

Les biotechnologies appliquées aux productions animales : situation actuelle et perspectives

Houdebine L.M.

in

Demarly Y. (ed.).
Place et rôle des biotechnologies dans les systèmes de recherche agronomique des pays méditerranéens

Zaragoza : CIHEAM

Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 14

1991

pages 41-50

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=92605112>

To cite this article / Pour citer cet article

Houdebine L.M. **Les biotechnologies appliquées aux productions animales : situation actuelle et perspectives.** In : Demarly Y. (ed.). *Place et rôle des biotechnologies dans les systèmes de recherche agronomique des pays méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, 1991. p. 41-50 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 14)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Les biotechnologies appliquées aux productions animales : situation actuelle et perspectives

L.M. HOUDEBINE

Unité de Différenciation Cellulaire
Institut National de la Recherche Agronomique
78352 JOUY-EN-JOSAS CEDEX
FRANCE

RESUME - Un certain nombre de techniques nouvelles permettant d'isoler n'importe quel gène, de le muter et de le réintroduire dans une cellule ou un animal entier, sont venues bouleverser la recherche dans le domaine des productions animales. Des sondes d'ADN ainsi que des anticorps monoclonaux sont disponibles et leur nombre va aller en croissant rapidement. Ces sondes permettent des diagnostics divers : détermination du sexe des embryons, polymorphisme des gènes, sensibilité aux maladies, présence d'agents pathogènes, etc... De nouveaux schémas de sélection vont apparaître lorsqu'un nombre suffisant de ces sondes sera utilisé à grande échelle. Des protéines recombinantes fabriquées par des microorganismes sont disponibles. Ainsi, la GH est utilisable pour augmenter la croissance ou la production laitière. Des stratégies nouvelles de vaccination sont à l'étude : production d'antigènes recombinants, production de peptides antigènes synthétiques, utilisation de nouveaux vecteurs plus efficaces et plus sûrs. Des animaux domestiques transgéniques ont été obtenus par différents groupes. Cette approche bien qu'encore malaisée reste très prometteuse. Des animaux transgéniques produisant des protéines de haute valeur d'intérêt clinique ou vétérinaire existent et leur nombre va aller croissant dans la décennie qui commence. Il sera beaucoup plus difficile de produire des lignées ayant acquis une résistance nouvelle à une maladie ou ayant des caractéristiques génétiques supérieures par le transfert de gènes étrangers. Il est peu probable que de tels animaux arrivent de manière massive dans les fermes avant le siècle prochain. Diverses techniques liées à la reproduction des animaux : maturation des ovocytes *in vitro*, fécondation *in vitro*, clonage des embryons, ont été maîtrisées chez plusieurs espèces domestiques. Les rendements sont encore relativement faibles mais il fait peu de doute que de gros progrès seront faits dans ce domaine dans les dix ans qui viennent.

Mots-clés : Biotechnologies animales - Sondes moléculaires - Vaccins - Anticorps monoclonaux - Transfert de gènes - Clonage - Manipulation d'embryons - Protéines recombinantes - ARN antisens.

SUMMARY - "Biotechnology applied to animal productions: present status and prospects". A certain number of new techniques to isolate genes, to mutate them and to reintroduce them into cells or whole animals have profoundly modified research in the field of animal production. DNA and monoclonal antibodies probes are available and their numbers are going to increase rapidly. These probes can be used for various diagnosis: sex determination of embryos, gene polymorphism, sensitivity to diseases, presence of pathogens, etc... New selection procedures will appear when a sufficient number of these probes are used at a large scale. Recombinant proteins synthesized by microorganisms are available. For example, GH can be used to enhance growth and milk production. New strategies for vaccination are under study: production of recombinant antigens, production of synthetic antigen peptides, utilization of new more efficient and safer vectors. Domestic transgenic animals are being obtained by different laboratories. This approach although still uneasy, remains very promising. There exist transgenic animals producing proteins of high value and of clinical and veterinary interest and their number will increase rapidly during the next decade. It will remain more difficult to produce lines of animals having new resistance to diseases or exhibiting better genetic traits through foreign gene transfer. It is very unlikely that such animals will appear massively in farms before the end of this century. Various techniques related to animal reproduction: *in vitro* maturation of oocytes, *in vitro* fertilization, cloning of embryos are working in several animal species. The yields are still relatively low but there is little doubt that very significant progress will be done in this field during the next ten years.

Key words : Animal biotechnologies - Molecular probes - Vaccines - Monoclonal antibodies - Gene transfer - Cloning - Embryo manipulation - Recombinant proteins - Antisense RNA.

Introduction

Les productions animales qui occupent une part essentielle de la nourriture humaine ont eu un gain de productivité considérable depuis une trentaine d'années. Ces succès tiennent de toute évidence à deux

facteurs essentiels : 1.°) une meilleure application sur le terrain des meilleures techniques traditionnelles (alimentation, hygiène,...), 2.°) l'introduction de nouvelles techniques issues directement de la recherche (sélection génétique, contrôle de la reproduction, vaccins, alimentation...). Les progrès considérables qui ont été accomplis dans la connaissance et la maîtrise du

vivant depuis dix ans ont ouvert des perspectives sans précédent qui vont apporter de nouveaux bouleversements profonds dans les techniques de production et dans la consommation des matières animales. Ces nouveaux domaines de la recherche que l'on regroupe le plus souvent sous le nom de biotechnologies comprennent non seulement l'étude et l'utilisation des gènes, mais en réalité tout aussi bien la chimie des protéines, la manipulation des embryons, l'étude des fonctions biologiques et la physiologie cellulaire. L'acquisition des connaissances dans tous ces domaines qui sont de toute évidence complémentaires est en effet très importante. Aussi puissantes que soient les techniques modernes de la génétique moléculaire et du génie génétique, elles ne sauraient suffire à répondre aux nombreux problèmes que pose l'élevage moderne. Les techniques faisant appel à l'étude de molécules sont en effet par essence simplificatrices et leurs limites sont contenues dans leur succès même. Aussi n'est-il pas surprenant de voir la recherche avancer sur plusieurs fronts à la fois même si la génétique moléculaire joue à l'heure actuelle un rôle moteur essentiel et irremplaçable.

