

LE PORC TRANSGENIQUE

C. DELOUIS (1) Anne DESPREZ-OBLIN (1) R. L'HARIDON (2) P. ROMBAUTS (1).

Institut National de la Recherche Agronomique

(1) Station de Physiologie Animale, 78350, JOUY-EN-JOSAS.

(2) Station de Virologie, 78350, JOUY-EN-JOSAS.

INTRODUCTION

Au cours de ces dix dernières années, des progrès considérables ont été réalisés sur la connaissance des mécanismes qui contrôlent la différenciation de la cellule animale au niveau moléculaire. Grâce au développement rapide de nouvelles techniques de biologie moléculaire et, notamment, à la disponibilité en enzymes de restriction, la structure des gènes a été précisée et de nombreuses informations sur leur fonctionnement ont été rassemblées.

La possibilité d'introduire un élément génique fonctionnel dans le génome d'un animal, grâce à la maîtrise des techniques de production d'embryons de nombreuses espèces d'élevage, a ouvert des perspectives impressionnantes pour des progrès dans la compréhension du vivant par les physiologistes, les généticiens, les pathologistes et les cancérologues ainsi que pour la création de lignées animales originales pour les zoo-techniciens.

Le présent article se propose de faire le point sur les possibilités actuelles des méthodes de transfert de gènes dans les cellules et les embryons et sur certaines applications prévisibles de la production de porcs transgéniques.

1. LES CONNAISSANCES SUR LA STRUCTURE ET L'EXPRESSION DES GENES DES CELLULES EUCARYOTES PERMETTENT DE PRODUIRE DES ANIMAUX TRANSGENIQUES.

Les gènes des eucaryotes sont composés de deux parties (Figure 1). Une partie codante dont l'enchaînement de désoxyribonucléotides est copié sous forme de RNA messagers (transcription du DNA) de telle façon que la séquence dirige la construction de protéines selon un code génétique universel (traduction des RNA messagers). Cette partie codante des gènes comprend des séquences (introns) qui ne figurent plus dans les RNA messagers au moment de la traduction ; seuls des éléments spécifiques (exons) sont conservés pendant la maturation (Figure 1).

Une deuxième partie des gènes est constituée de régions spécialisées dans le contrôle de l'expression des séquences codantes qui leur sont associées. Certaines séquences sont toujours présentes (CAAT, ATA) et des séquences régulatrices très spécialisées assurent une transcription spécifique dans un tissu au cours du développement et un contrôle hormonal de l'expression des gènes (Figure 1). Les séquences régulatrices comprennent des éléments promoteurs et activateurs. La présence d'introns peut participer au contrôle transcriptionnel de l'expression d'un gène chez la souris (BRINSTER et al., 1988).

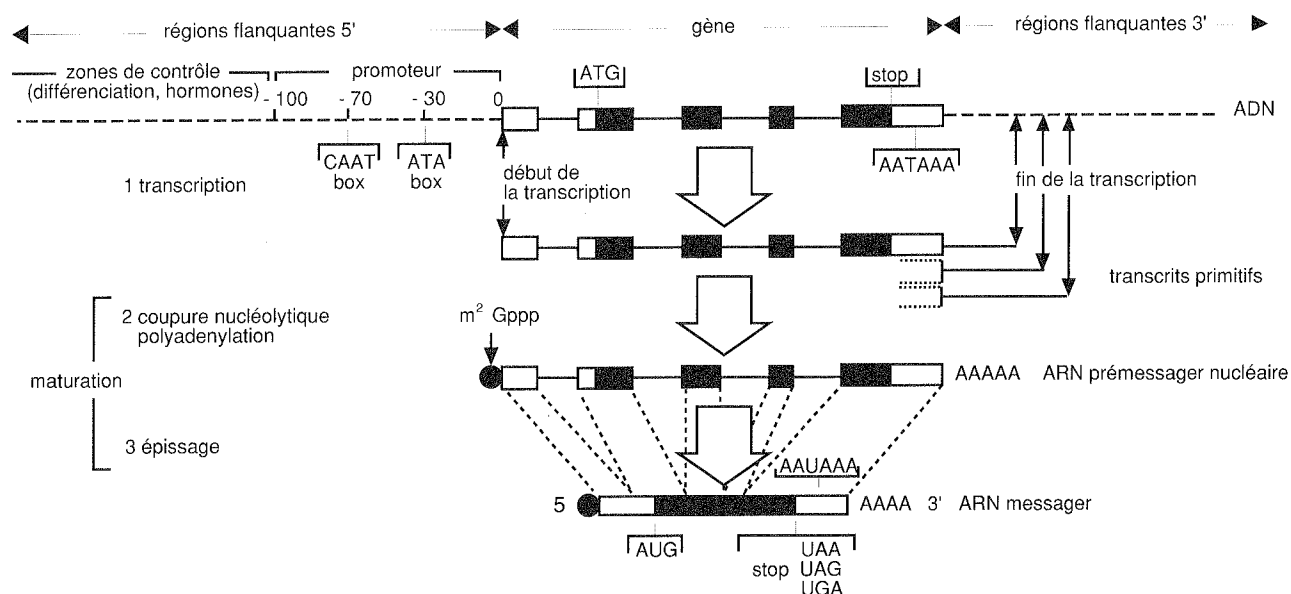
Ainsi, l'utilisation du génome est liée à la nature du message génomique et à la présence de facteurs cellulaires qui interviennent au niveau de séquences régulatrices. Celles-ci peuvent diriger l'expression de différentes séquences codantes qui leur sont associées (gènes hybrides) dans un même tissu et sous le même contrôle hormonal.

En utilisant la partie codante d'un gène précédée de séquences régulatrices, il doit être possible de faire transcrire et traduire ces constructions dans une cellule eucaryote. On sait, depuis longtemps, que des virus font exprimer leur génome par la cellule-hôte qu'ils infectent. C'est ainsi, qu'au cours de ces dernières années, il a été montré qu'un gène étranger (transgène) pouvait s'intégrer dans le génome d'une cellule animale (cellule transgénique), qu'il y était transcrit sous le contrôle spécifique de ses séquences régulatrices et qu'il y dirigeait la synthèse de la protéine pour laquelle il code (Tableau 1).

