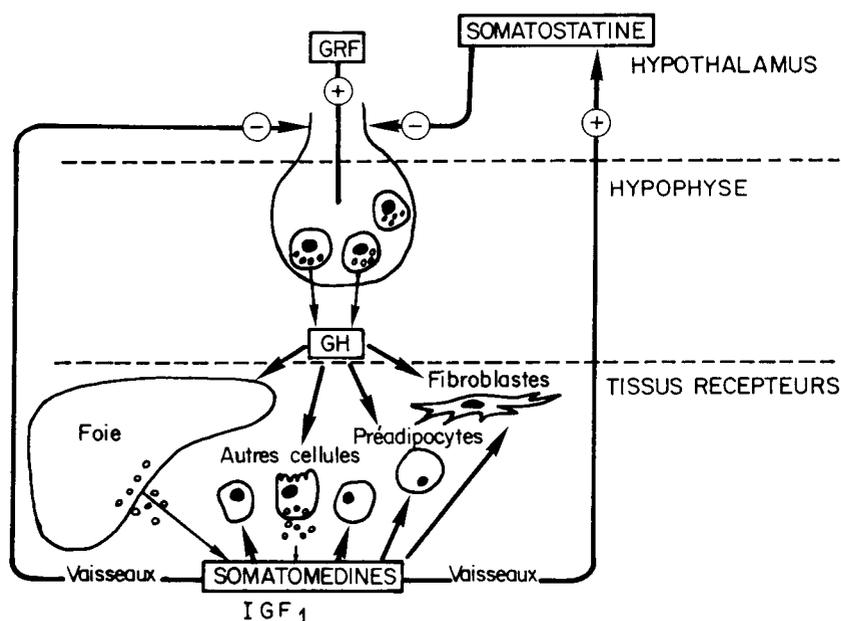
La croissance musculaire est sous la dépendance de l'hormone de croissance dont la sécrétion est elle-même stimulée par le GRF et qui agit en grande partie via une somatomédine d'origine hépatique, l'IGF1 (figure 1). Une rétroaction au niveau hypothalamo-hypophysaire est exercée par la somatostatine et l'IGF1. Des injections de GRF, de GH ou d'IGF1 et un abaissement du taux de somatostatine sont

donc théoriquement capables d'accélérer la croissance musculaire. Le clonage des gènes (et les progrès de la synthèse chimique des peptides) a rendu ces hormones disponibles grâce à leur biosynthèse en masse dans des bactéries recombinantes. Ainsi, l'hormone de croissance porcine (ainsi que d'autres GH de mammifère et que le GRF) stimule la croissance musculaire du porcelet en réduisant la consommation relative de nourriture et l'accumulation de lipides (Campbell *et al* 1989, revue dans Genetic Technology News 1989).

De la même manière, des hormones de mammifères, d'oiseaux ou de poissons stimulent la croissance des saumons (Down *et al* 1988). Les ruminants semblent beaucoup moins sensibles aux injections de GH pour la croissance alors que leurs performances laitières sont par contre nettement améliorées par l'hormone. La sélection génétique pratiquée depuis longtemps chez les ruminants peut avoir réduit la dépendance vis-à-vis de l'hormone exogène. Chez le poulet, des injections de GH n'améliorent pas les performances de croissance, il semble même que les oiseaux aient sur ce point un contrôle hormonal de la croissance différent des autres espèces (Burke *et al* 1987). Administrées de manière modérée, les diverses hormones de croissance ont donc plutôt un effet favorable sur la croissance des animaux en cours de développement sans que des effets biologiques indésirables n'apparaissent. Le problème sur le plan physiologique et biochimique paraît donc bien posé : un transgène de GRF, de GH et éventuellement d'IGF1 s'exprimant de manière convenable doit donc théoriquement avoir les mêmes effets désirables que les injections répétées d'hormone sans en avoir les inconvénients. De telles expériences ont effectivement été réalisées avec les gènes du GRF, de la GH et de l'IGF1. Il est bon de noter que, s'il est logique de solliciter ces trois gènes étant donné les effets connus des hormones correspondantes, il reste concevable de faire appel à des gènes codant pour d'autres facteurs de croissance. L'IGF1 a un rôle déterminant dans le cycle de division cellulaire, mais d'autres facteurs tels que le FGF, les TGF, l'EGF, etc..., sont également de puissants agents mitogènes ayant des actions plus ou moins spécifiques d'un type cellulaire donné. Il serait donc logique de s'attacher non seulement à l'axe somatotrope, mais également et, plus généralement, aux gènes des facteurs qui contrôlent la division cellulaire (Goddard 1988).

Figure 1. Les hormones de l'axe somatotrope.

Le GRF (Growth Releasing Factor) ou somatotrophine est sécrété dans le cerveau au voisinage de l'hypophyse par l'hypothalamus. Le GRF stimule la sécrétion d'hormone de croissance (GH : Growth Hormone) qui passe dans la circulation sanguine. L'effet de croissance de la GH s'exerce par son action sur différents tissus. Le foie est la cible privilégiée de la GH. Sous son influence, la cellule hépatique sécrète un facteur de croissance, l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor), ou somatomédine C, qui est un intermédiaire obligatoire dans l'action de la GH. L'IGF1 est un facteur de croissance pour la plupart des cellules de l'organisme.



