



# Modifications génétiques animales et végétales : méthodes de transgénèse et expression des transgènes

► La transgénèse est un moyen essentiel pour étudier le rôle des gènes dans l'expression des fonctions biologiques ainsi que leur fonctionnement. Elle permet également d'envisager des applications biotechnologiques diverses. Bien que vieille de vingt ans chez les animaux et de dix-sept ans chez les végétaux, elle souffre encore de limites techniques qui sont progressivement repoussées. L'expression des transgènes est souvent mal contrôlée. C'est surtout le cas lorsque des gènes étrangers sont ajoutés dans des sites quelconques des génomes. L'expression est considérée comme satisfaisante lorsque le transgène est exprimé dans toutes les lignées, d'une manière qui respecte la spécificité du promoteur utilisé et, dans l'idéal, en fonction du nombre de copies intégrées. De nouveaux outils, qu'il est encore nécessaire de perfectionner, permettent de mieux utiliser la transgénèse pour des études fondamentales et de développer diverses applications dans les domaines médical et agronomique. ◀

**L**a transgénèse, comme le transfert de gène isolé dans des cellules en culture, est une suite logique à l'isolement des fragments d'ADN portant une information génétique. En effet, seule une cellule ou mieux un organisme entier sont susceptibles de fournir certaines informations sur les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes. Ce fait a été révélé, sans qu'on le perçoive bien, dès les premières expériences de transgénèse. Le gène de globine utilisé s'est en effet avéré inactif à l'état de transgène. Cette observation incompréhensible à l'époque a conduit une décennie plus tard à définir la notion de LCR (*locus control region*). Tout ceci est encore plus vrai lorsque l'on cherche à définir le rôle des gènes dans l'expression des fonctions biologiques. La transgénèse est donc par essence le retour du gène isolé dans son contexte naturel complexe qu'est l'organisme. La transgénèse comprend deux opérations distinctes : l'addition et le remplacement de gène. La première est très largement pratiquée et chez plusieurs espèces. Pour des raisons d'ordre technique la seconde commence seulement à être mise en œuvre chez des espèces autres que la souris.

## Louis-Marie Houdebine

L.M. Houdebine: Biologie du développement et biotechnologie, Institut national de la recherche agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

L'addition de gène, réalisée pour la première fois en 1980-1982, a rapidement montré que le transfert de gène n'était pas fondamentalement très difficile, à condition toutefois de mettre en œuvre la technique de microinjection qui est un peu délicate. Le fait que les souris qui abritaient un gène d'hormone de croissance exogène avaient une croissance augmentée a fortement frappé les esprits, dans la mesure où la modification de caractères phénotypiques paraissait relativement simple à obtenir de cette manière. Très rapidement, toute une série d'applications potentielles ont été proposées qui deviennent petit à petit des réalités. Le remplacement de gène chez des animaux entiers n'est venu que dix ans plus tard et a été réservé à la souris jusqu'à 1999. La transgénèse expérimentale est désormais une des opérations incontournables dans l'étude des gènes (*figure 1*). Ceci ne va faire que s'accroître avec la possibilité désormais offerte d'identifier systématiquement l'ensemble des gènes d'un génome.

Le succès de la transgénèse dépend encore pour une part de la maîtrise de certaines techniques. L'addition et le remplacement de gène sont des techniques laborieuses mais standar-

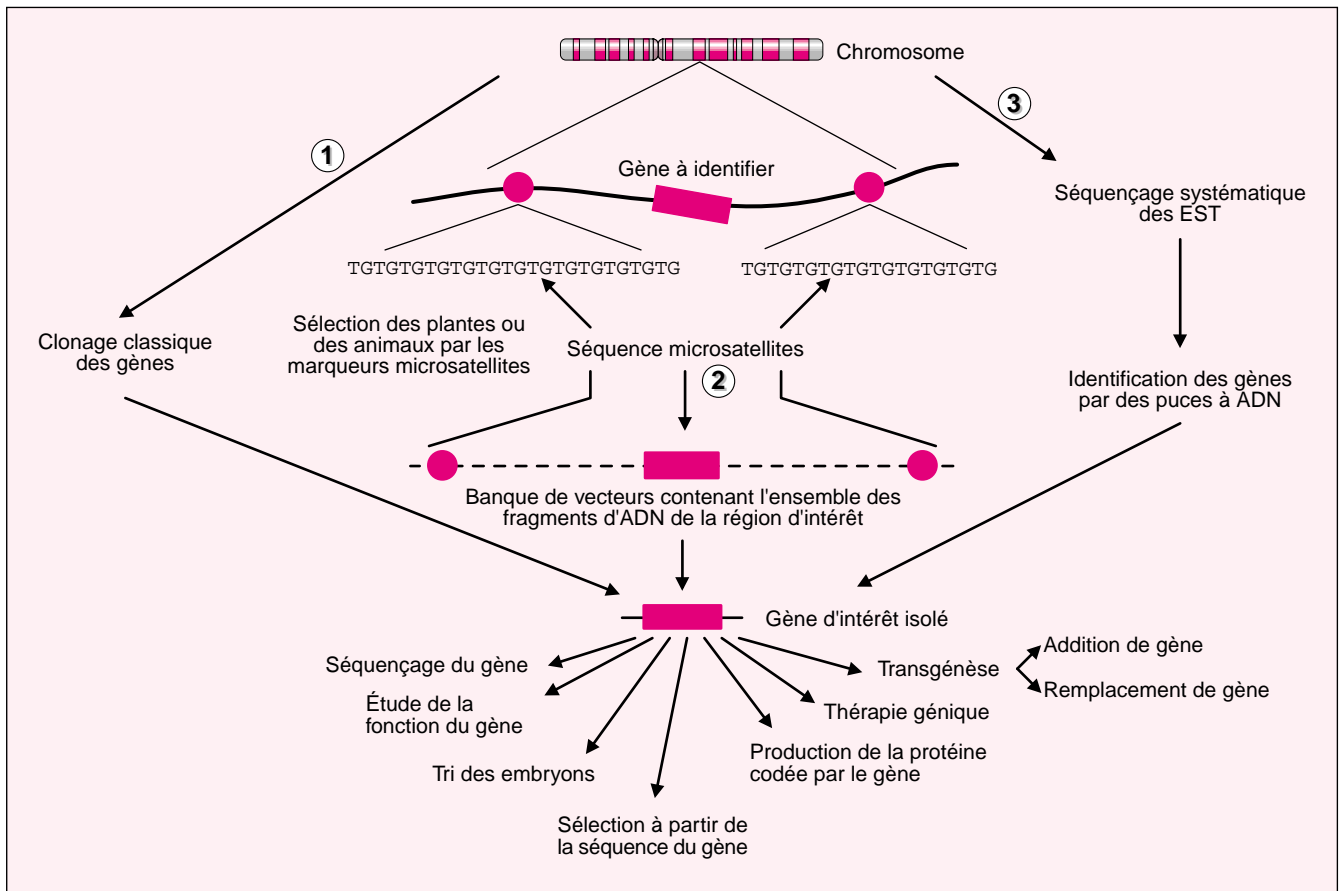


Figure 1. **Principales utilisations des gènes isolés.** Les gènes peuvent être isolés par les méthodes classiques de clonage (1), par l'utilisation de marqueurs microsatellites (2) ou par la séquence systématique des ADNc et des génomes (3). Les gènes isolés peuvent être étudiés en tant que tels, utilisés pour réaliser des diagnostics et de la sélection ainsi que pour produire les protéines correspondantes et procéder à une thérapie génique ou à une transgénèse.

disées chez la souris. Il n'en est pas de même pour d'autres espèces, notamment pour les oiseaux et les gros mammifères. Chez les plantes, l'addition de gènes est largement utilisée mais est plutôt laborieuse lorsqu'elle met en œuvre la biolistique. Le remplacement de gène chez les végétaux n'est encore qu'une curiosité de laboratoire.

Une des limites de la transgénèse par addition de gènes réside dans le fait que beaucoup de transgènes ne fonctionnent pas de manière satisfaisante. Il apparaît de plus en plus clairement que ceci est dû à l'incapacité des expérimentateurs à construire des gènes actifs, et à la méconnaissance qu'ils ont encore de ce que sont réellement les mécanismes de contrôle de l'expression génétique. La transgénèse apporte dans ce domaine une moisson d'informations essentielles

dont elle est directement bénéficiaire.

Malgré ses imperfections, la transgénèse a été largement adoptée par les expérimentateurs ainsi que par certains industriels. Environ 1000 gènes ont été modifiés par recombinaison homologue chez la souris [1]. La première protéine recombinante issue du lait doit être mise sur le marché cette année. Le rejet hyperaigu que subit un organe de porc transplanté chez un primate est en grande partie maîtrisé grâce à deux transgènes. Plusieurs dizaines de plantes transgéniques destinées à la consommation humaine sont sur le marché ou en cours d'expérimentation. Des animaux transgéniques sont également prêts à être proposés aux consommateurs.