Dans un premier temps, l'expression du transgène était limitée à un type cellulaire en culture. Par la suite, on a établi un système plus complet dans lequel le transgène peut s'exprimer dans tous les types cellulaires des tissus animaux en l'introduisant dans l'oeuf d'un mammifère, la souris. La première souris transgénique est née en 1980. L'expression du transgène et sa transmission à la descendance ont été décrites au cours des deux années suivantes (Tableau 1).

Cette méthode d'étude dynamique de l'expression des gènes

FIGURE 1
REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE D'UN GÈNE EUCARYOTE.



Le schéma représente la structure d'un gène et sa transcription sous forme de RNA messagers. Les rectangles noirs correspondent aux exons.

TABLEAU 1
LES PRINCIPALES ÉTAPES DE LA PRODUCTION D'ANIMAUX TRANSGÉNIQUES.

1974-1976:	Introduction de matériel génétique dans les cellules animales par des virus (JAENISCH et MINTZ 1974 ; JAENISCH 1976).
1977:	Introduction de gènes dans les cellules animales et développement rapide de cette technique pour l'étude de l'expression des gènes clonés (BACHETTI et GRAHAM, 1977; WIGLER et al., 1977).
1980:	Introduction de DNA dans le génome de la souris (GORDON et al. 1980).
1981-1982:	Expression d'un transgène chez la souris (BRINSTER et al. 1981) et transmission de ce transgène à la descendance selon les lois de Mendel (GORDON et RUDDLE 1981 ; STEWART et al. 1982).
1983:	Transfert de gènes dans les cellules eucaryotes à l'aide de vecteurs rétroviraux (MANN et al. 1983 ; CONE et MULLIGAN, 1984; MILLER et al., 1985).
1983-1985:	Démonstration de la conservation des séquences régulatrices de l'expression des gènes au cours de l'évolution ; les gènes provenant de différentes espèces (le porc : FRELS et al. 1985) s'expriment normalement au cours du développement et de façon tissu-spécifique chez la souris. Application de la transfection des oeufs pour la production de mammifères transgéniques autres que la souris dont le porc (HAMMER et al. 1985 ; BREM et al., 1985).
1985-1986:	Infection d'embryons de souris à l'aide de rétrovirus (HUSZAR et al. 1985 ; van der PUTTEN et al. 1985 ; JAHNER et al. 1985 ; RUBENSTEIN et al. 1986). Création de lignées de souris transgéniques à l'aide de cellules totipotentes transfectées (LOVELL-BADGE et al. 1985) ou infectées par des rétrovirus recombinants défectifs (WAGNER et al. 1985 ; ROBERTSON et al. 1986).
1988 :	Isolement de cellules embryonnaires totipotentes porcines (PIEDRAHITA et al. 1988). Production de vecteurs rétroviraux recombinants défectifs murins capables de transférer des gènes dans les cellules de différents mammifères dont le porc (DELOUIS et al. 1988 a).

au cours du développement a immédiatement connu un succès considérable, puisque, à l'heure actuelle, les laboratoires qui l'utilisent, produisent une souris transgénique par jour (SCANGOS et BIEBERICH, 1987). La production d'animaux domestiques transgéniques, apparue dès 1985 (Tableau 1), bien que présentant de très grandes difficultés de mise en

oeuvre (RENARD et BABINET, 1987) est certainement promise à un grand avenir. Déjà, la disponibilité de tels animaux permet de faire progresser les connaissances sur les mécanismes de régulation des différentes fonctions physiologiques au niveau moléculaire.

Dans un avenir raisonnable, elle permettra de produire des animaux ayant un patrimoine génétique modifié selon des critères de performances zootechniques spécifiques (croissance, prolificité, résistance aux maladies, etc.,).

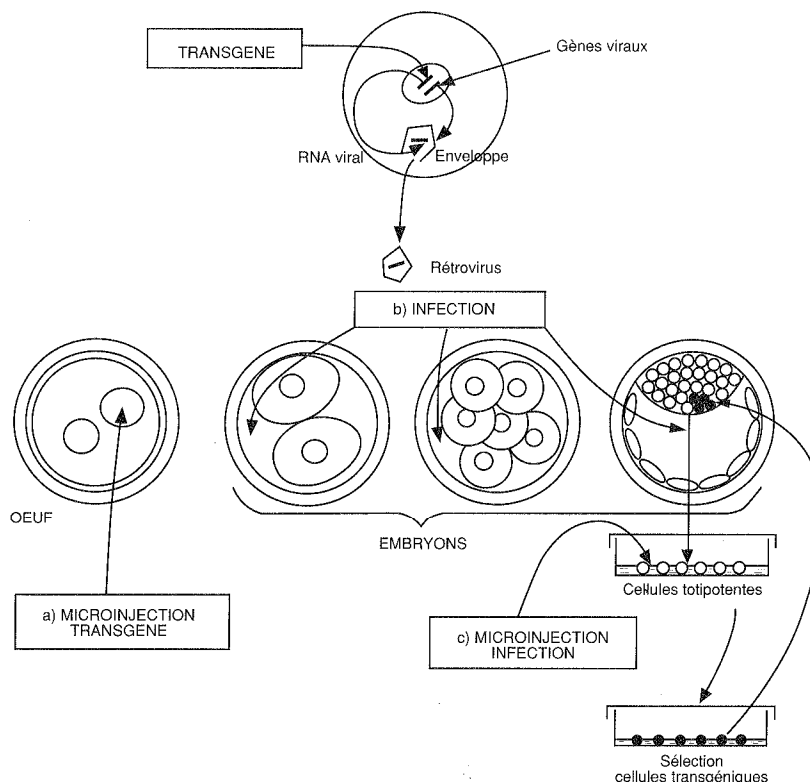
2. LA TRANSGÉNÈSE.