## Les techniques de transgénèse

Introduire un gène dans des cellules est devenu une routine dans bon nombre de laboratoires (figure 2). Divers procédés sont utilisés et aucun n'a un très haut rendement sauf la microinjection directe du gène dans le noyau de la cellule. C'est donc ce procédé qui a été retenu pour introduire des gènes dans des embryons qui sont des cellules relativement rares et dont l'obtention est souvent coûteuse. Cette méthode reste elle-même d'une efficacité limitée puisque chez la souris, 10-20 % des embryons manipulés donnent naissance à des

sourceaux dont 0-30 % sont transgéniques. Il faut donc manipuler de l'ordre de 100 embryons pour espérer raisonnablement avoir un adulte transgénique. Ce taux descend notablement lorsqu'on s'adresse à d'autres mammifères comme le lapin, le porc, le mouton, la chèvre ou la vache (Brinster *et al* 1985, Hammer *et al* 1986, Fabricant *et al* 1987, Mc Evoy *et al* 1987, Brem *et al* 1988, Pursel *et al* 1989). Il est préférable d'utiliser les gènes entiers et non leur contrepartie ADNc si l'on souhaite avoir une expression élevée des transgènes (Brinster *et al* 1988). Les transgènes sont généralement introduits dans les chromosomes de l'hôte et ils sont transmis de manière stable à la descendance. Un certain nombre d'embryons n'intègrent pas le gène étranger au stade une cellule mais un peu plus tard. Une partie seulement des cellules de l'adulte ont donc le transgène. Ces animaux que l'on qualifie de mosaïques ne transmettent le transgène qu'à une fraction de leurs descendants inférieure à 50 %. Une cellule germinale d'un animal mosaïque ayant ou non le transgène, le mosaïcisme disparaît évidemment à la génération suivante (Wilkie *et al* 1986). L'expression des transgènes a lieu le plus souvent dans les tissus où ils s'expriment normalement, mais leur taux d'expression est largement imprévisible.

Chez les poissons et, plus généralement semble-t-il, chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés, une microinjection du gène dans le cytoplasme des embryons conduit à l'obtention d'un taux élevé d'animaux transgéniques (Chourrout *et al* 1989).

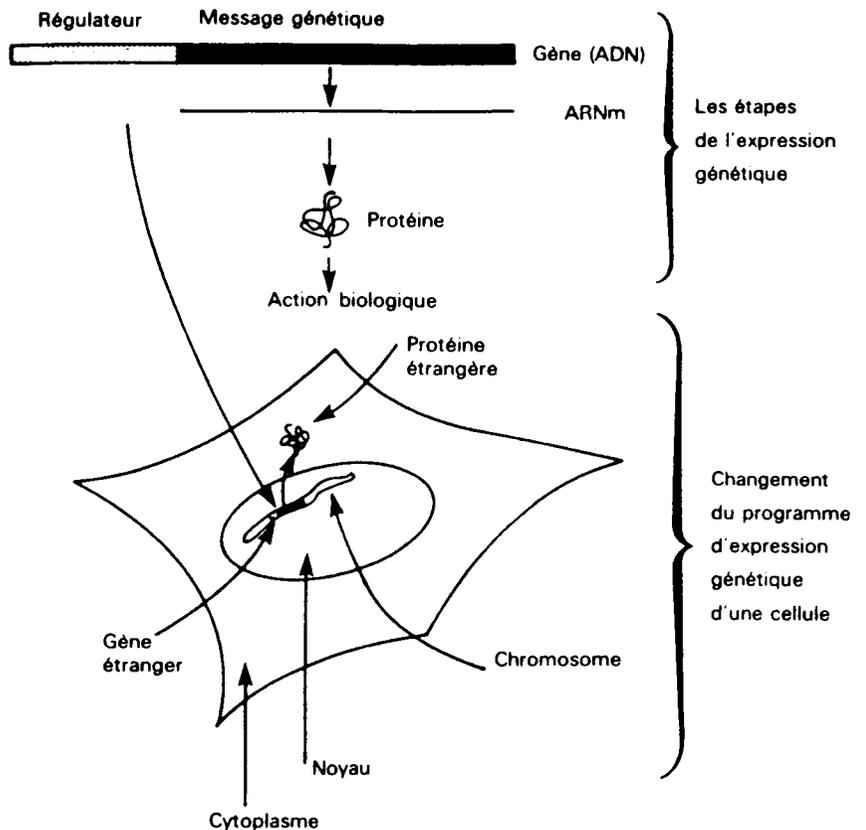
D'autres techniques, comme l'utilisation de vecteurs rétroviraux, font l'objet d'études intenses. Cette technique repose sur le fait que les rétrovirus doivent s'incorporer dans le génome des cellules infectées pour pouvoir se multiplier. Un gène étranger introduit dans le génome viral se trouve ainsi véhiculé jusqu'au génome de la cellule hôte par le virus. Cette méthode délicate a fait des progrès notables chez le poulet (Bosselman *et al* 1989). Chez cette espèce, cette approche est rendue plus nécessaire dans la mesure où on ne sait pas manipuler les embryons précoces. Chez les mammifères, il ne semble pas que de tels vecteurs aient une supériorité franche sur la microinjection, à moins qu'on ne cherche à les utiliser pour transférer des gènes dans des cellules souches embryonnaires (Frohman et Martin 1989) ou dans des cellules d'un organisme entier dans le but de faire de la thérapie génétique (Anderson 1984).