Cet article se propose de faire le point sur l'état des techniques et des réalisations mettant en œuvre la transgé-

nèse. Il exclut délibérément les modifications du génome de la souris par recombinaison homologue, déjà traitée dans un numéro précédent [1]. Pour plus ample information, les lecteurs peuvent consulter plusieurs ouvrages ou dossiers concernant les animaux [2-5] ou les plantes transgéniques [5-6].

### **Les techniques de transfert de gène**

L'obtention de lignées d'organismes transgéniques suppose qu'un gène étranger ait été transféré de manière telle qu'il soit présent dans les gamètes pour pouvoir être transmis à la descendance. Ce but peut être atteint de plusieurs manières qui dépendent de l'organisme concerné et de la maîtrise que l'on a des différentes techniques de la reproduction.

## Le transfert de gène dans les gamètes

La microinjection de gène dans les ovocytes des animaux ne conduit pas fréquemment à l'intégration de l'ADN étranger. L'introduction d'une particule rétrovirale recombinante recouverte de l'enveloppe du VSV (*vesicular somatitis virus*) entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte conduit au transfert et à l'intégration des gènes du vecteur. L'enveloppe du virus VSV permet une haute efficacité d'infection, et l'intégration est facilitée par l'absence de membrane nucléaire de l'ovocyte au moment choisi pour réaliser l'infection [7]. Les contraintes inhérentes aux vecteurs rétroviraux font que cette technique, actuellement appliquée à la vache seulement, est peut-être plus intéressante que la microinjection dans les pronoyaux mais moins performante que le protocole mettant en œuvre le transfert de noyau.

La mise en contact direct des spermatozoïdes avec des solutions d'ADN, suivie d'une fécondation *in vitro* ou *in vivo*, n'a conduit qu'à l'obtention d'un très petit nombre d'animaux transgéniques. Plusieurs invertébrés marins, des poissons, des poulets, une vache et un porc transgéniques ont pu être obtenus de cette manière. Dans beaucoup de cas, les gènes intégrés étaient très profondément réarrangés et inexploitable. Il se pourrait qu'une activité DNAsique localisée en périphérie des spermatozoïdes les protège contre une invasion intempestive par des gènes étrangers. Une inhibition de cette enzyme permettrait peut-être à ce procédé d'être utilisable. Une méthode mise au point chez le xénope [8], et étendue très récemment à la souris [9], consiste à perméabiliser préalablement la membrane du spermatozoïde avant de l'incuber en présence d'ADN et de procéder à une fécondation par ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*). L'efficacité du procédé dépend alors du rendement de l'ICSI. La maturation des cellules précurseurs des spermatozoïdes *in vitro*, suivie d'un transfert dans des testicules adoptifs, pourrait en principe permettre une addition ou un remplacement de gènes. Tous ces points ont été décrits dans un article récent [10] et traités dans un congrès

spécialisé dont les présentations ont été publiées dans un numéro récent de la revue *Molecular Reproduction and Development* [11].

Le transfert de gène dans les gamètes végétaux n'est pas opérationnel.

## Le transfert de gène dans les embryons au stade une cellule

Les embryons sont des cellules relativement précieuses, chez les mammifères en particulier. Seules des méthodes permettant un haut rendement d'intégration des gènes étrangers sont donc acceptables dans ce cas.

Chez les mammifères, l'injection de quelques milliers de copies du gène isolé se fait couramment dans les pronoyaux (*figure 2A*). Cette technique perd très nettement de son efficacité chez les gros mammifères, du fait de la rareté relative des embryons et des femelles adoptives, mais aussi du faible taux d'intégration de l'ADN étranger. Pour contourner ces difficultés, les embryons peuvent être obtenus après maturation des ovocytes et fécondation *in vitro*. Après microinjection, les embryons sont cultivés jusqu'au stade blastocyste, ce qui permet une élimination spontanée des embryons non viables et un tri des transgéniques, si l'on a pris soin d'introduire un gène marqueur avec le gène d'intérêt. Ce protocole, qui a fait ses preuves chez la vache, a été presque aussitôt remplacé par la technique mettant en œuvre le transfert de noyau. La microinjection de gènes dans l'embryon de poulet, qui ne peut avoir lieu que dans le cytoplasme car les pronucléus sont invisibles, impose que l'embryon achève son développement après avoir été transféré dans le jaune d'un œuf non fécondé. Ce procédé ne permet que rarement une intégration du gène étranger. Le transposon *Mariner* de la drosophile s'est avéré performant pour obtenir des poulets transgéniques [12].

Chez la plupart des poissons, les embryons sont abondants. Ils sont obtenus naturellement par fécondation *ex vivo* et ils se développent de manière autonome. Ils sont de ce fait protégés par une coque et contiennent une réserve nutritionnelle, ce qui rend la cellule peu accessible.

Des injections de plusieurs millions de copies du gène dans le cytoplasme conduisent à l'obtention d'individus transgéniques en assez grand nombre mais, le plus souvent, fortement mosaïques. Chez certaines espèces comme le poisson zèbre, la microinjection ne permet que très difficilement d'obtenir des individus transgéniques. L'utilisation d'un transposon s'est avéré d'une bonne efficacité [13].

Chez la drosophile, le transposon P est un outil extrêmement performant pour transférer des gènes étrangers [14]. De même, un vecteur dérivé du transposon *piggy Bac* permet d'obtenir des vers à soie transgéniques [15]. Le nématode *Caenorhabditis elegans* peut être rendu transgénique aisément par injection directe d'ADN dans le syncytium de la gonade [16]. Chez les invertébrés marins, diverses techniques incluant la microinjection de gène et la biolistique pratiquée sur des embryons sont mises en œuvre pour obtenir des lignées d'animaux transgéniques [17].

Chez les végétaux, le transfert de gène dans les embryons s'est avéré difficilement praticable et cette approche méthodologique n'est pas, en pratique, utilisée.

## Le transfert de gène par l'intermédiaire de cellules

Les cellules dans lesquelles on a transféré des gènes peuvent être un intermédiaire intéressant pour engendrer des organismes transgéniques. Ceci n'est possible que dans la mesure où les cellules ont la capacité de participer ensuite au développement de l'embryon.

### • La formation de chimères à partir de cellules multipotentes

Les cellules multipotentes ont par essence la capacité de pouvoir participer au développement d'un embryon. Elles peuvent être obtenues à partir de la masse cellulaire d'un blastocyste (cellules ES) ou des cellules primordiales germinales d'un fœtus (cellules EG). Certains marqueurs, comme la phosphatase alcaline, définissent en partie au moins le caractère multipotent. En pratique, des cellules sont considérées comme multipotentes si elles peuvent coloniser une morula ou un blastocyste

**Tableau I.** Les principales étapes dans l'obtention des animaux et des plantes transgéniques.

Date	Espèce	Méthode
1980	Souris	Microinjection
1982	Drosophile	Transposon P
1983	Tabac	Infection avec le plasmide Ti
1985	Lapin, Mouton, Porc	Microinjection
1986	<i>C. elegans</i>	Microinjection
1987	Truite	Microinjection
1988	Tabac	Biolistique dans le noyau
1988	Vache	Microinjection
1989	Souris	Recombinaison homologue dans les cellules ES → chimères
1989	Poulet	Infection par vecteur rétroviral
1990	Tabac	Biolistique dans les chloroplastes
1993	Souris	Transfert de YAC
1997	Souris	Transfert d'un chromosome humain
1997	Poisson zèbre	Transposon TC1 de saumon
1998	Souris	Vecteur épisomal circulaire
1998	Mouton	Transfection de cellules somatiques → embryons par clonage
1999	Xénope, Souris	Incubation des spermatozoïdes avec l'ADN et ICSI
1999	Poulet	Transposon <i>Mariner</i>
1999	Maïs et Tabac	Inactivation de gène par recombinaison homologue
1999	Mouton	Recombinaison homologue dans les cellules somatiques → embryons par clonage
1999	Vache	Infection de l'ovocyte par un vecteur rétroviral
1999	Vers à soie	Transposon <i>piggy-Bac</i>

après y avoir été introduites par microinjection, puis participer au développement de l'embryon et à la formation des gamètes (*figure 2B*). Des cellules fraîchement prélevées sur un embryon ont de telles propriétés. Pour pouvoir participer à une transgénèse, les cellules multipotentes doivent être cultivées pendant des temps suffisamment longs pour que soient sélectionnés les clones qui ont intégré un gène étranger ou dans lequel un gène a été remplacé par recombinaison homologue. Seules quelques lignées de cellules ES de souris permettent d'atteindre ces buts. Des lignées de cellules ES de poulet [18] et plusieurs lignées de cellules EG, notamment de porc [19], sont capables de participer au développement de l'embryon et de donner naissance à des animaux chimériques potentiellement transgéniques. Dans aucun cas toutefois, sauf chez la souris, les cellules multipotentes cultivées ne se sont avérées capables, de manière reproductible, de transmettre leur génotype en participant à la formation des gamètes. Ces échecs répétés viennent de notre méconnaissance de ce qu'est réellement une cellule multipotente, en tout cas une cellule capable de participer à la

genèse de l'ensemble des tissus d'une chimère [20, 21]. Les études dans ce domaine sont poursuivies depuis une dizaine d'année. La possibilité de transférer des gènes par la technique de clonage des embryons a quelque peu réduit l'intérêt d'utiliser les cellules multipotentes et la génération de chimères.