Le transfert de gènes dans une cellule animale peut être réalisé à l'aide de différentes techniques : la transfection, la

microinjection, l'électroporation l'infection par des rétrovirus recombinants, la fusion avec des liposomes, l'hybridation cellulaire, etc.,... Les deux techniques les plus couramment utilisées pour le transfert de gènes dans les oeufs et les embryons de mammifères sont la microinjection et l'infection (Figure 2).

De plus, des souris transgéniques ont été produites à l'aide de cellules totipotentes transfectées ou infectées (Tableau 1 ; Figure 2) ; cette méthode, qui permet de sélectionner, avant

FIGURE 2
LES PRINCIPALES MÉTHODES DE PRODUCTION DE MAMMIFÈRES TRANSGÉNIQUES.



- a) Microinjection de transgènes dans le pronucléus mâle de l'oeuf.
 b) Infection de l'embryon aux stades précoces du développement à l'aide de rétrovirus vecteurs du transgène.
 c) Transfection ou infection de cellules multipotentiellles qui après sélection en culture sur l'expression du transgène participent à la construction d'un animal chimère. Certains de ces animaux peuvent être à l'origine d'une lignée grâce à la présence du transgène dans les cellules germinales.

leur transfert, les cellules exprimant au mieux le transgène en culture et donc de créer un animal selon un génome choisi, pourrait être prochainement utilisable chez le porc (Tableau 1).

21. Microinjection de DNA

Cette méthode consiste en l'introduction d'une très petite quantité de DNA (100 à 1.000 copies d'un fragment plasmidique linéaire, représentant un volume de 1 à 10 picolitres) dans le pronucléus mâle de l'oeuf.

Chez la truie l'ovulation survient 36 à 40 heures après le début de l'oestrus ; elle est suivie immédiatement de la fécondation (HUNTER, 1974). Les oeufs sont collectés 10 à 12 heures après celle-ci par perfusion rétrograde des trompes. Cette intervention a lieu par chirurgie ou bien après abattage.

Les oeufs collectés sont placés dans un milieu de survie (mKRB) et centrifugés. Les granules lipidiques sont alors

rassemblés en un seul endroit dans l'oeuf, voire même extrudés, sans altérer sensiblement la viabilité (WALL et al., 1985). Les oeufs centrifugés sont microinjectés à l'aide d'un dispositif optique de contraste interférentiel.

Les oeufs microinjectés sont transférés dans les trompes de truies au même stade du cycle oestrien que les femelles donneuses d'embryons ou bien entrées en oestrus 12 heures plus tard que la femelle donneuse (SPRINGMANN et al., 1988). Le transfert a lieu aussi rapidement que possible après la microinjection afin de limiter la durée de la conservation des embryons in vitro, toujours préjudiciable au maintien d'une excellente viabilité.

Baucoup de facteurs peuvent influencer le rendement de la microinjection des oeufs de porc en produits viables. Parmi ceux-ci, citons l'expertise pour la collecte, la micromanipulation et le transfert ; la qualité initiale des oeufs ; le nombre d'oeufs micromanipulés transférés (SPRINGMANN et al., 1988). Le nombre de produits viables varie de 3 à 10 % selon

les auteurs (Tableau 2). Ce résultat est à rapprocher de celui décrit pour les oeufs de souris (10 % RENARD et BABINET, 1987) et de la lapine (7 % DELOUIS et al., 1988 b). Sept à 15 % des porcelets ont le transgène intégré dans le génome de

leurs cellules, soit un rendement global de 0,3 à 1,4 % par rapport au nombre d'oeufs micromanipulés, (Tableau 2) ce qui correspond au chiffre général donné pour la production d'animaux de ferme transgéniques (HAMMER et al., 1985 ; BIERY et al., 1988).

TABLEAU 2.
PRODUCTION DE PORCS TRANSGÉNIQUES PAR MICROINJECTION ET PAR INFECTION.

Oeufs manipulés transférés	truies receveuses	totaux	porcelets transgéniques	références
Microinjection				
268	10	15	1 (0,3 %) i	a
2035	64	192	20 (1,0 %)	b
4123	98	130	18 (0,4 %)	c
423	14	17	6 (1,4 %)	d
104	5	13 ii	n.d.	e
Infection				
101	5	33 iii	n.d.	f

i : pourcentage de porcelets transgéniques par rapport au nombre d'embryons micromanipulés;
 ii : 7 foetus âgés de 28 jours et 6 porcelets ;
 iii : 33 foetus âgés de 42 jours;
 n.d. : non déterminé;
 a : BREM et al. 1985 ;

b : HAMMER et al. 1985 ;
 c : SPRINGMANN et al. 1988 ;
 d : VIZE et al. 1988 ;
 e : DELOUIS et al. non publié ;
 f : PETTERS et al. 1987.

L'amélioration de ce rendement dépendra des progrès de nos connaissances fondamentales sur les mécanismes de différenciation de l'oeuf des mammifères des cellules embryonnaires et des cellules foetales.

Chez la souris, le nombre de copies du transgène ainsi que les sites d'intégration dans le génome sont très variables. Dans la plupart des cas, plusieurs copies associées tête bêche sont intégrées en un seul endroit. De plus, il y a fréquemment des réarrangements du génome de l'hôte au site d'intégration.