Une méthode qui vient d'être proposée soulève de grands espoirs, en particulier en ce qui concerne les gros animaux. Elle consiste à faire pénétrer les gènes dans les spermatozoïdes avant la fécondation, les spermatozoïdes devenant alors eux-mêmes les vecteurs des gènes (Lavitrano *et al* 1989).

Les problèmes techniques restent donc d'une importance essentielle pour le développement des animaux domestiques transgéniques. Les succès encore très limités n'ont en effet permis l'examen que d'un nombre relativement faible d'animaux portant une information génétique étrangère.

Figure 2. Le rôle de l'expression génétique dans l'activité cellulaire.

Dans une cellule, une part essentielle de l'activité est assurée par les protéines, enzymes, protéines, structures, récepteurs, etc... La synthèse d'une protéine est sous la dépendance directe d'un gène donné. Lorsqu'une protéine est synthétisée, on dit que le gène correspondant s'exprime. Le fragment d'ADN d'un gène peut être isolé. Le gène peut être muté *in vitro* dans la partie codant pour la protéine en changeant l'ordre des bases de l'ADN. La protéine qui en dérive a alors changé de structure et potentiellement de fonction. Un gène peut également être muté dans sa partie régulatrice (promoteur). Le gène s'exprime alors dans des situations physiologiques différentes. La cellule qui reçoit un gène étranger, muté ou non, synthétise une nouvelle protéine et elle acquiert donc une nouvelle fonction. Si le gène a été introduit dans l'embryon, on a réalisé une transgénèse. Le gène étranger est transmis à la descendance et son expression peut dans certains cas changer la physiologie de l'animal entier.



## Les effets du transgène GRF

Des souris et des porcs transgéniques exprimant le gène du GRF humain ont été obtenus par différents laboratoires. Chez les souris, ce gène a conduit à un accroissement significatif de la croissance pondérale des animaux qui, elle-même, est accompagnée d'une augmentation très marquée de la sécrétion de GRF et de GH (respectivement jusqu'à 200 ng/ml et 1000 ng/ml) (tableau 1). Le transgène GRF s'exprime dans toute une série d'organes autres que l'hypothalamus, dont l'hypophyse. Le GRF agit donc alors en partie directement sur l'hypophyse sans passer par la circulation générale (sécrétion autocrine). Le précurseur du GRF qui doit être clivé en plusieurs régions pour donner le GRF mature peut donc être maturé dans des cellules autres que celles de l'hypothalamus. Le transgène GRF est moins puissant que les transgènes GH eux-mêmes pour augmenter le taux de GH circulante, l'hypophyse constituant l'élément limitant effectif pour la sécrétion de GH. C'est sans doute pour cette raison que les animaux transgéniques exprimant le gène du GRF n'ont pas de problème de santé particulier et que leur fécondité ne paraît pas altérée.

**La transgénèse reste un exercice difficile chez les animaux domestiques.**

Tableau 1. Effets du transgène GRF.

Le gène du GRF a été placé sous la dépendance de promoteurs puissants. L'expression du GRF a eu lieu chez la souris et chez le porc mais seule la première a été physiologiquement modifiée.

Promoteur	Animal	Effets	Références
Métallothionéine	souris	croissance × 2 GRF (200 ng/ml) GH (1000 ng/ml) hypophyse hypertrophiée (× 3-10) fertilité normale	Hammer <i>et al</i> 1985 Mayo <i>et al</i> 1968
Métallothionéine	porc	GRF (× 10-500)	Pursel <i>et al</i> 1989
Albumine	"	GH inchangée croissance inchangée	Brem <i>et al</i> 1988

(Hammer *et al* 1985). Leur hypophyse est par contre considérablement hypertrophiée. Ce sont essentiellement les cellules sécrétant la GH qui se sont multipliées. Le GRF apparaît donc non seulement comme un agent provoquant la sécrétion de GH, mais aussi comme un facteur de croissance spécifique des cellules à GH (Mayo *et al* 1988).

Des porcs transgéniques exprimant le même gène du GRF ont également été obtenus. De manière surprenante et contrairement à ce qui a été observé chez la souris, chez les porcs qui expriment très fortement le gène du GRF (jusqu'à 500 fois le taux normal), la sécrétion de GH ne s'est pas trouvée augmentée (Brem *et al*, Pursel *et al* 1989). Il semble qu'une partie de cet échec soit attribuable au fait que chez cette espèce le transgène GRF ne s'exprime majoritairement que dans des types cellulaires incapables de transformer le précurseur du GRF en hormone biologiquement active.