Parmi les avancées récentes ou prévisibles, on peut mentionner : l'utilisation de sondes moléculaires (ADN, anticorps monoclonaux), la préparation de protéines à usage vétérinaire, la définition de nouveaux vaccins et de nouveaux modes de protection des animaux contre les maladies, le clonage des animaux domestiques, le transfert de gènes dans le but d'obtenir des animaux transgéniques. Le présent article se propose de faire le point sur les recherches actuelles dans les domaines des biotechnologies animales.

L'utilisation de sondes moléculaires

La sélection génétique repose sur le repérage d'un caractère nouveau chez les individus d'un troupeau puis la transmission par les techniques classiques de la reproduction à leur descendance. Toute l'efficacité de cette approche tient dans la perception que l'on peut avoir des caractères génétiques étudiés. Les caractères morphologiques et les performances des animaux constituent, entre autres, des éléments dont l'efficacité n'est plus à démontrer. Une appréciation beaucoup plus fine peut être donnée lorsqu'il est possible de caractériser et de comparer les protéines codées par 2 allèles donnés à l'aide de techniques biochimiques. Cette appréciation a toutes chances d'être encore plus précise si les examens ont lieu au niveau du génome lui-même. Différents systèmes de sondes d'ADN permettent de déceler aisément la présence d'un gène dans une cellule et de mettre en évidence des mutations même limitées à un seul nucléotide. Citons parmi ces techniques les sondes RFLP (restriction fragment length polymorphism) et les sondes ASO (allele specific oligonucleotides) (1). Ces sondes correspondent en

général à des gènes dont la séquence est connue et elles s'adressent le plus souvent à la région codante de ces gènes. Les sondes de type RFLP ne sont utilisables que dans la mesure où une mutation est repérable par un enzyme de restriction. Par ailleurs, la variabilité des formes produites par coupure enzymatique est faible. Ces restrictions limitent à certains cas particuliers l'utilisation des RFLP dans la sélection génétique. Des régions du génome (ADN minisatellite) qui sont abondantes, très peu conservées et varient d'un individu à l'autre, peuvent être repérées à l'aide de sondes quasi universelles (2). On admet généralement que ces régions du génome ne sont pas fonctionnelles au sens strict dans la mesure où elles ne paraissent pas avoir de lien direct avec l'expression génétique. Ces sondes ne sont donc pas a priori en relation avec un caractère génétique donné. Elles peuvent par contre permettre de suivre avec une grande précision la filiation entre individus étant donné leur hypervariabilité et également le fait qu'elles repèrent simultanément environ 20 loci dans chaque génome. Toutes ces sondes nucléiques ont de plus l'avantage d'être très précises et de pouvoir être utilisées très tôt dans le cycle de reproduction d'un animal. Il est en effet devenu possible de repérer tel ou tel allèle à partir de la semence d'un mâle, donc bien avant que le caractère génétique correspondant ait dû s'exprimer chez ce géniteur ou chez ses descendants. Elles permettent donc potentiellement de gagner en précision et en temps dans le processus de sélection (3).

Les sondes d'ADN en raison de leur grande précision permettent également de révéler l'existence de gènes mutés qui rendent les animaux vulnérables vis-à-vis de certaines maladies. En raison de leur spécificité et de leur sensibilité particulièrement élevées, ces sondes constituent par ailleurs un moyen très fiable de détecter la présence d'agents pathogènes dans un milieu donné (4).

Les sondes ADN spécifiques du chromosome Y de bovin

La connaissance du sexe d'un embryon avant son transfert est souhaitée depuis longtemps par les éleveurs. La recherche de protéines de surface spécifiques des cellules de l'embryon mâle s'étant révélée infructueuse, c'est à l'ADN du chromosome Y que les chercheurs se sont plutôt adressés. Plusieurs groupes ont aussi pu identifier des séquences d'ADN spécifiques du chromosome Y à l'aide de clonage différentiel (5). Ces séquences sont répétées, variables et ne semblent pas appartenir aux régions de l'ADN impliquées dans l'expression génétique. Dans la pratique, il est souhaitable de déterminer le sexe d'un embryon en quelques heures par des techniques simples et utilisables par des laboratoires non hautement spécialisés et ce, sans nuire à la viabilité de cet embryon. La technique de PCR (polymerase chain

reaction) permet en quatre heures de connaître le sexe d'un embryon de bovin en n'ayant prélevé pas plus de cinq à dix cellules de cet embryon.

La sonde déterminée par un groupe français et un groupe américain paraît n'être utilisable que chez les bovins. A l'inverse, la sonde obtenue par un groupe australien paraît reconnaître les embryons mâles de plusieurs ruminants. Il est bien évident que ce procédé peut être étendu à n'importe quelle espèce d'élevage et une séquence spécifique du chromosome Y de porc récemment identifiée pourrait ainsi être utilisée pour le sexage (6).