L'expression du transgène n'est pas corrélée au nombre de copies intégrées mais elle est obtenue dans un type cellulaire précis. Ainsi, par exemple, un transgène d'immunoglobuline s'exprime dans les lymphocytes B de souris (RUSCONI et KOHLER, 1985) et de lapin (KNIGHT et al., 1988) ; un transgène hybride comprenant les séquences régulatrices des protéines du lait s'exprime dans les cellules de la glande mammaire de la souris (ANDRES et al., 1987 ; LEE et al., 1988 ; PITTIUS et al., 1988 ; YU-LEE et ROSEN, 1988). Lorsque le transgène contient un promoteur de gènes ubiquitaires, son expression survient dans plusieurs types cellulaires de l'animal transgénique. Parmi les promoteurs les plus utilisés, citons ceux des gènes de la métallothionéine (PALMITER et al., 1982), du complexe majeur d'histocompatibilité (MORELLO et al., 1986), de l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (DELOUIS et al., 1988 b). Dans ces cas, l'expression du transgène peut avoir des effets considérables sur l'animal ; l'expression du gène de l'hormone de croissance sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine a produit des souris transgéniques géantes (PALMITER et al., 1982) ; l'expression du transgène est alors modulée selon les organes (SHEA et al., 1987).

Bien que placés sous la régulation de promoteurs ubiquitaires, certains gènes ne s'expriment pas dans tous les tissus de l'animal transgénique. Cette situation peut avoir deux causes :

(i) le transgène a été perdu dans quelques cellules au cours du développement embryonnaire précoce l'animal est mosaïque d'intégration ; (ii), le site d'intégration du transgène ne permet pas son expression dans tous les tissus, l'animal est mosaïque d'expression (ALLEN et al., 1988). L'expression du gène de la bêta-galactosidase sous promoteur hypoxanthine phosphoribosyl transférase est mosaïque dans les tissus de lapin transgénique (DELOUIS et al., 1988 b).

Ces observations impliquent qu'il faut produire de très nombreux animaux transgéniques pour obtenir un individu présentant des caractéristiques spécifiques d'expression d'un gène.

22. Infection des embryons.

Le transfert de gènes par infection consiste en l'utilisation de virus dont le génome modifié contient le transgène sans altérer ses capacités d'infection. Les embryons sont infectés par co-culture avec des cellules donneuses de virus (l'embryon de souris est alors sorti de son enveloppe pellucide) ou bien par microinjection de ces cellules sous l'enveloppe pellucide (pour les embryons d'autres espèces, Figure 2).

Les rétrovirus ont un génome sous forme de RNA qui est copié en DNA dans la cellule-hôte infectée. Ce DNA ou provirus est intégré sous forme d'une seule copie dans le génome de la cellule. Il sera transmis à l'ensemble de la descendance produisant un clone cellulaire génétiquement modifié pour assurer la synthèse de virions. Parmi les différents rétrovirus utilisables, les virus de Moloney, responsables de leucémies murines, présentent l'avantage de regrouper dans l'extrémité 5' terminale de leur génome, en plus des séquences régulatrices de l'expression des gènes, les gènes qui codent pour des signaux d'emballage (nécessaires pour l'introduction du RNA génomique viral dans l'enveloppe protéique des virions). La délétion de tout ou partie du reste du génome viral remplacé

par un transgène permet de produire des virions possédant ce gène particulier et ainsi de l'intégrer dans le génome d'une cellule-hôte par simple infection.

Les protéines de l'enveloppe virale sont produites par une cellule assistante (cellule transcomplémentante, Figure 2). La cellule animale infectée ne produit pas de virions puisque le génome proviral intégré est incomplet. Enfin, le gène sera transféré dans les cellules de différentes espèces selon la spécificité des protéines d'enveloppe synthétisées par la cellule transcomplémentante (Figure 2).

Nous avons pu établir deux lignées cellulaires transcomplémentantes (une de cellules de chat, l'autre de lapin) qui produisent des rétrovirus défectifs recombinants capables d'infecter et de transférer un gène marqueur (le gène bactérien codant pour l'enzyme bêta-galactosidase) dans des cellules de porc (DELOUIS et al., 1988 a ; Tableau 1). Le transgène s'exprime dans les cellules porcines de différentes origines tissulaires. Il n'existe qu'une seule référence concernant le transfert d'un gène (résistance à un antibiotique) dans les cellules de l'embryon de porc par des vecteurs viraux dérivés d'un rétrovirus aviaire (PETTERS et al., 1987 ; Tableau 2). Il existe beaucoup plus de données sur le même sujet concernant l'embryon de souris (Tableau 1 RENARD et BABINET, 1987) et de lapine (DELOUIS et al. non publié).

L'ensemble des résultats montre que la viabilité des embryons infectés est très supérieure à celle des embryons microinjectés au stade une cellule. Ainsi, l'infection de l'embryon de la lapine aux stades 2-8 cellules et blastocyste, par des cellules donneuses de virus autorise la production de 34 et 59 % de produits viables, respectivement. Ce résultat est comparable à celui rapporté pour l'infection des embryons de porc au stade morula (33 %, Tableau 2). L'embryon de la souris est plus facilement infectable, car l'enveloppe pellucide peut être enlevée sans trop altérer la viabilité de l'embryon transféré ; ceci a permis d'infecter les embryons de cette espèce par des cocultures avec les cellules donneuses de rétrovirus recombinants défectifs (RUBENSTEIN et al., 1986). Dans ce cas, 38 % des embryons infectés *in vitro* sont viables (RENARD et BABINET, 1987).

En plus de son efficacité pour la production d'animaux transgéniques, l'utilisation de vecteurs rétroviraux présente l'avantage d'introduire le transgène sous forme d'une seule copie dans le génome des cellules-hôtes. Cette propriété permettra des études fondamentales de mutagenèse par insertion dans le génome des mammifères domestiques, études déjà commencées chez la souris (ALLEN et al., 1988).

L'intégration du provirus peut provoquer des interactions avec le DNA de l'hôte (activation de gènes par les promoteurs viraux, destruction de gènes au site d'insertion, etc,...). Ces difficultés sont évitées, ou au moins réduites, par des modifications spécifiques des génomes recombinants et par des délétions de séquences activatrices des promoteurs viraux (DANOS et MULLIGAN, 1988).