• *L'obtention de clones à partir de cellules différenciées*

Une approche *a priori* plus simple que la production de chimères à partir de cellules multipotentes consiste, en principe, à recréer un embryon et un organisme entier à partir d'une cellule plus ou moins différenciée. Chez les plantes, ce phénomène a été décrit et maîtrisé bien avant que le transfert de gène puisse être envisagé. Des cellules du méristème d'un certain nombre de végétaux peuvent redonner naissance à des plantes entières *in vitro*. Ce procédé, défini il y a un demi-siècle, est très couramment utilisé pour cloner les plantes d'intérêt agronomique ou ornemental. Cette propriété remarquable est à l'origine de la transgénèse chez les plantes. Le transfert du gène étranger peut se faire dans les cellules avant que celles-ci se multi-

plient pour donner une plante entière. Chez les dicotylédones, un vecteur plasmidique dérivé de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* permet de véhiculer un gène étranger jusqu'au génome de la cellule. Chez les monocotylédones, le transfert de gènes est le plus souvent réalisé par biolistique. Ce procédé consiste à projeter à haute vitesse des microbilles métalliques enrobées d'ADN. Ces projectiles traversent la paroi cellulosique et la membrane plasmique et délivrent ainsi leur ADN dans la cellule. Cette opération doit être suivie du tri des cellules qui ont intégré le gène étranger et de la production d'une plante transgénique. Ces deux méthodes sont très intensément utilisées pour procéder à des additions de gènes.

Ce n'est que très récemment que le clonage des animaux à partir de cellules différenciées a pu être obtenu, et avec lui une nouvelle manière de procéder au transfert de gènes. Le clonage par transfert de noyau a été obtenu il y a cinquante ans chez le xénope. Cette méthode a été étendue aux ruminants domestiques il y a environ vingt ans, dans le but d'accélérer le progrès génétique. Le rendement de l'opération est resté trop

Tableau II. Les principales étapes clés des applications de la transgénèse.

Date	Espèce	Application
1985	Lapin, porc, mouton	Croissance (animaux non exploitables)
1985	Souris	t-PA dans le lait
1987	Différentes plantes	Résistance aux insectes
1987	Lapin	$\alpha$ -antitrypsine dans le sang
1988	Tabac, pomme de terre	Albumine humaine
1990	Tabac	Résistance à un herbicide
1990	Mouton	$\alpha$ -antitrypsine dans le lait
1991	Truite	Croissance
1991	Tabac	Vaccin contre l'hépatite B
1994	Porc	Inhibition du complément humain (xénogreffe)
1996	Souris	Anticorps humain par immunisation
1996	Lapin	Modèle d'athérosclérose
1997	Porc	Croissance (animaux exploitables)
1998	Différentes plantes	Anticorps
1999	Riz	Supplémentation en vitamine A et en fer
2000	Chèvre	Mise sur le marché d'antithrombine III humaine

faible pour lui permettre d'avoir un véritable impact dans les élevages. Le clonage ne paraissait par ailleurs possible qu'à partir de cellules embryonnaires fraîches. Il y a environ cinq ans, la méthode a été appliquée de manière plus extensive mais sans véritable modification, pour tenter de simplifier la transgénèse. Des clones de moutons ont été ainsi obtenus à partir de cellules pluripotentes issues de cellules embryonnaires cultivées, puis de cellules fœtales et somatiques différenciées. Cette méthode a été immédiatement mise à profit pour procéder à l'addition de gène. Le gène du facteur IX humain a ainsi pu être transféré à des moutons [22], en utilisant 2,5 fois moins d'animaux que ce qu'exige la microinjection dans les pronoyaux. Cette méthode offre plus de souplesse à l'expérimentateur. Elle permet de choisir le sexe de l'animal donneur de noyaux, de sélectionner des clones cellulaires ne comportant que des gènes étrangers intacts et en nombre de copies limité. Elle permet enfin de faire naître plusieurs animaux génétiquement identiques, et non mosaïques, même à partir de cellules congelées. Des chèvres transgéniques ont été obtenues essentiellement de la même manière [23]. La méthode est actuellement étendue à d'autres espèces et notamment à la vache.

Le remplacement de gène par recombinaison homologue a ensuite été rapidement envisagé, en utilisant également la technique de clonage des

embryons par transfert de noyau. Les expérimentateurs devaient affronter pour cela deux difficultés prévisibles : le faible taux de recombinaison homologue dans les cellules somatiques par rapport aux cellules ES [24], et le nombre limité de cycles de division que peuvent subir les cellules primaires non immortalisées, même fœtales. En dépit de ces difficultés, plusieurs moutons ont pu être obtenus chez lesquels des gènes ont été remplacés [25]. La méthode est actuellement étendue à la chèvre, à la vache, au porc, au lapin, et à la souris. Son efficacité dépend surtout de la maîtrise du clonage que l'on a pu acquérir chez ces animaux. Des porcs transgéniques clonés, très attendus, ont été très récemment obtenus à partir de cellules différenciées. Le remplacement de gène est donc devenu possible chez toutes les espèces chez lesquelles le clonage est lui-même possible.

#### Le transfert de gène dans les organites cellulaires

Deux organites cellulaires, les mitochondries chez les animaux et les chloroplastes chez les plantes sont des cibles pour le transfert de gène. Des fragments d'ADN étranger peuvent être transférés dans des mitochondries isolées, et les mitochondries peuvent être introduites par microinjection dans des cellules hôtes. Ceci peut permettre d'étudier le rôle du génome mitochondrial, en

particulier dans la survenue de certaines maladies humaines [26].

Le transfert de gène dans les chloroplastes présente davantage d'intérêt, pour plusieurs raisons. La première est que le génome chloroplastique contient beaucoup plus de gènes que celui des mitochondries. Il existe par ailleurs 10 000 chloroplastes par cellule, environ. Le transfert de gène dans les chloroplastes est possible, et les plantes qui en résultent sont qualifiées de transplastomiques. L'ADN étranger peut être introduit par biolistique, par une transfection à l'aide du polyéthylène glycol ou par un système particulier de microinjection [27, 28]. L'ADN étranger peut s'incorporer dans le génome chloroplastique par recombinaison homologue. Outre l'étude du génome chloroplastique, le transfert de gène ainsi pratiqué permet une expression très intense des transgènes, jusqu'à 100 fois plus que celle obtenue avec le même gène incorporé dans le génome principal. Ce fait est évidemment dû essentiellement au grand nombre de chloroplastes que contient chaque cellule. Les chloroplastes, comme les mitochondries, sont par ailleurs d'origine maternelle. Le pollen ne transmet donc pas le gène étranger incorporé dans les chloroplastes. Ceci offre une sécurité très élevée pour l'environnement, quoique celle-ci ne soit pas totale dans la mesure où quelques chloroplastes paternels se retrouvent parfois dans le zygote, comme c'est le cas pour quelques mitochondries.