Les gènes des protéines du lait

Le lait, en raison de son importance pour la nutrition humaine, est l'objet d'un nombre important d'investigations, notamment dans le domaine de la génétique. Les principales protéines du lait des ruminants, caséine- α 1, - α 2, - β , β -lactoglobuline, α -lactalbumine, sont connues depuis longtemps et l'on sait que chacune de ces protéines existe sous la forme de variants. Ce polymorphisme a été inventorié en détail pour un certain nombre de races (7). Les études du polymorphisme des protéines du lait ont reposé jusqu'à toutes ces dernières années sur la mise en évidence des variants par électrophorèse. Cette méthode a permis, entre autres, de démontrer que les variants caséine-KB et caséine- β B conféraient au lait une meilleure aptitude fromagère. De même, le variant β -lactoglobuline B est moins abondant que le variant A et un lait qui ne contient que le variant B est un peu plus riche en caséines. L'identification de ces variants dans le lait permet une sélection des animaux laitiers. Cette méthode comporte toutefois des limites bien connues. L'électrophorèse ne révèle qu'une partie des mutations qui se produisent dans les gènes des protéines du lait. Cette détermination est par ailleurs très lente dans la mesure où il faut attendre d'avoir du lait pour évaluer les performances d'un animal. L'identification des gènes des protéines du lait et l'obtention de sondes ADN correspondantes apportent un avantage décisif dans ce domaine. Ainsi, deux allèles de la caséine-K bovine ont pu être identifiés par la technique de RFLP (8).

Les séquences virales des génomes de poulet

Le génome des oiseaux contient de nombreuses séquences virales qui sont très vraisemblablement des reliquats d'infections virales qui ont spontanément cessé à la suite de mutations. Si la présence de ces séquences ne rend plus les animaux viréniques, elle peut ne pas être sans conséquence sur le

développement des animaux. Les séquences d'ADN viral elles-mêmes ou les protéines dont elles dérivent peuvent en effet perturber l'expression génétique ou fragiliser les animaux vis-à-vis de certaines maladies. Le repérage des séquences virales, à l'aide de sondes ADN spécifiques, est susceptible de permettre une sélection des oiseaux jusqu'alors impensable.

Les gènes de résistance aux maladies

A l'intérieur d'une population d'animaux, un certain nombre apparaît spontanément résistant à telle ou telle maladie. Dans un certain nombre de cas, des corrélations ont pu être établies entre la présence d'un allèle particulier d'un gène donné et la résistance d'un animal à une maladie. Il existe parfois une relation fonctionnelle directe entre la présence du gène et la susceptibilité de l'animal vis-à-vis d'une maladie. Ainsi seuls les porcs qui ont l'antigène de surface K88 sont sensibles aux colibacilles entérotoxigènes. Dans ce cas, l'antigène K88 est directement responsable de l'attachement des agents pathogènes aux cellules de l'animal. Dans une autre situation qui est celle de la maladie de Marek chez le poulet, il est admis que les animaux qui ont l'haplotype B21 et qui sont homozygotes B21/B21 présentent une résistance contre la maladie. Le mécanisme de cette résistance au niveau cellulaire et moléculaire est inconnu. Lorsque les gènes de résistance auront tous été identifiés, clonés et que leur rôle aura été bien décrypté, il sera possible d'envisager de transférer ces gènes par transgénèse et de conférer directement ainsi la résistance à diverses races de poulets. En attendant, les sondes ADN correspondant aux gènes déjà identifiés peuvent contribuer à sélectionner les animaux présentant une résistance aux maladies (9).

Ces quelques exemples démontrent la puissance de l'impact des sondes ADN dans les processus de sélection génétique. Il est clair que le nombre de sondes utilisables va aller en croissant rapidement au fur et à mesure que les génomes des animaux domestiques deviendront mieux connus. Une gestion nouvelle des animaux basée sur l'utilisation des sondes ADN est donc en train de naître.

Le diagnostic de gestation

Il est souhaitable de savoir très rapidement si un animal domestique est gestant ou non. De cette information découle en effet un choix dans le traitement à faire subir à l'animal ultérieurement. Une famille de protéines a récemment été identifiée dans le sang des vaches gestantes. Ces protéines sont décelables dès le premier mois de la gestation par un test ELISA (10). Ce test paraît applicable à d'autres ruminants.

La production de protéines à usage vétérinaire

L'utilisation de molécules ayant une activité biologique comme des hormones excluait presque totalement les protéines jusqu'au développement récent du génie génétique. Les protéines sont en effet difficiles à préparer massivement par synthèse chimique dès lors qu'elles dépassent 40 acides aminés. Par ailleurs, un grand nombre de ces protéines restaient et restent encore inconnues. L'accès beaucoup plus aisé à leurs gènes a complètement bouleversé la situation, y compris en ce qui concerne leur identification. Des protéines recombinantes sont désormais préparées en masse, ou en passe de l'être, à partir de bactéries, de levures, de champignons, de cellules de plantes, de cellules d'insectes, de cellules de vertébrés supérieurs et même du lait ou du sang de mammifères transgéniques. Un des exemples les plus éclatants est certainement celui de l'hormone de croissance (GH). Depuis plus de trente ans, il est admis que cette hormone stimule de 10 à 25% la production laitière des ruminants. Des études approfondies n'ont pu voir le jour qu'à partir du moment où l'hormone a été fabriquée par des bactéries ayant reçu le gène de l'hormone. Simultanément, la synthèse peptidique par voie chimique ayant fait des progrès substantiels, le GRF qui a pour fonction de stimuler la sécrétion de GH, s'est avéré aussi actif que la GH et peut être moins onéreux. Ces études démontrent clairement que des injections de GH sont effectivement praticables sans effets néfastes, contrairement à ce que certains groupes influents voudraient faire croire (11). Tout au plus observe-t-on un accroissement d'IGF1 dans le lait des animaux traités dont l'effet n'a peut-être pas encore été totalement évalué. L'utilisation autre qu'expérimentale de la GH pour stimuler la lactation n'a pas encore été autorisée pour des raisons d'ordre socio-économique plutôt que scientifique. L'augmentation de production de lait par animal par la GH n'aurait évidemment pas pour conséquence de produire plus de lait, mais d'en réduire le coût de production. Cette pratique aurait des répercussions non négligeables dans la manière d'élever les animaux laitiers.