La principale difficulté de la technique de transfert de gènes dans l'embryon par infection réside dans le faible titre de production de rétrovirus recombinants défectifs (seuls utilisables pour éviter l'intégration de provirus sauvages dans le génome des animaux) ce qui entraîne une forte proportion de mosaïcisme. En effet, lors de l'infection de l'embryon, seules quelques cellules deviennent transgéniques ; les tissus formés seront donc mosaïques, notamment les gonades. Si l'obten-

tion de lignées cellulaires productrices de rétrovirus recombinants ayant des titres élevés est réalisée, la transgénèse par infection de l'embryon des mammifères domestiques peut devenir une technique très efficace.

Les rétrovirus transfèrent des gènes dans les cellules souches de tissus adultes différenciés : hépatocytes (LEDLEY et al., 1987 ; WILSON et al., 1988) et cellules de la lignée hématopoïétique (BOWTELL et al., 1987 ; CHANG et al., 1987 ; HAWLEY et al., 1987 ; LIM et al., 1987 ; EGLITIS et al., 1987, 1988 ; WEBER-BENAROUS et al., 1988). Cette propriété des rétrovirus n'a pas été exploitée d'un point de vue zootechnique (infection des cellules souches des gonades par exemple) ; elle pourrait l'être chez le porc dans la perspective de développer des modèles cliniques pour la thérapie génique chez l'homme (ANDERSON, 1986).

2.3. Les cellules totipotentes.

La méthode consiste dans le transfert du génome d'une cellule en culture en celui d'un animal à l'origine d'une lignée spécifique. Des cellules de tératocarcinome (JACOB, 1978 ; JAKOB et NICOLAS, 1987) et d'embryons de souris (EVANS et KAUFMAN, 1981) conservent la capacité de se différencier en de nombreux types cellulaires en culture. Introduites dans des blastocystes, elles participent à la constitution des tissus d'une souris tétraparentale (STEWART et MINTZ, 1981 ; BRADLEY et al., 1984 ; Figure 2). Dans ce cas, l'animal est une chimère, puisque les cellules de certains tissus ont deux patrimoines génétiques différents, celui de l'embryon et celui de la cellule multipotentielle. Ces animaux chimères sont à l'origine de lignées dont le génome est celui des cellules multipotentiels, génome qui peut être modifié en culture par transfection ou par infection (Tableau 1 ; Figure 2).

La viabilité des blastocystes micromanipulés est excellente (55%, RENARD et BABINET, 1987). Plus de la moitié des souris produites sont chimères et, parmi celles-ci, au moins un tiers le sont dans la lignée germinale.

Cette technique de transgénèse est la plus prometteuse car elle associe les avantages d'une bonne efficacité de production d'animaux avec celle de production d'un génome transgénique obtenu par infection à l'aide de rétrovirus recombinants et sélectionné en culture sur les qualités d'expression du transgène (EVANS et al., 1985 ; BRADLEY et ROBERTSON, 1986 ; ROBERTSON, 1986 ; ROBERTSON et al., 1986).

Aussi, il paraît très important de disposer de cellules multipotentiels pour d'autres espèces que la souris. Des recherches sont réalisées actuellement dans plusieurs laboratoires pour répondre à cette demande. Récemment des cellules multipotentiels de hamster ont été obtenues (DOETSCHMAN, 1988). A notre connaissance, il n'a pas été produit d'animaux de ferme avec des cellules totipotentes, bien que la disponibilité de telles cellules d'origine porcine ait été publiée (PIEDRAHITA et al., 1988).

3. LE PORC : UN BON CANDIDAT POUR LA TRANSGÉNÈSE.

La comparaison des principaux paramètres concernant la reproduction chez le porc avec ceux de la reproduction d'autres mammifères montre que la manipulation des embryons porcins présente des avantages (Tableau 3). La reproduction de la truie n'est pas influencée par la saison, l'âge à la puberté

est très précoce, notamment pour les animaux des races chinoises, la durée de la gestation est courte et la taille de portée est élevée.

Toutefois, plusieurs inconvénients concernant la manipulation de l'embryon de porc sont à souligner. La culture des oeufs a des rendements médiocres; elle nécessite encore de nombreuses améliorations (STONE et al., 1984 ; DAVIS, 1985 ; FLOOD et WIEBOLD, 1988). Or, la mise au point des techni-

ques de manipulation de l'embryon implique la disponibilité d'une bonne survie pendant deux ou trois jours in vitro. La microinjection de DNA dans l'oeuf exige la connaissance du moment précis de l'ovulation naturelle ou sous stimulation hormonale.

La production d'oeufs de porc in vitro est la meilleure solution pour disposer d'embryons d'âge strictement connu et en quantité moins aléatoire que par la collecte chirurgicale après

TABEAU 3.
DONNÉES COMPARATIVES CONCERNANT LA REPRODUCTION DE DIFFÉRENTS
MAMMIFÈRES UTILISÉS POUR LA MANIPULATION DES EMBRYONS.

	Souris	Lapine	Truie	Brebis	Chèvre	Vache
Reproduction saisonnée	non	non	non	oui	oui	non
Puberté (*)	10-12	25-32	25-40	20-35	52-65	
Oeufs/ponte	5-10	6-10	8-12	1-3	1-4	1
Oeufs/ponte stimulée	20-30	20-40	15-20	4-10	6-12	5-10
Gestation (*)	4	16	20	20	40	
Taille portée	5-10	5-10	8-12	1-2	1-3	1

d'après CLARK et al., 1987. (*): semaines

ovulation naturelle ou stimulée par les hormones. La fécondation d'ovocytes porcins en culture a été réalisée (CHENG et al., 1986) de même que celle des ovocytes ovins (CROZET et al., 1987 ; FUKUI et al., 1988) et bovins (LE GUIENNE et al., 1988) ; cette technique devrait être développée pour assurer des conditions optimales de micromanipulation des embryons d'animaux de ferme.