## Les effets du transgène GH

Les premiers animaux transgéniques exprimant des gènes de GH ont été des souris. Divers promoteurs puissants fonctionnant dans la plupart des types cellulaires ont été utilisés dans le but d'obtenir une expression très élevée des transgènes. Dans ces conditions, la plupart des tissus de l'organisme synthétise de la GH. C'est ce qui explique les taux très élevés de GH circulante (souvent de l'ordre du µg/ml et jusqu'à 150 µg/ml). Ces souris ont également une hypersécrétion d'IGF1, une diminution du nombre des cellules GH de l'hypophyse et une croissance très nettement augmentée (tableau 2). Leur santé est par ailleurs assez gravement perturbée. Leur reproduction est altérée, en partie par effet hyperprolactinémique dans le cas de l'hormone de croissance humaine (hGH) qui est douée d'une activité prolactine élevée. Les souris exprimant le gène hGH ont un taux de prolactine anormalement bas, un taux de LH (luteinizing hormone) anormalement élevé, une réponse atténuée de la LH au GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) et une rétro-action

faible de la testostérone sur la FSH (Follicule Stimulating Hormone) (Bartke 1988). De nombreuses autres perturbations ont été observées qui sont d'ailleurs variables selon que le transgène est le GRF, la GH ou l'IGF1 (Brem *et al* 1989, Quaife *et al* 1989). De manière inattendue, le transgène GH ovine ne provoque qu'un nombre plus limité de désordres (Orian *et al* 1989). Il n'est pas aisé d'expliquer ces différences. Il est probable que les hormones hétérologues synthétisées par des transgènes issus d'une autre espèce, si elles sont toutes de véritables somatotropines, peuvent avoir des effets secondaires que n'aurait peut-être pas l'hormone homologue même à très forte concentration. Les constructions de gène doivent être elles-mêmes prises en considération. En effet, il est admis que le promoteur d'un gène n'est pas le seul facteur qui contrôle l'expression génétique. Des signaux sont également présents à l'intérieur même des régions transcrites. L'association d'un promoteur donné avec un autre gène que le sien peut, par ailleurs, créer des signaux actifs de manière tout à fait imprévisible. C'est ainsi que l'on voit certaines constructions s'exprimer plus intensément dans certains tissus sans que la nature du promoteur ne le laisse présager. Ceci peut se traduire par une production locale de GH très élevée dans tel ou tel tissu. Cette hyperproduction locale qui ne se traduit pas nécessairement par un taux particulièrement élevé de GH sanguine peut gravement perturber le tissu producteur par une action de type autocrine.

Les porcs transgéniques exprimant des gènes de GH ont en gros les caractéristiques des animaux traités par des injections d'hormone : croissance accélérée (à condition que le régime alimentaire soit riche en lysine), perte partielle d'appétit, meilleure utilisation de la ration alimentaire, dépôt limité de graisse. Ces avantages ont une contrepartie négative sur la santé des animaux. Les transgènes GH induisent en effet chez le porc une réduction des capacités de reproduction, de l'arthrite, une tendance à l'ulcération de l'estomac, un état diabétique, etc... (tableau 2).

Les moutons transgéniques qui expriment des gènes GH ont de graves perturbations de

**Les transgènes GRF, GH et IGF1 modifient le métabolisme des animaux.**

leur santé, en particulier au niveau des articulations, non accompagnées d'une accélération de leur croissance (tableau 2).

Trop peu de lapins transgéniques exprimant les gènes GH ont été obtenus pour que des conclusions claires puissent être tirées sur leurs effets (tableau 2).

Chez les poissons, les transgènes GH sont supposés accélérer la croissance. Les résultats sont encore controversés (Chourrou *et al* 1989).

## Les effets du transgène IGF1

Des lignées de souris exprimant le gène de l'IGF1, placé sous la dépendance du promoteur du gène de la métallothionéine qui est actif dans la plupart des cellules, ont une croissance pondérale augmentée qui résulte d'une organomégalie sélective et non d'un accroissement de la taille du squelette (Mathews *et al* 1988a). Chez ces animaux, l'expression de la GH endogène est significativement atténuée par l'effet de rétroaction de l'IGF1. Les effets de croissance sont moins spectaculaires que ceux obtenus avec les gènes du GRF ou de la GH. Ceci peut être dû à la réduction du taux de GH circulante qui doit agir en synergie avec l'IGF1 pour assurer une croissance élevée. Plus simplement, la relative inefficacité du transgène IGF1 peut être due à son expression plutôt modeste dans les lignées de souris étudiées.

## La transgénèse comme modèle d'étude de la croissance

L'expression souvent débridée des transgènes GH induit des états physiologiques qui ne seraient que difficilement obtenus par de simples injections d'hormone. Un examen de ces animaux transgéniques a déjà apporté des informations précieuses.

Une lignée de souris naines qui n'a plus de gène GH fonctionnel a pu retrouver en partie sa taille normale en recevant un transgène GH (Hammer *et al* 1984). A l'inverse, l'ablation génétique qui consiste à détruire spécifiquement les cellules qui expriment un gène donné au cours du développement, a permis de générer des lignées de souris naines en éliminant de l'hypophyse les cellules à GH (Behringer *et al* 1988, Borelli *et al* 1989).