Il convient également de mentionner que des injections de GH augmentent légèrement la croissance des porcelets. De manière peut-être plus intéressante, ce traitement conduit à la diminution des dépôts lipidiques et à une hypercroissance des tissus musculaires (12). Cette même hormone augmente également la croissance de poissons comme la truite d'élevage et le saumon (13). Le fait de pouvoir disposer en abondance et presque simultanément de GRF, de GH et d'IGF1 a par ailleurs très fortement stimulé la recherche sur la croissance.

D'autres molécules protéiques à usage vétérinaire commencent à être produites. Parmi ces molécules se trouvent les interférons α , β et γ ainsi que certaines interleukines comme l'Il2. Les études en cours ne permettent pas encore de conclure si ces molécules confèrent aux animaux une résistance vis-à-vis de certaines maladies sans effets secondaires indésirables.

A cette liste, il convient d'ajouter les vaccins synthétiques (voir plus loin), la FSH et la rennine. Il fait peu de doute que le nombre de molécules qui vont être étudiées et très vraisemblablement utilisées va aller croissant dans les années à venir.

Les nouvelles stratégies pour la vaccination

Pour être acceptable, un vaccin animal doit évidemment être efficace, mais aussi être d'un coût réduit et satisfaisant aux réglementations de sécurité. Traditionnellement, des virus mutants ne se propageant pas ou des virus totalement inactivés sont la source essentielle d'antigènes vaccinaux. Les techniques de génie génétique permettent de repenser ces problèmes de diverses autres manières (14).

1) Les peptides synthétiques

Un anticorps reconnaît une courte séquence peptidique spécifique de chaque molécule d'antigène. Un peptide synthétique peut donc théoriquement servir d'agent vaccinant s'il génère la formation d'anticorps neutralisants. Ainsi, 2 peptides protecteurs ont pu être définis pour neutraliser la fièvre aphteuse. Dans la pratique, un peptide peut s'avérer très peu immunogène, étant trop court, non glycosylé et présenté de manière non conforme aux cellules du système immunitaire.

2) Les antigènes recombinants

Une protéine virale entière préparée à partir de bactéries ayant reçu le gène correspondant peut être utilisée comme agent immunisant. Les limitations mentionnées pour les peptides synthétiques se retrouvent pour les antigènes recombinants.

3) Les anticorps anti-idiotypes

Un anticorps est lui-même un antigène pour une espèce animale dont il n'est pas issu. Un anticorps a une structure complémentaire de l'antigène. Un anticorps dirigé contre un anticorps peut avoir pour cette raison une structure ressemblant à l'antigène de départ. Ces

anticorps, dits anti-idiotypes, peuvent servir comme agents vaccinaux en remplacement de l'antigène initial. Cette approche n'a pas encore reçu d'application significative dans le domaine animal. Elle peut être précieuse dans le cas où l'antigène de départ n'a pas une structure protéique. Il est intéressant de noter toutefois que dans le domaine de l'endocrinologie, des anticorps anti-idiotypes dirigés contre des anticorps anti-GH miment l'action de l'hormone. L'animal ainsi immunisé se trouve stimulé de manière durable en absence de l'hormone et cet effet peut aller jusqu'à une augmentation de la croissance chez le rat (15).

4) Les vecteurs

L'introduction des antigènes vaccinaux s'avère être dans certains cas très efficace lorsque l'information génétique est apportée sous forme d'ADN par un vecteur viral non invasif. Les gènes codant pour les antigènes sont alors insérés dans le génome du vecteur viral. Divers vecteurs sont étudiés : adénovirus, herpès, papillome, vaccinia. Ce dernier s'est avéré particulièrement efficace pour lutter contre la rage chez les animaux sauvages comme les renards (16). Un même vecteur peut véhiculer plusieurs gènes étrangers et être ainsi utilisé pour induire simultanément plusieurs vaccinations.

5) Les souches atténuées par génie génétique

Les souches atténuées de virus utilisés traditionnellement comme agents vaccinaux sont des mutants naturels qui sont par essence plus ou moins satisfaisants. Une attitude plus rationnelle consiste à muter *in vitro* certaines régions des génomes viraux. Les multiples essais qui peuvent être faits ont toutes les chances de pouvoir conduire à la génération de virus atténués sûrs et ayant gardé leur pouvoir vaccinant. Ainsi, le virus de la maladie d'Aujeszky présente ces caractéristiques intéressantes dès lors que son gène thymidine kinase est délété.