La richesse en lipides du cytoplasme rend l'oeuf de porc opaque pour l'examen microscopique en lumière transmise. Une centrifugation est nécessaire pour visualiser les pronucléi de l'oeuf et les noyaux des blastomères de l'embryon précoce (WALL et al., 1985). La même stratégie est appliquée pour les oeufs ovins (NANCARROW et al., 1984) et bovins (LOSKU-TOFF et al., 1986). Après différents essais, nous avons retenu qu'une centrifugation de 50.000 g pendant 10 minutes à 25°C, les oeufs étant placés dans du milieu mKRB (DAVIS, 1985), est nécessaire et suffisante pour permettre la visualisation des pronucléi observés à l'aide d'un système optique de contraste interférentiel (DELOUIS et al non publié).

4. QUELS GENES ?

Le recours à la biotechnologie pour produire des animaux domestiques transgéniques a été prévu depuis longtemps en prenant comme exemple l'utilisation du gène de l'hormone de croissance (PALMITER et al., 1982). Dans la perspective d'améliorer quantitativement et qualitativement la productivité, tous les aspects des aptitudes et des fonctions des animaux domestiques qui sont dirigés génétiquement pourront faire l'objet d'un investissement biotechnologique. Pour cela il faudra caractériser des gènes spécifiques (par exemple le gène de l'hypertrophie musculaire du porc, OLLIVIER, 1980 ; ou le gène de proliféricité du mouton, BINDON, 1984) les isoler, les cloner et les transférer en un site du génome qui permettra une ségrégation appropriée et un contrôle de l'expression dans le phénotype.

La nécessité d'insérer les gènes dans un site spécifique du

génome est très importante. A l'heure actuelle, on retient, parmi les animaux transgéniques produits, ceux qui présentent un bon niveau d'expression du transgène. Compte tenu de la valeur nominale des embryons d'animaux de ferme, cette stratégie est prohibitive dans les conditions de la pratique. Il n'y a pas de doute que ces difficultés seront surmontées grâce à un investissement important en recherche fondamentale sur la manipulation du DNA recombinant, notamment sur le décryptage des génomes animaux, sur l'étude des recombinaisons homologues et sur celle des rétrotransposons.

4.1. Fonctions physiologiques.

Le transfert de gènes hybrides comprenant des promoteurs ubiquitaires a permis de modifier l'accomplissement de certaines fonctions physiologiques. Il existe plusieurs exemples de réussite de cette méthodologie chez la souris (revue de SCANGOS et BIEBERICH, 1987) et une référence chez le porc (HAMMER et al., 1985), un animal ayant présenté une croissance corporelle significativement augmentée (VIZE et al., 1988).

La croissance semble la fonction la plus simple à stimuler chez l'animal normal comme chez l'animal nain (BEHRINGER et al., 1988). De plus, un taux plasmatique élevé d'hormone de croissance augmente significativement la production laitière des ovins (DENAMUR et MARTINET, 1970 ; HEAD et al., 1980) et des bovins (RICHARD et al., 1985). Un apport exogène d'hormone de croissance peut avoir des effets sur la répartition des nutriments pendant la lactation, il pourrait donc influencer favorablement la composition tissulaire en lipides et la proportion de tissus gras dans la carcasse (MACHLIN, 1972).

Le transfert de gènes hybrides comprenant des promoteurs tissu-spécifiques permet d'obtenir l'expression d'un transgène dans un type cellulaire précis. Ainsi, la fonction gonadotrope a été restaurée chez la souris hypogonadique (MASON et al. 1986), et nous avons déjà indiqué que différents promoteurs dirigeaient l'expression d'un gène spécifiquement dans les cellules de la glande mammaire et dans les cellules de la lignée

hématopoïétique.

Une autre méthode pour influencer une fonction physiologique consiste en l'augmentation du nombre de récepteurs à une molécule régulatrice ou substrat d'une voie métabolique. Le transfert du gène du récepteur des LDL qui s'exprime dans les fibroblastes de lapin en culture (MIYANOHARA et al., 1988) élimine les LDL plasmatiques chez la souris transgénique (HOFMANN et al., 1988).

Le transfert d'un gène hybride comprenant le promoteur du gène de l'insuline a produit une hypertrophie des cellules bêta du pancréas et induit un diabète chez la souris (SARVETNICK et al., 1988) ; cette méthodologie ouvre la possibilité de supprimer sélectivement le fonctionnement d'un gène.

4.2. Résistance aux maladies.

Une des applications les plus prometteuses du transfert de gènes dans le génome des animaux domestiques est l'acquisition d'une moindre sensibilité aux agents pathogènes. Quelques suggestions ont été faites pour ce qui concerne le porc (OLLIVIER, 1988).

On pourrait modifier l'expression de certains gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, faire exprimer des gènes viraux qui dépriment la liaison entre le pathogène et la cellule-hôte ou bien utiliser le transfert de gènes d'immunoglobulines spécifiques de protéines virales et bactériennes.

4. 3. Le porc modèle pour la thérapie génique.

Il existe de nombreux projets de thérapie génique pour l'homme (ANDERSON, 1986 ; EGLITIS et al., 1987), dont certains sont activement développés actuellement. Le passage aux applications cliniques reposera sur les résultats obtenus au cours d'expérimentations pilotes sur des modèles animaux. Le porc est un excellent candidat à ce titre pour de nombreuses raisons physiologiques et économiques.

CONCLUSION.

Différentes techniques de transfert de gènes sont utilisables pour l'embryon de porc comme cela a été établi pour l'embryon de souris, animal pour lequel l'expression des transgènes est obtenue dans des conditions physiologiques (tissu-spécificité, régulation hormonale et expression au cours du développement).

Bien que le rendement en animaux transgéniques soit encore faible, la prolificité de l'espèce porcine permettrait d'obtenir un nombre suffisant d'animaux pour sélectionner sur l'expression phénotypique d'un génotype ponctuellement modifié.