Chez les souris géantes exprimant un transgène GH, l'hypercroissance des tissus ne se fait pas de manière allométrique avec les animaux témoins. Ainsi, le foie et la rate sont particulièrement stimulés alors que le cerveau reste insensible à la GH provenant du transgène (Shea *et al* 1987). De manière inattendue, l'accélération de la croissance chez les souris transgéniques ne commence pas avant la troisième semaine de leur vie extra-utérine alors que le taux d'IGF1 sanguin est supérieur aux animaux témoins dès la deuxième semaine et que le taux de GH est toujours plus élevé chez

Tableau 2. Effets du transgène GH.

Le gène de différentes GH a été placé sous la dépendance de promoteurs forts non inductibles dans les conditions expérimentales ou de promoteurs inductibles (PEPCK et Prolactine). La sécrétion de GH issue des transgènes a eu des effets de croissance et des actions secondaires variables selon les espèces.

Promoteur	Transgène	Animal	Effets	Références
Métallothionéine	GH de rat	souris	GH ↗ IGF ↗	Palmiter <i>et al</i> 1982
"	GH humaine	"	croissance (× 2)	Palmiter <i>et al</i> 1983
"	"	"	infertilité partielle	Bartke <i>et al</i> 1988
"	"	"	hépatomégalie	Chandrashekar <i>et al</i> 1988
"	GH bovine	"	mort précoce	Orian <i>et al</i> 1989
"	GH bovine	"	léthargie	Quaife <i>et al</i> 1989
h2K	GH humaine	"	ulcération etc.	Morello <i>et al</i> 1986
PEPCK	GH bovine	"	expression régulée du transgène	Hanson <i>et al</i> 1989
Métallothionéine	GH humaine	porc	GH ↗	Pursel <i>et al</i> 1989
"	GH bovine	"	IGF ↗	idem
"	GH humaine	"	croissance ↗	Brem <i>et al</i> 1988
"	GH porcine	"	animaux plus maigres	Wize <i>et al</i> 1988
MLV	GH de rat	"	santé altérée	Ebert <i>et al</i> 1988
PEPCK	GH bovine	"	expression régulée du gène	Pinkert <i>et al</i> 1989
Prolactine	GH bovine	"	"	Polge <i>et al</i> 1989
Métallothionéine	GH ovine	mouton	GH ↗	Nancarow <i>et al</i> 1987
"	GH humaine	"	croissance inchangée	Rexroad 1989
"	GH bovine	"	santé altérée	"
"	GH ovine	"	"	"
Transferrine	GH bovine	"	"	"
Métallothionéine	GH humaine	lapin	GH ↗	Hammer <i>et al</i> 1985a
"	GH humaine	"	croissance inchangée	Hammer <i>et al</i> 1985b

les animaux transgéniques. L'accélération de la croissance paraît donc à peu près corrélée avec l'augmentation du taux d'IGF1, mais l'effecteur hépatique ne paraît pas immédiatement sensible à la GH (Mathews *et al* 1988b).

Chez les porcs exprimant un transgène hGH ou bGH, la GH endogène est réduite, l'IGF1 est augmenté et la sensibilité au GRF est atténuée (Miller *et al* 1989).

Le transgène GH induit chez les souris une féminisation du foie qui exprime chez les mâles transgéniques plus d'IGF1, moins de MUP (murine urinary protein) et plus de récepteur prolactine que chez les animaux témoins. Cette situation ressemble à celle des femelles normales chez qui une sécrétion de GH relativement élevée est permanente. Il apparaît donc que la sécrétion discontinue de GH caractérise l'état mâle et que la féminisation hépatique est induite par une sécrétion continue de l'hormone (Norstedt et Palmiter 1984).

Le transgène hGH peut être induit par des injections de glucocorticoïdes qui stabilisent l'ARNm (Selden *et al* 1989). Le même transgène hGH est régulé par le glucose au niveau de la traduction comme le gène insuline endogène (Welsh *et al* 1986). Le transgène a donc alors gardé une bonne partie de ses capacités à être régulé.

De manière un peu inattendue, des souris transgéniques qui expriment le transgène de la somatostatine n'ont pas de retard dans la croissance bien que le taux de somatostatine sanguin soit élevé. La somatostatine est produite chez ces animaux par différents organes dont les cellules gonadotropes de l'hypophyse (Low *et al* 1986). Les cellules hypophysaires à GH doivent donc être au contact de la somatostatine produite par le transgène. Il n'est pas certain toutefois que la somatostatine produite par les cellules gonadotropes migre aisément jusqu'aux cellules à GH. Une explication plus simple pour expliquer la non interférence de la somatostatine sur la croissance est que l'hyper-sécrétion de cette hormone a induit une désensibilisation de son récepteur qui se traduit par une sécrétion normale de GH chez les animaux exprimant le transgène somatostatine.

## Conclusions

Après maintenant plusieurs années d'expérimentation, il est possible de faire un bilan des tentatives qui ont été faites pour améliorer la croissance via le transfert de gène. Force est de constater que l'on se trouve dans une situation de demi-échec malgré les importants investissements consentis. Si l'on veut être objectif, il convient tout d'abord de ne pas omettre de prendre en considération le fait qu'une partie essentielle des efforts a porté sur la mise au point des techniques de transgénèse, indépendamment de la nature des gènes transférés. Il est désormais clair qu'une simple transposition de la technique de microinjection de la souris au gros mammifère n'est que partiellement satisfaisante. Un certain succès a pu être atteint toutefois de cette manière et on sait désormais

le prix à payer avec la technique de microinjection pour obtenir de gros mammifères transgéniques. De toute évidence, un effort important doit être et sera maintenu dans cette direction. L'utilisation des cellules souches embryonnaires (cellules ES) et la possibilité d'introduire les gènes directement dans les spermatozoïdes soulèvent un peu partout de grands espoirs.