6) Les vaccinations génétiques

Un moyen d'enrayer le cycle d'infection par un virus peut consister à interférer avec les mécanismes cellulaires et moléculaires qui interviennent dans le processus d'infection et de multiplication du virus. Il est ainsi concevable de neutraliser ou de détruire spécifiquement les ARN viraux en faisant exprimer dans la cellule des ARN antisens ou ribozymes (17, 18). Dans le cas des rétrovirus, l'expression en excès de la protéine de l'enveloppe virale conduit à une saturation du récepteur cellulaire du virus et partant à une impossibilité pour le virus de se lier à sa cellule cible et d'y pénétrer. Une lignée de poulet se trouve ainsi

protégée contre la leucose aviaire (19). Dans le cas d'autres types de virus, notamment des virus à ARN, l'expression en excès d'une des protéines virales conduit à la génération de particules virales mal formées et dépourvues de leur acide nucléique. Il est également imaginable de faire exprimer en excès une séquence d'ARN ayant une fonction régulatrice pour le virus (pour l'ARN polymérase par exemple). L'enzyme peut alors se fixer sur ce leurre présent en excès et ainsi ne plus pouvoir assurer son rôle dans la réplication du virus.

Une méthode générale pour conférer une résistance à une maladie ne faisant pas intervenir le système immunologique actif de l'animal peut consister à faire s'exprimer de manière constitutive et par n'importe quelles cellules de cet animal un anticorps monoclonal recombinant. Cet anticorps recombinant devrait dans l'idéal comprendre 1°) une région hypervariable spécifique de l'antigène et provenant d'un hybridome sélectionné, 2°) d'une région constante appartenant à l'espèce que l'on veut protéger.

D'autres approches théoriquement possibles consistent à provoquer une stimulation du système immunologique de défense en injectant par exemple des interleukines aux animaux.

Ces stratégies n'ont encore été couronnées que de succès de laboratoire relativement peu nombreux. Il est évident que beaucoup d'expérimentations seront encore nécessaires pour que de vrais succès voient le jour et que des approches expérimentales, efficaces et généralisables finissent par émerger.

La manipulation des embryons

1) Fécondation *in vitro*

La disponibilité d'embryons d'animaux domestiques en grand nombre est depuis longtemps une nécessité pour des études fondamentales. Les nouvelles techniques de transgénèse et de clonage des embryons n'ont fait qu'augmenter cette demande. Les embryons produits *in vivo* après superovulation et fécondation peuvent être obtenus en relative abondance, mais ce matériel biologique est hétérogène. Cette hétérogénéité résulte du fait que les moments précis où ont lieu l'ovulation et la fécondation ne peuvent être maîtrisés *in vivo*. La maturation des ovocytes et la fécondation *in vitro* devraient pouvoir conduire à l'obtention d'embryons ayant atteint un degré de développement connu. Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années chez les ruminants. Il est maintenant possible de réaliser *in vitro* l'ensemble des étapes : maturation des ovocytes, capacitation du sperme, fécondation, développement des embryons jusqu'au stade de morula. Des ovaires récoltés dans les abattoirs

sur des animaux non préparés à cet effet peuvent dans ces conditions être la source d'un grand nombre d'ovocytes. Bien que l'ensemble de ces étapes puisse être réalisé en totalité *in vitro*, les rendements restent encore relativement faibles si l'on considère le nombre d'embryons qui se développent jusqu'à terme après avoir été transférés. Une amélioration de ces techniques est donc encore nécessaire pour que des embryons précoces soient disponibles en nombre suffisant (20).

2) Le clonage des embryons

L'acquisition des connaissances fondamentales et la maîtrise des techniques de la reproduction ont permis de faire des progrès considérables dans l'élevage des animaux domestiques. Citons parmi les techniques désormais pratiquées en routine, l'insémination artificielle, la synchronisation des chaleurs et l'induction des mises bas, le transfert des embryons, la congélation du sperme et des embryons, l'obtention de vrais jumeaux par clivage des embryons précoces. Une technique extrêmement prometteuse qui est actuellement en pleine expansion est le clonage des embryons. Cette approche a l'avantage théorique de reproduire un individu très rapidement et en nombre illimité et, donc, de s'affranchir en partie des lenteurs jusqu'à maintenant incompressibles du cycle de reproduction. En pratique, elle consiste à introduire le noyau d'une cellule d'un embryon précoce dans un ovocyte préalablement énucléé. L'énucléation se fait par micromanipulation tandis que l'introduction du noyau étranger est obtenue par une fusion de la cellule embryonnaire avec l'ovocyte. Cette opération doit être suivie d'une activation qui mime l'effet du spermatozoïde et qui permet au nouvel embryon de commencer son développement. Le clonage des embryons réalisé avec succès depuis longtemps chez les vertébrés inférieurs n'a été couronné de succès chez les mammifères que récemment. On admet que la difficulté de la relative rapidité avec laquelle le génome des embryons reprend son activité chez les vertébrés supérieurs. Ceci conduit à une différenciation irréversible du noyau de l'embryon en cours de développement. Des veaux, des agneaux, des lapereaux et, plus récemment, des porcelets ont ainsi pu être obtenus (21,22). Cet ensemble de techniques, s'il est fondamentalement maîtrisé, est encore loin d'être satisfaisant étant donné son faible rendement. Une meilleure compréhension, entre autres, des événements qui conduisent à la reprogrammation du noyau du blastocyte par le cytoplasme de l'ovocyte permettra sans doute d'améliorer la situation actuelle. Malgré ses imperfections, cette méthode de clonage commence à se développer à relativement grande échelle chez les bovins. Son impact sur la sélection génétique devrait être considérable, et ce d'autant plus que les noyaux de blastocytes congelés paraissent aptes à redonner des

individus adultes après transfert dans le cytoplasme d'un ovocyte frais. Encore faut-il ne pas omettre de prendre en compte le fait que les caractéristiques génétiques individuelles de l'embryon cloné sont inévitablement inconnues au moment où le clonage a lieu. La mise en réserve de blastocytes par congélation permet d'évaluer les caractéristiques génétiques de quelques individus adultes clonés issus du même embryon et ainsi de n'utiliser finalement que les noyaux des blastocytes que l'on sait pouvoir générer des animaux intéressants.