Des investissements importants de recherches en biologie du développement et en biologie moléculaire du génome sont nécessaires pour créer des génotypes porcins modulables à la demande. Leurs résultats, en créant des possibilités techniques entièrement nouvelles, auraient des conséquences économiques considérables pour la production porcine future.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN D.N., GRAM D.G., BARTON S.C., HETTLE S., REIK W., SURANI M.A., 1988. *Nature* (London), 333,852-855.
- ANDERSON W.F., 1986. *La Recherche* (Paris), 17,458-468.
- ANDRES A-C., SCHONENBERGER C-A., GRONER B., HEN-NIGHAUSEN L., LE MEUR A., GERLINGER P. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**,1299-1303.
- BACHETTI S., GRAHAM F.L., 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**,1590-1594.
- BEHRINGER R.R., MATHEWS L.S., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1988. *Genes & Development* **2**,453-461.
- BIERY K.A., BONDIOLI K.R., DE MAYO F.J., 1988. *Theriogenology* **29**,224.
- BINDON B.M., 1984. *Austr. J. Biol. Sci.*, **37**,163-189.
- BOWTELL D.D.L., JOHNSON G.R., KELSO A., CORY S. 1987. *Molec. Biol. Med.*, **4**,229-250.
- BRADLEY A., EVANS M.J., KAUFMAN M.H., ROBERTSON E., 1984. *Nature* (London), 309,255-256.
- BRADLEY A., ROBERTSON E., 1986. *Curr. Topics in Devtl. Biol.* **20**,357-371.
- BREM G., BRENIG B., GOODMAN H.M., SELDEN R.C., GRAF F., KRUFF B., SPRINGMAN K., HONDELE J., MEYER J., WINNAKER E.L., KRAUSSLICH H., 1985. *Zuchthygiene* **20**,251-252.
- BRINSTER R.L., ALLEN J.M., BEHRINGER R.R., GELINAS R.E., PALMITER R.D., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**,836-840.
- BRINSTER R.L., CHEN H.Y., TRUMBAUER M.E., SENEAR A.W., WARREN R., PALMITER R.D., 1981. *Cell* **27**,223-231.
- CHANG S.M.W., WAGER-SMITH K., TSAO T.Y., HENKEL-TIGGES J., VAISHNAV S., CASKEY C.T., 1987. *Molec. Cell. Biol.*, **7**,854-863.
- CHENG W.T.K., MOOR R.M., POLGE C., 1986. *Theriogenology* **25**,146.
- CLARK A.J., SIMONS P., WILMUT I., LATHE R., 1987. *Trends in Biotech.* **5**,20-24.
- CONE R.D., MULLIGAN R.C., 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**,6349-6353.
- CROZET N., HUNEAU D., DESMEDT V., SZOLLOZI D., TORRES S., SEVELLEC C., THERON M-C., 1987. *Gamete Res.*, **16**,159-170.
- DANOS O., MULLIGAN R.C., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**,6460-6464.
- DAVIS D.L., 1985. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **33**,115-124.
- DELOUIS C., L'HARIDON R., GIANQUINTO L., BONNEROT C., MILAN D., NICOLAS J-F., 1988 a. en préparation.
- DELOUIS C., DESPREZ-OBLIN A., BONNEROT C., NICOLAS J-F., 1988 b. (en préparation.)
- DENAMUR R., MARTINET J., 1970. *Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.* **186**,185-188.
- DOETSCHMAN T., WILLIAMS P., MAEDA N., 1988. *Develop. Biol.* **127**,224-227.
- EGLITIS M.A., KANTOFF P.W., MC LACHLIN J.R., GILLIO A., FLAKE A.W., BORDIGNON C., MOEN R.C., KARSON E.M., ZWIEBEL J.A., KOHN D.B., GILBOA E., BLEASE R.M., HARRISON M.R., ZANJANI E.D. O'REILLY R., ANDERSON W.F., 1987. *CIBA Found. Symp.* **130**,229-246.
- EGLITIS M.A., KOHN D.B., MOEN R.C., BLEASE R.M., ANDERSON W.F., 1988. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **151**, 201-206.
- EVANS M.J., BRADLEY A., KUEHN M.R., ROBERTSON E., 1985. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **50**,691-700.
- EVANS M.J., KAUFMAN M.H., 1981. *Nature* (London), 292,154-156.
- FLOOD M.R., WIEBOLD J.L., 1988. *J. Reprod. Fert.*, **84**,7-12.
- FRELS W.J., BLUESTONE J.A., HODES R.J., CAPECCHI M.R., SINGER D.S., 1985. *Science* **228**,577-580.
- FUKUI Y., GLEW A.M., GANDOLFI F., MOOR R.M., 1988. *Theriogenology*, **29**,883-891.
- GORDON J.W., RUDDLE F.H., 1981. *Science* **214**,1244-1246.
- GORDON J.W., SCANGOS G.A., PLOTKIN D.J., BARBOSA J.A., RUDDLE F.H., 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**,7380-7384.
- HAMMER R.E., BRINSTER R.L., ROSENFELD M.G., EVANS R.E., MAYO K.E., 1985. *Nature* (London) **315**,413-416.