Ces limites techniques ont sévèrement réduit le nombre d'essais permettant d'évaluer le fonctionnement des transgènes. Une conclusion s'impose désormais à tous. L'utilisation de transgènes GH (ou GRF ou IGF1) reste une possibilité intéressante puisque les animaux sont effectivement physiologiquement modifiés par les hormones dérivant de ces transgènes. De manière non moins évidente, il apparaît assez clairement qu'un succès véritable ne pourra intervenir que lorsque l'on se sera très sensiblement rapproché de la situation dans laquelle on se trouve lorsque l'on injecte de la GH. En d'autres termes, il paraît probable que les animaux exprimant un transgène GH n'auront pas de réel intérêt zootechnique tant que l'expression des transgènes ne sera pas contrôlée. Seule cette situation permettra à la GH de n'être présente à un taux élevé qu'à certains moments de la vie de l'animal. Des tentatives ont été faites dans ce sens puisque le gène GH a été placé sous la dépendance du promoteur de la phosphoenolcarboxykinase (PECK) que l'on sait sensible aux régimes riches en glucides et au glucagon (Pinckert *et al* 1989). Les animaux transgéniques qui abritent ce gène recombinant ont un taux de GH qui varie effectivement en fonction du régime alimentaire. Une autre tentative intéressante a consisté à placer le gène GH sous la dépendance du promoteur du gène de la prolactine que l'on sait sensible à toute une série de composés chimiques comme la perphenazine. Des injections de ces drogues suffisent à induire une augmentation transitoire du taux de GH (Polge *et al* 1989). L'intérêt réel de ces animaux reste encore à démontrer.

En attendant que des progrès aient été réalisés, il est certainement d'ores et déjà possible d'utiliser les animaux transgéniques exprimant des gènes GH par exemple pour des études métaboliques fondamentales, ces animaux représentant des situations physiologiques extrêmes.

Plus généralement, on doit se poser la question de savoir si la transgénèse est tout simplement un bon moyen d'utiliser la GH quand on dispose de l'hormone purifiée en abondance. Ces deux méthodes, injections d'hormone et transgénèse, risquent de pâtir de manière à peu près équivalente d'un rejet du public (Dickman 1989 ; Genetic Technology News 1987). L'intervention unique et définitive qui est la transgénèse reste séduisante et il serait déraisonnable de ne pas poursuivre dans cette direction et ce d'autant plus que les prix de revient comparés des deux méthodes ne sont pas prêts d'être correctement évalués. Les enjeux sont de taille puisque, faut-il le rappeler, la GH stimule non seulement la croissance chez certaines espèces, mais aussi la sécrétion laitière, même chez le porc et le rat (Bauman *et al* 1989, Madon *et al* 1986, Boyd *et al* 1985).

**La transgénèse sera utilisable lorsqu'elle sera mieux maîtrisée.**

Ce texte a été présenté aux Journées scientifiques « Croissance des bovins et qualité de la viande » à Rennes les 8-10 novembre 1989. Il est extrait du recueil complet des communications édité par l'ENSA de Rennes et l'INRA.

### Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'aide financière du programme « Biotechnology Action Programme » de la Communauté Economique Européenne.

### Références bibliographiques

ANDERSON W.F., 1984. Prospects for human gene therapy. *Sciences* 226, 401-409.

BARTKE A., STEGER S.L., HODGES S.L., PARKENING T.A., COLLINS T.J., YUN J.S., WAGNER T.E., 1988. Infertility in transgenic female mice with human growth hormone expression : evidence for luteal failure. *J. Exp. Zool.* 248, 121-124.

BAUMAN D.E., HARD D.L., CROOKER B.A., PARTRIDGE M.S., GARRICK K., SANDLES L.D., ERB H.N., FRANSON S.E., HARTNELL G.F., HINTZ R.L., 1989. Long-term evaluation of a prolonged-release formulation of N-methionyl bovine somatotropin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 642-651.

BEHRINGER R., MATTEWS L.S., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1988. Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes Dev.* 2, 453-461.

BORELLI E., HEYMAN R.A., ARIAS C., SAWCHENKO P.E., EVANS R.M., 1989. Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* 339, 538-541.

BOSSelman R.A., HSU R.Y., BOGGS T., HU S., BRUSZEWSKI J., OU S., LOZAR L., MARTIN F., GREEN C., JACOBSEN F., NICOLSON M., SCHULTZ J.A., SEMON K.M., RISHHELL W., STEWART R.G., 1989. Germiline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 243, 533-535.

BOYD R.D., HARKINS M., BAUMAN D.E., BUTLER W.R., 1985. The effect and practical implications of recombinant porcine growth hormone on lactation performance of sows. *Proc. Nutr. Cornell. Conferences for food manufacturers*, pp. 10-19.