La transgénèse chez les animaux

Il y a bientôt 10 ans, la preuve a été donnée qu'il était possible d'introduire un gène isolé recombinant ou non dans un embryon, de faire en sorte que le gène étranger soit exprimé chez l'animal adulte et qu'il soit transmis à sa descendance. Cette opération, appelée transgénèse, qui a immédiatement soulevé de très nombreux espoirs, a maintenant été réalisée chez toutes les catégories d'animaux : insectes, poissons, poulets, petits et gros mammifères.

1) Les méthodes de la transgénèse

La microinjection directe du gène en solution dans un des pronuclei de l'embryon au premier stade de son développement a été la première méthode utilisée avec succès. Elle reste la seule pratiquée à grande échelle. Cette méthode est néanmoins pénible puisqu'elle suppose que les embryons aient été isolés, microinjectés, puis réintroduits dans une mère adoptive. Elle reste également relativement peu efficace puisqu'environ 10% seulement des embryons de mammifères manipulés deviennent des adultes transgéniques (23). Cette méthode est donc d'un coût très élevé pour les gros mammifères. Des injections de gènes dans le cytoplasme des embryons se sont par contre avérées très efficaces pour les vertébrés inférieurs et certains invertébrés (24).

L'utilisation de rétrovirus jouant le rôle de vecteur a été proposée comme alternative indispensable pour des espèces comme les oiseaux chez lesquels la manipulation des embryons précoces n'est pas assez maîtrisée pour que puissent être envisagées des microinjections directes du gène (25). Une technique permettant le développement des embryons de poulet *in vitro* a toutefois ouvert des perspectives prometteuses (26).

Une autre méthode qui a été couronnée de succès chez la souris consiste à utiliser des cellules souches embryonnaires (cellules ES) qui peuvent être cultivées dans des conditions où elles ne se différencient pas et où elles gardent leur totipotence. Ces cellules peuvent *in vitro* recevoir un gène étranger, être sélectionnées,

puis réintroduites au milieu des cellules d'un embryon en cours de développement. Cette méthode conduit à la génération de chimères dans la mesure où une partie seulement des cellules de l'adulte (y compris de ses cellules germinales) ont le gène étranger. Les animaux transgéniques de la génération suivante sont homogènes de ce point de vue et toutes leurs cellules ont le gène (27). Cette technique est applicable en théorie aux gros animaux domestiques et des expériences ont montré qu'elle était réellement envisageable (28). L'utilisation des cellules ES paraît actuellement la seule qui puisse permettre de substituer un gène très précisément par un homologue muté plutôt que de surajouter un gène étranger au génome de l'hôte (29). Chez les oiseaux, des chimères réalisées à partir de cellules d'oeufs pondus permettent d'envisager des choses semblables (30).

L'introduction directe du gène dans les spermatozoïdes avant la fécondation a été proposée mais n'a pu être obtenue que par un seul groupe (31). Cette méthode n'est probablement pas praticable telle qu'elle a été décrite. Des modifications sont tentées un peu partout dans le monde pour essayer de s'affranchir de la technique de microinjection.

2) La transgénèse pour des études fondamentales

Les véritables succès de la transgénèse chez les animaux ont été obtenus pour des études à caractère fondamental. La transgénèse est en effet devenue un moyen indispensable pour l'étude du mécanisme de contrôle de l'expression des gènes. Les transgènes s'insèrent dans le génome de l'hôte en nombre incontrôlé et à des sites imprévisibles. L'expression des transgènes est de ce fait en partie imprévisible. L'établissement de plusieurs lignées d'animaux pour le même transgène permet le plus souvent de répondre aux questions posées.

3) La création de lignées pour des études médicales et vétérinaires

Un transgène peut conduire à la génération d'animaux ayant acquis des propriétés biologiques nouvelles parfois imprévues. Ces animaux constituent des modèles d'étude extrêmement précieux. Un des cas les plus célèbres est celui des souris transgéniques qui expriment l'oncogène *myc* spécifiquement dans leur glande mammaire et qui, de ce fait, développent des tumeurs mammaires avec une fréquence très élevée (32).

4) La production de protéines de haute valeur

Les bactéries, les levures, les cellules d'insectes (infectées par le baculovirus) et les cellules animales en culture sont capables de synthétiser des quantités substantielles de protéines recombinantes. Cependant, les bactéries sont incapables d'ajouter aux chaînes polypeptidiques des éléments parfois indispensables aux protéines pour qu'elles soient actives ou stables (phosphore, sucres ...). Les cellules de mammifères peuvent faire ces modifications. Les cellules en culture sont d'un prix de revient élevé et leur production reste limitée. La production de protéines dans le lait (33) ou le sang d'animaux transgéniques (Massoud et al., résultats non publiés) est en train de devenir une réalité et 35 protéines sont actuellement de bons candidats pour être produites dans le lait.