- HAWLEY R.G., COVARRUBIAS L., HAWLEY T., MINTZ B., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**,2406-2410.
- HEAD H.H., DELOUIS C., TERQUI M., KANN G., DJIANE J., 1980. *J. Anim. Sci.* **50**,706-712.
- HOFMANN S.L., RUSSELL D.W., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L., HAMMER R.E., 1988. *Science*, 239,1277-1281.
- HUNTER R.H.F., 1974. *Anat. Rec.* 178,169-185.
- HUSZAR D., BALLING R., KOTHARY R., MAGLI M.C., HOZUMI N., ROSSANT J., BERNSTEIN A., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**,8587-8591.
- JACOB F., 1978. *Proc. Royal Soc. Lond., B.* 201,249-270.
- JAKOB H., NICOLAS J-F., 1987. *Methods in enzymol.*, 151,66-81.
- JAENISCH R., 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**,1260-1264.
- JAENISCH R., MINTZ B., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**,1250-1254.
- JAHNER D., HAASE K., MULLIGAN R., JAENISCH R., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**,6927-6931.
- KNIGHT K.L., SPIEKER-POLET H., KASDIN D.S., OI V.T., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**,3130-3134.
- LEDLEY F.D., DARLINGTON G.J., HAHN T., WOO S.L.C., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**,5335-5339.
- LEE K-F., DE MAYO F.J., ATIEE S.H., ROSEN J.M., 1988. *Nucl. Acid Res.*, **16**,1027-1041.
- LE GUIENNE B., THIBAUT C., CHUPIN D., GERARD M., THIBIER M., 1988. *Elev. et Insem.* 225,13-22.
- LIM B., WILLIAMS D.A., ORKIN S.H., 1987. *Molec. Cell. Biol.* **7**,3459-3465.
- LOSKUTOFF N.M., COREN B.R., BARRIOS D.R., BESSOUDE E., BOWEN M.J., STONE G., KREAMER D.C., 1986. *Theriogenology* **25**,168.
- LOVELL-BADGE R.H., BYGRAVE A.E., BRADLEY A., ROBERTSON E., EVANS M.J., CHEAH K.S.E., 1985. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**,707-711.
- MACHLIN L.J., 1972. *J. anim. Sci.*, **35**,794-800.
- MANN R., MULLIGAN R.C., BALTIMORE D., 1983. *Cell* **33**,153-159.
- MASON A.J., PITTS S.L., NIKOLICS K., SZONYI E., WILCOX J.N., SEEBURG P.H., STEWART T.A., 1986. *Science*, 234,1372-1378.
- MILLER A.D., LAW M-F., VERMA I.M., 1985. *Molec. Cell. Biol.*, **5**, 431-437.
- MIYANOHARA A., SHARKEY M.F., WITZTUM J.L., STEINBERG D., FRIEDMAN T., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**,6538-6542.
- MORELLO D., MOORE G., SALMON A-M., YANIV M., BABINET C., 1986. *EMBO J.*, **5**,1877-1883.
- NANCARROW C.D., MURRAY J.D., BOLAND M.P., HAZELTON I.G., SUTTON R., 1984. *Theriogenology* **21**,248.
- OLLIVIER L., 1980. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **12**,383-394.
- OLLIVIER L., 1988. *Adv. Anim. Breed. World Symp.* R. POLITIEK Pudoc, Wageningen, Netherlands; . 90-106.
- PALMITER R.D., BRINSTER R.L., HAMMER R.E., TRUMBAUER M.E., ROSENFELD M.G., BIRNBERG N.C., EVANS R.M., 1982. *Nature (London)* 300,611-615.
- PETTERS R.M., SHUMAN R.M., JOHNSON B.H., METTUS R.V., 1987. *J. of exper. Zool.* 242,85-88.
- PIEDRAHITA J.A., ANDERSON G.B., MARTIN G.R., BONDU-RANT R.H., PASHEN R.L., 1988. *Theriogenology* **29**,286.
- PITTIUS C., HENNIGHAUSEN L., LEE E., WESTPHAL H., NICOLS E., VITALE J., GORDON K., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**,5874-5878.
- RENARD J-P., BABINET C., 1987. *Theriogenology* **27**,181-200.
- RICHARD A.L., MC CUTCHEON S.N., BAUMAN D.E., 1985. *J. Dairy Sci.* **68**,2385-2389.
- ROBERTSON E., 1986. *Trends in Genetics*, **2**,9-13.
- ROBERTSON E., BRADLEY A., KUEHN M., EVANS M.J., 1986. *Nature (London)* 323,445-448.
- RUBENSTEIN J.L.R., NICOLAS J-F.; JACOB F., 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**,366-368.
- RUSCONI S., KOHLER G., 1985. *Nature (London)*, 314,330-334.
- SARVETNICK N., LIGGITT D., PITTS S., HANSEN S.E., STEWART T.A., 1988. *Cell*, **52**,773-782.
- SCANGOS G., BIEBERICH C., 1987. *Adv. in Genetics* **24**,285-322.
- SHEA B.T., HAMMER R.E. BRINSTER R.L., 1987. *Endocrinology* 121,1924-1930.
- SPRINGMANN K., MAIER E., BINDER S., BREM G., 1988. *Theriogenology* **29**,311.
- STEWART T.A., MINTZ B., 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**,6314-6317.
- STEWART T.A., WAGNER E.F., MINTZ B., 1982. *Science* 217,1046-1048.
- STONE B.A., QUINN P., SEAMARK R.F., 1984. *Anim. Reprod. Sci.* **7**,405-412.
- van der PUTTEN H., BOTTARI F.M., MILLER A.D., ROSENFELD M.G., FAN H., EVANS R.M., VERMA I.M., 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **82**,6148-6152.
- VIZE P.D., MICHALSKA A.E., ASHMAN R., LLOYD B., STONE B.A., QUINN P., WELLS J.R.E., SEAMARK R.F., 1988. *J. Cell Sci.* **90**, 295-300.
- WAGNER E.F., KELLER G., GILBOA E., RUTHER U., STEWART C.L., 1985. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**,691-700.
- WALL R.J., PURSEL V.G., HAMMER R.E., BRINSTER R.L., 1985. *Biol. of Reprod.* **32**,645-651.
- WEBER-BENAROUS A., CONE R.D., LONDON I.M., MULLIGAN R.C., 1988. *J. Biol. Chem.*, 263,6142-6145.
- WIGLER M., SILVERSTEIN S., LEE L.S., PELLICER A., CHENG Y.C., AXEL R., 1977. *Cell* **11**,223-232.
- WILSON J.M., JEFFERSON D.M., CHOWDHURY J.R., NOVICKOFF P.M., JOHNSTON D.E., MULLIGAN R.C., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**,3014-3018.
- YU-LEE L., ROSEN J.M., 1988. *Molec. endocrinology*, **2**,431-442.