BREM G., BRENIG B., MULLER M., KRAUSSLICH H., WINNCKER E.L., 1988. Production of transgenic pig and possible application to pig breeding. *British Society of Animal Production. Animal Breeding Opportunities*, pp. 15-31.

BREM G., WANKE R., WOLF E., BUCHMÜLLER T., MÜLLER M., BRENIG B., HERMANN W., 1989. Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice. *Mol. Biol. Med.* 6, 531-547.

BRINSTER R.L., CHEN H.Y., TRUMBAUER M.E., YAGLER M.K., PALMITER R.D., 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4438-4442.

BRINSTER R.L., ALLEN J.M., BEHRINGER R.D., GELINAS R.E., PALMITER R.D., 1988. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 836-840.

BURKE W.H., MOORE J.A., OGEZ J.R., BUILDER S.E., 1987. The properties of recombinant chicken growth hormone and its effects on growth, body composition, feed efficiency and other factors in broiler chickens. *Endocrinology* 120, 651-658.

CAMPBELL R.G., STEELE N.C., CAPERNA T.J., MC MURTRY J.P., SOLOMON M.B., MITCHELL A.D., 1989. Effects of exogenous porcine growth hormone administration between 30 and 60 kilograms on the subsequent and overall performance of pig grown to 90 kilograms. *J. Anim. Sci.* 67, 1265-1271.

CHOURROUT D., GUYOMARD R., HOUEBINE L.M., 1989. Techniques for the development of transgenic fish : a review. *Transgenic models in medicine and agriculture. UCLA symposium. Mol. Cell. Biol.* (sous presse).

DICKMAN S., 1989. Europe delays BST decision. *Nature* 340, 415.

DOWN N.E., DONALDSON H.M., DYE K., LANGLEY K., SOUZA L.M., 1988. Recombinant bovine somatotropin more than doubles the growth rate of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) acclimated to seawater and ambient winter conditions. *Aquaculture* 68, 141-145.

EBERT K.M., LOW M.J., OVERSTROM E.W., BUONOMO F.C., BAILE C.A., ROBERTS T.M., LEE A., LANDEL G., GOODMAN R.H., 1988. A moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *Mol. Endocr.* 2, 227-283.

FABRICANT J.D., NUTI L.C., MINHAS B.S., BAKER W.C., CAPEHART J.S., MARRACK P., CHALMERS J.H., BRADBURY M.W., WOMACK J.E., 1987. Gene transfer in goat. *Theriogenology* 27, 229.

FROHMAN M.A., MARTIN G.R., 1989. Cut, paste and save : new approaches to altering specific genes in mice. *Cell* 56, 145-157.

GODDARD C., 1988. Cellular growth. The key to animal growth. *British Society of Animal production. Animal Breeding Opportunities*, pp. 182-188.

HAMMER R.E., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1984. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. *Nature* 311, 65-68.

HAMMER R.E., BRINSTER R.L., ROSENFELD M.G., EVANS R.M., MAYO K.E., 1985. Expression of human growth hormone releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature* 315, 413-416.

HAMMER R.E., PURSEL V.G., REXROAD C.E., WALL R.J., BOLT D.J., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1986. Genetic engineering of mammalian embryos. *J. Anim. Sci.* 63, 269-278.

HANSON R.W., MC GRANE M.M., HATAZOGLU M., WYNshaw-BORIS A., BOSCH F., ROTTMAN F., FRITZ M., JUNE Y., THOMAS E., 1989. The introduction of genes of metabolic interest into cells and animals. *Second symposium on the genetic engineering of animals. Cornell University USA 25-28 juin 1989.*

LAVITRANO M., CAMALONI A., FAZIO V.M., DOLCI S., FARACE M., SPADAFORA C., 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs : genetic transformation of mice. *Cell* 57, 717-723.

LOW M.J., LECHAN R.M., HAMMER R.E., BRINSTER R.L., HABENER J.F., MANDEL G., GOODMAN R.H., 1986. Gonadotroph-specific expression of metallothionein fusion genes in pituitary of transgenic mice. *Science* 231, 1002-1004.

MADON R.J., ENSOR D.M., KNIGHT C.H., FLINN D.L., 1986. Effects of an antiserum to rat growth hormone on lactation in the rat. *J. Endocrin.* 111, 117-123.

MATHEWS L.S., HAMMER R.E., BEHRINGER R.R., D'ERCOLE A.J., BELL G.I., BRINSTER R.L., PALMITER R.D., 1988a. Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 123, 2827-2833.

MATHEWS L.S., HAMMER R.E., BRINSTER R.L., PALMITER R.D., 1988b. Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology* 123, 433-437.

MAYO K.E., HAMMER R.L., SWANSON L.W., BRINSTER R.L., ROSENFELD M.G., EVANS R.M., 1988. Dramatic pituitary hyperphasia in transgenic mice expression a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol. Endocr.* 2, 606-612.

McEVOY T.G., STACK M., BARRY T., KEANE B., 1987. Direct gene transfer by microinjection. *Theriogenology* 27, 258.