5) La protection des animaux contre les maladies

Plusieurs méthodes de protection des animaux contre les maladies (voir plus haut) sont, théoriquement au moins, applicables par le moyen de la transgénèse. Il est en effet en principe possible de protéger des animaux de manière définitive puisqu'héréditaire en leur transférant des gènes qui confèrent d'une manière ou d'une autre une résistance vis-à-vis d'une maladie (gènes viraux, gènes d'immunoglobulines, gènes d'interleukine, gènes de résistance spécifiques, etc...).

6) Le changement de la physiologie des animaux

Changer la physiologie des animaux par la transgénèse s'est rapidement avérée possible. Des souris géantes exprimant le gène de l'hormone de croissance sont en effet parmi les premiers animaux transgéniques qui ont été obtenus. Il est rapidement apparu que ces résultats n'étaient pas transposables facilement aux espèces domestiques qui n'ont eu qu'un accroissement modeste, voire nul dans des conditions semblables (23). Un autre fait est apparu beaucoup plus grave encore. Les animaux transgéniques exprimant un gène de GH étranger sont en effet le plus souvent en mauvaise santé. Cette situation est de toute évidence le résultat d'une surexpression des transgènes. Une expression contrôlée est donc nécessaire pour qu'un quelconque succès pratique soit possible dans ce domaine. Cet exemple est parfaitement représentatif des difficultés considérables auxquelles se heurtent les expérimentateurs pour tenter de modifier de manière utile la physiologie des animaux par la transgénèse. Dans tous les cas, les gènes à transférer devront être définis avec le plus grand soin et leur expression finement contrôlée pour qu'aucun effet secondaire

néfaste ne vienne annuler les bienfaits apportés par les transgènes.

De nombreuses études ont été entreprises dans ce sens. Des groupes australiens envisagent de transférer des gènes provenant de microorganismes et qui favorisent la synthèse de cystéine que l'on sait être un facteur limitant pour la croissance de la laine (34).

La transgénèse peut théoriquement permettre de changer la composition du lait. En cas de succès, l'impact de ces expériences serait évidemment considérable puisque l'on peut imaginer des laits appauvris en lactose, en β -lactoglobuline (qui gène la fabrication du fromage), ou en cholestérol ou, au contraire, des laits enrichis en caséines qui favorisent la préparation des fromages ou des laits contenant des facteurs favorables pour les nourrissons (IgA, transferrine,...).

Des études à plus long terme sont également en cours pour tenter d'identifier le gène *Boroola* de prolificité, le gène de nanisme de la poule, le gène de résistance à l'halothane, etc... pour les transférer ensuite dans des espèces animales autres que celles dont ils sont issus. En cas de succès, cette approche permettrait de réaliser ce que la sélection génétique classique ne peut évidemment pas faire.

Conclusions

Un bilan de 10 ans de biotechnologie dans le domaine animal indique que des investissements ont été relativement consentis dans la plupart des pays qui ont une tradition de recherche et même dans certains pays qui n'ont pas de telles traditions. Ceci a conduit à répandre, entre autres, les techniques de base de la manipulation des gènes. Force est de constater que les succès palpables sont encore relativement minces. Ceci tient aux difficultés rencontrées qui avaient peut-être été sous-estimées dans l'enthousiasme du début. Cette relative lenteur ne paraît en rien devoir justifier une remise en cause des objectifs.

Les succès les plus incontestables sont sans doute ceux qui font appel à des techniques d'observation plutôt qu'à celles qui impliquent une intervention directe sur les animaux. Ainsi, un certain nombre de sondes (ADN ou anticorps monoclonaux) permettent effectivement maintenant de procéder à des diagnostics fins et de réorienter certains schémas de sélection. Peu de vaccins de nouvelle génération ont encore vu le jour, mais rien n'indique que les approches retenues n'aboutiront pas.

Le clonage des animaux devrait connaître un développement rapide avant la fin du siècle et la répercussion sur l'élevage devrait être considérable.

La transgénèse destinée à produire des protéines d'intérêt clinique et vétérinaire devrait également connaître de beaux succès et se banaliser avant la fin de ce siècle. Il est difficile de prévoir l'amplitude du développement de cette technique de production des protéines rares. Le succès dépend en grande partie de nouvelles techniques qui pourraient apparaître et abaisser le coût de production des gros animaux transgéniques. Dans le meilleur des cas, un succès même franc ne devrait pas avoir de répercussion profonde au niveau des élevages car il est vraisemblable qu'un nombre relativement limité d'animaux sera concerné.

Il est difficile d'imaginer qu'une arrivée massive d'animaux transgéniques ayant des caractéristiques génétiques nouvelles intéressantes aura lieu avant la fin de ce siècle. Les succès de laboratoire sont encore rares et la diffusion des nouveaux gènes dans les troupeaux ne pourra se faire très rapidement, même si la technique de clonage venait accélérer le processus.

De nombreuses techniques sont disponibles et d'autres plus performantes vont les remplacer. Ceci ne doit pas occulter le fait que les progrès vont et sont déjà freinés par le manque de connaissances fondamentales sur un certain nombre de fonctions biologiques.

Des études à caractère fondamental ne doivent pas être reléguées au deuxième plan si l'on veut que la biotechnologie remporte tous les succès auxquels elle peut prétendre dans la décennie qui vient.