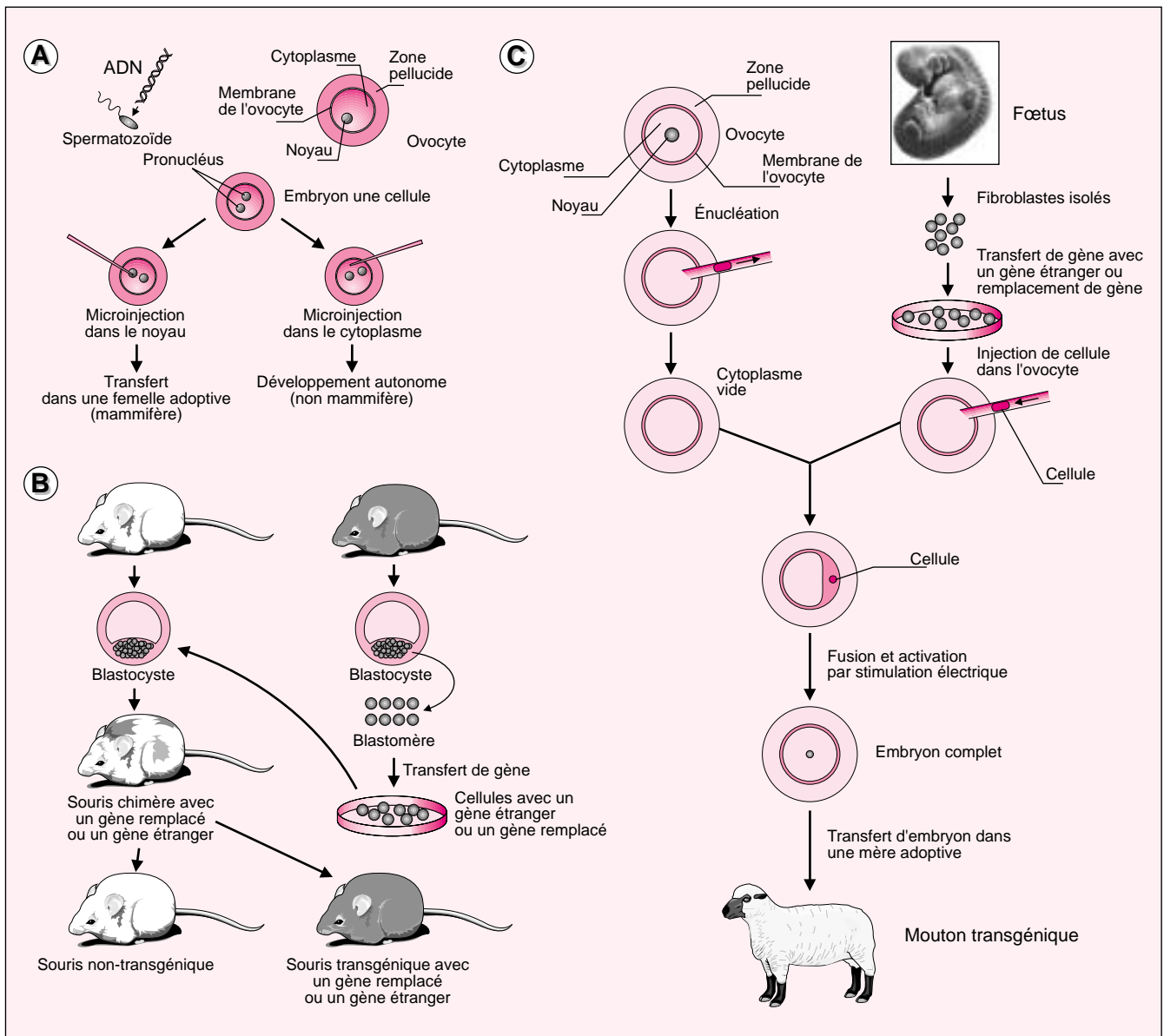


Figure 2. **A. Méthodes de transfert de gène dans les gamètes et les embryons.** L'ADN peut être introduit dans le spermatozoïde par contact direct mais surtout après altération de la membrane plasmique. Dans ce deuxième cas, la fécondation doit être réalisée par ICSI. Des vecteurs rétroviraux peuvent apporter un gène étranger dans le génome des ovocytes après introduction de particules infectieuses entre la zone pellucide et la membrane plasmique. Chez les mammifères, la microinjection de quelques milliers de copies du gène isolé dans un des pronucléus conduit à l'établissement de lignées transgéniques. Chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés, les pronucléus ne sont pas accessibles. L'injection de plusieurs millions de copies du gène doit avoir lieu dans le cytoplasme.

**B. Transfert de gène via les cellules ES et formation d'embryons chimères.** Cette technique, surtout utilisée depuis plus de dix ans pour inactiver des gènes cellulaires, ne peut pas être exploitée chez d'autres espèces, car la transmission à la descendance de la mutation provoquée dans les cellules ES n'a pratiquement jamais lieu.

**C. Transfert de gène via la technique de clonage.** Des cellules foetales sont transfectées avec des gènes étrangers pour procéder à une addition ou un remplacement de gène. Les cellules sélectionnées sont ensuite utilisées pour engendrer des animaux clonés transgéniques. Cette technique permet de procéder plus simplement à une addition de gène, surtout chez les animaux peu prolifiques. C'est la seule technique disponible actuellement pour obtenir un remplacement de gène par recombinaison homologue chez les espèces autres que la souris.

## Le transfert de gène à l'aide de vecteurs épisomiques

Les vecteurs capables de se répliquer de manière indépendante du génome principale offrent des avantages théoriques très importants. L'utilisation intense des plasmides, des phages, des cosmides, des BAC et de YAC dans les bactéries et les levures est là pour le prouver. De tels vecteurs sont en principe transférés et transmis avec une efficacité maximale. L'obtention d'animaux ou de plantes transgéniques deviendrait aisée avec ces outils. Les vecteurs épisomiques sont par ailleurs souvent présents sous forme de plusieurs copies indépendantes dans les cellules. Les gènes insérés dans les vecteurs épisomiques ne subissent pas l'influence d'éléments de la chromatine puisqu'ils n'en font pas partie. Ils ne sont donc soumis qu'à l'action limitée des composants du vecteur. Il y a par ailleurs de bonnes chances que ces effets soient évaluables avec fiabilité dans des cellules en culture, et transposables à l'échelle d'un organisme entier.

La recherche de vecteurs épisomiques est poursuivie entre autres afin d'optimiser la thérapie génique. Il serait extrêmement confortable, pour la thérapie génique comme pour la transgénèse, de pouvoir disposer de vecteurs stables, autorépliqués, transmis et bien actifs dès lors qu'ils ont été introduits dans une cellule.

Un vecteur épisomique linéaire doit comprendre au minimum une origine de répllication de l'ADN, un centromère et des télomères. Des vecteurs appelés HAC (*human artificial chromosomes*) contiennent de tels éléments prélevés sur des chromosomes humains. Ces vecteurs sont d'un maniement difficile en raison de leur grande taille [29].

Un vecteur épisomique circulaire n'a pas besoin de télomère. La construction logique de tels vecteurs n'est actuellement pas possible, car les origines de répllication des génomes végétaux et animaux ne sont définies que de manière imprécise. Cela tient au fait que ces origines de répllication sont réparties sur des fragments d'ADN pouvant atteindre plusieurs kb sans séquences consensus bien repérables. Les centromères cellulaires ont par ailleurs une taille qui les rend

peu maniables. Des régions chromosomiques relativement courtes, ainsi que des éléments de vecteurs viraux, ont une certaine capacité à autorepliquer un ADN circulaire dans les cellules animales. Une combinaison de tels éléments a permis d'obtenir un vecteur épisomique navette, capable de s'implanter chez des souris avec une très haute efficacité, d'être de nouveau transférable ensuite à des bactéries puis à des embryons de porcs et encore une fois à des bactéries [30]. Ce vecteur est toutefois instable chez la souris et ce d'autant plus qu'il contient des gènes étrangers.

Un certain nombre de virus, et notamment les herpès, se maintiennent à l'état latent dans le noyau sous forme circulaire. Des éléments du génome du virus d'Epstein Barr (EBV) nécessaires au maintien du génome viral ont été identifiés. Ces éléments sont une origine de répllication et une région d'ADN capable de fixer la protéine EBNA1, elle-même codée par le génome viral. La protéine EBNA1 se fixe à l'ADN viral, et également à des protéines nucléaires. Cet ensemble joue donc le rôle de pseudocentromère, de manière relativement peu spécifique. L'origine de répllication du virus EBV n'est en revanche fonctionnelle que dans des cellules de primates. La recherche systématique de séquences du génome humain susceptibles de contenir des origines de répllication chromosomiques et capables de compléter le système du virus EBV a été réalisée par plusieurs laboratoires. Elle a conduit à identifier des fragments de chromosome humain dont l'un permet, associé au vecteur épisomique dérivé du virus EBV, un maintien de l'ensemble non seulement dans des cellules humaines, mais également dans des cellules murines et chez des souris transgéniques [31]. Il est vraisemblable, mais non prouvé, que les fragments de génome humain ont apporté une origine de répllication tandis que le système EBV assure le transfert du vecteur dans les cellules filles par son pseudocentromère.