MILLER K.F., BOLT D.J., PURSEL V.G., HAMMER R.E., PINKERT C.A., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1989. Expression of human or bovine growth hormone gene with a mouse metallothionein-1 promoter in transgenic swine alters the secretion of porcine growth hormone and insulin-like growth factor-I. *J. Endocrin.* 120, 481-488.

MORELLO D., MOORE G., SALMON A.M., YANIV M., BABINET C., 1986. Studies on the expression of an H-2K/human growth hormone fusion gene in grant transgenic mice. *EMBO J.* 5, 1877-1883.

NANCARROW C., MARSHALL J., MURRAY J., HAZELTON I., WARD K., 1987. Production of a sheep transgenic with the ovine growth hormone gene. *Theriogenology* 27, 263.

- NORSTEDT G., PALMITER R.D., 1984. Secretory rhythm of growth hormone regulates sexual differentiation of mouse liver. *Cell* 36, 805-812.
- ORIAN J.M., LEE C.S., WEISS L.M., BRANDON M.R., 1989. The expression of a metallothionein-ovine growth hormone fusion gene in transgenic mice does not impair fertility but results in pathological lesions in the liver. *Endocrinology* 124, 455-463.
- PALMITER R.D., BRINSTER R.L., HAMMER R.E., TRUMBBAUER M.E., ROSENFELD M.G., BIRNBERG N.C., EVANS R.M., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300, 611-615.
- PALMITER R.D., NORSTEDT G., GELINAS R.E., HAMMER R.E., BRINSTER R.L., 1983. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222, 809-815.
- PINCKERT C.A., McGRANE M.M., HOOVER J., HOLTZMAN S.H., HANSON R.W., WAGNER T.E., WIEGHART M., 1989. Targeting enhanced production characteristics in transgenic swine. Second symposium the genetic engineering of animals, Cornell University USA 25-28 juin 1989.
- POLDGE E.J.C. et al., 1989. In *Biotechnology of growth regulation*. Édité par R.B. Heap (Butterworth, Londres) (sous presse).
- PURSEL V.G., PINKERT C.A., MILLER K.F., BOLT D.J., CAMPBELL R.G., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., HAMMER R.E., 1989. Genetic engineering of livestock. *Science* 244, 1281-1288.
- QUAIFE C.J., MATHEWS L.S., PINKERT C.A., HAMMER R.E., BRINSTER R.L., PALMITER R.D., 1989. Histopathology associated with elevated levels of growth hormone and insulin like growth factor I in transgenic mice. *Endocrinology* 124, 40-48.
- REXROAD C.E., 1989. Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes in ruminants. Second symposium on the genetic engineering of animals, Cornell University USA 25-28 juin 1989.
- SELDEN R.F., YUN J.S., MOORE D.D., ROWE M.E., MALIA M.A., WAGNER T.E., GOODMAN H.M., 1989. Glucocorticoid regulation of human growth hormone expression in transgenic mice and transiently transfected cells. *J. Endocrin.* 122, 49-60.
- SHEA B.T., HAMMER R.E., BRINSTER R.L., 1987. Growth allometry of the organs in giant transgenic mice. *Endocrinology* 121, 1924-1930.
- WELSH M., HAMMER R.E., BRINSTER R.L., STEINER D.F., 1986. Stimulation of growth hormone synthesis by glucose in islets of Langerhans isolated from transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 261, 12915-12917.
- WILKIE T.M., BRINSTER R.L., PALMITER R.D., 1986. Germiline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Develop. Biol.* 118, 9-18.
- WIZE P.D., MICHALSKA A.E., ASHMAN R., LLOYD B., STONE B.A., QUINN P., WELLS J.R.E., SEAMARK R.F., 1988. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J. Cell. Sci.* 90, 295-300.
1987. Genetically engineered animals : regulation threaten big market. *Genetic Technology News*, Juin, pp. 6-7.
1989. Porcine somatotropin : less feed and leaner pork. *Genetic Technology News*, Août, pp. 8-11.

## Summary

### *Genetic engineering : How to improve growth*

Recent development in molecular biology makes the isolation of virtually any gene possible. The isolated gene can be mutated, *in vitro*, to modify its genetic message or its regulatory elements. It can then be reintroduced into cells or into the whole organism (transgenesis) and a physiological function can thus potentially be modified. These possibilities have been and still are being applied to animal growth. Genes coding for GRF (Growth Releasing Factor), GH (Growth Hormone), and IGF1 (Insulin-like Growth Factor) have been introduced into embryos of various animal species. These transgenes were expressed and this led to an acceleration of growth and to an increase in animal size. This phenomenon was accompanied by significant

changes in the metabolism of the animals. The fact that the expression of the transgenes used could not be modulated led to an over secretion of GH, which is responsible for various physiological disorders, rendering most of the transgenic animals expressing a GH transgene of low interest for production. Although transgenesis has become a routine experiment in a certain number of laboratories, it remains relatively difficult on a large scale using most domestic animals. Further studies on the mechanisms which control transgene expression and on methods leading to transgenesis must be conducted before genetic engineering can really contribute to an improvement in animal breeding.

HOUDEBINE L.M., 1990. Les manipulations génétiques : comment améliorer la croissance. *INRA Prod. Anim.* 3 (3), 207-214.