Références bibliographiques

1. CASKEY, C.T. (1987) : Disease diagnosis by recombinant DNA methods. *Science* 236, 1223-1228.
2. JEFFREY, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. (1985) : Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316, 76-79.
3. BECKMANN, J.S., SOLLER, M. (1987) : Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. *Biotechnology* 5, 573-576.
4. BARRY, T., POWELL, R., GANNON, F. (1990) : A general method to generate DNA probes for microorganisms. *Biotechnology* 8, 233-236.
5. LEONARD, M., KIRSZENBAUM, M., COTINOT, C., CHESNE, P., HEYMAN, Y., STINNAKRE, M.G., BISHOP, C., DELOUIS, C., VAIMAN, M., FELLOUS, M. (1987) : Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology* 27, 248.

6. McGRAN, R.A., JACOBSON, R.J., AKAMATSU, M. (1988) : A male-specific repeated DNA sequence in the domestic pig. *Nucleic Acids Res.* 16, 10389.
7. GROSCLAUDE, F. (1988) : Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. *INRA Prod. Anim.* 1, 5-17.
8. LEVEZIEL, H., METENIER, L., MAHE, M.F., CHOPLAIN, J., FURET, J.P., PABOEUF, G., MERCIER, J.C., GROSCLAUDE, F. (1988) : *Genet. Sel. Evol.* s20, 247-254.
9. CAUCHY, L., COUDERT, F., DAMBRINE, G., LANTIER, F., LEVY, D., MOLENAT, I., VUTTIEN, J. (1988) : Résistance aux maladies infectieuses. *Biofutur* (juin) 45-51.
10. CAMOUS, S., CHARPIGNY, G., GUILLMOT, M., MARTAL, J., SASSER, R.G. (1989) : Purification d'une protéine bovine spécifique de la gestation chez la vache par chromatographie liquide à haute performance. XXVI^e Réunion de la Société Française pour l'Etude de la Fertilité (sous presse).
11. SUN, M. (1989) : Market sows on milk hormone. *Science* 246, 876-877.
12. (1989) : Porcine somatotropin : less feed and leaner pork. *Genetic Technology News*, Août, pp. 8-11.
13. DONALDSON, E.M., FAGERLUND, U.H.M., HIGGS, D.A., McBRIDE, J.R. (1979) : *Hormonal enhancement of growth.* *Fish Physiology VIII*, 455-597.
14. AYNAUD, J.M., LAUDE, H. (1988) : Les vaccins vétérinaires. *Biofutur* (juin) 65-71.
15. DIXON, B. (1989) : Using antibodies to increase yields. *Biotechnology* 7, 1118.
16. TARTAGLIA, J., PAOLETTI, E. (1988) : Recombinant vaccina virus vaccines. *TIBTECJ* 6, 43-46.
17. JENNINGS, P.A., MOLLOY, P.L. (1987) : Inhibition of SV40 replicase function by engineered antisense RNA transcribed by RNA polymerase III. *EMBO J.* 6, 3043-3047.
18. SARVER, N., CANTIN, E.M., CHANG, P.S., ZAIA, J.A., LADNE, P.A., STEPHENS, D.A., ROSSI, J.J. (1990) : Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 247, 1222-1225.
19. CRITTENDEN, L.B., SALTER, D.W. (1986) : Gene insertion : current progress and long-term goals. *Avian Diseases* 10, 41-46.
20. CROZET, N. (1990) : Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. *J. Reprod. Fert.* (sous presse).
21. MARX, J.L. (1988) : Cloning sheep and cattle embryos. *Science* 239, 463-464.
22. PRATHER, R.S., SIMS, M.M., FIRST, N.L. (1989) : Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41, 414-418.
23. PURSEL, V.G., PINKERT, E.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.
24. CHOURROUT, D., GUYOMARD, R., HOUBEINE, L.M. (1990) : Techniques for the development of transgenic fish : a review. *UCLA Symposium on Transgenic Models in Medicine and Aquaculture* (sous presse).
25. 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) : Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science* 243, 533-535.
26. SANG, H., PERRY, M.M. (1989) : Episomal replication of cloned DNA injected into the fertilised ovum of the hen, *Gallus Domesticus*. *Mol. Reprod. Develop.* 1, 98-106.
27. ROBERTSON, E., BRADLEY, A., KUEHN, M., EVANS, M. (1986) : Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
28. EVANS, M.J., NOTARIANNI, E., GALLI, C., LAZZAR, G., MOOR, R.M. (1989) : Second Symposium on the Genetic Engineering of Animals, Cornell University USA.
29. MANSOUR, S.L., THOMAS, K.R., CAPECCHI, M.R. (1988) : Disruption of proto-oncogenic int-2 in mouse embryo-derived stem cells : a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
30. PETITTE, J.N., CLARK, M.E., LIU, G., GIBBINS, A.M., ETCHES, R.J. (1990) : Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108, 185-189.
31. BRINSTER, R.L., SANDGREN, E.P., BEHRINGER, R.R., PALMITER, R.D. (1989) : No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 239-241.
32. STEWART, T.A., PATTENGAL, P.K., LEDER, P. (1984) : Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV-myc fusion genes. *Cell* 38, 627-637.
33. CLARK, A.J., BESSOS, H., BISHOP, J.O., BROWN, P., HARRIS, S., LATHE, R., McCLENAGHAN, M., PROWSE, C., SIMONS, J.P., WHITELAW, C.B.A., WILMUT, I. (1989) : Expression of human anti-hemophylic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology* 7, 487-492.
34. ROGERS, G.E. (1990) : Improvement of wool production through genetic engineering. *TIBTECH* 8, 6-11.