La mise au point de tels vecteurs est d'une grande importance pour la transgénèse comme pour la thérapie génique. Ils représentent par ailleurs un outil potentiellement très intéressant pour les biologistes. Relativement peu de recherches sont toutefois

effectuées dans ce domaine, sans doute en raison des risques d'échec nombreux qu'il comporte. Ces vecteurs comportent des risques qui peuvent être maîtrisés. Ils sont, à l'origine, également des plasmides bactériens, et sont donc susceptibles de se disséminer de manière sournoise en passant des cellules animales aux cellules bactériennes, en particulier celles du tube digestif, et réciproquement. La simple délétion de l'origine de répllication bactérienne des vecteurs, avant de les transférer dans des cellules eucaryotes, doit suffire à supprimer tout risque.

## L'expression des transgènes

De manière paradoxale, alors que ce problème s'est posé dès les premières expériences de transgénèse chez la souris puisque le gène de globine transféré est resté inactif, le nombre d'études sur cette question est relativement limité. Ceci tient au fait que les utilisateurs de la transgénèse ont rapidement remporté des succès suffisants pour ne pas perfectionner un outil par essence très complexe. Les expérimentateurs utilisant des souris transgéniques ne souhaitent souvent qu'exprimer un gène étranger de manière relativement modeste pour en évaluer les effets. Les constructions de gène peu sophistiquées suffisent souvent pour obtenir 10 000 à 50 000 molécules de protéine recombinante par cellule. L'obtention de plusieurs lignées de souris transgéniques suffit donc généralement pour atteindre ce but. Les lignées ne répondant pas au problème sont tout simplement éliminées, sans que soient étudiées les causes du dysfonctionnement du transgène.

La situation est encore plus nette dans le domaine végétal. La relative facilité qu'il y a à obtenir des plantes transgéniques a permis très rapidement aux industriels de s'emparer des techniques sans chercher à les perfectionner. Plusieurs raisons indépendantes ont toutefois incité à étudier l'expression des transgènes de manière systématique. Les expérimentateurs se contentent de moins en moins de transgènes dont l'expression et les effets biologiques sont imprévisibles et ininterprétables. L'obtention de

gros animaux transgéniques, qui est coûteuse, ne peut pas avoir pour stratégie unique d'engendrer un grand nombre de lignées pour ne retenir que les meilleures. Les groupes, notamment industriels, qui souhaitent exprimer des transgènes à un très haut niveau ne peuvent se satisfaire de l'imprévisible.

Après de nombreuses observations, un certain nombre de règles plus ou moins empiriques ont fini par émerger. Un gène étranger ajouté à un génome fonctionne d'autant moins bien qu'il contient plus de séquences d'ADN d'origine non eucaryote, qu'il est intégré sous forme de multicopies et qu'il est plus proche des centromères ou des télomères de son hôte. Il est par ailleurs impossible de prévoir de manière fiable le fonctionnement d'une construction de gène devenue transgène à partir des données obtenues à l'aide de cellules transfectées. L'expérience montre qu'il est judicieux de faire une distinction entre la faculté intrinsèque qu'a une construction de transcrire un gène et son efficacité à l'état de transgène. La première propriété peut être évaluée à l'aide de cellules et la seconde ne peut l'être qu'*in vivo*, ce qui complique et ralentit considérablement les expérimentations.

### **L'influence de la région transcrite des transgènes**

Diverses études ont démontré qu'un intron au moins devait accompagner un ADNc dans un transgène. Un seul intron placé devant l'ADNc peut suffire [32, 33]. Les introns ne sont pas équivalents en raison des signaux d'épissage plus ou moins proches des séquences consensus qu'ils contiennent [34]. Les introns, et essentiellement les plus proches du site d'initiation de la transcription, contiennent souvent des sites de fixation pour des facteurs de transcription. Ceux-ci participent donc à l'ouverture de la chromatine de part et d'autre du site d'initiation de la transcription et au contrôle de la transcription. Des éléments capables de fixer des facteurs de transcription peuvent être ajoutés à l'intérieur des introns. De tels éléments peuvent très notablement stimuler l'expression des transgènes [33].

L'épissage alternatif des exons pour former l'ARNm mûr est un phénomène fréquent qui permet de synthétiser des protéines différentes à partir d'un même gène. La construction de gène apporte de multiples signaux inconnus, dont certains induisent des épissages intempestifs qui conduisent à la synthèse de protéines tronquées. Des logiciels permettent d'identifier les sites cryptiques d'épissage des ADNc susceptibles d'interagir avec les signaux des introns qui les précèdent ou les suivent. Cela ne permet pas de prévoir si les épissages indésirables auront lieu ou non. La nature et l'état physiologique des cellules contrôlent en effet ces phénomènes. Ainsi, le gène de l'hormone de croissance humaine associé au promoteur du gène WAP (*whey acidic protein*) de souris conduit à la synthèse d'ARNm fonctionnel dans la glande mammaire de souris et de porc, mais à un ARNm tronqué chez le lapin transgénique [35]. L'empirisme reste donc en partie la règle dans ce domaine. Un des rôles des introns est de permettre à l'ARNm mature d'être transporté dans le cytoplasme. Un certain nombre de gènes n'ont pas d'intron et sont pourtant bien exprimés. Certains ARNm contiennent une séquence qui favorise leur passage dans le cytoplasme [36]. Le rôle éventuel de telles séquences dans l'expression des transgènes ne semble pas avoir été évalué.

Les régions 5'UTR (*untranslated region*) des gènes contiennent parfois des éléments régulateurs de la traduction et notamment des IRES (*internal ribosome entry site*). L'addition d'IRES peut favoriser la traduction des ARNm dans certains cas [37]. En règle générale, les régions 5'UTR doivent être peu structurées, et donc être riches en AU plutôt qu'en GC.

Le codon initiateur doit de préférence se trouver dans la séquence consensus GCCA/GCCAUGG définie par M. Kozak [38].

L'addition d'un peptide signal est nécessaire si l'on veut qu'une protéine qui n'est pas naturellement sécrétée le soit.

Chaque groupe d'espèces vivantes utilise préférentiellement certains codons plutôt que d'autres [39]. Des mutations des codons permettant de se conformer à l'usage de la cellule

qui décrypte l'ARNm peuvent améliorer considérablement l'expression des transgènes. L'élimination des séquences CpG des ARNm est également souhaitable. Ces structures, abondantes notamment dans certains gènes procaryotes, sont autant de sites de méthylation qui peuvent contribuer à inactiver le transgène. Les séquences CpG sont particulièrement inhibitrices lorsqu'elles sont situées dans la région promotrice des transgènes.

Les IRES sont connues pour permettre la traduction du deuxième cistron des ARNm bicistroniques. Il semble que ces structures soient essentiellement des stimulateurs de la traduction plutôt que des éléments capables de recruter *de novo* des ribosomes. Quoiqu'il en soit, les IRES n'ont pas toutes la même efficacité. Il est par ailleurs nettement préférable de placer les IRES à environ 80-100 nucléotides après le codon de terminaison du premier cistron [37]. Il faut par ailleurs considérer le fait que les ARNm bicistroniques sont souvent nettement moins bien exprimés, notamment le second cistron, que les ARNm monocistroniques. En fonction du problème à résoudre, il peut être intéressant de préparer des gènes bicistroniques, ou au contraire de faire exprimer deux gènes complets indépendants associés au préalable dans une seule construction ou plus simplement coinjectés.

Les régions 3'UTR des ARNm contiennent parfois des séquences qui contrôlent leur stabilité. Il peut donc être avantageux de les retirer ou au contraire d'en ajouter dans les constructions de gène.

Les terminateurs de la transcription ne sont pas tous équivalents. L'expérience montre que ceux provenant des gènes d'hormone de croissance humaine ou bovine, du gène de la  $\beta$ -globine et de quelques autres sont généralement fiables.

Une solution qui s'avère parfois satisfaisante consiste à introduire un ADNc à l'intérieur d'un gène et notamment du gène correspondant. L'ADNc peut se retrouver ainsi entouré des meilleurs éléments régulateurs du gène. Cette approche n'est malheureusement en rien généralisable tant sont complexes les interférences des signaux en partie inconnus que recèlent les gènes.



### L'influence des régions entourant la partie transcrite

L'essentiel des éléments qui contrôlent l'expression des gènes se situent en amont du site d'initiation de la transcription (figure 3). Il est de plus en plus admis que ces éléments comprennent le promoteur proprement dit, situé au voisinage immédiat du site d'initiation de la transcription. C'est cette région qui participe directement à la formation du complexe de transcription. Sa puissance dépend des éléments qui la composent. Des régions distales ou très éloignées constituent ce que l'on nomme globalement des amplificateurs. Il apparaît de plus en plus que les amplificateurs ne règlent pas tant l'intensité de l'expression des gènes que sa fréquence. Il semble qu'un complexe d'initiation de la transcription se forme et se disloque de manière alternative. Les amplificateurs ont surtout pour rôle de stabiliser ces complexes, ce qui se traduit globalement par un niveau élevé de transcription.

Les transgènes sont généralement bien exprimés lorsque de longs fragments d'ADN génomique obtenus à partir de banques de BAC ou de YAC sont utilisés. L'expression d'un transgène est considérée comme satisfaisante lorsque celui-ci est actif dans toutes les lignées d'animaux ou de plantes transgéniques, qu'il ne s'exprime que dans les cellules dans lesquelles le promoteur est naturellement actif et que son niveau d'expression est dépendant du nombre de

copies intégrées. Les grands fragments d'ADN possèdent souvent toutes ces propriétés. Cette approche est possible si l'on souhaite exprimer un gène dans son état natif. Il est en principe possible mais laborieux d'insérer une construction de gène à l'intérieur d'un vecteur BAC ou YAC qui s'est avéré bien exprimé à l'état de transgène. Le succès de cette approche n'est toutefois pas, assuré [40]. Une autre possibilité peut consister à insérer le gène étranger à l'intérieur d'un gène de l'hôte par recombinaison homologue, soit directement soit par l'intermédiaire d'un site loxP préalablement intégré dans ce site [41]. Le succès ne peut, là non plus, être assuré dans tous les cas.

Des travaux menés avec quelques gènes, notamment ceux du locus de la  $\beta$ -globine de mammifères et de poulet, du gène du lysozyme de poulet et du gène du récepteur TCR, ont conduit à établir un certain nombre de notions sur le rôle des régions régulatrices distales des gènes. Les régions situées de part et d'autre du gène du lysozyme de poulet sont indispensables pour obtenir un fonctionnement satisfaisant des transgènes associés. Ces régions contiennent divers éléments dont des MAR (*matrix attached region*). Les MAR sont des séquences le plus souvent riches en AT, qui se lient à la matrice nucléaire sur laquelle sont concentrés des facteurs de transcription. Les MAR induisent une activité topoisomérase censée favoriser l'ouverture de la chromatine. Les MAR ont été qualifiées d'isolateurs. Il est en

effet généralement admis que si un transgène s'exprime dans des tissus dans lesquels il devrait rester silencieux, et s'il n'est pas fonctionnel, c'est qu'il subit dans son site d'intégration l'influence des régions voisines de la chromatine. Cette interprétation contient sans doute une part de vérité mais ne saurait expliquer tous les faits que l'on observe. Il est ainsi peu vraisemblable qu'un transgène contrôlé par le promoteur du gène *EF1 $\alpha$*  humain soit peu ou pas exprimé dans 6 lignées d'animaux transgéniques sur 6 [42].

Les effets bénéfiques des régions contenant des MAR ont donc été attribués initialement aux MAR elles-mêmes jusqu'à ce qu'une étude systématique révèle qu'ils étaient dus à d'autres régions voisines [43].

La notion de LCR (*locus control region*) s'est progressivement imposée. Les LCR sont des régions qui bordent des gènes ou des groupes de gènes et qui leur permettent d'être exprimés à un niveau intense et spécifique. Les LCR sont des régions qui contiennent des sites hypersensibles à la DNase1, plus ou moins spécifiques de types cellulaires. Elles sont pour cette raison considérées comme des ouvreurs de chromatine, permettant aux gènes et aux transgènes associés d'être accessibles aux divers facteurs qui assurent la transcription. Le LCR du locus de la  $\beta$ -globine joue ce rôle vis-à-vis des gènes du locus.

L'effet bénéfique des régions régulatrices distales des gènes est également supposé provenir de l'action d'isola-

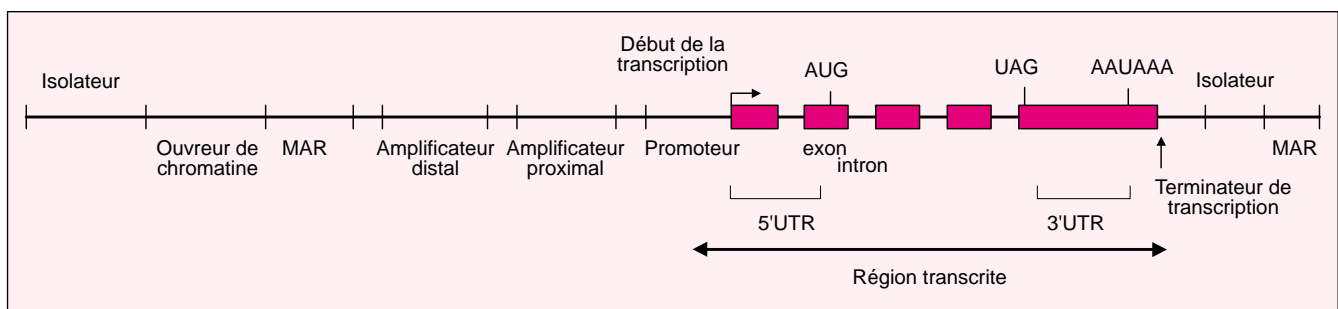


Figure 3. **Structure consensus d'un gène.** Sous sa forme native comprenant de longues séquences flanquant la région transcrite, un gène est en général bien exprimé sous forme de transgène. Les constructions de gène classiques contiennent souvent des ADNc plutôt que des gènes natifs et ne comportent que des séquences génomiques relativement courtes. Les régions qualifiées d'isolatrices permettent d'empêcher la chromatine de se refermer au niveau du transgène souvent reconnu comme étranger par la cellule. Les isolateurs qui comprennent des éléments variés permettent souvent une expression fiable et spécifique des transgènes. Les autres éléments des gènes (amplificateurs, introns, régions non traduites) contribuent également à l'expression des transgènes. MAR: matrix associated regions.

teurs des gènes. Cette notion est bien établie chez la levure et chez la drosophile [44]. Un tel isolateur a été identifié dans la région 5'HS4 du LCR du locus de la  $\beta$ -globine de poulet [45]. Cette région n'est pas, à proprement parler, un stimulateur de la transcription. Elle permet d'annuler les effets stimulants d'un amplificateur lorsqu'elle est placée entre cet amplificateur et un promoteur [45]. La région 5'HS4 maintient la chromatine ouverte au niveau du gène associé en favorisant l'acétylation des histones et en s'opposant à la méthylation de l'ADN [46]. Elle permet à des transgènes exprimés dans le foie [47], dans l'ensemble des tissus [42] ou dans la cellule mammaire [48] d'être exprimés de manière intense et fiable. Les effets de séquences comme la région 5'HS4 sont donc assez bien décrits [49, 50] mais leur mécanisme d'action n'est pas encore compris : il est difficile de faire une distinction claire entre un effet positif qui maintiendrait la chromatine ouverte et une action inhibitrice qui s'opposerait à l'extinction du transgène par la chromatine [51]. L'intervention du facteur CTCF, qui se lie à une séquence spécifique de l'ADN, joue un rôle essentiel dans l'effet isolateur et également, de manière intéressante, dans le contrôle des gènes soumis à l'empreinte génétique [52].

Des faits accumulés ces dernières années tendent à montrer que l'extinction des transgènes est due aux transgènes eux-mêmes. Selon leur structure, les transgènes semblent être reconnus par la cellule comme des éléments étrangers indésirables. Celle-ci, ne pouvant se débarrasser aisément des intrus, met en œuvre des mécanismes qui vont les inactiver. Il est vraisemblable que les mécanismes mis en jeu sont également ceux qui inactivent les transposons et les rétrovirus [53, 54]. Un fait particulièrement démonstratif est venu étayer une telle hypothèse. Un transgène bordé par la séquence loxP et intégré sous la forme d'un concatémère de 100 copies n'est pas exprimé chez la souris. La réduction du nombre de copies à un par l'enzyme Cre, qui recombine les séquences loxP, se traduit par une activation du transgène [55, 56]. L'inactivation partielle ou totale du transgène, qui se

traduit par une expression bigarrée ou nulle, est donc due pour une grande part au transgène lui-même. Ces effets sont neutralisés par les longues séquences d'ADN génomique qui entourent les gènes, ou par des régions identifiées jouant le rôle d'ouvriers de chromatine et/ou d'isolateurs [57]. Une meilleure connaissance de ces éléments devrait progressivement conduire à la construction de vecteurs d'expression compacts et fiables.

L'expression ectopique des transgènes est généralement considérée comme résultant de l'effet activateur des amplificateurs des gènes voisins. Il est vraisemblable alors que les isolateurs réduisent ces effets. Il ne peut être exclu que les faibles expressions anormales des transgènes soient dues à une transcription cryptique à bas bruit, dans la région du génome dans laquelle s'est intégré le gène étranger [58, 59]. Ce phénomène a été très rarement étudié. Il pourrait avoir des conséquences importantes pour l'expression des transgènes. Il est en effet désormais admis que des ARN double-brins, ayant une longueur d'au moins 500 bp pour chaque brin, peuvent induire une extinction du gène correspondant (*voir plus loin*). La transcription des deux brins d'un transgène pourrait dans certains cas conduire à son inactivation.

### Les vecteurs particuliers pour l'expression des transgènes

La recombinaison homologue est très largement utilisée chez la souris pour inactiver spécifiquement des gènes [1]. Elle peut *a priori* être appliquée aux espèces chez lesquelles le clonage par transfert de noyau est maîtrisé.

Le remplacement de gène n'est en pratique pas possible chez les végétaux dans la mesure où la recombinaison homologue est un phénomène particulièrement peu fréquent. Une recombinaison homologue a toutefois été observée chez *Aspergillus awamori* à l'aide du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* [60]. La recombinaison homologue classique, pratiquée dans les cellules animales à l'aide de relativement longs fragments d'ADN [1], n'est donc en pratique pas possible chez les plantes. Le cli-vage ponctuel de l'ADN cellulaire

provoqué expérimentalement induit le système de réparation, ce qui augmente la fréquence de recombinaison homologue. Ceci ne suffit toutefois pas pour envisager aisément la recombinaison homologue chez les végétaux.

Des études menées depuis plusieurs années ont révélé que des structures mixtes composées de ribo- et de désoxyribo-nucléotides ont une capacité particulièrement élevée de se recombinaison spécifiquement avec l'ADN cellulaire. Ces structures appelées RDO (*ribo-deoxyribo-oligonucleotides*) ont ainsi été capables de muter très spécifiquement le gène de la  $\beta$ -globine, le gène du facteur IX, le gène de la tyrosinase et quelques autres. Bien que non totalement maîtrisée, cette technique paraît très séduisante. Il ne semble toutefois pas qu'une recombinaison homologue ait pu être observée après les microinjections de RDO dans des embryons de mammifères. Des travaux encore peu nombreux mais convaincants indiquent que les RDO peuvent induire une recombinaison homologue chez les végétaux [61]. Ce procédé ouvre des perspectives particulièrement intéressantes. Il faut toutefois noter qu'avec cet outil, la recombinaison homologue ne porte que sur une très courte séquence de quelques nucléotides seulement. La méthode ne permet donc que des inactivations de gène, et plus généralement des mutations ponctuelles.

L'utilisation du système bactérien RecA permet à un simple brin d'ADN de muter spécifiquement une région correspondante par recombinaison homologue. Ce procédé peut virtuellement être appliqué pour la mutation spécifique de gène chez une plante ou chez un animal [62].

L'inactivation de transgène peut se faire autrement qu'en le mutant par recombinaison. Des ARN ou des oligonucléotides formant des triple-hélices avec des régions oligopyrimidiques de l'ADN, s'opposent à la transcription du gène [63, 64]. Les ARN antisens simple brins et les ribozymes peuvent également, dans certains cas, arrêter l'expression des transgènes en inactivant leurs ARNm [63].

Une notion nouvelle particulièrement intéressante va peut-être fournir de nouveaux outils pour inactiver spéci-

fiquement les ARNm. Il est maintenant bien établi que certains transgènes s'inactivent progressivement, ou inactivent des gènes qui comportent des séquences homologues, par un processus appelé cosuppression [65, 66]. De manière quelque peu inattendue, cet effet se propage chez les plantes dans l'ensemble de l'organisme [67]. Les mécanismes mis en jeu ne sont encore que partiellement connus. Ils mettent en œuvre des ARN double-brins qui induisent une destruction sélective de l'ARNm correspondant et, dans certains cas, une inactivation des gènes en grande partie due à leur méthylation [53, 54]. Chez les animaux, ce phénomène a été observé chez *C. elegans* et chez la drosophile, mais aussi chez le poisson medaka et même chez la souris [68]. La synthèse d'ARN double brin contenant deux éléments de 500 bases en position inverse grâce à l'effet d'un transgène est particulièrement aisée. Ce mécanisme, qui pourrait être un élément naturel important de la régulation de l'expression génétique, pourrait devenir un outil remarquable pour le contrôle expérimental des gènes. Il reste à vérifier que la présence d'ARN double brin n'induit pas la formation d'interféron et l'apoptose des cellules.

L'inactivation des effets d'un gène peut enfin s'exercer au niveau des protéines par la surexpression d'un transdominant négatif. Un analogue du facteur de transcription NF- $\kappa$ B peut ainsi inactiver l'action de cette protéine dans certaines cellules seulement, sans compromettre la vie de l'animal [69].

Plusieurs systèmes permettant le contrôle des transgènes par des agents exogènes n'agissant pas du tout sur les gènes endogènes ont été décrits [3]. Le plus utilisé d'entre eux repose sur le contrôle des transgènes par la tétracycline et ses dérivés. Dans sa version originale, ce système comporte au moins un inconvénient. L'expression basale en absence de l'inducteur est relativement élevée. Un système plus sophistiqué, mettant en œuvre non seulement un gène activateur mais également un gène inhibiteur agissant alternativement, permet un contrôle plus strict des transgènes par la tétracycline [70, 71]. Chez les plantes, un système inductible par l'éthanol pourrait

s'avérer exploitable à l'échelle agromique [72]. Ce système tétracycline est fonctionnel dans certaines plantes comme le tabac, tandis qu'un autre fondé sur l'utilisation des glucocorticoïdes comme inducteur est efficace dans d'autres.

## Conclusions

Malgré ses imperfections, la transgénèse est déjà un outil très exploité par les biologistes et de plus en plus par les biotechnologistes. Les uns et les autres souhaitent une amélioration de certaines de ces techniques. Les oiseaux transgéniques demeurent encore peu utilisés tant le transfert de gène reste difficile chez ces espèces. Quelques espèces candidates pour la transgénèse n'ont encore fait l'objet que d'un nombre d'études limité. Ces espèces présentent pour la plupart un intérêt plus biotechnologique que fondamental. En ce qui concerne les animaux, les modèles pour l'étude des fonctions biologiques et des gènes vont vraisemblablement continuer à être la souris, la drosophile, *Caenorhabditis elegans* et le medaka, auxquels devrait s'adjoindre le poulet. D'autres espèces comme le rat, le lapin et le porc sont nécessaires pour certaines études particulières. Chez les plantes, l'arabidopsis et le tabac vont continuer à être très sollicités pour des études impliquant la transgénèse.

De nombreuses applications de la transgénèse sont déjà en cours. Elles ne peuvent que s'amplifier. Elles seront d'autant mieux acceptées que les outils mis en œuvre seront plus précis et plus fiables ■

## RÉFÉRENCES

1. Babinet C, Cohen-Tannoudji M. Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris: une révolution dans l'approche génétique de la biologie des mammifères. *Med Sci* 2000; 16: 31-42.
2. Houdebine LM. *Transgenic animals: generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publisher, 1997.
3. Houdebine LM. *Les animaux transgéniques*. Collection Génie génétique. Paris: Tec et Doc Lavoisier, 1998.
4. Houdebine LM. Les biotechnologies animales. *Cahiers Agricultures* 1998; 7: 427-565.

5. Organismes génétiquement modifiés à l'INRA. *Environnement, agriculture et alimentation*. Paris: INRA, 1998.

6. The plants revolution. *Science* 1999; 285: 367-89.

7. Chan AWS, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC, Bremel RD. Transgenic cattle produce reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14028-33.

8. Marsh-Armstrong N, Huang H, Berry DL, Brown DD. Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14389-93.

9. Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999; 284: 1180-3.

10. Auvray P, Guillaudoux T, Jégou B. Le spermatozoïde transgénique: une piste de recherche féconde? *Med Sci* 2000; 16: 102-4.

11. Baccetti B, Spadafora C. Conclusions. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 329-30.

12. Sherman A, Dawson A, Mather C, et al. Transposition of the *Drosophila* element mariner into the chicken germ line. *Nat Biotech* 1998; 16: 1050-3.

13. Hackett PB, Izsvak Z, Ivics Z, CaldoVIC L. Development of genetic tools for transgenic fish. *Transgenic Animal Research Conference*. Tahoe City USA, 1997: 26.

14. Kayser K. Gene transfer in *Drosophila melanogaster*. In: Houdebine LM, ed. *Transgenic animals: generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 133-7.

15. Tamura T, Thibert C, Royer C, et al. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotech* 1999; 18: 81-4.

16. Thierry-Mieg D, Naert K, Bonnerot C. Genetic transformation on *Caenorhabditis elegans*. In: Houdebine LM, ed. *Transgenic animal: generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 137-51.

17. Miahle E, Boulo V, Cadoret JP, et al. Gene transfer technology in marine invertebrates. In: Houdebine LM, ed. *Transgenic animals: generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 151-7.

18. Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenic potentialities. *Development* 1996; 122: 2339-48.

19. Mueller S, Prella K, Rieger N, et al. Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 1999; 54: 244-54

20. Fléchon JE What are ES cells? In: Houdebine LM, ed. *Transgenic animals: generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 157-66.

**RÉFÉRENCES**

21. McLaren A. Establishment of the germ cell lineage in mammals. *J Cell Physiol* 2000 ; 182: 141-3.
22. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997 ; 278: 2131-3.
23. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotech* 1999 ; 17: 456-61.
24. Sedivy JM. Gene targeting and somatic cell genetics a rebirth or a coming of age? *Trends Genet* 1999 ; 15: 88-90.
25. Ayares D. Gene targeting in livestock. *Transgenic Res* 1999 ; 8: 469-70.
26. Irwin MH, Johnson LW, Pinkert CA. Isolation and microinjection of somatic cell-derived mitochondria and germline heteroplasmy in transmitochondrial mice. *Transgenic Res* 1999 ; 8: 119-23.
27. Bilang R, Potrykus I. Containing excitement over transplastomic plants. *Nat Biotech* 1998 ; 16: 333-4.
28. Daniell H. New tools for chloroplast genetic engineering. *Nat Biotech* 1999 ; 17: 855-6.
29. Vos JH. Mammalian artificial chromosomes as tools for gene therapy. *Curr Opin Genet Dev* 1998 ; 8: 351-9.
30. Attal J, Stinnakre MG, Théron MC, Terqui M, Houdebine LM. The use of episomal vectors for transgenesis. In: Houdebine LM, ed. *Transgenic animals: generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 251-5.
31. Kelleher ZT, Fu H, Livanos E, Wendelburg B, Gulino S, Vos JM. Epstein-barr-based episomal chromosomes shuttle 100 kb of self-replicating circular human DNA in mouse cells. *Nat Biotech* 1998 ; 16: 762-8.
32. Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, Allen DD, Brinster RL. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88: 478-82.
33. Petitclerc D, Attal J, Théron MC, et al. The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice. *J Biotechnol* 1995 ; 40: 169-78.
34. Horowitz DS, Krainer AR. Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet* 1994 ; 10: 100-6.
35. Aigner B, Pambalk K, Reichart U, et al. Species specific alternative splicing of transgenic RNA in the mammary glands of pigs, rabbits and mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 257: 843-50.
36. Cullen BR. Connections between the processing and nuclear export of mRNA: evidence for an export license? *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97: 4-6.
37. Houdebine LM, Attal J. Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. *Transgenic Res* 1999 ; 8: 157-77.
38. Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 1991 ; 266: 19867-70.
39. Fox TD. Natural variation in the genetic code. *Ann Rev Genet* 1987 ; 21: 67-91.
40. Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R, et al. High-level expressing YAC vector for transgenic animal bioreactors. *Mol Reprod Dev* 1999 ; 52: 414-20.
41. Kolb AF, Ansell R, McWhir J, Siddell SG. Insertion of a foreign gene into the b-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene* 1999 ; 227: 21-31.
42. Taboit-Dameron F, Malassagne B, Viglietta C, et al. Association of the 5'HS4 sequence of the chicken beta-globin locus control region with human EF1 alpha gene promoter induces ubiquitous and high expression of human CD55 and CD59 cDNAs in transgenic rabbits. *Transgenic Res* 1999 ; 8: 223-35.
43. Sippel AE, Saueressig H, Huber MC, Faust N, Bonifer C. Insulation of transgenes from chromosomal position effects. In: Houdebine LM, ed. *Transgenic animals: generation and use*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 257-65.
44. Dorsett D. Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Curr Opin Gene Dev* 1999 ; 9: 505-14.
45. Recillas-Targa F, Bell AC, Felsenfeld G. Positional enhancer-blocking activity of the chicken b-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96: 14354-9.
46. Pinkaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* 1998 ; 12: 2852-62.
47. Wang Y, DeMayo FJ, Tsai SY, O'Malley BW. Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat Biotech* 1996 ; 15: 239-43.
48. Echelard Y. *Increasing efficiency of transgenesis. Genetically engineering and cloning animals*. Deer Valley, Utah USA, 1998.
49. Walters MC, Magis W, Fiering S, et al. Transcriptional enhancers act in cis to suppress position-effect variegation. *Genes Dev* 1996 ; 10: 185-95.
50. Bonifer C. Long-distance chromatin mechanisms controlling tissue-specific gene locus activation. *Gene* 1999 ; 238: 277-89.
51. Bell AC, Felsenfeld G. Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr Opin Gene Dev* 1999 ; 9: 191-8.
52. Reik W, Murrell A. Silence across the border. *Nature* 2000 ; 405: 408-9.
53. Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 1999 ; 15: 358-63.
54. Boshier JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2: E31-6.
55. Dorer DR. Do transgene arrays form heterochromatin in vertebrates? *Transgenic Res* 1997 ; 6: 3-10.
56. Garrick D, Fiering S, Martin DIK, White-law E. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* 1998 ; 18: 56-9.
57. Santoso B, Ortiz BD, Winoto A. Control of organ-specific demethylation by an element of the T-cell receptor locus's control region. *J Biol Chem* 2000 ; 275: 1952-8.
58. Ashe HJ, Monks J, Wijgerde M, Fraser P, Proudfoot NJ. Intergenic transcription and transinduction of the human b-globin locus. *Genes Dev* 1997 ; 11: 2494-509.
59. Travers A. Chromatin modification by DNA tracking. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96: 13634-7.
60. Gouka RJ, Gerk C, Hooykaas PJJ, et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat Biotech* 1999 ; 17: 598-601.
61. Hohn B, Puchta H. Gene therapy in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96: 8321-3.
62. Pati S. Genetically engineering and cloning animals. Park City, Deer Valley, Utah USA, 1998.
63. Vasquez K. M. and Wilson J. H. Triplex-directed modification of gene and gene activity. *TIBS* 1998 ; 23: 4-9.
64. Chan PP, Glazer PM. Triplex DNA: fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy. *J Mol Med* 1997 ; 75: 267-82.
65. Palauqui JC, Vaucheret H. Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95: 9675-80.
66. Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 1998 ; 279: 2113.
67. Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RLS, Lucas WJ. An RNA-based information superhighway in plants. *Science* 1998 ; 279: 1486-7.
68. Wianny F, Zernicka-Goez M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2: 70-5.
69. Bach FH, Ferran C, Soares M, et al. Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and apoptosis. *Nat Med* 1997 ; 3: 944-8.

## RÉFÉRENCES

70. Blau HM, Rossi F. Tet B or not tet B: advances in tetracycline-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 797-9.

71. Forster K, Helbl V, Lederer T, Urlinger S, Wittenburg N, Hillen W. Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 708-10.

72. Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I, et al. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat Biotech* 1998; 16: 177-80.

## MS2000

## Summary

**Genetic modifications in animals and plants: methods of gene transfer and transgene expression**

Gene transfer to generate transgenic animals and plants has been performed for the first time in 1980-1982 and 1983 respectively. Transgenesis has been extended to other mammals (rat, rabbit, pig, goat, sheep and cow), to lower vertebrates (chicken, fish, xenopus) and to invertebrates (*Drosophila*, *C. elegans*). Direct gene microinjection into one-cell embryos, originally defined in mouse, is still the most frequently used method for most animal species. Gene transfer into sperms or oocytes is only marginal. The use of the animal cloning by transfer of nuclei from previously transfected cells led to the generation of transgenic sheep and goats. Gene replacement by homologous recombination has been restricted essentially to mouse until 1999. It is based on the use of embryonic stem cells (ES cells) and the generation of chimeric animals. The technique of embryo cloning allowed in 1999 the generation of sheep having a gene specifically replaced by homologous recombination. Transgenesis in plants appeared soon as relatively easy to manage, at least in some species, via the Ti vector from *Agrobacterium tumefaciens* and later by using biolistic. The expression of transgenes is often badly controlled. This is mainly the case when foreign genes are added at any site in genomes. A satisfactory expression is observed when the transgene is expressed in all the lines, according to the specificity of the promoter used and ideally as a function of copy number. These conditions are often met when the foreign gene is flanked by long genomic sequences or when it is inserted into a selected site. Vectors allow a conditional expression of transgenes which depends on exogenous inducers, such as tetracycline, having no action on the host genes. Several systems allow a transgene to interrupt specifically the expression of a cellular gene at its mRNA level or via the overexpression of a transdominant negative protein. These tools which still have to be improved favour the use of transgenesis for basic studies and for various biotechnological applications in medicine and agriculture.

## TIRÉS À PART

L.M. Houdebine.

 **Jouan**